

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΔΠΜΣ ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ

**ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ
ΑΠΟ ΤΗΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΜΕ
ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΤΗΝ ΟΦΘΑΛΜΟΛΟΓΙΑ**

ΗΛΙΑΣ ΜΗΛΙΩΝΗΣ

ΙΑΤΡΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΣΩΤΗΡΗΣ Κ. ΧΑΤΖΗΚΑΚΟΥ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017

Στον ακοίμητον οφθαλμόν και απερινόητον , τον πάσης όρωμένης και νοουμένης
κτίσεως Δημιουργό. Τον ιδόντα και σπλαχνισθέντα, τον ποιόντα τυφλούς
αναβλέποντες , τον υπέρ φίλου δακρύσαντα, τον έσχατο και Υιό της ταπείνωσης.

Στην οικογένειά μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ -ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3 - 5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ - ΣΚΟΠΟΣ.....	25
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	27
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	54
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	56

Πρόλογος

Η εργασία αυτή με τίτλο «Σχεδιασμός και ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών υλικών από την τροποποίηση αντιβιοτικών φαρμάκων με χρήση στην Οφθαλμολογία » εκπονήθηκε στο πλαίσιο του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων « Ιατρική Χημεία» κατά τα ακαδημαϊκά έτη 2014-2016 στο εργαστήριο Ανόργανης Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη του καθηγητή Ανόργανης Χημείας Σωτήρη Χατζηκακού. Από τους διδάσκοντες στο πρόγραμμα της Ιατρικής Χημείας θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές κ. Νίκο Κουρκουμέλη , κ. Αλέξανδρο Τσελέπη για την βοήθεια τους και την συμμετοχή τους στην τριμελή μου επιτροπή, τον κ. Ιωάννη Σαΐνη για την βοήθειά του και τον καθηγητή κ. Περικλή Παππά για τις συμβουλές και την ευγενική παραχώρηση σειράς ανθρώπινων αθανатоποιημένων κερατινοκυττάρων HaCat και την χρήση τους στο βιολογικό μέρος της εργασίας αυτής. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την δόκτωρ Μαρία Νοταρά από το ερευνητικό ινστιτούτο του τμήματος οφθαλμολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Κολονίας για την ευγενική δωρεά αθανатоποιημένης (μέσω αδενοϊού SV40) κυτταρικής σειράς ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων του κερατοειδούς (HCECs) , με αρχική προέλευση από την δρ. Araki-Sasaki και τα εργαστήρια RIKEN στην Tsukuba της Ιαπωνίας. Ευχαριστώ πολύ την κυρία Αλεξία Γκουρογιάννη για την βοήθειά της και τον οργανωτικό της ρόλο στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα. Κατά τους εθιμικούς κανόνες η σελίδα του προλόγου , των ευχαριστηρίων επιβάλλει ένα συγκεκριμένο τυπικό ύφος κι έναν περιορισμό για πρόσωπα ή / και θεσμούς που έχουν συμβάλει στην ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής διατριβής. Η ακαδημαϊκή πορεία όμως είναι ένα δυναμικό ταξίδι κι ένα απότοκό της η ανάγκη και η δυνατότητα να ξεφεύγει κάποιος από τον φορμαλισμό των τυπικών ευχαριστηρίων μιας διατριβής. Το δεκαοκτάμηνο

ταξίδι μου μέσω του ΔΠΜΣ Ιατρική Χημεία είχε την ευτυχή συγκυρία, κάπου στην αρχή του να με φέρει στο εργαστήριο του Σωτήρη Χατζηκακού. Ήταν μια διαδρομή αντίστοιχη αυτής του Γέιτς που ταξιδεύοντας τις θάλασσες φτάνει στην άγια πόλη του Βυζαντίου. Θέλω να ευχαριστήσω τον άνθρωπο , τον δάσκαλο και ερευνητή για την καθοδήγησή του , την εμπιστοσύνη και την βοήθειά του. Μοιραζόμενος το ίδιο πάθος για την βασική έρευνα ωφελήθηκα πολλαπλάσια δίπλα του σε θέματα μεθοδολογίας και αρχών της. Σωτήρη από ένα χρυσό κλωνί θα πούμε « για όσα περνούν και για όσα θα'ρθουν» , και στα επόμενα λοιπόν. Από τα μέλη της ομάδας του εργαστηρίου ανόργανης βιολογικής χημείας ευχαριστώ τους συνεργάτες – προπτυχιακούς, μεταπτυχιακούς – για το ευχάριστο κλίμα. Ευχαριστώ ιδιαίτερα την μεταδιδάκτορα κυρία Χριστίνα Μπαντή για την συμβολή και την βοήθειά της σε μεγάλο και βασικό μέρος των πειραμάτων, και τον διδάκτορα Βασίλη Μπαλά για την βοήθεια και την φιλία του.

Περίληψη

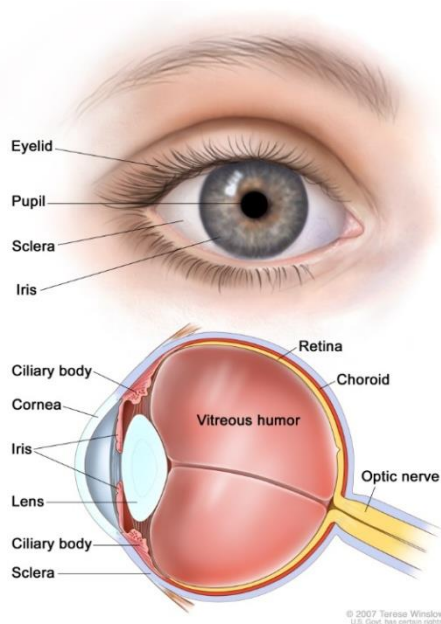
Σκοπός της μεταπτυχιακής αυτής που διατριβής, που υποβάλλεται στο πλαίσιο του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών Ιατρική Χημεία του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων , είναι η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός νέων αντιμικροβιακών συμπλόκων των αντιβιοτικών της οικογένειας των κινολονών με άργυρο για την αντιμετώπιση της μικροβιακής κερατίτιδας και άλλων οφθαλμολογικών μικροβιακών λοιμώξεων.

Abstract

The aim of this Master's thesis, submitted in the context of the Interdepartmental Masters of Science in Medical Chemistry, is the synthesis and characterization of novel metal complexes of silver and fluoroquinolones, a class of antibiotics, towards the treatment of bacterial keratitis and other ocular bacterial infections.

Εισαγωγή

Ο οφθαλμός (εικόνα 1) το αισθητήριο όργανο της όρασης , χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση. Το 90% των εξωτερικών ερεθισμάτων που δέχεται ο εγκέφαλός μας προέρχονται από το οπτικό σύστημα της όρασης και μόλις ένα 10% εξυπηρετείται από τις υπόλοιπες αισθήσεις. Η πρώτη κατά σειρά ανατομική δομή του οφθαλμού είναι ο κερατοειδής χιτώνας, καλυπτόμενος από μια ανανεούμενη στοιβάδα δακρύων (δακρυϊκό φιλμ), και εκτίθεται άμεσα στις επιδράσεις του εξωτερικού περιβάλλοντος και διάφορων μικροοργανισμών . Μια από τις συχνές και επικίνδυνες για την όραση κατηγορίες παθήσεων είναι οι μικροβιακές κερατίτιδες. Στη συνέχεια θα δούμε κάποια πράγματα για την ανατομία και λειτουργία του κερατοειδούς χιτώνα καθώς και για τις μικροβιακές κερατίτιδες.

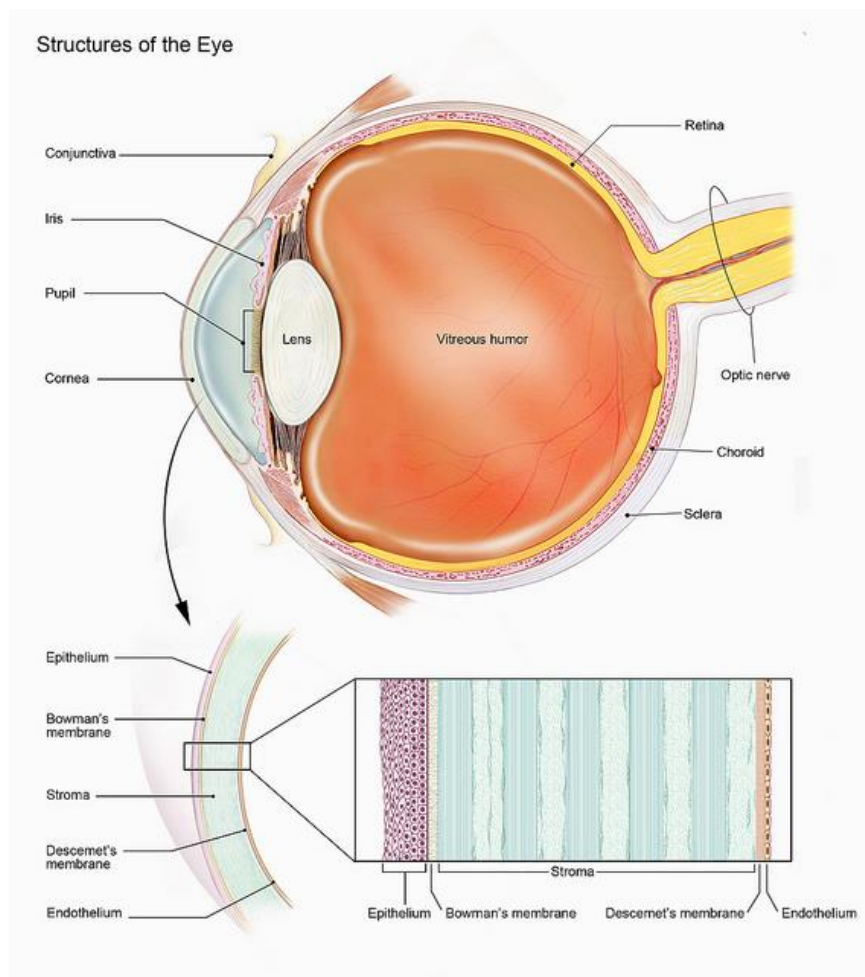


Εικόνα 1, ο οφθαλμός και η δομή του.

Κερατοειδής

Ο κερατοειδής είναι ο διαφανής εξωτερικός χιτώνας που αποτελεί το πρόσθιο ένα έκτο του οφθαλμού. Οι μέσες διαστάσεις του είναι 11-12 χιλιοστά οριζόντια και 10-11 χιλιοστά κάθετα. Κατά τον οπίσθιο άξονά του είναι κυκλικός και

κοίλος με πάχος 500 περίπου μικρόμετρα στο κέντρο του και 600-700 μικρόμετρα στην περιφέρειά του. Πέραν της αδιαφάνειάς του κύριο χαρακτηριστικό του είναι η πλήρης απουσία αγγείων, είναι ανάγγειος και μικροσκοπικά διακρίνεται σε 5 επιμέρους στρώματα όπως βλέπουμε και στην εικόνα 2.



Εικόνα 2 Τα στρώματα του κερατοειδούς χιτώνα

Μικροσκοπικά ο κερατοειδής χιτώνας αποτελείται από πέντε στρώματα τα οποία κατά σειρά από την εξωτερική του επιφάνεια προς το εσωτερικό είναι 1) το επιθήλιο 2) η μεμβράνη του Bowman 3) η θεμέλια ουσία 4) η μεμβράνη του Descemet και 5) το ενδοθήλιο.

Το κερατοειδικό επιθήλιο αποτελείται από 5 περίπου στίβους στρωματοποιημένων πλακωδών επιθηλιακών κυττάρων έχοντας πάχος 50 μικρομέτρων. Τα κύτταρα του επιφανειακού στρώματος είναι επίπεδα, εμπύρηννα, μη

κερατινοποιημένα πλακώδη κύτταρα τα οποία μετατρέπονται σε κυλινδρικά στα βαθύτερα στρώματα. Στο σκληροκερατοειδικό όριο (limbus), το κερατοειδικό επιθήλιο παχύνεται και αποτελείται από έως και δέκα ή περισσότερα στρώματα κυττάρων. Τα κύτταρα του τελικού στρώματος είναι αυτά που έχουν την ικανότητα να αναγεννούνται και να αντικαθιστούν τα κύτταρα των επιφανειακών στρωμάτων όταν αυτά πεθαίνουν.

Η μεμβράνη του Μπούμαν είναι το επόμενο στρώμα που βρίσκεται κάτω από την βασική μεμβράνη του επιθηλίου έχοντας πάχος 8 με 12 μικρόμετρα. Δεν έχει κύτταρα και αποτελείται μόνο από διαπλεκόμενα ινίδια κολλαγόνου που εξασφαλίζουν την σταθερότητα και την μηχανική αντοχή με τον τρόπο που ενσωματώνονται στην μεσοκυττάρια ουσία.

Το στρώμα ή θεμέλια ουσία, είναι η στοιβάδα με το μεγαλύτερο πάχος στον κερατοειδή (περίπου το 90% του) και αποτελείται από ελάσματα ινιδίων κολλαγόνου που διατάσσονται παράλληλα προς την επιφάνεια. Είναι κυρίως ινίδια από κολλαγόνο τύπου I, με την παρουσία μικρότερων ποσοτήτων των άλλων τύπων, καθώς και (III, V, και VI). Υπάρχουν 200 έως 250 πεπλατυσμένα ελάσματα πάχους 2 μικρομέτρων, συνδεόμενα μεταξύ τους με ινίδια.

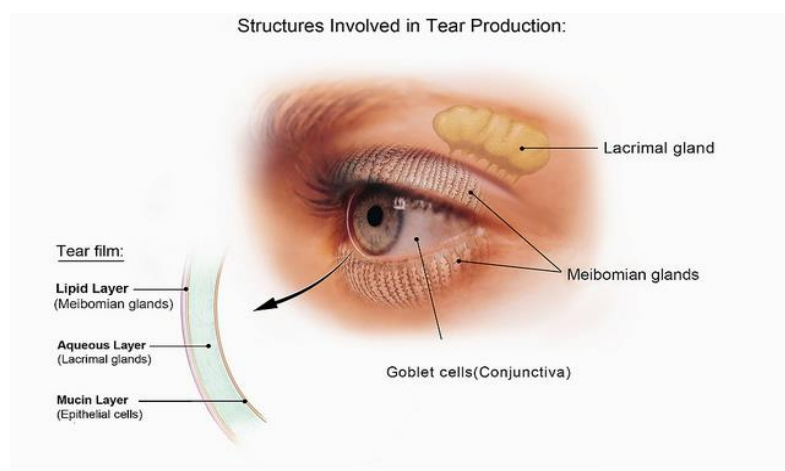
Η μεμβράνη του Descemet είναι ιδιαίτερα ανθεκτική με πάχος 10 μικρόμετρα και αποτελεί την βασική μεμβράνη του ενδοθηλίου που ακολουθεί, ενώ έχει και αυτή ινίδια κολλαγόνου τύπου IV.

Το ενδοθήλιο είναι ένα μονόστιβο στρώμα επιπεδομένων πολυγωνικών κυττάρων με μεμβράνες που συμπλέκονται μεταξύ τους. Τα κύτταρά του έχουν μεγάλο αριθμό μιτοχονδρίων και δεν διαιρούνται *in vivo*, παρά μόνο σε *in vitro* συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας. Λειτουργία του ενδοθηλίου είναι η διατήρηση της διαύγειας και διαφάνειας του κερατοειδούς κάτι που επιτυγχάνεται μέσω δύο μηχανισμών: δρώντας σαν φραγμός του υδατοειδούς υγρού και μέσω μιας αντλίας ενεργητικής μεταφοράς, ελέγχοντας έτσι την ενυδάτωση του κερατοειδούς.

Αν και ανάγγειος ο κερατοειδής είναι πολύ ευαίσθητος φέροντας περίπου 600.000 αμμύελες αισθητήριες νευρικές ίνες (από τον πρώτο ή οφθαλμικό κλάδο του τριδύμου νεύρου) έχοντας 500 μεγαλύτερη ευαισθησία στον πόνο από ότι το δέρμα. Δεν εκτίθεται άμεσα στο εξωτερικό περιβάλλον γιατί μεταξύ των δύο παρεμβάλλεται η δακρυϊκή στοιβάδα ή δακρυϊκό φιλμ, η οποία όπως θα δούμε στη συνέχεια έχει περισσότερο προστατευτικό ρόλο για τον οφθαλμό.

Δακρυϊκή στοιβάδα

Αποδίδεται σχηματικά στην εικόνα 3, έχοντας τρία στρώματα 1) ένα υπερκείμενο λεπτό ελαιώδες στρώμα με πλάτος 0,9 με 11 μικρομέτρα 2) το παχύ υδάτινο στρώμα πάχους 6,5 με 7,5 μικρομέτρων που εκκρίνεται από τους δακρυϊκούς αδένες και 3) την λεπτή βλενώδη στοιβάδα. Το αρχικό ελαιώδες στρώμα του δακρυϊκού φιλμ εμποδίζει την εξάτμιση της υδάτινης στοιβάδας η οποία και περιέχει πλήθος αμυντικών ουσιών (λυσοζύμη, ανοσοσφαιρίνες, β-λυσίνη κ.ά.). Συνολικά η δακρυϊκή στοιβάδα χρησιμεύει για την έκπλυση των διαφόρων παθογόνων και τοξικών παραγόντων αλλά και των αλλεργιογόνων από την επιφάνεια του οφθαλμού.



Εικόνα 3 η δακρυϊκή στοιβάδα

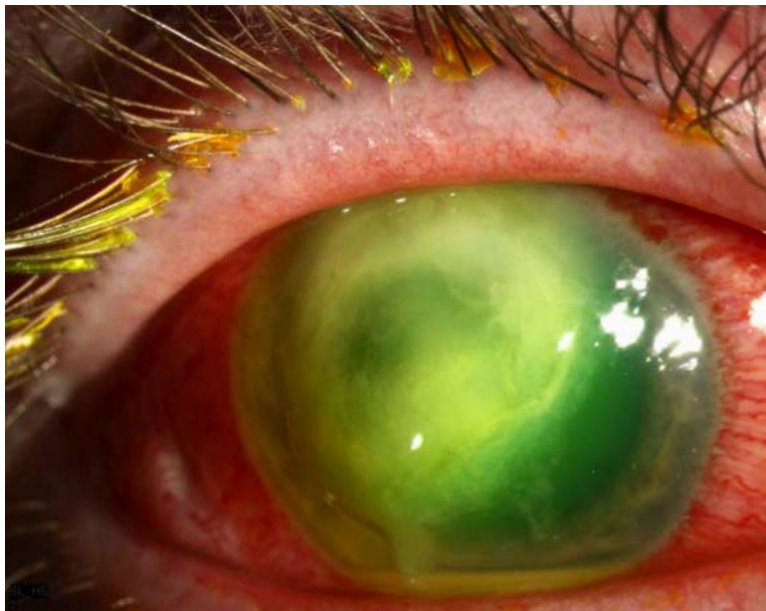
Κερατίτιδα

Ο όρος κερατίτιδα (που με βάση την συστηματική ταξινόμηση των παθήσεων ICD-10 της ΠΟΥ έχει κωδικό H16) αναφέρεται σε φλεγμονή του κερατοειδούς χιτώνα η οποία μπορεί να κατηγοριοποιηθεί με βάση την χρονική της διάρκεια σε οξεία και χρόνια και με βάση τον αιτιολογικό της παράγοντα σε 1) Ιογενή 2) Βακτηριακή 3) Μυκητιασική 4) Αμοιβαδική 5) Παρασιτική και 6) Αυτοάνοσης αρχής-αιτιολογίας. Στο πλαίσιο της έρευνάς μας για την διπλωματική αυτή διατριβή μας ενδιαφέρει η βακτηριακή ή μικροβιακή μορφή της νόσου για την οποία και θα αναφερθούμε περαιτέρω σε αίτια, μηχανισμούς, κλινική εικόνα και θεραπευτικές επιλογές.

Μικροβιακή-βακτηριακή κερατίτιδα

Η βακτηριακή κερατίτιδα εκδηλώνεται όταν διαταραχθεί η ακεραιότητα του κερατοειδικού επιθηλίου από μια σειρά λόγων (τραύμα, χρήση φακών επαφής, ανοσοκαταστολή κ.ά.) και ευνοηθεί έτσι η διείσδυση μικροβίων στο εσωτερικό του κατά τα άλλα υγιούς επιθηλίου. Είναι απειλητική για την όραση και έναν από τους κύριους παράγοντες θόλωσης του κερατοειδούς και τύφλωσης παγκοσμίως. Ενδεικτικό αυτής της σοβαρότητας είναι το γεγονός ότι ένα 8% των μεταμοσχεύσεων κερατοειδούς χιτώνα που γίνονται ετησίως στο Ηνωμένο Βασίλειο αφορούν περιπτώσεις κατατρεπτικών επιπλοκών μικροβιακής κερατίτιδας [Ocular Tissue Advisory Group to NHS BT UK], όταν κατά έτος στη χώρα αναφέρονται 8000 περιστατικά μικροβιακής κερατίτιδας. Τα τυπικά συμπτώματα και κλινικά σημεία συμπεριλαμβάνουν ερυθρότητα του οφθαλμού, ήπιο έως σοβαρό οφθαλμικό πόνο (λόγω του μεγάλου αριθμού αμμύελων νευρικών ινών στον κερατοειδή και της αυξημένης ευαισθησίας τους, όπως προαναφέραμε), φωτοφοβία, θολή όραση, οφθαλμικό έκκριμα, λευκωπές εστίες στον κερατοειδή, οίδημα του στρώματός του, σοβαρή αντίδραση του προσθίου θαλάμου με υπόπυο, οπίσθιες συνέχεις κλπ. Σε

σοβαρές περιπτώσεις μπορεί να οδηγήσει σε ελκωτικές βλάβες του επιθηλίου (διαταράσσεται ο προστατευτικός φραγμός του επιθηλίου και επιπλέκονται στην φλεγμονή και τα βαθύτερα στρώματα του κερατοειδούς). Στην εικόνα 4 από τα εκπαιδευτικά εγχειρίδια της αμερικανικής εταιρείας οφθαλμολογίας φαίνεται μια χαρακτηριστική εικόνα οφθαλμού με βακτηριακή κερατίτιδα.



Εικόνα 4 βακτηριακή κερατίτιδα από ψευδομονάδα.

Τα συνηθέστερα μικρόβια που προκαλούν μικροβιακή κερατίτιδα από συγκριτικές μελέτες μεγάλου πλήθους ασθενών σε διάφορες χώρες είναι από τα θετικά στη χρώση Gram, Gram (+), βακτήρια οι σταφυλόκοκκοι. Ο σταφυλόκοκκος ο χρυσίζων με ποσοστό από 5%-35%, με τους αρνητικούς στην Κοαγκιουλάση και κυρίως τον σταφυλόκοκκο επιδερμίδας σε 17% έως 48% και από τα αρνητικά κατά την χρώση Gram, Gram (-), μικρόβια την ψευδομονάδα την αεριογενή σε ποσοστά 10% με 25%. Προδιαθεσικοί παράγοντες για τον ανεπτυγμένο κόσμο όπως αναδεικνύεται και στον πίνακα από την μελέτη του Bourcier (1) σε δείγμα 300 ασθενών με βακτηριακή κερατίτιδα στην Γαλλία είναι κατά σειρά συχνότητας η χρήση φακών επαφής σε ένα 50% (2) η επιπλοκή κάποιας πάθησης του κερατοειδή σε ένα 20% και το τραύμα του κερατοειδή σε ένα ποσοστό 15%. Σε μικρότερη συχνότητα μπορούν να

εντοπιστούν άλλα παθογόνα, όπως στρεπτόκοκκοι, η ναισέρια , διάφορα άτυπα μυκοβακτήρια κ.ά.

Παράγοντας	Αριθμός ασθενών	Ποσοστό (%)
Χρήση φακών επαφής	151	50,3
Επιφανειακή νόσος κερατοειδούς	64	21,3
Τραύμα κερατοειδούς	45	15
Χειρουργική επέμβαση στον κερατοειδή	12	4
Άγνωστο	28	9,4

Πίνακας 1 Συχνότερα αίτια μικροβιακής κερατίτιδας στο δυτικό κόσμο.

Για τις αναπτυσσόμενες και υποανάπτυκτες χώρες τα τραύματα του κερατοειδούς και η πλημμελής υγιεινή είναι οι κυριότεροι λόγοι , σε αντιδιαστολή με την πλημμελή υγιεινή και χρήση φακών επαφής για τις ανεπτυγμένες χώρες.

Διάγνωση

Λόγω της σοβαρότητας της πάθησης, καθώς μπορεί να προκαλέσει σε διάστημα ακόμα και 24 ωρών σε κάποιες περιπτώσεις μη αναστρέψιμη βλάβη του κερατοειδή, είναι αναγκαία η έγκαιρη διάγνωση που επιτυγχάνεται με λήψη επιχρίσματος του πάσχοντος κερατοειδούς και καλλιέργειά του για εντοπισμό του/των μικροβίων που εμπλέκονται στην κερατίτιδα.

Θεραπεία

Από μελέτη των McLeod et al (2) βρέθηκε ότι σε νοσηλευόμενους ασθενείς για μικροβιακή κερατίτιδα με ελκωτική βλάβη η αρχική θεραπεία είναι ο κρισιμότερος παράγοντας, ενώ συστηνόταν και η επιθετική θεραπευτική αντιμετώπιση με ευρέως φάσματος αντιβιοτικά. Συνυπολογίζοντας τον χρόνο που απαιτείται για την εκτίμηση του μικροβιακού παράγοντα, το γεγονός ότι σε αρκετές περιπτώσεις μπορεί να είναι πολυμικροβιακής αιτιολογίας η κερατίτιδα και τον μικρό χρόνο στον οποίο μπορεί να γίνει μη αναστρέψιμη βλάβη του κερατοειδούς χιτώνα, προτιμάται από την αρχή η εμπειρική χορήγηση ισχυρής και ευρέως φάσματος αντιβίωσης. Για μικρές περιφερικές βλάβες προτιμούμε την έναρξη κάποιου θεραπευτικού σχήματος με κολλύριο κινολόνης σε μεσοδιαστήματα λίγων ωρών, ανά δύο με έξι ώρες. Όταν η περιφερική αυτή βλάβη επιπλέκεται με άλλες όπως κάποιο έλλειμα του κερατοειδικού επιθηλίου, αντίδραση άλλοτε άλλου βαθμού του προσθίου θαλάμου, μεγαλύτερα επιθηλιακά έλκη κλπ. Προτιμούμε την αύξηση της συχνότητας χορήγησης της κινολόνης ακόμα και ανά ώρα ή και την χρήση ισχυρότερων ενισχυμένων αντιβιοτικών όπως το εναλλασόμενο σχήμα ενισχυμένης τομπραμυκίνης, γενταμυκίνης ανά ώρα με βανκομυκίνη που χορηγείται κι αυτή ανά μεσοδιαστήματα μιας ώρας.

Φθοριοκινολόνες

Χαρακτηρίζονται από ένα ευρύ φάσμα δράσης τόσο κατά Gram (+) θετικών και Gram (-) αρνητικών μικροβίων και έχουν μικρή τοξικότητα για τον κερατοειδή χιτώνα (4). Ο μηχανισμός δράσης τους βασίζεται στην ικανότητά τους να αναστέλλουν τα ένζυμα της τοποϊσομεράσης II (DNAγυράση) και τοποϊσομεράση IV, ένζυμα ζωτικά για τη σύνθεση του μικροβιακού DNA. Υπάρχουν τέσσερεις γενιές ουσιών από την κατηγορία των κινολονών που χρησιμοποιούνται σαν αντιβιοτικά και οι δεύτερης γενιάς σιπροφλοξασίνη και οφλοξασίνη τυγχάνουν ευρείας χρήσης στην αντιμετώπιση

της μικροβιακής κερατίτιδας. Οι κινολόνες είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές στους Gram (-) αρνητικούς βάκιλους (συμπεριλαμβανομένης και της ψευδομονάδας (*Ps. aeruginosa*), μέτρια δραστικές έναντι του χρυσίζοντα σταφυλόκοκκου (*Staph. Aureus*) και λιγότερο δραστικές σε πνευμονιόκοκκους και στρεπτόκοκκους. Ιστορικά είναι μια επιτυχημένη κατηγορία αντιβιοτικών η δεύτερη γενιά κινολονών, όμως έχει αυξηθεί πλέον κατά πολύ η ανθεκτικότητα μικροβίων όπως ο *Staph. aureus* (5) και η *Ps. aeruginosa* (6) έναντί τους. Από τις κινολόνες τρίτης και τέταρτης γενιάς χρησιμοποιούνται για οφθαλμική χρήση στην Ευρώπη οι λεβοφλοξασίνη και μοξιφλοξασίνη αντίστοιχα, καθώς είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές. Στις ΗΠΑ προτιμάται η χρήση κινολονών όπως η βεσιφλοξασίνη και η γατιφλοξασίνη.

Αμινογλυκοσίδες

Έχουν αντίστοιχα ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα δράσης και είναι περισσότερο δραστικές έναντι των Gram (-) αρνητικών ραβδίων. Χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με αντιβιοτικά που είναι ιδραστικά έναντι των Gram (+) θετικών μικροβίων, γνωστές ενώσεις της κατηγορίας με οφθαλμολογική χρήση είναι η γενταμυκίνη και η τομπραμυκίνη με την χρήση τους να μην είναι τόσο συνηθισμένη, λόγω της αυξημένης τοξικότητάς τους στον κερατοειδή.

Κεφαλοσπορίνες

Είναι αντιβιοτικά ευρέως φάσματος δράσης που καλύπτουν αποτελεσματικά και τα διάφορα μικροβιακά είδη του αιμόφιλου (*Haemophilus infl.*). Τα μόρια των κεφαλοσπορινών περιέχουν έναν β λακταμικό δακτύλιο όπως και οι πενικιλίνες, είναι όμως περισσότερο ανθεκτικά στη δράση των πενικιλλασών. Χαρακτηριστικές ουσίες της κατηγορίας με οφθαλμολογική χρήση είναι οι δεύτερης γενιάς κεφουροξίμη και κεφταζιδίμη.

Σε περιπτώσεις μικροβιακής κερατίτιδας χρησιμοποιούνται επίσης άλλα αντιβιοτικά όπως τα γλυκοπεπτίδια τεϊκοπλανίνη και βανκομυκίνη έχουν χρησιμοποιηθεί εναντίον Gram (+) θετικών μικροβίων συμπεριλαμβανομένου του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο (methicillin and penicillin-resistant staphylococci).

ΦΑΚΟΙ ΕΠΑΦΗΣ

Οι φακοί επαφής είναι διαφανείς ιατρικές συσκευές (μαλακοί ή σκληροί) από πολυμερές υλικό που χρησιμοποιούνται για διορθωτική (διαθλαστικής ανωμαλίας) , θεραπευτική (π.χ. κερατόκωνος) ή κοσμητική χρήση. Έχουν τις διαστάσεις του κερατοειδή χιτώνα πάνω στον οποίο και τοποθετούνται και ακολουθούν την καμπυλότητά του. (εικόνα 5)



Εικόνα 5 , εφαρμογή μαλακού φακού επαφής.

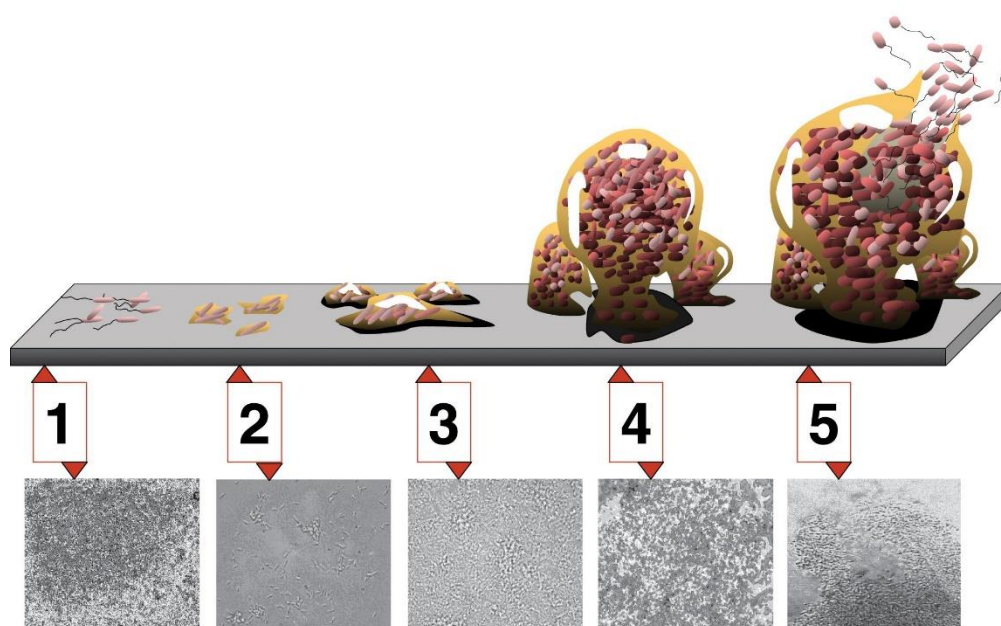
Είναι συνήθως μαλακοί ημερήσιας χρήσης ή παρατεταμένης , μηνιαίοι. Απαιτείται καλή υγιεινή και συμμόρφωση των ασθενών κατά την εφαρμογή των φακών επαφής (

7) για την αποφυγή επιπλοκών όπως η μικροβιακή κερατίτιδα (7). Ακόμη και οι ημερήσιας χρήσης φακοί (8) ή η παρατεταμένη χρήση τους κατά την διάρκεια του ύπνου (9) αυξάνουν τον κίνδυνο για κερατίτιδα (όχι μόνο μικροβιακή αλλά και χειρότερων μορφών πχ μυκητιασικής κ.ά.) (10). Από τα διαθέσιμα επιδημιολογικά δεδομένα τουλάχιστον 30.000 περιστατικά μικροβιακής κερατίτιδας αναφέρονται κατ' έτος στις ΗΠΑ (11). Η επίπτωση ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο των φακών επαφής π.χ. για τους φακούς με αυξημένη διαπερατότητα σε οξυγόνο (gas permeable) σε 1,2 ανά 10.000 οφθαλμούς για τους ημερήσιας χρήσης σε 1,9 ανά 10.000 οφθαλμούς και τους μηνιαίους σε δεκαπλάσια συχνότητα περίπου στα 20 περιστατικά ανά 10.000 οφθαλμούς (12). Συνηθέστερος μικροβιακός παράγοντας όπως προαναφέραμε είναι η αερογενής ψευδομονάδα. Με τον πλημμελή καθαρισμό των φακών επαφής , συνηθέστερα στην θήκη τους , αναπτύσσονται στην οπίσθια επιφάνειά τους βακτήρια που με την πάροδο του χρόνου σχηματίζουν βιομεμβράνες (βιοφίλμ) , οργανωμένες δομές μικροβίων αντίστοιχες ενός ιστού οργάνων. Οι βιομεμβράνες αυτές έχουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά , όπως θα δούμε στην συνέχεια που δυσχεραίνουν την αντιμετώπισή τους.

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΕΣ (BIOFILMS)

Τα βακτήρια συνήθως βρίσκονται στο περιβάλλον τους ως πλαγκτονικά (περιφερόμενα) κύτταρα. Με την προσκόλλησή τους σε κάποια επιφάνεια αλλάζει η φαινοτυπική και γονιδιακή τους έκκριση. Αρχίζουν να παράγουν αριθμό ουσιών που προσελκύει μεγάλο αριθμό μικροβιακών κυττάρων του ίδιου είδους και εκκρίνουν παράλληλα μια εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (EPS) κυρίως πολυσακχαριδικής φύσης , πλούσια σε γλυκοπρωτεΐνες. Η δημιουργία της βιομεμβράνης – βιοφίλμ (13) γίνεται σε

στάδια , πρώτη είναι α) η αρχική προσκόλληση των πρώτων βακτηριακών κυττάρων μετά β) η μη αναστρέψιμη προσκόλληση με επόμενη την γ) έναρξη της ωρίμανσης της βιομεμβράνης , δ) την ολοκλήρωση της ωρίμανσης και τελικά ε) την διασπορά βακτηρίων από το βιοφίλμ , όταν τα θρεπτικά στοιχεία στο περιβάλλον αρχίζουν να εξαντλούνται. Τα στάδια ανάπτυξης μια βιομεμβράνης αερογενούς ψευδομονάδας φαίνονται στο σχήμα που ακολουθεί , με αντίστοιχες φωτογραφίες από μικροσκόπιο. (σχήμα 2)



Σχήμα 2. Τα 5 στάδια ανάπτυξης της μικροβιακής βιομεμβράνης: 1) αρχική προσκόλληση 2) μη αναστρέψιμη προσκόλληση 3) ωρίμανση I 4) ωρίμανση II 5) διασπορά και αντίστοιχες φωτογραφίες για την αερογενής ψευδομονάδα.

Σε ένα μεγάλο ποσοστό , τουλάχιστον 80% (14) , των λοιμώξεων ενέχεται και παίζει κάποιο ρόλο η ανάπτυξη βιομεμβρανών για χρόνιες λοιμώξεις (15) ωτορινολαρυγγολογικές λοιμώξεις (16), (17) , ουροποιητικού συστήματος , περιοδοντίτιδας , σε επιφάνειες χειρουργικών και τεχνητών προθέσεων (18 – 20) , όπως

σε μικρότερο ποσοστό και σε οφθαλμικές παθήσεις και σε περιπτώσεις μικροβιακής κερατίτιδας που μας ενδιαφέρει περισσότερο.

Πρώτα πρέπει να τονιστούν 2 χαρακτηριστικά στοιχεία των βιοφίλμ. Απαιτείται πολύ μεγάλη συγκέντρωση αντιβιοτικών για να αντιμετωπιστεί μια βιομεμβράνη περίπου 10 με 1000 φορές μεγαλύτερη από αυτή που χρειάζεται για πλαγκτονικά βακτηριακά κύτταρα (21) κάτι που σχετίζεται κυρίως με την πυκνή εξωκυττάρια μήτρα πολυσακχαρίτη. Και κατά δεύτερο η βιομεμβράνη χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός μικρού αριθμού βακτηριακών κυττάρων γνωστών ως ανθεκτικά ή επιμένοντα κύτταρα (persister cells). Είναι κύτταρα ουσιαστικά εν υπνώση χαμηλής δραστηριότητας που ενεργοποιούνται όταν τα επίπεδα του αντιβιοτικού είναι χαμηλά και ξαναεπισκευάζουν την δομή της βιομεμβράνης (22). Η επικοινωνία μεταξύ των βακτηρίων τόσο στην φάση της δημιουργίας του βιοφίλμ αλλά και στην αναδόμησή του γίνεται μέσω της έκκρισης ουσιών από τα ίδια στο περιβάλλον τους για να προσελκύσουν άλλα και είναι γνωστή ως αίσθηση απαρτίας ή quorum sensing. Τον ρόλο αυτό παίζουν διάφορα χημικά μόρια.

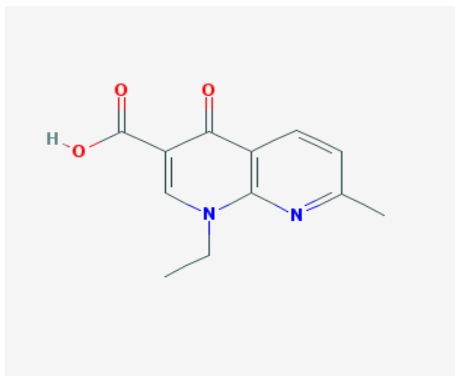
ΒΙΟΦΙΛΜ ΣΤΗΝ ΟΦΘΑΛΜΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΚΕΡΑΤΙΤΙΔΑ

Σύμφωνα με την πρόσφατη ανασκόπηση των Bispo et al. (23) τα βιοφίλμ σχετίζονται με λοιμώξεις όπως ενδοφθαλμίτιδα από τοποθέτηση ενδοφθάλμιων ενδοφακών , προθέσεων στον σκληρό ή στον επιπεφυκώτα, λοιμώξεων της δακρυϊκής συσκευής από χρήση αντίστοιχων προθέσεων κ.τ.ό . Στην περίπτωση βακτηριακής κερατίτιδας βιοφίλμ έχουν παρατηρηθεί στην οπίσθια επιφάνεια φακών επαφής - συχνότερα οφειλόμενα σε σταφυλοκόκκους και ψευδομονάδα (24) - και σε κρυσταλλική κερατοπάθεια οφειλόμενη σε στρεπτόκοκκους. Από νεότερες μελέτες (25) στελέχη αερογενούς ψευδομονάδας ασθενών με κερατίτιδα που έχουν την δυνατότητα σε in

in vitro συνθήκες να σχηματίζουν βιοφίλμ έχουν σαν αποτέλεσμα μεγαλύτερη έκπτωση όρασης από αυτά που δεν σχηματίζουν. Κατά συνέπεια οι μηχανισμοί λειτουργίας και επικοινωνίας των βακτηρίων για την δημιουργία βιομεμβρανών (σηματοδοτικά μόρια, μηχανισμός συναίσθησης απαρτίας κ.τ.ό.) αποτελούν νέους φαρμακευτικούς στόχους.

ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ – ΦΘΟΡΙΟΚΙΝΟΛΟΝΕΣ

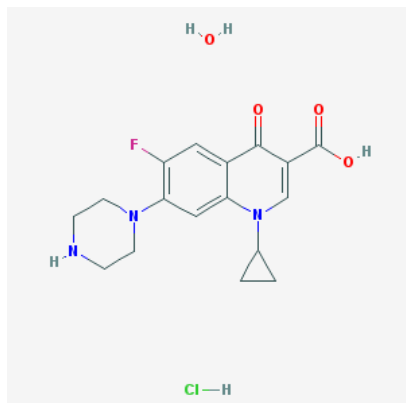
Οι κινολόνες και οι φθοριοκινολόνες είναι μια τάξη συνθετικών βακτηριοκτόνων αντιβιοτικών με ευρύ φάσμα δράσης (25). Η πρώτη κινολόνη που χρησιμοποιείται σαν φάρμακο είναι το ναλιδικό οξύ (σχήμα 3) και ανακαλύφθηκε από τον Λέσερ το 1962.



Σχήμα 3 δομή ναλιδικού οξέως, πηγή Pubchem

Όλες οι επόμενες κινολόνες που αναπτύχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στην συνέχεια σαν φάρμακα είναι φθοριομενά παράγωγα του ναλιδικού οξέως με την παρουσία ενός ατόμου φθορίου στην θέση 6, εξ ου και το όνομα φθοριοκινολόνες. Η παρουσία του φθορίου είναι πολύ σημαντική καθώς αυξάνει κατά 100 φορές την ΕΒΣΣ – MIC της κινολόνης. Ταξινομούνται σε 4 γενιές και η πλέον επιτυχημένη εμπορικά είναι η σιπροφλοξασίνη 2^{ης} γενιάς φθοριοκινολόνη που αναπτύσσεται το 1981.

Χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας ομάδας πιπεραζίνης στην θέση 7 και μια ομάδα 1-κυκλοπροπυλίου στη θέση 1 (σχήμα 4)



Σχήμα 4 , η δομή της σιπροφλοξασίνης , πηγή Pubchem

Ως προς το μηχανισμό δράσης τους στοχεύουν στις τοποϊσομεράσες IV και στην II (DNA γυράση) . Είναι ένζυμα υπεύθυνα αντίστοιχα για τον αποχωρισμό του θυγατρικού DNA και το άνοιγμα του υπερελικωμένου DNA στη φάση της αντιγραφής του, με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Έχουν ευρύ φάσμα δράσης όπως είδαμε νωρίτερα. Οι κινολόνες έχουν ιδιαίτερη αξία στην αντιμετώπιση περιπτώσεων βακτηριακής κερατίτιδας χορηγούμενες υπό τη μορφή σταγόνων (κολλύρια), είναι φθηνές αποτελεσματικές και τα περισσότερα περιστατικά είναι μέτριας βαρύτητας κλινικά. Για μικρά περιφερικά έλκη γίνεται χρήση κολλυρίου φθοριοκινολόνης κάθε 2 με 6 ώρες. Αν υπάρχει ορατό επιθηλιακό έλλειμμα στην ελκωτική βλάβη και αντίδραση προσθίου θαλάμου οι σταγόνες κινολόνης χρησιμοποιούνται κάθε ώρα. Μεγαλύτερες βλάβες απαιτούν τη χρήση ενισχυμένων , συνδυαστικών αντιβιοτικών κολλυρίων. Οι McDonald et al (26) από μια συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση τυχαιοποιημένων κλινικών δοκιμών , συμπέραναν ότι οι κινολόνες μειώνουν τον κίνδυνο οφθαλμικής δυσανεξίας και χημικής επιπεφυκίτιδας (στην περίπτωση της οφλοξασίνης) χωρίς να υστερούν στο θεραπευτικό αποτέλεσμα συγκρινόμενες με σχήματα αμινογλυκοσιδών – κεφαλοσπορίνης. Στην Κρήτη μελέτη (27) in vitro

σύγκρισης της ευαισθησίας απομονωμένων μικροβιακών στελεχών περιστατικών επιπεφυκίτιδας και κερατίτιδας βάθους δεκαετίας (για *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* και coagulase-negative staphylococci (CoNS) , έδειξε ότι λόγω του μεγάλου αριθμού Gram (+) στην περιοχή οι κινολόνες είναι ακόμη μια άριστη θεραπευτική επιλογή.

Μηχανισμοί ανάπτυξης ανθεκτικότητας στις κινολόνες

Η μεγάλη χρήση κινολονών οδηγεί μέσω μηχανισμών αύξησης της πίεσης της φυσικής επιλογής σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας των βακτηρίων τόσο για παλαιότερες κινολόνες 2^{ης} γενιάς όπως η σιπροφλοξασίνη αλλά και για νεότερες όπως η γατιφλοξασίνη και βεσιφλοξασίνη (4^{ης} γενιάς). Αυτό γίνεται κυρίως με μεταλλάξεις στις τοποϊσομεράσες οπότε γίνεται πιο ασθενής η αλληλεπίδραση του συμπλόκου κινολόνης ενζύμου, όπως με τις πρωτεΐνες Qnr ή με την ακετυλοτρανσφεράση Aac(6')-Ib-cr η οποία ακετυλιώνει το ελεύθερο άζωτο στη θέση 7 του δακτυλίου της σιπροφλοξασίνης και μειώνει την αποτελεσματικότητά της.

Υποέκφραση των πορινών (των πρωτεϊνών διαύλων στο κυτταρικό τοίχωμα του μικροβίου μέσω των οποίων διέρχονται μόρια όπως και οι κινολόνες) οδηγεί σε μείωση του αριθμού τους και μειωμένη είσοδο φαρμάκου στο κύτταρο. Αντίστροφα η υπερέκφραση διαύλων όπως οι πρωτεϊνικές αντλίες εκροής (efflux pumps) μειώνει την συγκέντρωση της κινολόνης στο εσωτερικό του βακτηριακού κυττάρου.

Χαρακτηριστικά από τα πρώτα ήδη έτη κυκλοφορίας κινολονών 2^{ης} γενιάς για οφθαλμική χρήση αυξήθηκε δραματικά σε διάστημα 4-5 ετών η ανθεκτικότητα μικροβίων όπως ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος για αυτές ακόμη και σε ποσοστό 50% (28) και αργότερα για νεότερες κινολόνες (29).

ΑΡΓΥΡΟΣ

Ο άργυρος είναι ένα ευγενές μέταλλο με ατομικό αριθμό 47 και χαρακτηριστικό λευκό χρώμα. Χρησιμοποιούνταν από την αρχαιότητα ως νόμισμα και για την κατασκευή κοσμημάτων , ήταν όμως γνωστή και η αντιβακτηριακή δράση του με την μορφή νιτρικού αργύρου. Αργυρά σκεύη όπως αναφέρει ο Ηρόδοτος χρησιμοποιούνταν για την μεταφορά νερού και τη διατήρηση τροφίμων. Ο νιτρικός άργυρος ήταν γνωστός και χρησιμοποιούνταν στη ρωμαϊκή περίοδο και στον μεσαίωνα με την ονομασία *Lapis infernalis* για τη θεραπεία φλεγμονών και ακροχορδόνων.

Τα αρνητικά ιόντα αργύρου έχουν αντιμικροβιακή δράση η οποία είναι πιο έντονη όταν έχουν την μορφή νανοσωματιδίων αργύρου. Το μικρότερο μέγεθος των νανοσωματιδίων οδηγεί στην εμφάνιση νέων χημικών, φυσικών και βιολογικών ιδιοτήτων. Γενικά όσο μικρότερο είναι το μέγεθος του σωματιδίου τόσο μεγαλύτερη είναι η αντιμικροβιακή του δράση (αυξάνεται η διαθέσιμη επιφάνεια ανά μονάδα μάζας και η απελευθέρωση ιόντων αργύρου). Τα νανοσωματίδια αργύρου είναι δραστικά για Gram (+) θετικά και Gram (-) αρνητικά βακτήρια (30), (31) μύκητες και ιούς. Αλληλεπιδρά ο άργυρος 1) με το μικροβιακό κυτταρικό τοίχωμα, 2) με τα νουκλεϊκά οξέα DNA, 3) με ένζυμα και πρωτεΐνες και 4) με το σχηματισμό ελευθέρων ριζών - reactive oxygen species (ROS).

Παραμορφώνονται τα νουκλεϊκά οξέα, οι μεμβράνες και το κυτταρικό τοίχωμα των μικροβίων με την πρόσδεση του νανοαργύρου στη δομή τους. Τον χαρακτηρίζει επίσης η ιδιότητά του να παρεκτοπίζει αναγκαία (ασβέστιο, ψευδάργυρος και χαλκός) μέταλλα από οργανικές ενώσεις. Οι διαστάσεις των νανοσωματιδίων αργύρου κυμαίνονται από τα 100nm, στα 2,500 nm για κολλοειδή διαλύματα αργύρου. Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις του αργύρου (32) προκαλούν ρωγμές στο κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου, αυξάνοντας την διαπερατότητά του οδηγώντας το στον

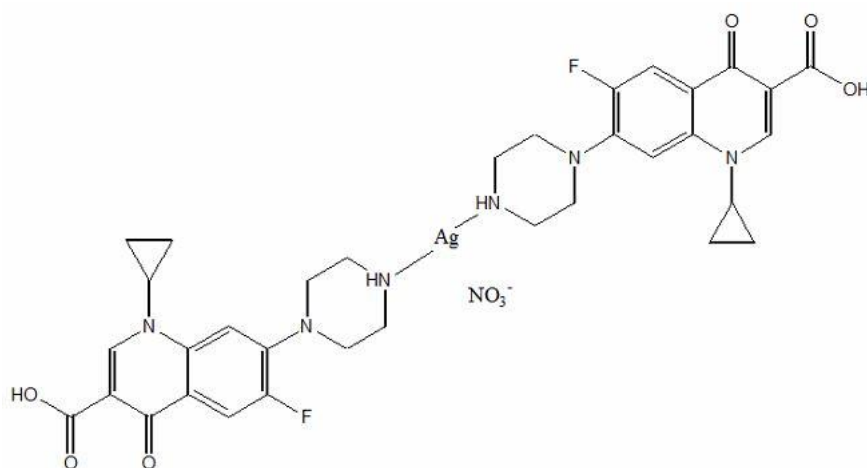
κυτταρικό θάνατο. Η πρόσληψη νανοσωματιδίων αργύρου οδηγεί σε απελευθέρωση λιποσακχαριτών και μεμβρανικών πρωτεϊνών από το κυτταρικό τοίχωμα αποσταθεροποιώντας το (33). Στο εσωτερικό του κυττάρου τα νανοσωματίδια αργύρου στην περίπτωση του *Staph. aureus* αναστέλλουν την κυτταρική αναπνοή και επηρεάζουν την έκφραση ορισμένων ενζύμων (μειώνεται η δραστικότητα της αφυδρογονάσης της αναπνευστικής αλυσίδας) (34). Π.χ. η αλληλεπίδραση των ιόντων αργύρου με τις ομάδες θειόλης στην αφυδρογονάση NADH, κάτι που οδηγεί και στην δημιουργία ελευθέρων ριζών.

Οι σημαντικότερες ελεύθερες ρίζες είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το ανιόν του υπεροξειδίου , το υδροξύλιο κ.ά. Στοχεύουν κυρίως τα λιπίδια , DNA, RNA, και τις πρωτεΐνες προκαλώντας καταστροφή των πρωτεϊνών ,των μεμβρανών και του μηχανισμού αντιγραφής του DNA. Ο συνδυασμός αντιβιοτικών με νανοσωματίδια αργύρου έχει συνεργιστική αντιβακτηριακή δράση , για Gram (+) και Gram (-) βακτήρια σε σχέση με απλή χορήγηση αντιβιοτικών στις ίδιες συγκεντρώσεις. (35). Σε άλλη μελέτη παρατηρήθηκε π.χ. 3πλάσια αύξηση δραστικότητας της πενικιλλίνης στον *Streptococcus mutans*, και της βανκομυκίνης 3,8 φορές στο *Enterobacter aerogenes*. Αναπτύσσεται όμως μικροβιακή ανθεκτικότητα και για τα νανοσωματίδια αργύρου είτε με την συσσώρευση και αποθήκευσή του στο μικροβιακό κύτταρο είτε με την λειτουργία πρωτεϊνικών διαύλων εκροής αργύρου στο κυτταρικό τοίχωμα.

ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η σύνθεση νέων μεταλλικών συμπλόκων αργύρου και κινολονών για την θεραπεία της μικροβιακής κερατίτιδας. Από την βιβλιογραφία αναδεικνύεται μια αυξανόμενη ανθεκτικότητα μικροβιακών στελεχών που προκαλούν κερατίτιδα έναντι κινολονών (ιδιαίτερα πρώτης και δεύτερης γενιάς) , που περιορίζει (π.χ. η σιπροφλοξασίνη είναι αποτελεσματική σε περίπτωση ψευδομοναδικής κερατίτιδας μόνο) τη θεραπευτική τους χρήση. Ο άργυρος είναι γνωστός για τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες , την ικανότητά του να προκαλεί λόγω του ηλεκτρικού του φορτίου ρωγμές στο κυτταρικό τοίχωμα των μικροβίων, να δρα συνεργιστικά χορηγούμενος σε ελεύθερα μίγματα με αντιβιοτικές ουσίες με ελάχιστη βακτηριοστατική συγκέντρωση κατά πολύ μικρότερη από αυτή των αντιβιοτικών. Μεταλλικά σύμπλοκα κινολονών έχουν επίσης βρεθεί να είναι αποτελεσματικότερα έναντι ανθεκτικών μικροβιακών στελεχών και με μικρότερη MIC.

Σε μια εκτενή ανασκόπηση (36) γίνεται ταξινόμηση περισσότερων από 60 μεταλλικών συμπλόκων κινολονών (με διάφορα μέταλλα). Κάποια από αυτά τα μεταλλικά σύμπλοκα κινολονών έχουν σημαντική αύξηση της αντιμικροβιακής τους δραστηριότητας σε σχέση με την απλή κινολόνη , ενώ εμφανίζουν αντιμυκητιασική, αντιϊκή και αντικαρκινική δράση. Με δεδομένη την συνεργιστική δράση των νανοσωματιδίων αργύρου σε συγχορήγησή τους με αντιβιοτικά και την απουσία βιβλιογραφικά κάποιου συμπλόκου σιπροφλοξασίνης αργύρου προσπαθήσαμε να συνθέσουμε το σύμπλοκο αργύρου και σιπροφλοξασίνης (CIPAG) και να μελετήσουμε το μηχανισμό δράσης του κι αν έχει αυξημένη αποτελεσματικότητα συγκρινόμενο με τον υποκαταστάτη του.



Σχήμα 5 Η δομή του συμπλόκου CIPAG.

Αξιολογήθηκε η αντιμικροβιακή δράση του συμπλόκου CIPAG έναντι μικροβίων που αποτελούν τα συνηθέστερα στελέχη που εμπλέκονται στη μικροβιακή κερατίτιδα, μελετήθηκε η *in vivo in vitro* γενοτοξικότητά του και η κυτταροτοξικότητά του.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

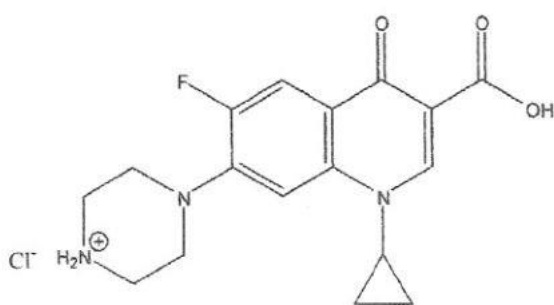
Για την συνθετική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια και διαλύτες υψηλής καθαρότητας και ποιότητας από την εταιρεία Sigma . Η σιπροφλοξασίνη ήταν δωρεά της φαρμακευτικής εταιρείας HELP. Για τον προσδιορισμό των φυσικών ιδιοτήτων (σημείο τήξης , διαλυτότητα) του CIPAG και για τον υπολογισμό του φάσματος υπερύθρου (IR) και $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα όργανα. Στη μελέτη αξιολόγησης της αντιμικροβιακής δράσης χρησιμοποιήθηκαν τα Gram (+) θετικά μικρόβια : *Staphylococcus Aureus* (ATCC 43300) , *Staphylococcus Epidermidis* (ATCC 14990) και από Gram (-) αρνητικά μικρόβια η *Pseudomonas Aeruginosa* (ATCC 27853) με ουσία σύγκρισης τον υποκαταστάτη,την υδροχλωριομένη σιπροφλοξασίνη που παραχωρήθηκε από την HELP. Η μελέτη της κυτταροτοξικότητας του συμπλόκου έγινε σε αθανατοποιημένες (μέσω αδενοϊού SV40) κυτταρικές σειρές ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων του κερατοειδούς (HCECs ,της δρ. Araki-Sasaki από τα εργαστήρια RIKEN στην Tsukuba της Ιαπωνίας, ευγενική δωρεά της δόκτωρος Μαρίας Νοταρά του τμήματος οφθαλμολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Κολονίας) και κερατινοκυττάρων δέρματος Hacat (ευγενική δωρεά του κ. Περικλή Παππά αναπληρωτή καθηγητή Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων).

ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

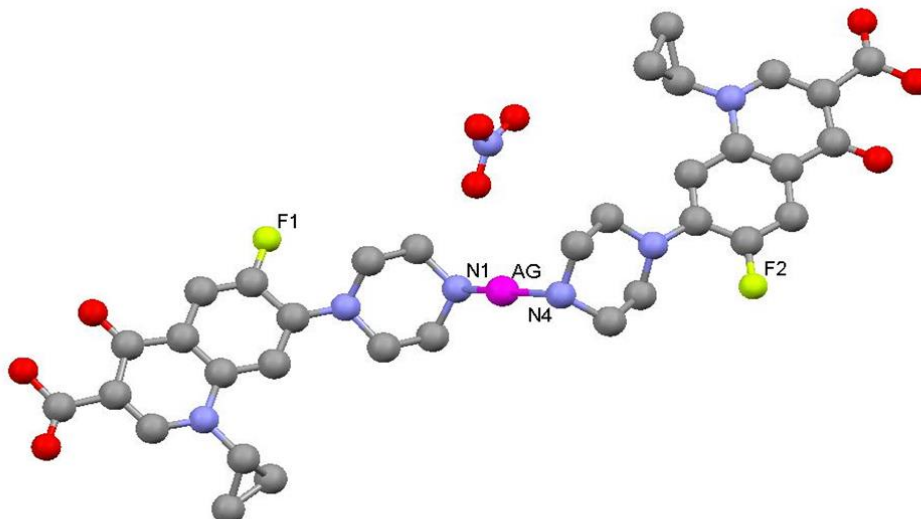
ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ CIPAG

Για την σύνθεση του συμπλόκου αρχικά υδροχλωρικό άλας της κινολόνης σιπροφλοξασίνης (σχήμα 1) εξουδετερώνεται με καυστικό κάλιο. Συγκεκριμένα 0,05 mmole άλατος υδροχλωρικής σιπροφλοξασίνης διαλύεται σε 5ml νερού και εξουδετερώνεται στη συνέχεια με την προσθήκη 500μl διαλύματος υδροξειδίου του καλίου συγκέντρωσης 1M. Το προϊόν που παραλαμβάνεται στη συνέχεια ξηραίνεται και το λευκό στερεό κατάλοιπο αντιδρά με νιτρικό άργυρο σε αναλογία 1:2 (μέταλλο:φάρμακο) , με χρήση 0,5 χιλιοστογραμμομοριακού ισοδυνάμου (mmol) νιτρικού αργύρου προς 1 χιλιοστογραμμομοριακό ισοδύναμο (mmol) υδροχλωρικής σιπροφλοξασίνης.

Το τελικό προϊόν δίνει υπερκαθαρούς υποκίτρινους κρυστάλλους οι οποίοι είναι κατάλληλοι για ανάλυση με περίθλαση ακτίνων-X που παραλαμβάνονται με ανακρυστάλλωση σε σύστημα διαλυτών μεθανόλη:ακετονιτρίλιο 1:1. Στο τελικό ανακρυσταλλωμένο προϊόν είναι συν-κρυσταλλωμένα ένα μόριο νερού και δύο μόρια μεθανόλης (σχήμα 2). Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με απαιτούμενο χρόνο 24 ώρες για την ξήρανση της υδροχλωρικής σιπροφλοξασίνης και την απομάκρυνση του υδροχλωρίου , με επιπλέον απαιτούμενο χρόνο τις 48-72 ώρες για την δημιουργία των καθαρών κρυστάλλων του τελικού προϊόντος.



Υδροχλωρική σιπροφλοξασίνη (1)



Το προϊόν της αντίδρασης, CIPAG (2)

Οι φυσικές ιδιότητες του προϊόντος είναι :

Εμφάνιση: υποκίτρινοι κρύσταλλοι ,

MB: 882 , 962 ,

Σημείο τήξης : 166-170 C ,

Διαλυτότητα: Δυσδιάλυτη στο νερό , υψηλή διαλυτότητα στο διμεθυλοσουλφοξείδιο και το χλωροφόρμιο.

Φασματοσκοπική εξέταση υπερύθρου (IR) : 1731 (s), 1633 (s), 1470 (s), 1453 (s), 1385 (s), 1339 (s), 1297 (w), 1263 (s), 1187 (w), 1145 (w), 1124 (w), 1105 (w), 1028 (s), 942 (s), 892 (s), 864 (w), 831 (s), 806 (s), 780 (s), 746 (s), 713 (w), 626 (w), 438 (w), 417 (s), 390 (s)

Φασματοσκοπική εξέταση πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (1 H- NMR) : 8.607 (s, H2), 7.86-7.809 (d, HS), 7.495-7.467 (d, HS), 5.72 (s), 4.091 (s, MeOH), 3.760

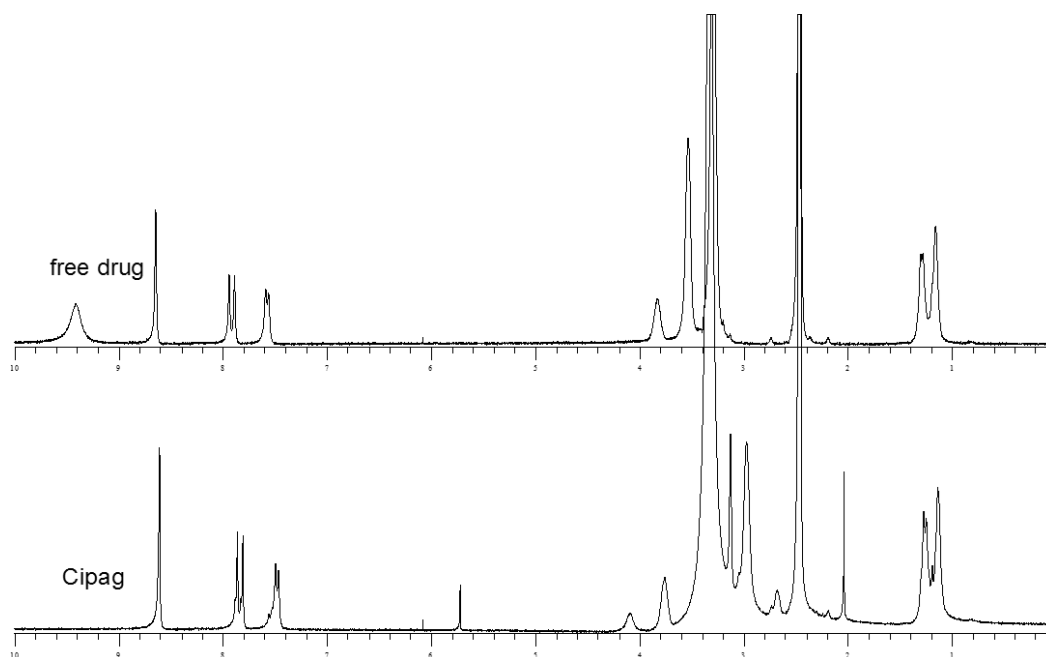
(s, 25 piperazine Ha), 3.13 (s MeOH), 2.961 (s), 2.033 (s, MeCN), 1.273 (m, cyclopropyl

CH₂), 1.139 (m, cyclopropyl CH₂).

Οι αποστάσεις των ατόμων στην κρυσταλλική δομή είναι Ag-N 1 = 2.152(6), Ag-N4 = 2.172(6), F1-ClO = 1.361(8), F2-C23 = 1.368(8), O4-C28 = 1.265(8), O1-ClI = 1.272(8), O5-C31 = 1.322(9), O6-C31 = 1.210(10), O2-C13 = 1.211(9), O3-C13 = 1.335(8) Å.

Οι γωνίες γύρω από το μέταλλο του αργύρου στην κρυσταλλική δομή είναι:

N1-Ag-N4 = 169.47(19), Ag-NI-C1 = 117.4(5), Ag-N1-C4 = 115.8(5), Ag-N4-C18 = 113.1(5), Ag-N4-C19 = 113.9(4), Ag-N1-H1N = 100.00, Ag-N4-H4N = 97(5).



Σχήμα 6

ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1) ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ

Για την μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης του συμπλόκου CIPAG υπολογίστηκαν αρχικά οι ελάχιστες μικροβιοστατικές (MIC) και μικροβιοκτόνες (MBC) συγκεντρώσεις του έναντι τριών μικροβιακών στελεχών , αξιολογήθηκε η ζώνη αναστολής του από ειδικό απορροφητικό χαρτί αντιβιογράμματος και υδρογέλη σύστασης ίδιας με φακούς επαφής.

1α) Υπολογισμός MIC - ΕΒΣ (ελάχιστης βακτηριοστατικής συγκέντρωσης)

Η ανάπτυξη των βακτηρίων ακολουθεί μια γεωμετρική πρόοδο με τον αρχικό αριθμό μικροοργανισμών να διπλασιάζεται κάθε 20 λεπτά μέχρι να φθάσει η αύξηση αυτή ένα πλατώ το οποίο αντιστοιχεί στην εξάντληση των διαθέσιμων θρεπτικών υλικών για ανάπτυξη. Όταν θέλουμε να αξιολογήσουμε την αντιμικροβιακή δραστηριότητα μιας ουσίας μια αρχική παράμετρος που χρησιμοποιούμε είναι η ελάχιστη βακτηριοστατική συγκέντρωση (ΕΒΣΣ) ή MIC (Minimum Inhibitory Concentration) , η οποία είναι η ελάχιστη συγκέντρωση της ουσίας που εμποδίζει την ορατή αύξηση του βακτηρίου. Για τον υπολογισμό της ελάχιστης βακτηριοστατικής συγκέντρωσης του συμπλόκου CIPAG και του υποκαταστάτη αυτού (σιπροφλοξασίνη) έναντι των προτύπων αερόβιων μικροβίων Staph. Epidermidis , Staph. Aureus και Pseudomonas Aeruginosa 01 (PA01) χρησιμοποιήθηκαν τα πρωτόκολλα των Wiegand et al (37) , CLSI 2015 (38) και ISO 20776-1:2006 (39) με μικρές παραλλαγές.

Συγκεκριμένα πρότυπα μικροβιακά στελέχη των Staphylococcus Aureus , Staphylococcus Epidermidis και Pseudomonas Aeruginosa 01 ανακτήθηκαν από καταψύκτη θερμοκρασίας -80 βαθμών Κελσίου και τοποθετήθηκαν σε αντίστοιχους

σωλήνες μικροφυγοκέντρωσης (Falcon) όπου καθένας περιείχε ποσότητα 3 χιλιοστόλιτρων (ml) του αντίστοιχου θρεπτικού υγρής καλλιέργειας που αναφέρουμε στην κατηγορία των υλικών. Αυτοί στη συνέχεια αφέθηκαν υπό ανάδευση 100 στροφών ανά λεπτό (100rpm) σε επωαστή θερμοκρασίας 37 βαθμών της κλίμακας Κελσίου για 24 ώρες. Την επόμενη μέρα από τις καλλιέργειες αυτές του εικοσιτετραώρου μικρές ποσότητες 10 μικρολίτρων με χρήση μικροβιολογικού κρίκου αποστειρωμένου υπό φλόγα μεταφέρονται με την τεχνική του ραβδίσματος σε πλαστικά τρυβλία που περιέχουν το αντίστοιχο θρεπτικό μέσο για τον κάθε μικροοργανισμό με την προσθήκη άγαρος, τα οποία με τη σειρά τους επωάζουμε σε θερμοκρασία 37 βαθμών Κελσίου για 24 ώρες.

Σκοπός είναι μετά τον χρόνο αυτό η ανάπτυξη ομοιόμορφων μεταξύ τους αποικιών μικροβίων στα τρυβλία αυτά. Ακολουθώντας χρησιμοποιώντας στοιχεία από την βάση δεδομένων, (με τις τιμές αναφοράς ΕΒΣΣ – MIC πρότυπων αντιβιοτικών ουσιών έναντι προτύπων μικροβιακών στελεχών), (40) της ευρωπαϊκής επιτροπής ελέγχου αντιμικροβιακής ευαισθησίας (EUCAST) σχετικά με τις επιλέχθηκε ένα εύρος αρχικών λογαριθμικών συγκεντρώσεων τόσο για το σύμπλοκο όσο και τον απλό υποκαταστάτη , για τον περιορισμό του εύρους συγκεντρώσεων για κάθε μικρόβιο , και στην συνέχεια ακολούθησε ο υπολογισμός της ΕΒΣΣ (MIC). Τα αρχικά διαλύματα των ουσιών μας είχαν ως διαλύτες το CIPAG το διμεθυλοσουλφοξείδιο και η υδροχλωριωμένη σιπροφλοξασίνη το νερό αντίστοιχα λόγω της καλύτερης διαλυτότητάς τους σε αυτά, σε συγκέντρωση 10-3M. Στη συνέχεια σε αποστειρωμένους σωλήνες μικροφυγοκέντρωσης του 1,5ml Eppendorf και με διαλύτη το αντίστοιχο θρεπτικό για κάθε μικρόβιο σχηματίσαμε διαλύματα με συγκέντρωση των ουσιών διπλάσια από αυτή που επιθυμούσαμε.

Τα αρχικά διαλύματα των ουσιών μας ξεκινούν από συγκεντρώσεις 10-5M οπότε και η αντίστοιχη ποσότητα DMSO είναι αμελητέα για να επηρεάσει την μικροβιακή

ανάπτυξη. Ο τελικός όγκος του δεν ξεπερνά το 1 μικρόλιτρο σε κάθε τελικό διάλυμα. Στη συνέχεια χρησιμοποιούμε μικροπλακέτα 96 βοθρίων (με 8 στήλες των 12 βοθρίων έκαστη). Στις πρώτες 10 θέσεις κατά σειρά αυξανόμενης συγκέντρωσης τοποθετούμε 50 μικρόλιτρα από καθένα από τα διαλύματα των ουσιών μας διπλάσιας αρχικής συγκέντρωσης από αυτή που επιθυμούμε. Στην ενδέκατη στήλη τοποθετείται ο θετικός μάρτυρας και στην δωδέκατη αντίστοιχα ο αρνητικός , σκέτο θεραπευτικό υγρής καλλιέργειας όγκου 100 μικρολίτρων. Το βέλτιστο είναι η παρασκευή των διαλυμάτων και η τοποθέτησή τους στην μικροπλακέτα να μην υπερβαίνει χρονικά τα 45 λεπτά της ώρας για κάθε μικρόβιο (αν χρησιμοποιούμε διαφορετικά υγρά θεραπευτικά μέσα) ή για κάθε ουσία (αν οι συγκεντρώσεις της ουσίας ή και οι επαναλήψεις της υπερβαίνουν την μια σειρά βοθρίων).

Για την ίδια συγκέντρωση της ουσίας μας (είτε σύμπλοκο , είτε υποκαταστάτης) χρησιμοποιήσαμε δύο επαναλήψεις στο ίδιο πείραμα. Στη συνέχεια και με βάση τα αντίστοιχα πρωτόκολλα (31, 32 ,33) πρέπει ο αριθμός των μικροβίων με τον οποίο εμβολιάζουμε τα βοθρία να είναι σταθερός , συγκεκριμένα της τάξης των 5×10^5 CFU/ml. Στη σύντμηση CFU αντιστοιχεί ο όρος Colony Forming Unit (μονάδα σχηματισμού αποικίας) και πρακτικά κάθε μικροβιακό κύτταρο είναι μια CFU καθώς θεωρητικά έχει τη δυνατότητα να σχηματίσει μια αποικία. Για να υπολογίσουμε με ακρίβεια τον επιθυμητό αριθμό βασιζόμαστε στην έννοια του προτύπου διαλύματος McFarland 0,5.

Σε έναν αποστειρωμένο γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετούμε αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό (0,9%) . Για κάθε είδος μικροβίου ξεχωριστά, παίρνουμε από το τρυβλίο των 24 ωρών επώασης. Από το αντίστοιχο τρυβλίο για κάθε μικρόβιο που παίρνουμε 3 με 5 ομοιόμορφες αποικίες με τον μικροβιολογικό κρίκο και τις διαλύουμε στον φυσιολογικό ορό. Μετά ακολουθεί η ανάδευση σε συσκευή βόρτεξ έτσι ώστε να δημιουργηθεί ένα ομοιόμορφο διάλυμα. Τον φυσιολογικό ορό τον χαρακτηρίζει η

ισοωσμοτικότητα με τις κυτταρικές μεμβράνες των μικροβίων , γεγονός που μας εξασφαλίζει το ότι αυτά θα παραμείνουν ζωντανά. Με βάση το πρότυπο διάλυμα McFarland 0,5 και το πρωτόκολλο (37) αναμένουμε στα 625 νανόμετρα φωτομετρούμενο το ομοιογενές διάλυμα μικροβίων – φυσιολογικού ορού να δώσει μια απορρόφηση στο εύρος 0,08-0,013 που ξέρουμε ότι θα αντιστοιχεί σε έναν αριθμό μεταξύ $1 - 2 \times 10^8$ CFU/ml.

Με βάση τον νόμο των αραιώσεων ($V_1C_1=V_2C_2$) και σε διαλύτη το αντίστοιχο θρεπτικό υγρής καλλιέργειας κάθε μικροβίου δημιουργούμε ένα διάλυμα μικροβίων με συγκέντρωση διπλάσια από αυτή των 5×10^5 CFU/ml δηλαδή 10^6 CFU/ml. Στη συνέχεια προσθέτουμε 50 μικρόλιτρα από το διάλυμα αυτό σε καθένα από τα αντίστοιχα βοθρία της μικροπλακέτας (τα πρώτα 10 της σειράς που περιέχουν τα διαλύματα των ουσιών και το ενδέκατο του θετικού μάρτυρα), με αποτέλεσμα ο τελικός αριθμός τους να γίνεται πάλι 5×10^5 CFU/ml. Η προετοιμασία και η χρήση του μικροβιακού διαλύματος εμβολιασμού πρέπει να γίνεται σε 15 λεπτά αντίστοιχα, καθώς ο χρόνος διπλασιασμού των μικροβίων είναι 20 λεπτά κι αν τον υπερβούμε αλλάζει ο αριθμός τους με αποτέλεσμα την υποεκτίμηση της δραστηριότητας της ουσίας μας.

Αφού τελειώσει η τοποθέτηση και του μικροβιακού διαλύματος στην μικροπλακέτα 96 βοθρίων, λαβάνουμε 10 μικρόλιτρα διαλύματος από ένα πηγαδάκι θετικού μάρτυρα το οποίο στη συνέχεια αραιώνουμε διαδοχικά 1000 φορές (10 μικρόλιτρα σε 990 μικρόλιτρα θρεπτικού υγρής και 100 μικρόλιτρα αυτού σε 900 μικρόλιτρα θρεπτικού υγρής) ώστε το τελικό μας διάλυμα να έχει περίπου 500 CFU/ml. Από το τελικό αυτό διάλυμα στρώνουμε 100 μικρόλιτρα σε 2 τρυβλία και τα απλώνουμε ομοιόμορφα σε όλη την επιφάνειά τους με το κατάλληλο αποστειρωμένο γυάλινο τρίγωνο και τα βάζουμε προς επώαση. Αναμένουμε να βρούμε στο 24ώρο περίπου 50 αποικίες ανά τρυβλίο ή έναν αριθμό στην ίδια τάξη μεγέθους (ένα λάθος είναι πιθανό στην αραιώση

ή στο τελικό στρώσιμο) , προς επαλήθευση του σωστού αριθμού μικροβίων. Στην συνέχεια η μικροπλακέτα μας μπαίνει στον επωαστή σε θερμοκρασία 35 ± 2 βαθμών της κλίμακας κελσίου και επωάζεται για 16 -20 ώρες.

Την επόμενη ημέρα σε ειδική συσκευή (ELISA Reader) μετρούμε στα 630nm τις απορροφήσεις των βοθρίων σε κάθε σειρά. Κάθε σειρά φέρει στα αρχικά 10 βοθρία την ουσία κατά αυξανόμενη συγκέντρωση , στην ενδέκατη σειρά έχουμε τον θετικό μάρτυρα (μικροβιακή καλλιέργεια) και στην δωδέκατη τον αρνητικό (σκέτο θρεπτικό υγρής). Θεωρητικά η MIC προσδιορίζεται ως η πρώτη συγκέντρωση η οποία είναι διαυγής, πρακτικά από τις κατάλληλες μετρήσεις , που επαναλαμβάνονται τρεις φορές, με κατάλληλη στατιστική επεξεργασία προσδιορίζεται ο μέσος όρος που αποτελεί και την τιμή της MIC.

Για την μέτρηση της MIC του συμπλόκου μας (CIPAG) και του απλού υποκαταστάτη του (σιπροφλοξασίνη) για τα 3 συνηθέστερα μικρόβια σε περίπτωση μικροβιακής κερατίτιδας (staph. aureus, staph. epidermidis και PA01) προέκυψαν δεδομένα που από την αντίστοιχη επεξεργασία είχαμε τα εξής αποτελέσματα (πίνακας 2)

Βακτήρια	CipAg ($\mu\text{g/ml}$)	CipAg (nM)	Ciprofloxacin ($\mu\text{g/ml}$)	Ciprofloxacin (nM)
Staph. Au.	0,48	550	0,50	1.360
Staph. Ep.	0,12	135	0,25	680
PA01	0,13	150	0,13	340

Πίνακας 2 . Οι τιμές ΕΒΣΣ - MIC του συμπλόκου CIPAG και του υποκαταστάτη του (υδροχλωρική σιπροφλοξασίνη) για τα 3 πρότυπα μικροβιακά στελέχη.

Συμπερασματικά από τα δεδομένα των πειραμάτων βλέπουμε το σύμπλοκο CIPAG να είναι το ίδιο δραστικό με την υδροχλωρική σιπροφλοξασίνη έναντι του χρυσίζοντα σταφυλόκοκκου (ΕΒΣΣ 0,48 $\mu\text{g/ml}$ έναντι 0,50 $\mu\text{g/ml}$) και της αερογενούς ψευδομονάδας PA01 (ΕΒΣΣ 0,13 $\mu\text{g/ml}$ και τα δύο) ενώ να είναι σημαντικά αποτελεσματικότερο για τον σταφυλόκοκκο επιδερμίδας (ΕΒΣΣ 0,12 $\mu\text{g/ml}$ και 0,25 $\mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα).

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ MBC.

Οι κινολόνες όπως προαναφέραμε στην εισαγωγή είναι βακτηριοκτόνα αντιβιοτικά, που δρουν στοχεύοντας στα βακτηριακά ένζυμα της γυράσης του DNA. Κατά συνέπεια μελετώντας την δραστικότητα του συμπλόκου CIPAG και του υποκαταστάτη του πρέπει να αξιολογήσουμε και την βακτηριοκτόνο δράση τους. Αυτό γίνεται με την μέτρηση της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (EBKT) ή MBC (Minimum Bactericidal Concentration).

Η ΕΒΚΣ - MBC μιας ουσίας ορίζεται ως η ελάχιστη βακτηριοστατική συγκέντρωση αυτής και πρακτικά είναι η συγκέντρωση που οδηγεί στο θάνατο του 99,9% των μικροβιακών κυττάρων. Για τον υπολογισμό της ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία. Μετά τον τελικό υπολογισμό της ΕΒΣΣ – MIC (ελάχιστης βακτηριοστατικής συγκέντρωσης) του συμπλόκου CIPAG και του υποκαταστάτη του επαναλήφθηκε η διαδικασία υπολογισμού της MIC και για τα τρία μικρόβια σε συγκεντρώσεις ακέραια πολλαπλάσια της αντίστοιχης MIC σε μικροπλακέτα 96 βοθρίων. Ακολούθησε επώαση για 16-20 ώρες και στη συνέχεια την επόμενη μέρα όγκος 10 μικρολίτρων από την κάθε συγκέντρωση (από την τιμή της MIC και πάνω) τοποθετήθηκε σχεδόν εξ επαφής σε

τρυβλίο του αντίστοιχου θρεπτικού μέσου σε άγαρ για το κάθε μικρόβιο, με μια αντίστοιχη επανάληψή του .

Τα τρυβλία επωάζονται επί 24ωρου και στη συνέχεια μετράται ο αριθμός των αποικιών ανά δείγμα των 10 μικρολίτρων. Με βάση τους προηγούμενους υπολογισμούς ξέρουμε ότι ανά χιλιοστόλιτρο θρεπτικού υγρής σε κάθε βοθρίο της μικροπλακέτας περιέχονται 500.000 CFU . Και κατά συνέπεια με βάση την απλή σχέση αναλογίας στα 100 μικρόλιτρα περιέχονται 50.000 CFU και στα 10 μικρόλιτρα που εμβολιάζουμε στο τρυβλίο για τον υπολογισμό της MBC 5000 CFU. Με βάση τον ορισμό της MBC αναμένουμε στο 24ωρο να επιβιώνει μόλις το 0,1% των μικροβίων, οπότε η MBC για το κάθε μικρόβιο θα είναι η συγκέντρωση η οποία (και η επανάληψή της) θα εμφανίζει στο τρυβλίο αριθμό αποικιών μικρότερο από 5 , <5CFU. Για τα 3 μικρόβια και την ουσία μας (CIPAG) από τις αντίστοιχες μετρήσεις , όπως φαίνεται και από την αντίστοιχη φωτογραφική λήψη (εικόνα 6) οι τιμές της MBC υπολογίστηκαν όπως δείχνει και ο παρακάτω πίνακας (Πίνακας 3)



Εικόνα 6 , υπολογισμός της MBC – ΕΒΚΣ του CIPAG

MBC CIPAG	Staph. Au.	Staph. Ep.	PA01
MBC	1100nM (2xMIC)	135nM (1xMIC)	150nM (1xMIC)

Πίνακας 3 υπολογισμός της MBC του CIPAG.

Σιπροφλοξασίνη MBC	Staph. Au.	Staph. Ep.	PA01
MBC	5.440nM (4xMIC)	680nM (1xMIC)	2720nM (8xMIC)

Πίνακας 4 η MBC της σιπροφλοξασίνης.

Το σημαντικό συμπέρασμα από τον υπολογισμό της EBKΣ – MBC για τις δύο ουσίες είναι ότι και για τα τρία μικρόβια η EBKΣ – MBC του CIPAG είναι κατά πολύ χαμηλότερη από αυτή της υδροχλωρικής σιπροφλοξασίνης κατά απόλυτες τιμές συγκρινόμενες μεταξύ τους αλλά και σαν πολλαπλάσιο της MIC της. Είναι αποτελεσματικότερο βακτηριοκτόνο το CIPAG από την σιπροφλοξασίνη , και για να εκδηλωθεί η βακτηριοκτόνος αυτή δράση του απαιτείται συγκέντρωσή του ίση με την EBΣΣ – MIC του τις περισσότερες φορές ενώ για την σιπροφλοξασίνη τετραπλάσια ή οκταπλάσια της EBΣΣ – MIC της.

ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ ΦΑΚΩΝ ΕΠΑΦΗΣ PHEMA ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΖΩΝΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ CIPAG

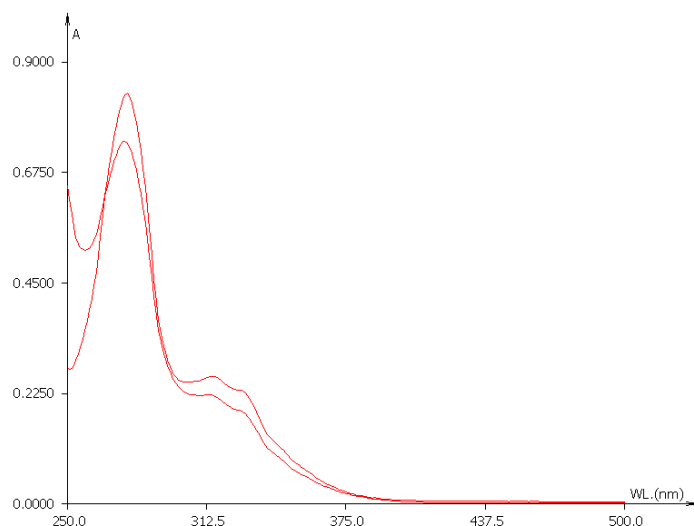
Από το 1961 ο Τσέχος χημικός Otto Wichterle κατοχύρωσε και κυκλοφόρησε τους πρώτους φακούς επαφής βασιζόμενους στο πολυμερές pHEMA (Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) – Πολυ υδροξυ αιθυλομεθακρυλικό οξύ. Πρόκειται για μια υδρογέλη , ένα υλικό που μπορεί να απορροφά και να συγκρατεί πολλαπλάσιο όγκο νερού από το βάρος του. Ένα χαρακτηριστικό των φακών επαφής από το πολυμερές αυτό είναι ότι δεν ήταν διαπερατό στο βέλτιστο βαθμό για την οξυγόνωση του κερατοειδούς χιτώνα. Το συγκεκριμένο πολυμερές ακόμα και σήμερα αποτελεί μέρος της σύστασης των νεότερων φακών επαφής. Επιλέξαμε λοιπόν το pHEMA για να συνθέσουμε υδρογέλες του , σε διαστάσεις περίπου αντίστοιχες ενός φακού επαφής (9 χιλιοστόμετρα) για να μελετήσουμε την προσρόφηση του συμπλόκου μας CIPAG από αυτές και την δραστικότητά του από το μέγεθος της ζώνης αναστολής που δημιουργούνται. Η σύνθεση της υδρογέλης έγινε ως ακολούθως. Πρόκειται για μια αντίδραση πολυμερισμού ελευθέρων ριζών με μονομερή το HEMA (2 υδροξυμεθακρυλικό) και το EGDMA (διμεθακρυλικό της αιθυλενογλυκόλης). Το EGDMA δρα σαν crosslinker με το TPO (2,4,6,- Τριμεθυλοβενζουλο-διφαινυλο-φωσφινοξείδιο) να είναι ο φωτοενεργοποιητής – καταλύτης με την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας.

Αναμιγνύουμε 2,7 χιλιοστόλιτρα HEMA (41) με 2 χιλιοστόλιτρα δις απεσταγμένου ύδατος και 10 μικρόλιτρα EGDMA σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα. Στη συνέχεια με bubbling αζώτου για 15 λεπτά αφαιρείται το οξυγόνο και προστίθεται μια ποσότητα 6 χιλιοστογραμμαρίων από τον φωτοενεργοποιητή TPO. Το διάλυμα που προκύπτει αναδεύεται μαγνητικά για 5 λεπτά στις 800 στροφές ανά λεπτό. Στο χρόνο που διαρκεί η ανάδευση ετοιμάζουμε το καλούπι της μήτρας της υδρογέλης που αποτελείται από 2 γυάλινες τετράγωνες επιφάνειες που ενώνονται μεταξύ τους με την παρεμβολή τριων

αντικειμενοφόρων πλακών σε διάταξη Πι. Το γυάλινο αυτό καλούπι συγκρατείται από μαύρους μεταλλικούς συνδετήρες σημειώσεων. Μετά την πεντάλεπτη ανάμειξη ακολουθεί με γυάλινη πιπέτα Παστέρ η έγχυση του διαλύματος της υδρογέλης στο εσωτερικό της αυτοσχέδιας μήτρας μας και η ακτινοβόλησή της σε ειδικό θάλαμο με λυχνία υπεριώδους ακτινοβολίας για 40 λεπτά ώστε να επιτευχθεί ο φωτοπολυμερισμός.

Με το πέρας του αναγκαίου χρόνου πολυμερισμού αφαιρείται η τετράγωνου σχήματος υδρογέλη (περίπου πλάτους 6 εκατοστόμετρων) και ακολουθεί μια διαδικασία χειρισμών που αποσκοπεί στην αφαίρεση των μονομερών από την υδρογέλη που δεν έχουν πολυμεριστεί. Συγκεκριμένα για 15 λεπτά εμβαπτίζεται σε δις αποσταγμένο νερό το οποίο βρίσκεται σε θερμοκρασία βρασμού (100 βαθμοί της κλίμακας Κελσίου). Έπειτα με ειδικό χάλκινο διακορευτή , που έχει αποστειρωθεί , εσωτερικής διαμέτρου της κοπτικής του επιφάνειας 9 χιλιοστόμετρων κόβεται η τετράγωνη υδρογέλη σε κύκλους διαμέτρου 9 χιλιοστόμετρων ο καθένας. Οι δίσκοι αυτοί υδρογέλης που μοιάζουν με φακούς επαφής εμβαπτίζονται και εκπλένονται κατά σειρά στα εξής διαλύματα 1) Σε δις απεσταγμένο ύδωρ 2) Διάλυμα φυσιολογικού ορού NaCl 0.9%, 3) διάλυμα υδροχλωρικού οξέως 0,1M και τελικά σε δις απεσταγμένο ύδωρ ξανά. Οι κυκλικοί αυτοί δίσκοι υδρογέλης στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν σε αποστειρωμένα τρυβλία.

Έπειτα εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα CIPAG αρχικής συγκέντρωσης 10 μM . Έγινε μέτρηση του UV φάσματος του αρχικού διαλύματος και μετά από 38 ημέρες μέτρηση του τελικού φάσματος για να υπολογιστεί η συγκέντρωση του διαλύματος CIPAG σε κάθε κυκλική υδρογέλη. Βρέθηκε να είναι 2,95 μM .



Η σύγκριση των φασμάτων UV του διαλύματος CIPAG συγκέντρωσης 10μM (αρχικού και του τελικού μετά 38 ημερών) για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης CIPAG στην υδρογέλη

Στη συνέχεια υπολογίστηκε η ζώνη αναστολής του υδροτζέλ για καθένα από τα τρία πρότυπα μικρόβια (Staph. Aureus, Staph. Epidermidis, PA01). Αρχικά 2,7ml HEMA (41) αναδεύονται σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα με 2 ml δις απεσταγμένου ύδατος και 10 μl EGDMA. Ακολουθεί bubbling με άζωτο για 15 λεπτά για να φύγει ο ατμοσφαιρικός αέρας. Παράλληλα ανάμεσα σε 2 γυάλινες πλάκες με καλυπτρίδες που καλύπτουν τα πλευρικά τοιχώματα δημιουργείται ένα καλούπι πάχους λίγων χιλιοστών. Αφού αφαιρεθεί ο αέρας τοποθετούνται 6mg φωτοενεργοποιητή TPO και αναδεύεται όλο το διάλυμα στις 800rpm για 5 λεπτά. Τοποθετείται στο ειδικό γυάλινο καλούπι και αφήνεται για 40. Τοποθετούνται τελικά σε δοκιμαστικούς σωλήνες υδατικού διαλύματος CIPAG αρχικής συγκέντρωσης 10 μM. Μετά το πέρας των 38 ημερών και τον υπολογισμό της τελικής συγκέντρωσης, στρώνουμε τρυβλία με τα τρία πρότυπα μικροβιακά μας στελέχη όπως περιγράφεται αντίστοιχα στο πρωτόκολλο της BSAC (42) για τον υπολογισμό της ζώνης αναστολής. Αφού επώαστηκε επί 24 ώρες

το κάθε τρυβλίο υπολογίστηκαν οι αντίστοιχες ζώνες αναστολής όπως φαίνεται στον πίνακα 5 και την εικόνα 7.

Η τεχνική της ζώνης αναστολής βασίζεται στην διάχυση του διαλύματος μιας αντιμικροβιακής ουσίας από μια περιοχή υψηλής της συγκέντρωσης σε μια άλλη χαμηλότερης στην επιφάνεια ενός τρυβλίου που έχει ενοφθαλμιστεί με κάποιο μικρόβιο και στην ανάπτυξη μιας ζώνης αναστολής - I.Z.(Inhibition Zone) η οποία έχει άλλοτε άλλη διάμετρο. Εμφανίζεται όταν η συγκέντρωση της αντιμικροβιακής ουσίας - σε τιμή τουλάχιστον ίσης της MIC – επιδρά στο πληθυσμό μικροβίων που έχουμε στρώσει στο τρυβλίο αναστέλλοντας την ανάπτυξή του. Κλινικά η ζώνη αναστολής χρησιμοποιείται (με την ονομασία Kirby-Bauer Test) για την αξιολόγηση της ευαισθησίας σε αντιβιοτικά μικροβίων που απομονώνονται από ασθενείς. Στην ιατρική χρήση του πρωτοκόλλου χρησιμοποιούνται χάρτινοι αποστειρωμένοι δίσκοι διαμέτρου 6 – 9 χιλιοστών εμποτισμένοι με γνωστά αντιβιοτικά. Αντίστοιχα στην μελέτη της δράσης αντιμικροβιακών ουσιών χρησιμοποιούνται αποστειρωμένοι χάρτινοι δίσκοι ή δίσκοι από χαρτί watman το οποίο αποστειρώνεται κατάλληλα. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν όμως και άλλα υλικά , όπως στην περίπτωσή μας δίσκοι από υδρογέλη (hydrogel) όπως αυτής των φακών επαφής της οποίας την σύνθεση προαναφέραμε. Αρχικά στρώνουμε δύο τρυβλία με το κατάλληλο θρεπτικό σε άγαρ για το κάθε μικρόβιο. Στην συνέχεια από μια 24ωρη καλλιέργεια του μικροβίου σε τρυβλίο επιλέγουμε με τον μικροβιολογικό κρίκο, αφού τον έχουμε αποστειρώσει, 3 με 5 ομοιόμορφες μικροβιακές αποικίες τις οποίες και έχουμε διαλύσει με ανάδευση - vortex σε αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό (NaCl 0,9%). Ο φυσιολογικός ορός λόγω ισοωσμωτικότητας με τα μικροβιακά κύτταρα προστατεύει τις κυτταρικές τους μεμβράνες από ρήξη. Αραιώνουμε το μικροβιακό διάλυμα σε φυσιολογικό ορό τόσο ώστε η απορρόφησή του (ενώ αυτό βρίσκεται σε δοκιμαστικό σωλήνα 13 x 10 εκατοστά) στα 625 νανόμετρα να αντιστοιχεί σε 0,08 έως 0,10. Η απορρόφηση αυτή

αντιστοιχεί σε ένα πρότυπο διάλυμα Mc Farland 0,5 το οποίο εξ ορισμού δίνει ένα εύρος της τάξης των 1 με 2×10^8 CFU/ml. Στη συνέχεια στο δοκιμαστικό σωλήνα του μικροβιακού εναιωρήματος 0,5 Mc Farland εμβαπτίζουμε αποστειρωμένο βαμβακοφόρο στυλεό. Τον στυλεό, επειδή μπορεί να έχει μεγάλη ποσότητα υγρού διαλύματος από τα μικρόβια, τον ακουμπούμε απαλά στα εσωτερικά τοιχώματα του δοκιμαστικού σωλήνα ώστε να φύγει η περίσσεια του διαλύματος.

Ακολούθως στον αποστειρωμένο πάγκο μας (laminar flow) ανοίγουμε τα τρυβλία και ραβδίζουμε με τον βαμβακοφόρο στυλεό προς μια κατεύθυνση για να επιτύχουμε ομοιόμορφη βακτηριακή ανάπτυξη, περιστρέφουμε το τρυβλίο κατά 90 μοίρες ξαναραβδίζουμε και επαναλαμβάνουμε, μια διαδικασία που συνολικά γίνεται 3 φορές. Στη συνέχεια αφήνουμε τα τρυβλία για 10 λεπτά ανοιχτά στο laminar flow ώστε να στεγνώσουν.

Σύμπλοκο CIPAG	Staph. Au.	Staph. Ep.	PA01
Ζώνη αναστολής (σε mm)	28mm	13mm	24mm

Πίνακας 5 Υπολογισμός ζώνης αναστολής υδροτζέλ CIPAG



Εικόνα 7 Οι ζώνες αναστολής του υδροτζέλ PHEMA συγκέντρωσης 2,95 μ M κατά σειρά από αριστερά προς τα δεξιά στα μικρόβια Staph. Aureus, Staph. Epidermidis, PA01 διαδοχικά.

Οι ζώνες αναστολής που υπολογίζονται είναι αντίστοιχες της ΕΒΣΣ – MIC για κάθε μικρόβιο. Είναι ένα πρώτο δεδομένο στην προσπάθειά μας να αξιολογήσουμε αργότερα την κινητική και δραστηριότητα του CIPAG από έναν φακό επαφής, και την δυνατότητα χρήσης του συμπλόκου σε θεραπευτικούς φακούς επαφής.

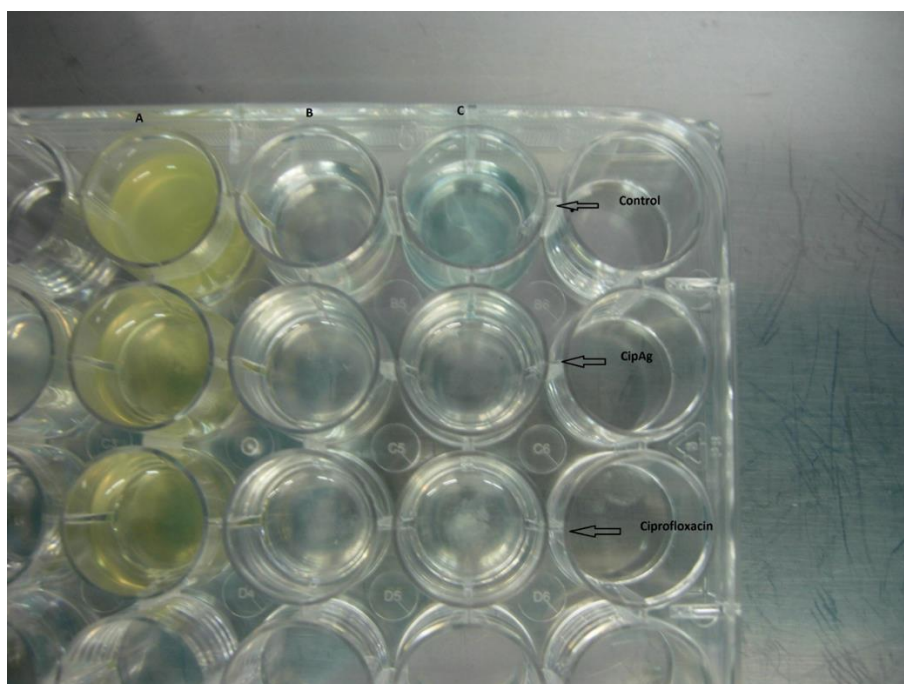
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ CIPAG ΣΕ ΒΙΟΜΕΒΡΑΝΗ-ΒΙΟΦΙΛΜ ΨΕΥΔΟΜΟΝΑΔΑΣ ΡΑ01

Το σύμπλοκο CIPAG συγκριτικά με τον υποκαταστάτη του είχε χαμηλότερη MBC. Προσπαθήσαμε στη συνέχεια να αξιολογήσουμε την διαφορά αυτή σε βιοφίλμ ψευδομονάδας, σε φακούς επαφής. Η ψευδομονάδα είναι το συνηθέστερο Gram (-) παθογόνο που εμπλέκεται σε κερατίτιδα από φακούς επαφής. Προσκολλάται στην εσωτερική επιφάνεια των φακών επαφής δημιουργώντας βιοφίλμ και μπορεί πολύ γρήγορα ακόμη και σε 48 ώρες να προκαλέσει ρήξη (τήξη – melting) του κερατοειδούς χιτώνα. Τρεις ημερήσιοι φακοί επαφής εμβαπτίστηκαν σε καλλιέργεια ψευδομονάδας με συνθήκες τέτοιες (ανάδευση υπό επώαση για 3 ώρες στις 100rpm, παύση για 30 λεπτά για να καθιζάνουν τα πλαγκτονικά κύτταρα που δεν προσκολλήθηκαν) που ευνοούν την δημιουργία βιοφίλμ εντός μικροπλακέτας καλλιέργειας κυττάρων 24 βοθρίων. Οι 3 φακοί στη συνέχεια υπό στείρες συνθήκες μεταφέρονται σε γειτονικά βοθρία με φρέσκο θρεπτικό μέσο LB και επωάζονται για 24 ώρες ώστε να αναπτυχθεί νέο βιοφίλμ.

Την επόμενη ημέρα πάλι υπό στείρες συνθήκες οι φακοί μεταφέρονται σε γειτονική τριάδα βοθρίων αφού εμβαπτίζονται προσεκτικά σε PBS. Τα βοθρία περιέχουν το πρώτο φρέσκο θρεπτικό υγρής καλλιέργειας LB και τα δύο επόμενα διαλύματα CIPAG και σιπροφλοξασίνης ίδιας συγκέντρωσης (600nanoM) με διαλύτη θρεπτικό LB.

Επωάζονται εκεί επί 24ώρου πάλι και την επόμενη ημέρα γίνεται αξιολόγηση της επίδρασης των συμπλόκων στο βιοφίλμ.

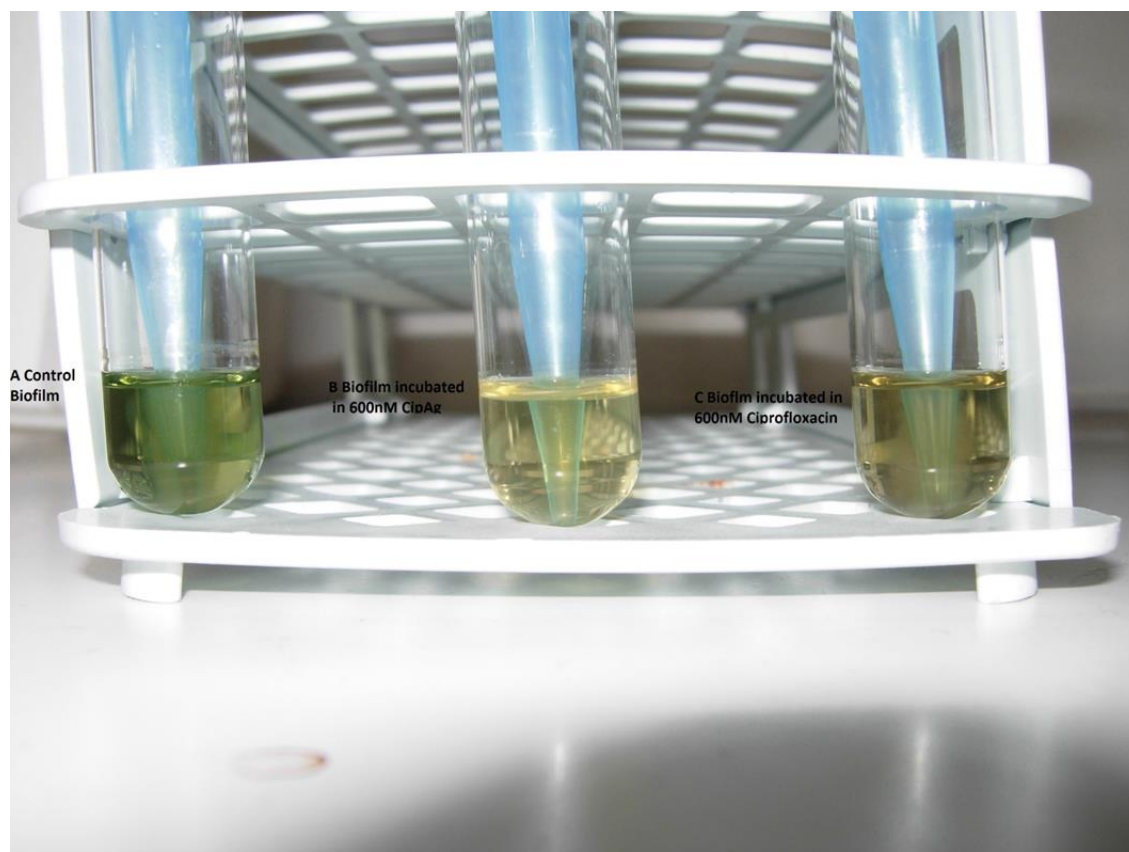
Βλέπουμε στην φωτογραφία 8 στον φακό που επωάστηκε στο διάλυμα του συμπλόκου μας (δεύτερο βοθρίο , δεύτερη στήλη) να έχει σχεδόν εξαφανισθεί οπτικά το βιοφίλμ ενώ τόσο στο φακό ελέγχου (πρώτο βοθρίο, δεύτερη στήλη) όσο και σε αυτόν που επωάστηκε με σπροφολοξασίνη ίδιας συγκέντρωσης (τρίτο βοθρίο, δεύτερη στήλη) να είναι ορατό.



Εικόνα 8 Βιοφίλμ ψευδομονάδας σε φακό επάφης. Επωάστηκαν οι φακοί με την ίδια συγκέντρωση 600νανοΜ συμπλόκου (δεύτερο βοθρίο, δεύτερη στήλη) και σιπροφλοξασίνης (τρίτο βοθρίο , δεύτερη στήλη). Στον φακό που επωάστηκε με το σύμπλοκο έχει σχεδόν εξαφανιστεί.

Αντίστοιχη διαδικασία έγινε με την ανάπτυξη βιοφίλμ ψευδομονάδας στην εξωτερική επιφάνεια αποστειρωμένων τιπ πιπέτας με σκοπό την παρατήρησή τους με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (εικόνα 9). Ο δεύτερος σωλήνας από αριστερά περιέχει τιπ με βιοφίλμ επωασμένο σε διάλυμα συμπλόκου CIPAG συγκέντρωσης 600νανοΜ , ο τρίτος σε

διάλυμα σιπροφλοξασίνης ίδιας συγκέντρωσης και ο πρώτος ένα τιπ ελέγχου με βιοφίλμ. Έχει εξαφανισθεί οπτικά το βιοφίλμ από τον σωλήνα με το σύμπλοκο και το θρεπτικό LB έχει το φυσιολογικό υποκίτρινο χρώμα του σε αντίθεση με τον σωλήνα ελέγχου και τον επωασμένο με την σιπροφλοξασίνη όπου λόγω της διαφορετικής μικροβιακής ανάπτυξης τόσο το θρεπτικό διάλυμα έχει πιο σκούρο χρώμα, ενώ το βιοφίλμ είναι ορατό στην εξωτερική τους επιφάνεια.



Εικόνα 9 , κατ'αντιστοιχία με την εικόνα 8 βιοφίλμ ψευδομονάδας στην εξωτερική επιφάνεια τιπ πιπέτας. Από αριστερά προς δεξιά κοντρόλ , συμπλόκου και σιπροφλοξασίνης.

ΜΕΛΕΤΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΓΕΝΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ CIPAG

ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

Σε αθανатоποιημένη σειρά ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων του κερατοειδούς (HCECs) έγινε μελέτη της κυτταροτοξικότητας του συμπλόκου CIPAG και του υποκαταστάτη του σιπροφλοξασίνης. Οι τιμές IC₅₀ (μM) που υπολογίστηκαν αντίστοιχα όπως φαίνονται στον πίνακα (πίνακας 6) δείχνουν το σύμπλοκο να είναι λιγότερο τοξικό.

Ουσία	IC ₅₀ (μM)
CIPAG	15.7±0.4
Σιπροφλοξασίνη	20.5±0.4

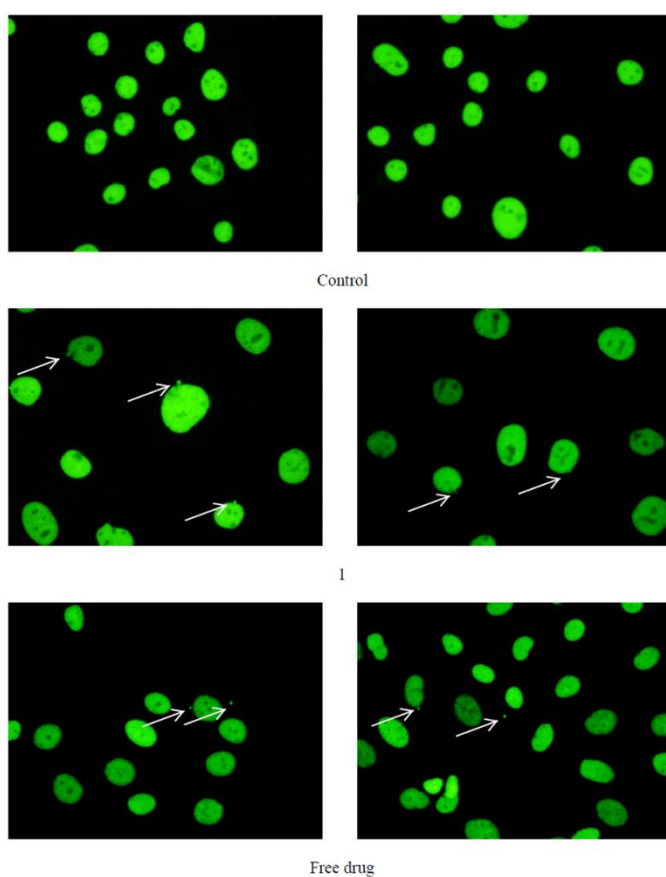
Πίνακας 6 Κυτταροτοξικότητα CIPAG σιπροφλοξασίνης έναντι αθανатоποιημένων ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων κερατοειδούς.

ΓΟΝΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ CIPAG

In vitro δοκιμή γονοτοξικότητας ανίχνευσης μικροπυρήνων.

Η in vitro αυτή δοκιμή γονοτοξικότητας στηρίζεται στην ανίχνευση μικροπυρήνων σε κύτταρα που βρίσκονται στη φάση της μεσόφασης κατά την κυτταρική διαίρεση. Είναι μια μέθοδος που μπορεί να αναδείξει με σαφήνεια κάποια χρωμοσωμική βλάβη που μετά την επίδραση της χημικής ουσίας που μελετούμε μεταφέρεται στα θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν από την κυτταρική διαίρεση. Είναι ιδιαίτερα αξιόπιστη και

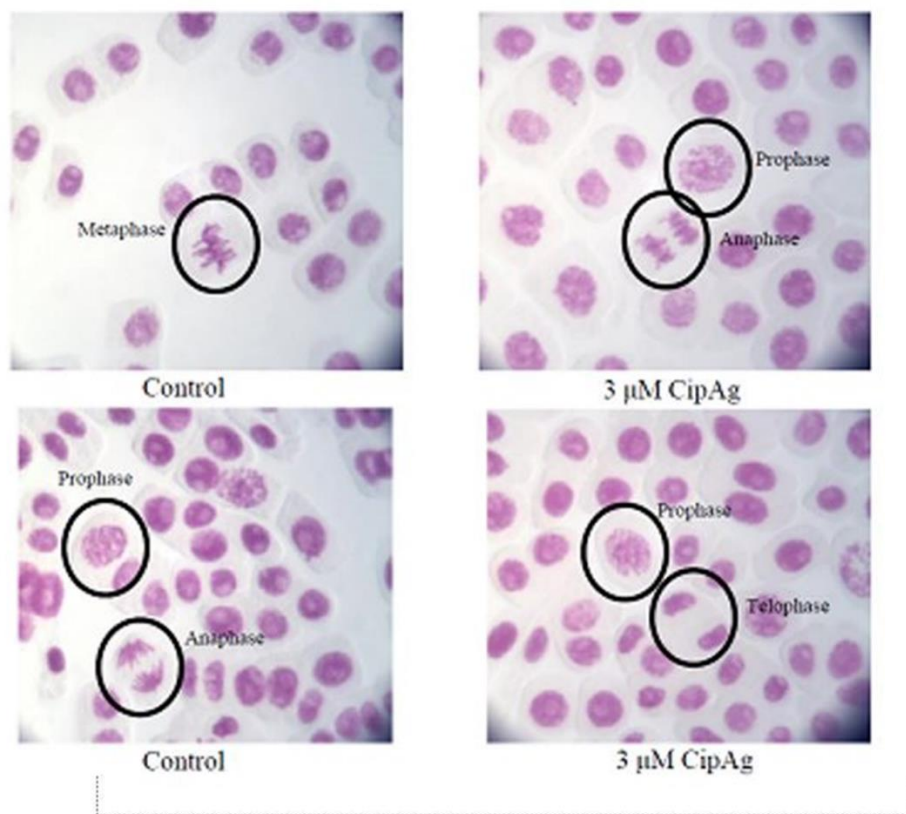
φθιγή τεχνική , όπως αναφέρεται και στο αντίστοιχο τεχνικό έγγραφο του ΟΟΣΑ (43), (44) . Η μελέτη έγινε στην κυτταρική σειρά ανθανατοποιημένων ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων κερατοειδούς (HCECs) . Βρέθηκε ότι η συχνότητα μικροπυρήνων στα κύτταρα χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας ήταν 3,8% , παρατηρήθηκε μια ελαφρά αύξηση μετά την επίδραση των κυττάρων με το σύμπλοκο CIPAG (1 στη φωτογραφία 10) στο 4,5% ποσοστό σχεδόν ίδιο με την επίδραση που είχε η σιπροφλοξασίνη (συχνότητα 4,6%). Το σύμπλοκο δεν είναι γονοτοξικό λοιπόν όπως και ο υποκαταστάτης του.



Εικόνα 9 in vitro δοκιμή γονοτοξικότητας μικροπυρήνων σε κύτταρα HCECs (ανθανατοποιημένα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα κερατοειδούς) . 1 το σύμπλοκο CIPAG και free drug η σιπροφλοξασίνη.

In vivo δοκιμή γονοτοξικότητας με το πρωτόκολλο *Allium Cera*.

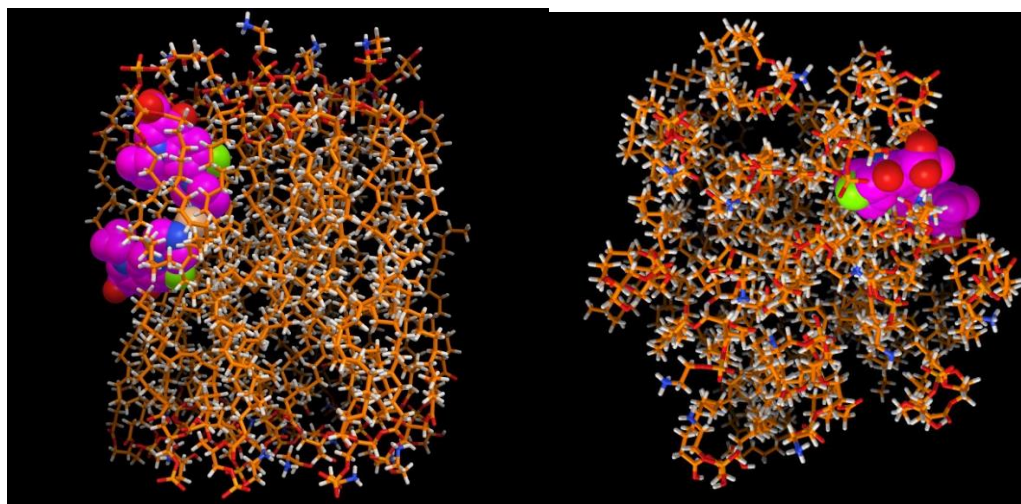
Η δοκιμή αυτή βασίζεται στην ανίχνευση χρωμοσωμικών ανωμαλιών στις ρίζες κυττάρων κρεμμυδιού του γένους *Allium cera*. Είναι μια αποτελεσματική και φτηνή δοκιμασία αξιολόγησης της *in situ* παρακολούθησης της γονοτοξικότητας περιβαλλοντικών ρυπαντών και όχι μόνο (45), (46). Κατά την δοκιμή αυτή βρέθηκε ότι ακόμα και σε συγκέντρωση 3 μM το σύμπλοκο CIPAG δεν ήταν γονοτοξικό (εικόνα 10).



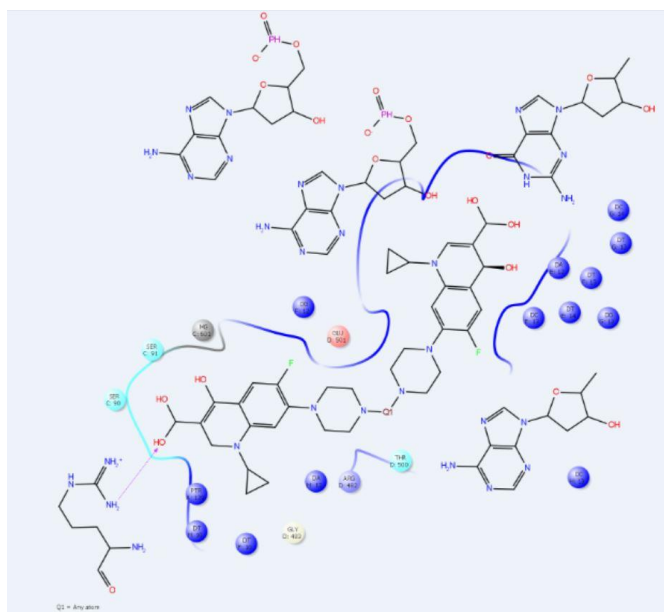
Εικόνα 10 , ακόμα και σε συγκέντρωση 3 μM το σύμπλοκο δεν είναι γονοτοξικό.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ (DOCKING)

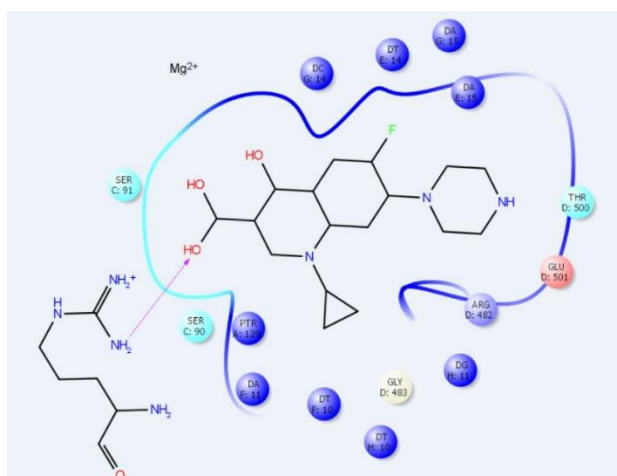
Οι *in silico* υπολογισμοί για την μελέτη της πρόσδεσης του συμπλόκου CIPAG με την βακτηριακή μεμβράνη έγιναν με το πρόγραμμα autodock vina (47) και για την πρόσδεσή του στο ενεργό κέντρο του ενζύμου της DNA γυράσης με το molegro virtual docker (48). Η μεμβράνη δομήθηκε σύμφωνα με την μελέτη (49) χρησιμοποιώντας σε αναλογία 3:1 την POPE (παλμιτοϋλ-ολεοϋλ- φωσφατιδυλαιθανολαμίνη) και την POPG (φωσφατιδυλογλυκερόλη) αντίστοιχα. Η κρυσταλλική δομή της DNA γυράσης με την σιπροφλοξασίνη δημοσιεύθηκε πρόσφατα (50) με αριθμό PDB ID: 5btc (51). Οι εικόνες δείχνουν ότι το σύμπλοκο προσδένεται στο ίδιο σημείο με την σιπροφλοξασίνη.



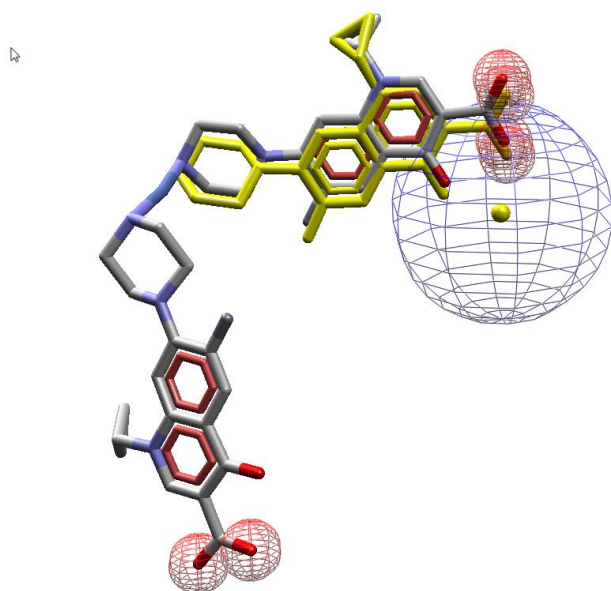
Εικόνα 11 αριστερά το σύμπλοκο πως αλληλεπιδρά με το μοντέλο της κυτταρικής μεμβράνης 3:1 POPE:POPG (49) και δεξιά η σιπροφλοξασίνη.



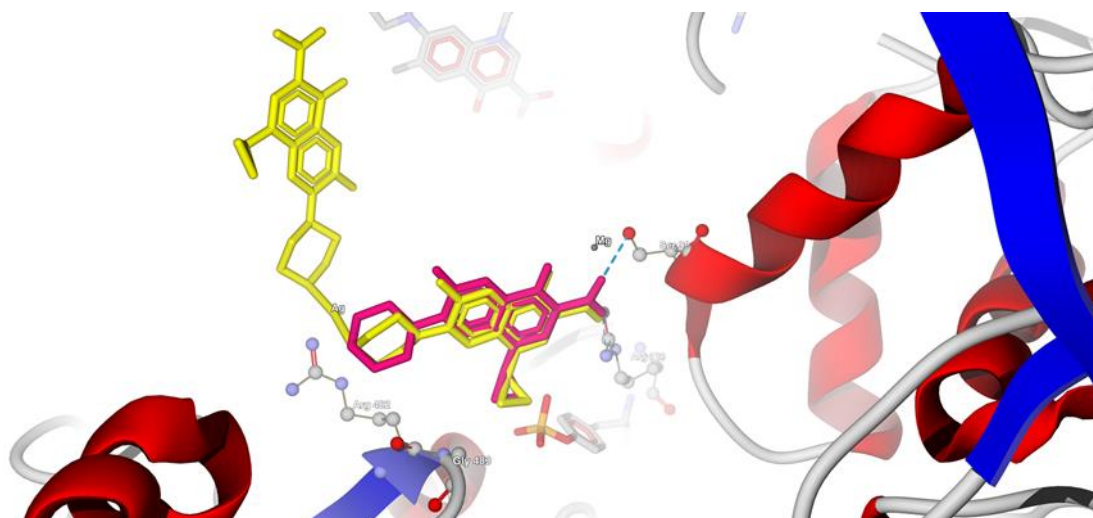
Εικόνα 12 Πως συνδέεται το σύμπλοκο CIPAG στο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου.



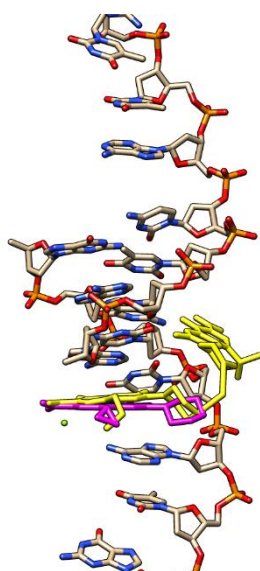
Εικόνα 13 Πως συνδέεται η σιπροφλοξασίνη στο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου.



Εικόνα 14 Υπέρθωση του συμπλόκου CIPAG και της σιπροφλοξασίνης όπου φαίνονται οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις τους με το ενεργό κέντρο της γυράσης.



Εικόνα 15 Υπέρθωση με την σιπροφλοξασίνη



Εικόνα 16 Αλληλεπιδράσεις με το DNA.

Συμπεράσματα

Αποτέλεσμα της εργασίας αυτής ήταν η σύνθεση ενός νέου συμπλόκου αργύρου και σιπροφλοξασίνης για την αντιμετώπιση της μικροβιακής κερατίτιδας.

- Είναι εξίσου δραστικό με την σιπροφλοξασίνη κατά των Staph. Aureus, PA01 έχοντας καλύτερη MIC έναντι του Staph. Epidermidis.
- Η MBC του είναι καλύτερη από του υποκαταστάτη του (ίση με την MIC του για τα 2 βακτήρια και διπλάσια αυτής για τον χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο, όταν η σιπροφλοξασίνη χρειάζεται συγκεντρώσεις τετραπλάσιες (Staph. Aureus) ή οκταπλάσιες (PA01) της MIC της για να εμφανίσει βακτηριοκτόνο δράση.
- Υπερτερεί του υποκαταστάτη του στην αντιμετώπιση των βιομεμβρανών-βιοφίλμ.
- Είναι ίδια ή λιγότερο κυτταροτοξική και γονοτοξική ουσία συγκρινόμενη με την σιπροφλοξασίνη και προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου στόχου του (της τοποϊσομεράσης II) με την ίδια ακρίβεια και ειδικότητα.

Οδήγησε στην κατοχύρωση ενός διπλώματος ευρεσιτεχνίας (OBI αριθμ. 1008941). Σε μια δημοσίευση άρθρου σε διεθνές επιστημονικό περιοδικό με τίτλο "Silver ciprofloxacin (CIPAG): a successful combination of antibiotics in inorganic-organic hybrid for the development of novel formulations based on chemically modified commercially available antibiotics" , σε 2 ελεύθερες ανακοινώσεις σε σημαντικά συνέδρια (στο 49^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Οφθαλμολογίας το και στο 13^ο διεθνές συμπόσιο οφθαλμολογικής φαρμακολογίας και θεραπευτικής ISOPTClinical) και σε μια αφίσα στο 22^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χημείας . Λόγω των 2 ελεύθερων καρβοξυλικών άκρων το σύμπλοκο δίνει την δυνατότητα πειραματισμού με διαφορετικές φαρμακοτεχνικές μορφές, και εκκρεμεί ακόμα ο έλεγχός του έναντι ανθεκτικών μικροβιακών στελεχών.

Εικόνες - Φωτογραφίες

Οι εικόνες 2 και 3 χρησιμοποιούνται με την άδεια του Εθνικού Ινστιτούτου Οφθαλμού, ΗΠΑ NEI.NIH.GOV

Η εικόνα 4 από Weed MC, Rogers GM, Kitzmann AS, Goins KM, Wagoner MD. Vision Loss. After Contact Lens-Related Pseudomonas Keratitis. EyeRounds.org. June 24, 2013; Available from: <http://www.EyeRounds.org/cases/171-pseudomonas-keratitis.htm>

Η εικόνα 5 με την άδεια του δημιουργού κ. Tal πηγή: https://en.wikipedia.org/wiki/Contact_lens#/media/File:Contact_Lens_Ayala.jpg

Το σχήμα 1 του βιοφίλμ με πηγή : D. Monroe. "Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms". PLoS Biology 5 (11, e307). DOI:10.1371/journal.pbio.0050307.} χρησιμοποιείται με την άδεια του συγγραφέα κ. Monroe και την άδεια του καθηγητή D. Davis για τη χρήση των φωτογραφιών.

Δομές σχήμα 3 και 4 πηγή Pubchem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Βιβλιογραφία

- 1 Bacterial keratitis: predisposing factors, clinical and microbiological review of 300 cases. T Bourcier, F Thomas, V Borderie, C Chaumeil, L Laroche Br J Ophthalmol 2003; 87:834–838

- 2 Liesegang TJ (1997) Contact lens-related microbial keratitis: part I: epidemiology. Cornea 16(2):125–131

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

- 4 Baum J, Barza M (2000). The evolution of antibiotic therapy for bacterial conjunctivitis and keratitis: 1970–2000. Cornea 19(5):659–672

- 5 Goldstein MH, Kowalski RP, Gordon YJ (1999). Emerging fluoroquinolone resistance in bacterial keratitis: a 5-year review. Ophthalmology 106(7):1313–1318.

- 6 Garg P, Sharma S, Rao GN (1999) Ciprofloxacin-resistant Pseudomonas keratitis. Ophthalmology 106(7):1319–1323

- 7 Dejaco-Ruhswurm I1, Scholz U, Hanselmayer G, Skorpik C. Contact lens induced keratitis associated with contact lens wear. Acta Ophthalmol Scand. 2001 Oct; 79(5):479-83.

8 S.M. Fleiszig,A. The Glenn Fry award lecture 2005. The pathogenesis of contact lens-related keratitis *Optom Vis Sci*, 83 (2006), pp. 866-873

9 F. Musa,R. Tailor,A. Gao,E. Hutley,S. Rauz,R.A. Scott
Contact lens-related microbial keratitis in deployed British military personnel
BR J Ophthalmol, 94 (2010), pp. 988-993

10 Y.W. Ibrahim,D.L. Boase,I.A. Cree
Epidemiological characteristics, predisposing factors and microbiological profiles of infectious corneal ulcers: the Portsmouth corneal ulcer study
Br J Ophthalmol, 93 (2009), pp. 1319-1324

11 B.H. Jeng,D.C. Gritz,A.B. Kumar
Epidemiology of ulcerative keratitis in Northern California
Arch Ophthalmol, 128 (2010), pp. 1022-1028

12 *Clinical Manual of Contact Lenses FOURTH EDITION* 2015 Edward S.

13 Rodney M. Donlan Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002 Sep; 8(9): 881–890.

14 Cortes ME, Consuegra J, Sinisterra RD (2011) Biofilm formation, control and novel strategies for eradication. *Sci Against Microbial Pathog Commun Curr Res Technol Adv* 2:896–905

- 15 Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004 Jun;12(3):185-90.

- 16 Vlastarakos PV, Nikolopoulos TP, Maragoudakis P, Tzagaroulakis A, Ferekidis E. Biofilms in ear, nose, and throat infections: how important are they? *Laryngoscope*. 2007 Apr;117(4):668-73.

- 17 Arciola CR, Campoccia D, Ehrlich GD, Montanaro L. Biofilm-based implant infections in orthopaedics. *Adv Exp Med Biol*. 2015;830:29-46

- 18 Costerton JW1, Montanaro L, Arciola CR. Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int J Artif Organs*. 2005 Nov;28(11):1062-8.

- 19 Braxton EE Jr1, Ehrlich GD, Hall-Stoodley L, Stoodley P, Veeh R, Fux C, Hu FZ, Quigley M, Post JC. Role of biofilms in neurosurgical device-related infections. *Neurosurg Rev*. 2005 Oct;28(4):249-55.

- 20 Katherine Belfielda, Roger Baystona , J.P. Birchall , Matija Daniela Do orally administered antibiotics reach concentrations in the middle ear sufficient to eradicate planktonic and biofilm bacteria? A review *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* Volume 79, Issue 3, March 2015, Pages 296–300

- 21 Keren I, Shah D, Spoering A, Kaldalu N, Lewis K. Specialized Persister Cells and the Mechanism of Multidrug Tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2004 December; 186(24): 8172–8180

- 22 Paulo J. M. Bispo, Wolfgang Haas, and Michael S. Gilmore Biofilms in Infections of the Eye Pathogens. 2015 Mar; 4(1): 111–136.

- 23 Stapleton F., Dart J. *Pseudomonas* keratitis associated with biofilm formation on a disposable soft contact lens. *Br. J. Ophthalmol*. 1995;79:864–865

- 24 Zegans ME, DiGiandomenico A, Ray K, Naimie A, Keller AE, Stover CK, Lalitha P, Srinivasan M, Acharya NR, Lietman TM. Association of Biofilm Formation, Psl Exopolysaccharide Expression, and Clinical Outcomes in *Pseudomonas aeruginosa* Keratitis: Analysis of Isolates in the Steroids for Corneal Ulcers Trial. *JAMA Ophthalmol*. 2016 Apr;134(4):383-9.

- 25 Μ. Μαρσέλος - Μ. Μάλαμας (2004). *Ιατρική Φαρμακολογία Ι. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων*.

- 26 Topical antibiotics for the management of bacterial keratitis: an evidence-based review of high quality randomised controlled trials. *Br J Ophthalmol*. 2014 Nov; 98(11):1470-7.

- 27 Antimicrobial susceptibility of Gram-positive cocci isolated from patients with conjunctivitis and keratitis in Crete, Greece. *J Microbiol Immunol Infect*. 2013

Feb;46(1):41-7 Mantadakis E1, Maraki S, Michailidis L, Gitti Z, Pallikaris IG, Samonis G.

28 Goldstein MH1, Kowalski RP, Gordon YJ. Emerging fluoroquinolone resistance in bacterial keratitis: a 5-year review. *Ophthalmology*. 1999 Jul;106(7):1313-8.

29 Hwang DG Fluoroquinolone resistance in ophthalmology and the potential role for newer ophthalmic fluoroquinolones. *Surv Ophthalmol*. 2004 Mar;49 Suppl 2:S79-83.

30 Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, Yacaman MJ. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 2005 Oct; 16(10):2346-53.

31 Baker C, Pradhan A, Pakstis L, Pochan DJ, Shah SI. Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*. 2005 Feb; 5 (2):244-9.

32 Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci* 2004; 275:177–182.

33 Amro NA, Kotra LP, Wadu-Mesthrige K, et al. High-resolution atomic force microscopy studies of the *Escherichia coli* outer membrane: Structural basis for permeability. *Langmuir* 2000; 16:2789–2796.

34 Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. Li WR1, Xie XB, Shi QS, Duan SS, Ouyang YS, Chen YB. *Biometals*. 2011 Feb; 24(1):135-41.

35 Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. A. R. Shahverdi, A. Fakhimi, H. R. Shahverdi, and S. Minaian, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, vol. 3, no. 2, pp. 168–171, 2007.

36 Metal complexes of quinolone antibiotics and their applications: an update. Uivarosi V. *Metal complexes of quinolone antibiotics and their applications: an update*. *Molecules*. 2013 Sep 11;18(9):11153-97.

37 Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Wiegand I1, Hilpert K, Hancock RE. *Nature Protocols* 2008;3(2):163-75

38 CLSI M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement 2015

(39) ISO 20776-1:2006 Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems -- Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices -- Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases.

40 MIC- and Inhibition zone diameter distributions of microorganisms without and with resistance mechanisms.

<https://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=init>

41 Paradiso P, Galante R, Santos L, Alves de Matos AP, Colaço R, Serro AP, Saramago B. Comparison of two hydrogel formulations for drug release in ophthalmic lenses. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014 Aug;102(6):1170-80

42 BSAC Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing Version 12 May 2013

http://bsac.org.uk/wp-content/uploads/2012/02/Version-12-Apr-2013_final.pdf

43 OECD/OCDE TG 487 Adopted: 26 September 2014 OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. IN VITRO MAMMALIAN CELL MICRONUCLEUS TEST

<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/suppdocs/feddocs/oecd/oecd-tg487-2014-508.pdf>

44 Micheline Kirsch-Volders, Ilse Decordier, Azeddine Elhajouji , Gina Plas, Marilyn J. Aardema and Michael Fenech In vitro genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models *Mutagenesis* vol. 26 no. 1 pp. 177–184, 2011

45 Leme DM, Marin-Morales MA. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutat Res*. 2009 Jul-Aug;682(1):71-81.

46 Sainis I, Banti CN, Owczarzak AM, Kyros L, Kourkoumelis N, Kubicki M, Hadjikakou SK. New antibacterial, non-genotoxic materials, derived from the functionalization of the anti-thyroid drug methimazole with silver ions. *Inorg Biochem*. 2016 Jul;160:114-24.

47 Autodock Vina <http://vina.scripps.edu/>

48 Molegro virtual docker <http://molegro-virtual-docker.software.informer.com/5.5/>

49 Murzyn K , Róg T, Pasenkiewicz-Gierula M. Phosphatidylethanolamine-phosphatidylglycerol bilayer as a model of the inner bacterial membrane. *Biophys J.* 2005 Feb;88(2):1091-103.

50 Blower, T.R., Williamson, B.H., Kerns, R.J., Berger, J.M. Crystal structure and stability of gyrase-fluoroquinolone cleaved complexes from *Mycobacterium tuberculosis*. (2016) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 113: 1706-1713

51 PDBID <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?pdbId=5BTC>