

**«ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ  
ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΙΓΕΚΥΚΛΙΝΗΣ ΣΕ ΑΙΜΑ ΑΣΘΕΝΩΝ»**

**υπό**

**ΠΑΠΟΥΤΣΑΚΗ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ**

**Μεταπτυχιακή εργασία**

**υποβληθείσα για την εκπλήρωση των προϋποθέσεων απονομής  
Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης**

**«Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες»**

**του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων**

**2022**

**© Παπουτσάκη Ελευθερία**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ**

**«ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ (ΒΒΕ)»**

**ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ)**

**«ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ  
ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΙΓΕΚΥΚΛΙΝΗΣ ΣΕ ΑΙΜΑ ΑΣΘΕΝΩΝ»**

**ΠΑΠΟΥΤΣΑΚΗ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΠΑΠΠΑΣ ΠΕΡΙΚΛΗΣ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2022**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ**

**«ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ (ΒΒΕ)»**

**ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ)**

**«ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ  
ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΙΓΕΚΥΚΛΙΝΗΣ ΣΕ ΑΙΜΑ ΑΣΘΕΝΩΝ»**

**ΠΑΠΟΥΤΣΑΚΗ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΠΑΠΠΑΣ ΠΕΡΙΚΛΗΣ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2022**

«Η έγκριση της Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

**ΠΑΠΟΥΤΣΑΚΗ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ**

**«ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ (ΒΒΕ)»**

**ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ)**

**«Ανάπτυξη μεθοδολογίας και προσδιορισμός επιπέδων τιγκεκυκλίνης  
στο αίμα ασθενών.»**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

Επιβλέπων καθηγητής: Παππάς Περικλής, Καθηγητής

Μέλη:

Κωνσταντή Μαρία, Καθηγήτρια

Λεονταρίτης Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής

Ημερομηνία παρουσίασης: Πέμπτη, 20 Οκτωβρίου 2022

Η διαδικασία επικυρώνεται από:

- Την διευθύντρια του ΠΜΣ ΒΒΕ, Καθηγήτρια Βεζυράκη Πατρώνα
- Τον Πρόεδρο του Τμήματος Ιατρικής, Καθηγητή Κονιτσιώτη Σπυρίδων

Αφιερωμένη στους γονείς και τη γιαγιά μου...

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής σε συνεργασία με το Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και με τη Β' Παθολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η βιβλιογραφική ανασκόπηση φαρμακοκινητικών δεδομένων για το αντιβιοτικό τιγκεκυκλίνη και η ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθοδολογίας προσδιορισμού του συγκεκριμένου αντιβιοτικού σε πλάσμα ασθενών, στους οποίους χορηγήθηκε ως θεραπεία.

Για να εξυπηρετήσει τον παραπάνω σκοπό, η εργασία αποτελείται από τρία μέρη: το θεωρητικό, το πειραματικό και τη συζήτηση. Στο πρώτο και θεωρητικό μέρος γίνεται αναφορά στις αρχές λειτουργίας των αναλυτικών τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν στη μεθοδολογία που αναπτύχθηκε (Υγρή χρωματογραφία, Φασματοσκοπία Μάζας) καθώς και παρουσίαση πληροφοριών γενικά για τα αντιβιοτικά και ειδικότερα για τις φυσικοχημικές, φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες της τιγκεκυκλίνης. Μαζί με το κείμενο, παρατίθενται σχηματικές αναπαραστάσεις για την ευκολότερη κατανόηση των περιεχομένων και για την επεξήγηση ορισμένων φαινομένων. Στο δεύτερο και πειραματικό μέρος παρουσιάζεται με λεπτομέρεια η πειραματική διαδικασία, η οργανολογία και οι συνθήκες για την ανάλυση καθώς και η επικύρωση και η βελτιστοποίηση της μεθόδου, μαζί με τα σχετικά αποτελέσματα. Παρατίθενται σχετικοί πίνακες και διαγράμματα που αντιστοιχούν στα περιεχόμενα του κειμένου. Στο τρίτο και τελευταίο μέρος «Συζήτηση/Συμπεράσματα», γίνεται σχολιασμός των περιεχομένων του θεωρητικού και πειραματικού μέρους.

Η επεξεργασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής και Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων ενώ η ανάλυσή τους πραγματοποιήθηκε στη Μονάδα Περιβαλλοντικής, Οργανικής και Βιοχημικής ανάλυσης υψηλής ευκρίνειας ORBITRAP-LC-MS του Τμήματος Χημείας.

Για την εκπόνηση και την επιτυχή ολοκλήρωση αυτής της εργασίας θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω πολύ τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Περικλή Παππά, Καθηγητή Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής, που μου πρότεινε το συγκεκριμένο θέμα, κινώντας το ενδιαφέρον μου και προσέφερε την πολύτιμη βοήθεια και την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης και εφαρμογής της μεθοδολογίας με υπομονή και διάθεση για διάλογο.

Άλλο ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Δρ. Βάσια Μπότη του Εργαστηρίου Περιβαλλοντικής Χημείας για τις πολύτιμες συμβουλές της στην περίοδο σχεδιασμού της μεθόδου και την εφαρμογή των τεχνικών της γνώσεων για την επίλυση κάθε προβλήματος που προέκυπτε κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τους συμμετέχοντες στην Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή, κ. Μαρία Κωνσταντή, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας και κ. Γεώργιο Λεονταρίτη, Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής, που συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ</b>	<b>3</b>
1. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	3
1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ	3
1.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	6
1.2.1 Υγρή χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης/Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography-HPLC)	9
1.3 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ	14
2. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (MASS SPECTROMETRY - MS)	15
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ	15
2.1.1 Εφαρμογές της φασματομετρίας μάζας	16
2.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΙΟΝΤΙΣΜΟΥ	16
2.2.1 Ψεκασμός σε ηλεκτρικό πεδίο (Electrospray Ionization-ESI)	18
2.3 ΑΝΑΛΥΤΗΣ ΜΑΖΩΝ	19
2.3.1 Υβριδικός αναλυτής Orbitrap	20
2.4 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ ΣΕ «ΣΕΙΡΑ» (TANDEM)	24
3. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ	25
4. ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	28
4.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ	28
4.1.1 Ορισμός και κατηγορίες αντιβιοτικών	28
4.1.2 Διαφορετικοί τρόποι δράσης αντιβιοτικών	29
4.1.3 Μικροβιακή αντίσταση, τρόπος χρήσης αντιβιοτικών και πιθανές επιπλοκές	31
4.2 ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ ΚΑΙ ΤΙΓΕΚΥΚΛΙΝΗ ΩΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ	33
4.2.1 Συνοπτική ιστορία τετρακυκλινών	33
4.2.2 Γενικές πληροφορίες για την τιγκεκυκλίνη	34
4.2.3 Κλινικές εφαρμογές	34
4.2.4 Φυσικοχημικές ιδιότητες και σχέση δομής - δράσης	36
4.2.5 Μηχανισμός δράσης και ανάπτυξη αντοχής	38
4.2.6 Αντιμικροβιακό φάσμα	41
4.2.7 Φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική	42

4.2.8	Ανεπιθύμητες ενέργειες και τοξικότητα στον ξενιστή	50
5.	ΧΡΗΣΗ ΕΥΡΗΜΑΤΩΝ – ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	52
<b>B.</b>	<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	53
1.	ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ – ΥΛΙΚΑ - ΣΥΣΚΕΥΕΣ	53
2.	ΠΡΟΤΥΠΗ ΕΝΩΣΗ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΔΙΑΛΥΤΕΣ	54
3.	ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ	54
4.	ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ	54
5.	ΜΕΘΟΔΟΣ	55
5.1	ΑΡΧΙΚΗ ΔΟΚΙΜΗ	55
5.2	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ / ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΟ ΠΛΑΣΜΑ	57
5.2.1	Προετοιμασία προς ανάλυση δειγμάτων	57
5.2.2	Ανάλυση δειγμάτων	57
6.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	59
6.1	ΑΡΧΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	59
6.2	ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	62
6.2.1	Επίδραση υποστρώματος	62
6.2.2	Κατασκευή καμπύλης αναφοράς	63
6.2.3	Γραμμικότητα μεθόδου	64
6.2.4	Εκλεκτικότητα	64
6.2.5	Όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης	65
6.3	ΤΕΛΙΚΕΣ ΒΕΛΤΙΣΤΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	65
6.3.1	Προκατεργασία κλινικών δειγμάτων	65
6.3.2	Χρωματογραφικός διαχωρισμός	65
6.3.3	Φασματομετρία μάζας	65
6.3.4	Αποτελέσματα εφαρμογής μεθόδου σε κλινικό δείγμα	66
	<b>ΜΕΡΟΣ Γ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ/ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	68
	<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	72
	<b>ABSTRACT</b>	73
	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	74

## A ΜΕΡΟΣ – ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

### 1. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

#### 1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Ο όρος χρωματογραφία χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα σύνολο μεθόδων διαχωρισμού ουσιών με παραπλήσιες χημικές ιδιότητες που συνυπάρχουν σε σύνθετα μείγματα. Η χρωματογραφία επιτρέπει ποιοτικό ή/και ποσοτικό προσδιορισμό των διαφορετικών ουσιών που περιέχονται στο μείγμα.

Κατά τη διάρκεια ενός χρωματογραφικού διαχωρισμού το δείγμα διαλύεται σε μια κινητή φάση (mobile phase) που μπορεί να είναι κάποιο αέριο, ρευστό ή υπερκρίσιμο ρευστό. Έπειτα η κινητή φάση διαπερνά μια στατική φάση (stationary phase), που βρίσκεται καθηλωμένη σε μια στήλη ή κάποια άλλη στερεή επιφάνεια.

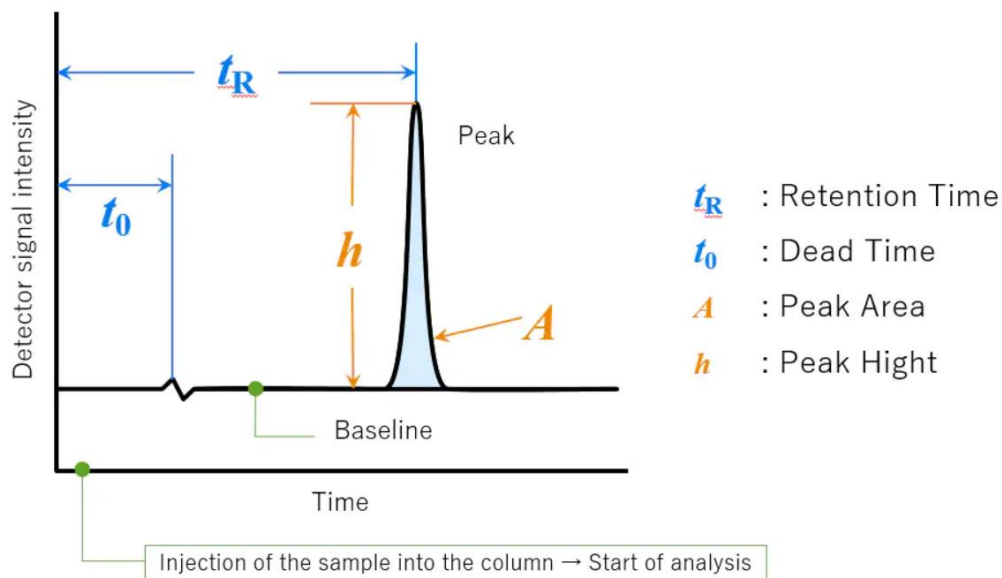
Πριν από την έναρξη της διαδικασίας πρέπει να έχει γίνει προσεκτική επιλογή φάσεων ώστε να γίνεται διαφορετικά η κατανομή των συστατικών του μείγματος σε κάθε μια, ώστε να μπορούν να διαχωριστούν με επιτυχία.

Κατά τη ροή της κινητής φάσης, κάποια συστατικά κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση και εκκλούνται με μικρότερη ταχύτητα ενώ άλλα δεν έχουν υψηλή συγγένεια με τη στατική φάση και εκκλούνται γρηγορότερα. Ως αποτέλεσμα της διαφορετικής αυτής κατανομής, τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται και το καθένα καταλαμβάνει διαφορετική ζώνη.

Σημαντικός παράγοντας στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων ενός χρωματογραφήματος, είναι η αραίωση του δείγματος. Κατά την πορεία του διαχωρισμού, οι αναλύτες σχεδόν πάντα αραιώνονται, όποτε το τελικό σήμα που φτάνει στον ανιχνευτή είναι σημαντικά μικρότερο σε σχέση με τη ζώνη ολόκληρου του δείγματος όταν αυτό εισάγεται αρχικά στη στήλη.

Στην έξοδο της στήλης, υπάρχει συζευγμένος ένας ανιχνευτής που αποκρίνεται στη συγκέντρωση των διαλυμένων ουσιών που περιέχονται στο υπό έκλυση δείγμα. Το σήμα που παράγεται από κάθε ουσία του δείγματος, όταν αυτή εκλύεται, καταγράφεται σε συνάρτηση με το χρόνο και λαμβάνεται τελικά ένα χρωματογράφημα με κορυφές που επιτρέπουν την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του δείγματος.

Αν ο διαχωρισμός έχει πραγματοποιηθεί σωστά, κάθε κορυφή στο τελικό χρωματογράφημα αντιστοιχεί σε ένα μόνο μόριο που περιέχεται στο δείγμα και είναι χαρακτηριστική για αυτό. Έτσι μπορεί να ταυτοποιηθεί το κάθε ένα συστατικό που περιέχεται στο δείγμα.



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση κορυφής σε χρωματογράφημα και σημαντικά χαρακτηριστικά.

Η θέση της κορυφής ως προς τον άξονα του χρόνου (**χρόνος συγκράτησης, retention time- $t_R$** ) είναι χαρακτηριστική για κάθε ουσία και επιτρέπει την ποιοτική ταυτοποίησή της, ενώ το ύψος ( **$h$** ) και το εμβαδόν της κορυφής ( **$A$** ) επιτρέπουν τον ποσοτικό προσδιορισμό του κάθε μορίου.

Οι κορυφές που αναλογούν σε κάθε συστατικό του μείγματος και αποτυπώνονται στο καταγραφικό σύστημα έχουν τη μορφή καμπύλων Gauss, όπως φαίνεται και στην *Εικόνα 1*.

### **Ποιότητα στήλης**

Ένα ποιοτικό χαρακτηριστικό μιας χρωματογραφικής στήλης είναι η Ικανότητα για διαχωρισμό (Column Efficiency) ή το Ύψος Θεωρητικών Πλακών (Height Equivalent of Theoretical Plates-*HEPT*).

Όσο αυξάνεται ο αριθμός των θεωρητικών πλακών, τόσο ανώτερη ποιοτικά είναι η στήλη.

Το **ύψος των θεωρητικών πλακών** μπορεί να υπολογιστεί με τον τύπο:

$$H = \frac{L}{N}$$

Όπου  $L$ : μήκος στήλης σε cm,

$N$ : αριθμός θεωρητικών πλακών

$H$ : μέσο ύψος θεωρητικών πλακών

Όπως φαίνεται από τον παραπάνω τύπο, ο αριθμός των θεωρητικών πλακών μπορεί να μεταβληθεί αλλάζοντας το μήκος της στήλης και τη διάμετρο των κόκκων του υλικού πλήρωσης (αλλάζει το ύψος των θεωρητικών πλακών).

Μεταβολή μπορεί να προκληθεί και μετά από αλλαγές στην ταχύτητα της κινητής φάσης.

Η **ικανότητα της στήλης** μπορεί να υπολογιστεί από τη σχέση:

$$N = \alpha \left( \frac{V_r}{W} \right)^2$$

Όπου  $V_r$ : όγκος συγκράτησης

$W$ : εύρος καμπύλης του Gauss

$\alpha$ : σταθερά αναλογίας

Οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την ικανότητα της στήλης είναι:

- α. η μέθοδος αποτίμησης της καμπύλης του Gauss για τις κορυφές
- β. η σύσταση του διαλύτη έκλουσης
- γ. η γραμμική ταχύτητα του διαλύτη
- δ. η θερμοκρασία

Ένα δεύτερο ποιοτικό χαρακτηριστικό μιας στήλης για χρωματογραφία είναι η **Διαχωριστική Ικανότητά** της (**Resolution - R**), που είναι μέτρο της δυνατότητας της στήλης να διαχωρίζει μεταξύ δύο ή και περισσότερων συστατικών.

Οι παράμετροι που καθορίζουν την παραπάνω ιδιότητα είναι:

- α. ο αριθμός θεωρητικών πλακών ( $N$ ),
- β. ο παράγοντας διαχωρισμού ( $\alpha$ ) και
- γ. ο παράγοντας χωρητικότητας για την ουσία που εκλύεται τελευταία ( $K_2'$ ).

Οι παράγοντες αυτοί εμφανίζονται στον τύπο από τον οποίο υπολογίζεται η διαχωριστική ικανότητα:

$$R = \left( \frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{K_2'}{K_2' + 1} \right)$$

Ο αριθμός θεωρητικών πλακών,  $N$ , είναι καθαρός αριθμός που επηρεάζεται από φυσικές παραμέτρους ενώ οι δύο παράγοντες  $\alpha$  και  $K_2'$  είναι περισσότερο χημικοί και σχετίζονται με τις αλληλεπιδράσεις των συστατικών του μείγματος που διαχωρίζεται, με τους διαλύτες που χρησιμοποιούνται και τις αλληλεπιδράσεις της στατικής με την κινητή φάση.

Τροποποιώντας τις συγκεκριμένους παραμέτρους, είναι δυνατό να βελτιωθεί η διαχωριστική ικανότητα της στήλης.

## 1.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

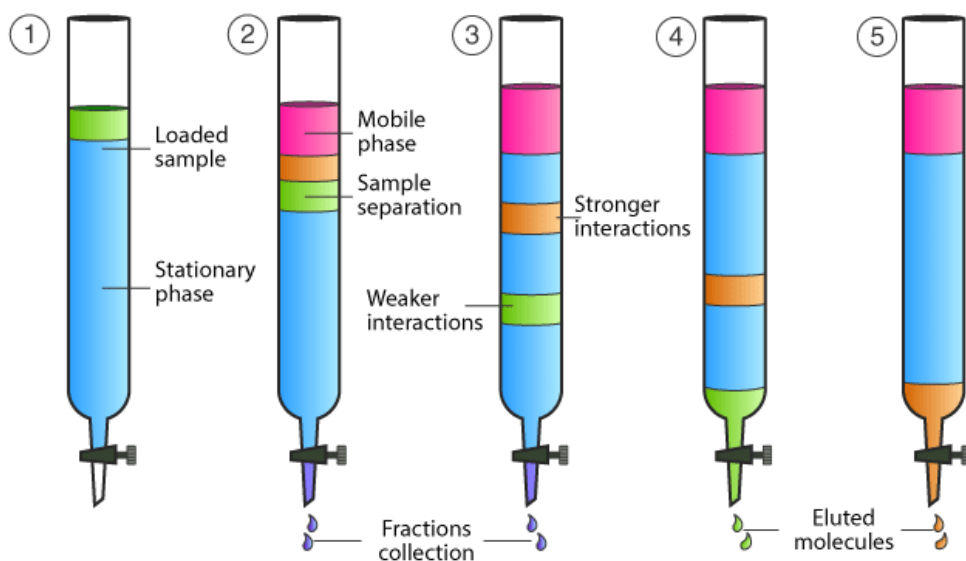
Στην υγρή χρωματογραφία ως κινητή φάση χρησιμοποιείται κάποιος υγρός διαλύτης και ως στατική φάση πιο συχνά χρησιμοποιούνται στερεά υλικά. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο για τον προσδιορισμό χημικών ενώσεων με χαμηλή πτητικότητα και θερμική αστάθεια.

Ο ιδανικός οργανικός διαλύτης για αναλύσεις με υγρή χρωματογραφία πρέπει να έχει τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

1. Να είναι υψηλής καθαρότητας, ειδικός για υγρή χρωματογραφία (LC-grade)
2. Να έχει όσο το δυνατόν χαμηλότερη τοξικότητα
3. Να μην καταστρέφει το προς ανάλυση δείγμα
4. Να μην είναι πτητικός
5. Να έχει μεγάλη ικανότητα διαχωρισμού
6. Να έχει χαμηλό ιξώδες
7. Να έχει χαμηλή πίεση επαναφοράς
8. Να μην αποσυντίθεται εύκολα
9. Να είναι δραστικός σε χαμηλές συγκεντρώσεις
10. Να έχει μικρό κόστος
11. Να μην απορροφά στο UV αν χρησιμοποιείται τέτοιος ανιχνευτής

Πρώτη επιλογή ως διαλύτης για αναλύσεις είναι η μεθανόλη, λόγω του χαμηλότερου κόστους και ιξώδους σε σχέση με άλλους διαλύτες, ενώ επόμενες επιλογές είναι η αιθανόλη και το ακετονιτρίλιο σε περιπτώσεις που δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί μεθανόλη.

Στη **χρωματογραφία στήλης (Column chromatography)**, η κινητή φάση διέρχεται με εφαρμογή πίεσης μέσω της στατικής φάσης, η οποία συγκρατείται σε μια στενή στήλη με τη βοήθεια της βαρύτητας (*Εικόνα 2*).



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση λειτουργίας χρωματογραφίας στήλης.

Η στήλη είναι ένας λεπτός σωλήνας με στενό άνοιγμα, στον οποίο βρίσκεται πακτωμένη λεπτόκοκκη, αδρανής, στερεή ουσία που συγκρατεί στην επιφάνειά της τη στατική φάση. Όταν προστίθεται η κινητή φάση, καταλαμβάνονται τα ενδιάμεσα κενά μεταξύ των πακτωμένων κόκκων, με αποτέλεσμα να έρχονται σε επαφή οι δύο φάσεις και να επιτρέπεται η κατανομή των ουσιών του μείγματος μεταξύ τους.

Η προσθήκη του υγρού έκλουσης επιτρέπει την παραλαβή των μορίων ή ιόντων των ουσιών από τη στήλη. Όσο εισάγεται επιπλέον κινητή φάση, ο αρχικός διαλύτης που περιέχει το δείγμα εξαναγκάζεται να κινηθεί κατά μήκος της στήλης και να επιτρέψει την κατανομή των συστατικών του μείγματος σε όλο και μεγαλύτερο τμήμα της στατικής φάσης. Ταυτόχρονα, ο καθαρός διαλύτης που εισάγεται, μπορεί να παραλάβει ουσίες που είχαν συγκρατηθεί προηγουμένως σε ανώτερα τμήματα της στατικής φάσης. Με συνεχιζόμενες προσθήκες νέου διαλύτη, τα μόρια των εκλουόμενων ουσιών μετακινούνται προς την έξοδο της στήλης με συνεχείς μεταφορές μεταξύ κινητής και στατικής φάσης.

Η μεταφορά των μορίων προς την έξοδο γίνεται αποκλειστικά με τη ροή της κινητής φάσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η ταχύτητα έκλουσης των ουσιών από τη στήλη να εξαρτάται από το χρονικό κλάσμα παραμονής της κάθε ουσίας στη φάση αυτή. Όσο περισσότερο κατακρατείται μια ουσία στη στατική φάση, τόσο μικρότερο το κλάσμα παραμονής και τόσο αργότερα εκλούνται από τη στήλη. Αντίθετα, μια ουσία με μικρή κατακράτηση από τη στατική φάση και μεγάλο κλάσμα παραμονής στην κινητή φάση, εκλούεται γρήγορα από τη στήλη. Οι διαφορές αυτές στην ταχύτητα έκλουσης είναι αυτές που δημιουργούν τις διαφορετικές ζώνες και διαχωρίζουν τις ουσίες που περιέχονται σε ένα μείγμα.

Η διαδικασία που ακολουθείται κατά τη χρωματογραφική ανάλυση ενός δείγματος είναι η εξής:

1. Ένεση του δείγματος στην κεφαλή της στήλης
2. Συνεχής προσθήκη καθαρού διαλύτη για έκλουση των ουσιών του δείγματος
3. Ανίχνευση των ζωνών διαφορετικών ουσιών
4. Συλλογή κλασμάτων ουσιών

Υπάρχουν τα παρακάτω είδη υγρής χρωματογραφίας:

- **Χρωματογραφία Προσρόφησης (Adsorption chromatography):** τα συστατικά του μείγματος διαχωρίζονται ανάλογα με το βαθμό προσρόφησης τους στη στατική φάση. Ανάλογα με την πολικότητα της κινητής και της στατικής φάσης η χρωματογραφία προσρόφησης χωρίζεται σε δύο τεχνικές:

- **Κανονικής φάσης (Normal phase chromatography):** τα συστατικά του μείγματος διαχωρίζονται βάσει της πολικότητάς τους. Η κινητή φάση αποτελείται από μη πολικό διαλύτη ενώ η στατική φάση είναι κατασκευασμένη από πολικό υλικό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα πολικά συστατικά να συγκρατούνται στη στήλη και να εκλούνται μετά από τα μη πολικά, τα οποία παρασύρονται πιο εύκολα από την κινητή φάση. Με το κατάλληλο σύστημα στατικής φάσης και διαλύτη/διαλυτών μπορεί να

γίνει κλασματοποίηση και συλλογή των διαφορετικών ουσιών που περιέχονται στο μείγμα.

- **Ανάστροφης φάσης (Reverse phase chromatography):** ακολουθεί ακριβώς την ίδια αρχή λειτουργίας με την κανονική φάση με τη διαφορά ότι σε αυτή την περίπτωση η κινητή φάση είναι πολική (συνήθως αποτελείται από νερό, μεθανόλη, ακετονιτρίλιο) και η στατική φάση είναι μη πολική (συνήθως σιλικόνη και διάφοροι υδρογονάνθρακες). Με αυτή την τεχνική πρώτα εκλούνται οι πολικές ενώσεις κι έπειτα ακολουθούν οι άπολες.

Η **Flash χρωματογραφία (Flash chromatography)** είναι μια τροποποιημένη χρωματογραφία προσρόφησης που επιτρέπει την ταχύτερη ροή της κινητής φάσης μέσω της εφαρμογής κενού ή αέρα υπό πίεση.

- **Χρωματογραφία διαμερισμάτων (Partition chromatography):** σε αυτή τη μέθοδο και οι δύο φάσεις είναι υγρές. Η στατική φάση αποτελείται από ένα υγρό μη αναμείξιμο με την κινητή. Βρίσκει εφαρμογή στο διαχωρισμό ομόλογων, μη ιοντικών ενώσεων.
- **Χρωματογραφία ιοντανταλλαγής (Ion exchange chromatography):** η στατική φάση έχει δεσμευμένες πλευρικές ομάδες αντίθετου φορτίου, συνήθως θειώδες ιόν ( $-SO_3^-$ ) ή τεταρτοταγή αμίνη ( $-N(CH_3)_3^+$ ), από αυτά που υπάρχουν στο υπό ανάλυση δείγμα. Ο διαχωρισμός βασίζεται στην ισορροπία ιοντανταλλαγής μεταξύ των ιόντων στο διάλυμα και των ιόντων της στήλης, τα οποία αλληλοεπιδρούν ηλεκτροστατικά.
- **Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (Size exclusion chromatography):** ο διαχωρισμός των ουσιών του μείγματος γίνεται βάσει του μεγέθους και του σχήματός τους. Η στατική φάση είναι κατασκευασμένη με μικρά μόρια πυριτίου ή πολυμερών ώστε να δημιουργούνται πόροι ορισμένου μεγέθους. Τα μικρότερα μόρια που μπορούν να διαπεράσουν τους πόρους, παγιδεύονται στη στήλη, καθυστερούν και εκλούνται αργότερα από τα μεγαλύτερα μόρια, που παρασύρονται από την κινητή φάση, χωρίς να αλληλοεπιδρούν με τη στατική φάση.
- **Χρωματογραφία συγγένειας (Affinity chromatography):** χρησιμοποιείται συνήθως για τον καθαρισμό πρωτεϊνών κατά την απομόνωσή τους. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με βάση τη σύνδεση ενός προσδέτη με τη στατική φάση της στήλης. Πριν την ανάλυση του δείγματος γίνεται προσθήκη ενός αντιδραστηρίου που συνδέεται χημικά με τα μόρια του δείγματος που είναι επιθυμητό να συγκρατηθούν στη στήλη και κατά την έκλυση, όλα τα υπόλοιπα μόρια που δεν έχουν τον προσδέτη παρασύρονται από την κινητή φάση. Με αλλαγή των συνθηκών έκλυσης, συνήθως του pH ή της ιοντικής δύναμης, μπορούν να σπάσουν οι δεσμοί του προσδέτη με τα μόρια και να απελευθερωθούν αυτά από τη στήλη. Μια παραλλαγή είναι η αγκυροβόληση του προσδέτη στη στατική φάση και η εκλεκτική δέσμευση των επιθυμητών υποκαταστατών όταν αυτοί βρίσκονται ελεύθεροι στην κινητή φάση.



- **Χρωματογραφία χειρικών κέντρων (Chiral chromatography):** επιτρέπει τον διαχωρισμό ρακεμικών μειγμάτων στα διαφορετικά επιμερή. Μπορεί να προστεθεί στην κινητή φάση ένα χειρικό μόριο ή να επιλεγθεί μια χειρική στατική φάση. Αυτό επιτρέπει την αναγνώριση του κάθε επιμερούς, τη δημιουργία ελκτικών δυνάμεων μεταξύ των δεσμών και το σχηματισμό συμπλόκων προσθήκης.

### 1.2.1 Υγρή χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης/Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography-HPLC)

Η HPLC είναι μια πιο σύγχρονη και βελτιωμένη μέθοδος βασισμένη στη χρωματογραφία συγγένειας. Πραγματοποιείται υπό κενό, σε υψηλές πιέσεις ώστε να μειωθεί ο χρόνος που απαιτείται ο διαχωρισμός και να μειωθεί το μέγεθος των στηλών που απαιτούνται χωρίς να μειωθεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων.

Πολύ συχνά αξιοποιείται η μέθοδος της **βαθμιδωτής έκλουσης** (gradient elution) δηλαδή η χρήση κατά το διαχωρισμό, δύο ή περισσότερων συστημάτων διαλυτών που διαφέρουν σημαντικά στην πολικότητα και σύστασή τους.

Αφού αρχίσει η έκλουση, μεταβάλλεται η αναλογία μεταξύ των διαφορετικών διαλυτών με προσχεδιασμένο τρόπο ώστε να επιτευχθεί ο καλύτερος διαχωρισμός των ουσιών που υπάρχουν στο δείγμα σε μικρότερο χρόνο.

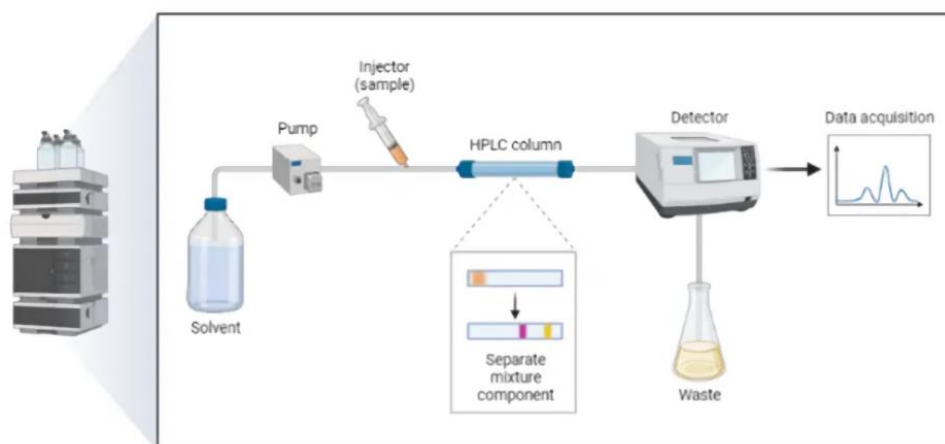
Αυτός όμως ο τρόπος έκλουσης απαιτεί πιο πολύπλοκο εξοπλισμό και έχει μεγαλύτερο κόστος. Επίσης είναι δύσκολη η διατήρηση σταθερής ταχύτητας ροής με τις αλλαγές που συμβαίνουν στην κινητή φάση, κάτι που μπορεί να επηρεάζει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί και η **ισοκρατική έκλουση**, κατά την οποία η σύσταση της κινητής φάσης παραμένει σταθερή αλλά απαιτεί περισσότερο χρόνο.

Σχεδόν όλοι οι σύγχρονοι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί με HPLC γίνονται σε ανάστροφη φάση, είναι εξαιρετικά σπάνια η χρήση κανονικής φάσης.

Ένα όργανο HPLC έχει ομοιότητες με κλασσικά συστήματα υγρής χρωματογραφίας αλλά είναι εξειδικευμένο ώστε να αντέχει τις υψηλές πιέσεις που εφαρμόζονται κατά το διαχωρισμό.

## High Performance Liquid Chromatography (HPLC)



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση ενός οργάνου HPLC.

Το κάθε όργανο HPLC αποτελείται από τα παρακάτω μέρη:

### A) Αντλίες

Οι αντλίες προωθούν το διαλύτη και το δείγμα κατά μήκος της στήλης υπό υψηλή πίεση. Για ελαχιστοποιείται η διακύμανση στα αποτελέσματα, η κάθε αντλία πρέπει να εξασφαλίζει και να διατηρεί σταθερή ταχύτητα ροής και πίεσης, χωρίς μεταβολές.

Υπάρχουν δύο τύποι αντλιών:

1. Αντλίες σταθερής ροής (constant flow pumps)
2. Αντλίες σταθερής πίεσης (constant pressure pumps)

### B) Αυτόματα συστήματα έγχυσης δείγματος (Autosamplers)

Τα αυτόματα συστήματα έγχυσης δείγματος παρεμβάλλονται μεταξύ της αντλίας και της στήλης και ο ρόλος τους είναι να εισάγουν μια ακριβή ποσότητα δείγματος από τον περιέκτη στον οποίο βρίσκεται το διάλυμα αυτό, στην αναλυτική στήλη του χρωματογραφου.

Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται χωρίς διακοπή της ροής του εκλουστικού συστήματος.

Τα αυτόματα συστήματα έγχυσης δείγματος αποτελούνται από:

1. τη βαλβίδα εισαγωγής
2. το βρόγχο δείγματος
3. τη μικροσύριγγα
4. το δίσκο στον οποίο τοποθετούνται τα δείγματα
5. τα φιαλίδια που τοποθετούνται στο σύστημα και περιέχουν τα προς ανάλυση δείγματα.

Το κάθε φιαλίδιο τοποθετείται σε συγκεκριμένη θέση στο δίσκο και γίνεται προγραμματισμός από το αντίστοιχη εφαρμογή στον Η/Υ ώστε η μικροσύριγγα να λάβει την ορισμένη ποσότητα δείγματος από το κάθε φιαλίδιο και να τη

διοχετεύσει στο βρόγχο της βαλβίδας, ώστε να προωθηθεί μετά στη στήλη και να ξεκινήσει ο χρωματογραφικός διαχωρισμός. Λόγω του προγραμματισμού αυτού, είναι δυνατό να γίνει εισαγωγή διαφορετικών ποσοτήτων δείγματος από κάθε φιαλίδιο, εάν κάτι τέτοιο είναι επιθυμητό.

Αυτά τα συστήματα αυξάνουν την επαναληψιμότητα και την ακρίβεια των αναλύσεων αφού πάντα προστίθεται η ίδια, καθορισμένη ποσότητα δείγματος. Πρέπει να έχουν αρκετά μεγάλο εύρος στον όγκο δείγματος που μπορούν να χειριστούν, να ολοκληρώνεται γρήγορα η διαδικασία ένεσης του δείγματος στη στήλη και να είναι πολύ χαμηλή η μεταφορά ιχνών (carryover) μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων που αναλύονται σε σειρά. Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι τέτοιων συστημάτων.

### Γ) Στήλες

Υπάρχουν οι παρακάτω κατηγορίες στηλών ανάλογα με τη χρήση τους:

- Προστήλες
- Αναλυτικές στήλες
- Ημι-παρασκευαστικές στήλες
- Παρασκευαστικές στήλες

Πολύ συχνά χρησιμοποιούνται οι προστήλες και ακόμα περισσότερο οι αναλυτικές στήλες, που αποτελούν την καρδιά μιας χρωματογραφικής μεθόδου.

Οι **προστήλες** τοποθετούνται μεταξύ του συστήματος εισαγωγής δείγματος και της αναλυτικής στήλης, ώστε να την προστατεύσουν κατά την εισαγωγή δειγμάτων που δεν έχουν υποστεί κάποια ιδιαίτερη προκατεργασία και μπορεί να περιέχουν αιωρούμενα σωματίδια ή ενώσεις που προσροφώνται πολύ ισχυρά στη στήλη και θα την κατέστρεφαν. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παράταση του χρόνου ζωής μιας αναλυτικής στήλης και την αύξηση της απόδοσής της χωρίς να επηρεάζεται μεταβολή στην ποιότητα του χρωματογραφήματος.

Οι προστήλες περιέχουν το ίδιο υλικό πλήρωσης με την αναλυτική στήλη που χρησιμοποιείται αλλά με πιο μικρό μέγεθος πόρων ενώ είναι μικρότερες και σε μήκος.

Η επιλογή της **αναλυτικής στήλης** είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας σε μια χρωματογραφική ανάλυση. Πρέπει να έχει τα κατάλληλα χαρακτηριστικά, ώστε να επιτρέπει το σωστό διαχωρισμό των διαφορετικών ουσιών που περιέχονται σε ένα δείγμα με ακρίβεια και επαναληψιμότητα.

Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι:

- τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της στήλης (μήκος, διάμετρος)
- το μέγεθος των μορίων του υλικού πλήρωσης και τη διάμετρο των πόρων του
- τον τύπο του αδρανούς μέρους του υποστρώματος
- το είδος της χαρακτηριστικής ομάδας που βρίσκεται καθηλωμένη στο υπόστρωμα, αφού αυτή καθορίζει και την εκλεκτικότητα της στατικής φάσης

Το μήκος των αναλυτικών στηλών κυμαίνεται από 10 – 30 cm και η διάμετρός τους από 4 – 5 cm.

Όσο μικρότερη είναι η διάμετρος των σωματιδίων των υλικών πλήρωσης, τόσο γρηγορότερος και καλύτερος ο διαχωρισμός αλλά είναι πιο πολλά τα προβλήματα που μπορεί να προκύψουν κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, π.χ. μπλοκάρισμα της στήλης. Επίσης, για το διαχωρισμό μακρομορίων πρέπει να γίνει επιλογή υλικών πλήρωσης με μεγαλύτερους πόρους.

Συχνότερα χρησιμοποιούνται στήλες ανεστραμμένης φάσης με υδρόφοβη στατική φάση (π.χ. C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub>, κυάνο, άμινο) και υδρόφιλους διαλύτες. Μη πολικά μόρια συγκρατούνται περισσότερο στη στήλη, ενώ υδρόφιλα μόρια εκλούνται πιο εύκολα.

#### **Δ) Ανιχνευτές**

Οι ανιχνευτές θα πρέπει οπωσδήποτε να παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία ως προς τις υπό προσδιορισμό ουσίες, να παρέχουν στοιχεία για την ταυτοποίηση τους καθώς και να εμφανίζουν γραμμικότητα στις συγκεντρώσεις στις οποίες περιέχονται οι ουσίες στο δείγμα.

Επίσης, θα πρέπει να αποκρίνονται γρήγορα στις αλλαγές, χωρίς να παράγουν υψηλό επίπεδο θορύβου και να λειτουργούν με τον ίδιο τρόπο ανεξάρτητα από μεταβολές της θερμοκρασίας, της σύστασης της κινητής φάσης και της ροής.

Εξίσου σημαντική με τους παραπάνω παράγοντες είναι και η όσο το δυνατόν μικρότερη καταστροφή του υπό ανάλυση δείγματος.

Σε αναλύσεις με υγρή χρωματογραφία χρησιμοποιούνται τα παρακάτω είδη ανιχνευτών:

- υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), που ανιχνεύουν τη συγκέντρωση των ουσιών που περιέχονται στο δείγμα χρησιμοποιώντας την απορρόφηση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας σε συγκεκριμένα μήκη κύματος.
- ηλεκτρικής αγωγιμότητας, που λόγω των ηλεκτροδίων που διαθέτουν, στα οποία εφαρμόζεται ορισμένο δυναμικό, ανιχνεύουν αλλαγές στο ηλεκτρικό ρεύμα ανάλογα με την παρουσία συγκεκριμένων ιόντων, όταν αυτά εκλουσθούν από τη στήλη.
- φθορισμού, που ανιχνεύουν το φως που εκπέμπει μια φθορίζουσα ουσία όταν έχει απορροφήσει ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος και συγκρίνουν τα δύο φάσματα εκπομπής και απορρόφησης ώστε να ανιχνευτεί και να ποσοτικοποιηθεί η φθορίζουσα ουσία. Μπορεί να υπάρχουν εγγενώς φθορίζουσες ενώσεις στο δείγμα ή να γίνει σύζευξη φθορίζουσών μορίων-ετικετών (tags) στις ουσίες που υπάρχει ενδιαφέρον να ανιχνευτούν αλλά δεν έχουν οι ίδιες την ικανότητα φθορισμού.

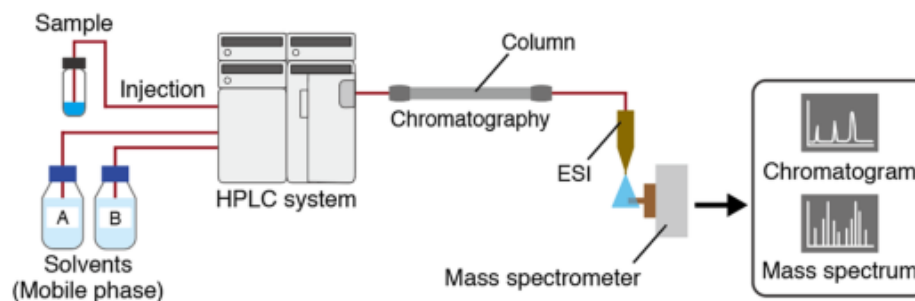
- δείκτη διάθλασης, που μετρούν τις αλλαγές στη διάθλαση μιας ακτίνας φωτός όταν αυτή διαπερνά το υπό ανάλυση δείγμα σε σχέση με τη διάθλαση τις ίδιες ακτίνας φωτός όταν διαπερνά μόνο τον διαλύτη. Χρησιμοποιούνται για ουσίες με περιορισμένη ή καθόλου απορρόφηση στο φως UV.

Πλέον, για ακόμα μεγαλύτερη εγκυρότητα στον διαχωρισμό και προσδιορισμό διαφορετικών χημικών ενώσεων που περιέχονται σε ένα δείγμα, χρησιμοποιείται ο συνδυασμός δύο πολύ σημαντικών αναλυτικών τεχνικών: της υγρής χρωματογραφίας και της φασματομετρίας μαζών.

Η νέα τεχνική της υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μαζών (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry –LC/MS), συνδυάζει τα πλεονεκτήματα των δύο μεθόδων (εύκολος διαχωρισμός πολλών, διαφορετικών ουσιών, ταυτοποίηση υπολειμμάτων) και επιτρέπει την εξαγωγή ακόμα πιο αξιόπιστων αποτελεσμάτων.

Στη συνδυασμένη αυτή τεχνική, το υγρό που ελκούεται από τη στήλη μετά το χρωματογραφικό διαχωρισμό, οδηγείται απευθείας στην πηγή ιόντων του φασματόμετρου μάζας, αφού έχει πρώτα απομακρυνθεί η μεγαλύτερη ποσότητα διαλύτη.

Στην *Εικόνα 4* γίνεται αναπαράσταση ενός τέτοιου συστήματος.



*Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση ενός συστήματος HPLC/MS.*

Μια ακόμα πιο νέα προσέγγιση είναι ο συνδυασμός της υγρής χρωματογραφίας με φασματογράφους Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance-NMR) για ανάλυση της δομής των μορίων που εκλούνται από τη στήλη του χρωματογράφου.

### **Ε) Συστήματα καταγραφής**

Στη σημερινή εποχή χρησιμοποιούνται ηλεκτρονικοί υπολογιστές για την καταγραφή και την επεξεργασία των σημάτων που προέρχονται από τους ανιχνευτές του οργάνου.

Η παραγωγή του χρωματογραφήματος γίνεται αυτόματα και μέσω του ειδικού προγράμματος που βρίσκεται εγκατεστημένο στο συνδεδεμένο με το όργανο Η/Υ, μπορούν να γίνουν παρεμβάσεις σε διάφορες παραμέτρους (π.χ. στον τρόπο ολοκλήρωσης των κορυφών ή στην κατασκευή πρότυπης καμπύλης για ποσοτική ανάλυση) από τους ερευνητές ώστε να ερμηνευτούν με ακόμα μεγαλύτερη ακρίβεια τα δεδομένα που λαμβάνονται από το σύστημα.

### **1.3 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ**

Οι χρωματογραφικές μέθοδοι και ιδιαίτερα η υγρή χρωματογραφία βρίσκουν εφαρμογή σε όλους τους πιθανούς τομείς που απαιτούν χημικές αναλύσεις.

Είναι μια από τις πιο διαδεδομένες αναλυτικές μεθόδους στην έρευνα και τη βιομηχανία σε πεδία όπως:

- η ιατρική/κλινική χημεία, η φαρμακευτική
- η βιοχημεία
- η χημεία τροφίμων
- η σύνθεση χημικών ενώσεων
- η χημεία περιβάλλοντος και πολλά άλλα.

## 2. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (MASS SPECTROMETRY - MS)

### 2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Η φασματομετρία μάζας μπορεί να παρέχει πληροφορίες που αφορούν

1. Τη στοιχειακή σύσταση του εξεταζόμενου δείγματος
2. Τις δομές των μορίων (ανόργανων, οργανικών, βιολογικών)
3. Την ποιοτική και ποσοτική σύσταση σύνθετων δειγμάτων
4. Τη δομή και τη σύσταση στερεών επιφανειών
5. Την αναλογία ισοτόπων ατόμων σε δείγματα

Η μέθοδος βασίζεται στην παραγωγή ιοντισμένων μορφών ατόμων, μορίων ή θραυσμάτων μορίων, την εφαρμογή πεδίου στις ιοντισμένες αυτές μορφές και στην καταγραφή της σχετικής έντασης του ιοντικού ρεύματος που αντιστοιχεί σε κάθε λόγο μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ). Η ένταση αυτή μπορεί να αποδοθεί σε ένα φάσμα μαζών και υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες, είναι χαρακτηριστική για κάθε μορφή και επιτρέπει στον προσδιορισμό αυτής αλλά και της αρχικής ένωσης ή ατόμου.

Ολόκληρη η διαδικασία πραγματοποιείται υπό κενό ώστε να γίνεται σύγκρουση των ηλεκτρονίων μόνο με τα μόρια της υπό ανάλυσης ένωσης και όχι με όλα τα μόρια που μπορεί να περιέχονται στον ατμοσφαιρικό αέρα αλλά και για να μην συγκρούονται τα παραγόμενα ιόντα με μόρια ατμοσφαιρικού αέρα που θα οδηγούσαν στην καταστροφή τους.

Πιο αναλυτικά, όταν ένα δείγμα εισάγεται στο φασματόμετρο μάζας, τα μόρια που περιέχονται σε αυτό βομβαρδίζονται με δραστικά ηλεκτρόνια ώστε να περάσουν σε διεγερμένη κατάσταση και να παραχθούν διεγερμένες μορφές τους, τα μοριακά ιόντα. Τα μοριακά ιόντα έχουν ίδιο μοριακό βάρος με το μητρικό μόριο αλλά είναι ριζικά ιόντα.

Η αποδιέγερση του μοριακού ιόντος συχνά επιτυγχάνεται μέσω της διάσπασής του σε ιόντα μικρότερης μάζας. Τα θετικά ιόντα που παράγονται από την πρόσκρουση με ηλεκτρόνια, έλκονται μέσω της σχισμής του φασματομέτρου μαζών και διαχωρίζονται βάσει του λόγου μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ). Από αυτό τον διαχωρισμό προκύπτει το φάσμα μαζών, που σχετίζει τις εντάσεις των διαφόρων κορυφών μαζών με το λόγο  $m/z$ .

Ο **λόγος μάζας προς φορτίο ( $m/z$ , *mass-to-charge ratio*)** είναι αποτέλεσμα της διαίρεσης της ατομικής ή μοριακής μάζας του ιόντος ( $m$ ) με τον αριθμό των φορτίων που φέρει ( $z$ ).

Ένα τυπικό φασματόμετρο μαζών αποτελείται από πέντε επί μέρους τμήματα:

1. το **σύστημα εισαγωγής δείγματος**, το οποίο εισάγει μικρή ποσότητα δείγματος σε αέρια ή υγρή μορφή και το εξαερώνει πριν εισαχθεί στο χώρο ιοντισμού
2. την **πηγή ιόντων**, στην οποία γίνεται η μετατροπή των μορίων του δείγματος σε ιοντικές μορφές, είτε με βομβαρδισμό τους με ηλεκτρόνια,

- ιόντα, μόρια ή φωτόνια, είτε με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου ή υψηλής θερμοκρασίας
- τον **αναλυτή μαζών**, όπου διαχωρίζονται τα ιόντα βάσει του λόγου  $m/z$  του καθενός
  - τον **ανιχνευτή**, όπου δεσμεύονται τα ιόντα και μετατρέπονται σε ηλεκτρικό σήμα ανάλογο του αριθμού τους και του φορτίου τους ανά μονάδα χρόνου
  - το **σύστημα κενού**, που επιτρέπει τη σωστή λειτουργία ολόκληρου του οργάνου σε συνθήκες υψηλού κενού. Στα περισσότερα φασματόμετρα μαζών το σύστημα αυτό αποτελείται από συνδυασμό αντλιών.

Τα δεδομένα από τον ανιχνευτή ψηφιοποιούνται, εξάγονται και γίνεται επεξεργασία τους μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή.

Τελικά λαμβάνεται ένα ραβδόγραμμα, στο οποίο η μεγαλύτερη κορυφή ονομάζεται βασική κορυφή (base peak) και αυθαίρετα παίρνει την τιμή 100, ενώ για όλες τις υπόλοιπες κορυφές, ο υπολογισμός γίνεται με αναφορά στο % ποσοστό του ύψους τους σε σχέση με τη βασική κορυφή.

Η αναγνώριση της βασικής κορυφής πραγματοποιείται αυτόματα από το όργανο και επίσης γίνεται κανονικοποίηση των υπολοίπων κορυφών ως προς τη βασική.



Εικόνα 5: Σχηματικό διάγραμμα οργανολογίας ενός φασματόμετρου μαζών.

### 2.1.1 Εφαρμογές της φασματομετρίας μάζας

Στη σημερινή εποχή, η τεχνική αυτή βρίσκει ευρεία χρήση στη διεκρίνιση δομών διαφόρων μορίων, ιδιαίτερα νεοσυντιθέμενων ή μορίων φυσικής προέλευσης που για πρώτη φορά απομονώνονται.

Μια άλλη διαδεδομένη εφαρμογή είναι η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση άγνωστων μειγμάτων από διάφορες πηγές π.χ. κλινικές και ιατροδικαστικές αναλύσεις, χημικοί έλεγχοι ποιότητας σε νερό, τρόφιμα.

### 2.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΙΟΝΤΙΣΜΟΥ

Η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής ιοντισμού είναι καθοριστικής σημασίας για την ποιότητα της ανάλυσης. Ανάλογα με τη φύση των υπό ανάλυση ουσιών, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί «μαλακή» ή «σκληρή» τεχνική.

Για ευαίσθητες ουσίες, χρησιμοποιείται κυρίως η τεχνική του ψεκασμού σε ηλεκτρικό πεδίο (Electron Spray Ionization-ESI) ή η νεότερη τεχνική Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI), που επιτρέπουν τον ιοντισμό σε ήπιες συνθήκες, με μικρή ή μηδαμινή θραύση της μητρικής ουσίας.



Για λιγότερο ευαίσθητες ουσίες, μπορούν να εφαρμοστούν τεχνικές με χρήση υψηλής ενέργειας όπως ο βομβαρδισμός με ηλεκτρόνια (EI), που οδηγούν συνήθως στη διάσπαση της μητρικής ένωσης σε θυγατρικές.

Ο ιοντισμός στην πλειοψηφία των σύγχρονων φασματομέτρων μάζας πραγματοποιείται σε αέρια φάση και σε υψηλή θερμοκρασία.

Οι προς ανάλυση ενώσεις πρέπει να είναι σταθερές στη θέρμανση, όχι πτητικές σε θερμοκρασία κάτω από 500°C και για τις περισσότερες τεχνικές, η μάζα τους να είναι κάτω από 1000 Da.

Στον Πίνακα 1 αναφέρονται συνοπτικά οι βασικές τεχνικές ιοντισμού που χρησιμοποιούνται σε σύγχρονες αναλύσεις και για ποιες περιπτώσεις είναι κατάλληλες.

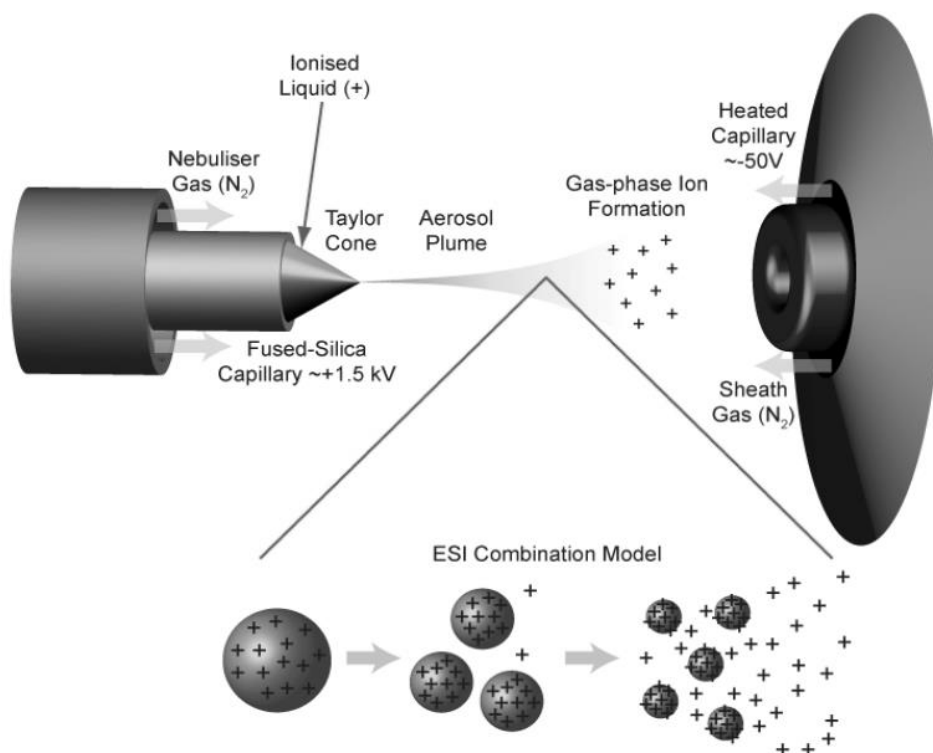
Πίνακας 1: Κύριες τεχνικές ιοντισμού και πού μπορούν να εφαρμοστούν.

Τεχνική Ιοντισμού	Κύρια ιόντα	Αναλυτής μαζών	Κατηγορίες ενώσεων
Ιοντισμός ηλεκτρονίων	$M^+$ , θυγατρικά ιόντα	$B^a$ , $Q^b$ , TRAP <sup>c</sup>	Μη πολικές, κάποιες πολικές  <1000 dalton
Χημικός ιοντισμός	$[M+H]^+$ $[M-H]^-$ , $M^+$ , $M^-$	B, Q, TRAP	Μη πολικές, κάποιες πολικές  <1000 dalton
Βομβαρδισμός ατομα (FAB)	με $[M+H]^+$ $[M-H]^-$	B, Q	Πολικές οργανικές, πρωτεΐνες, οργανομεταλλικές  <10.000 dalton
Thermospray	$[M+H]^+$ $[M+NH_4]^+$	B, Q	Πολικές, κάποιες μη πολικές, οργανικές  <1000 dalton
MALDI	$[M+H]^+$ $[M-H]^-$	TOF <sup>d</sup> , Orbitrap	Πολικές, κάποιες μη πολικές, βιοπολυμερή, συνθετικά πολυμερή  <10 <sup>6</sup> dalton
Electrospray	$[M+H]^+$ $[M+NH_4]^+$ $[M-H]^-$	B, Q, TRAP, TOF, QTOF, FTMS <sup>e</sup> , Orbitrap	Μη πολικές, κάποιες πολικές  <1000 dalton

<sup>a</sup>B: magnetic sector, <sup>b</sup>Q: Quadrupole, <sup>c</sup>TRAP: Ion Trap, <sup>d</sup>TOF: Time-of-flight, <sup>e</sup>FTMS: Fourier Transform Mass Spectrometer

### 2.2.1 Ψεκασμός σε ηλεκτρικό πεδίο (Electrospray Ionization-ESI)

Η τεχνική ψεκασμού σε ηλεκτρικό πεδίο είναι η μόνη που επιτρέπει την ανάλυση μορίων με μάζα έως και 200000 Da, άρα είναι πολύ χρήσιμη στη μελέτη βιολογικών μακρομορίων, όπως οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα. Είναι επίσης κατάλληλη για θερμικά ασταθείς, μη πτητικές ενώσεις, αφού η θραύση που προκαλείται λόγω αυτής της διαδικασίας είναι περιορισμένη. Για τους παραπάνω λόγους είναι η πιο κοινή πηγή ιόντων σε σύζευξη υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μαζών (LC-MS).



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση αρχής λειτουργίας πηγής ιόντων ESI.

Μέσω του ESI, τα ιόντα που έχουν δημιουργηθεί στο διάλυμα του υπό ανάλυση δείγματος μετατρέπονται σε ιόντα σε αέρια φάση. Αυτό γίνεται με την παρακάτω διαδικασία: το δείγμα σε μορφή διαλύματος εισάγεται στο σύστημα εν ροή μέσω ενός τριχοειδούς σωλήνα. Παράλληλα με τον σωλήνα αυτό, βρίσκεται ένας δεύτερος, εξωτερικός σωλήνας, που διαβιβάζει αέριο ώστε να δημιουργηθεί εκνέφωμα στην άκρη του τριχοειδούς (συνήθως  $N_2$ , αέριο εκνέφωσης-nebulizer gas). Το υγρό στην άκρη του τριχοειδούς σωλήνα διασπείρεται σε πολύ μικρές φορτισμένες σταγόνες ενώ εφαρμόζεται θετικό ή αρνητικό δυναμικό της τάξης των 3,5 – 5 V στο ηλεκτρόδιο που βρίσκεται ακριβώς απέναντι. Η παρουσία ρεύματος αερίου (συνήθως  $N_2$ , κύριο αέριο-sheath gas) διευκολύνει την εξατμισμό του διαλύτη και τη συρρίκνωση των σταγονιδίων. Παράλληλα, το υψηλό δυναμικό ωθεί ιόντα με κοινή πολικότητα να μετακινηθούν προς την επιφάνεια του υγρού και τελικά να σχηματίσουν τον κώνο Taylor (Taylor cone). Με την πάροδο του χρόνου μειώνεται όλο και περισσότερο το μέγεθος των σταγονιδίων και όταν τελικά εξατμιστεί όλη η ποσότητα του διαλύτη, αυτό που παραμένει είναι τα φορτισμένα μόρια του αναλύτη.

### 2.3 ΑΝΑΛΥΤΗΣ ΜΑΖΩΝ

Ο ιδανικός αναλυτής μαζών πρέπει να έχει την ικανότητα να διαχωρίζει μάζες μορίων που διαφέρουν ελάχιστα μεταξύ τους ενώ ταυτόχρονα να επιτρέπει τη ροή αρκετών ιόντων για να μπορεί να παραχθεί μετρήσιμο σήμα από το ρεύμα ιόντων.

Η ικανότητα του αναλυτή μάζας να διαχωρίζει μάζες αναφέρεται ως *διακριτική ικανότητα* ή *διακρισιμότητα* (Resolution- $R$ ).

Ο τύπος αναλυτή μαζών είναι ο καθοριστικός παράγοντας της διακριτικής ικανότητας του οργάνου και είναι εξαιρετικής σημασίας για την ποιότητα των αποτελεσμάτων. Η διακριτική ικανότητα αποτελεί το βασικό σημείο διαφοράς μεταξύ των διαφορετικών φασματομέτρων μαζών.

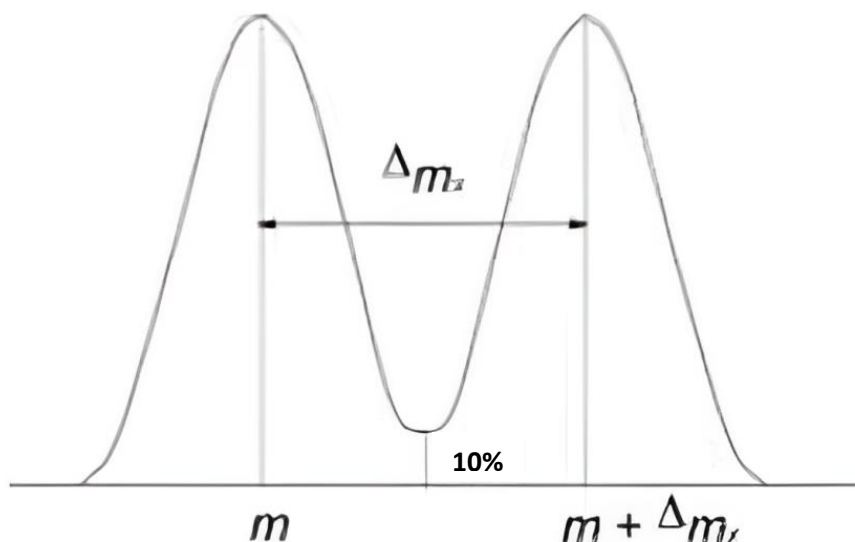
Η σχέση από την οποία υπολογίζεται η διακριτική ικανότητα ενός οργάνου είναι η:

$$R = \frac{M}{\Delta M}$$

Όπου  $M$ : μάζα της πρώτης κορυφής

$\Delta M$ : διαφορά μαζών δύο διαδοχικών κορυφών

Για παράδειγμα, για φασματομέτρο με  $R=1000$  όταν η μάζα είναι 100.0, είναι δυνατός ο διαχωρισμός μεταξύ μορίου με μάζα 100.0 και μορίου με μάζα 100.1 ( $\Delta M=0.1$ ).



Εικόνα 7: Ικανοποιητική Διακριτική Ικανότητα.

Ικανοποιητικός θεωρείται ο διαχωρισμός των ιόντων ως προς το λόγο  $m/z$  όταν η επικάλυψη δύο κορυφών με παρόμοιο ύψος δεν υπερβαίνει το 10% του ύψους των κορυφών.

Ανάλογα από τις εφαρμογές για τις οποίες χρησιμοποιείται το κάθε φασματόμετρο μαζών, απαιτείται διαφορετική διακριτική ικανότητα.

Οι συνηθέστεροι τύποι αναλυτών μαζών είναι οι:

1. Αναλυτής απλής εστίασης
2. Αναλυτής διπλής εστίασης
3. Παγίδα ιόντων (Ion trap)
4. Αναλυτής Χρόνου Πτήσης (Time of Flight-TOF)
5. Υβριδικός αναλυτής Orbitrap
6. Τετραπολικός αναλυτής (Quadrupole)

Στον Πίνακα 2 συγκρίνονται τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των κοινών αναλυτών μάζας.

Πίνακας 2: Σύγκριση χαρακτηριστικών κοινών αναλυτών μάζας.

Φασματόμετρο μαζών	Διακριτική ικανότητα (FWHM)	Ακρίβεια Μάζας (ppm)	Ευαισθησία (g)
Quadrupole	έως 5000	50	$10^{-15}$ (SRM)
Quadrupole ion trap	10000	50	$10^{-15}$
Time of flight	20000	3	$10^{-12}$ (full scan)
Magnetic Sector	50000	≈1	$10^{-12}$
Orbitrap	100000	2	$10^{-15}$ (full scan)
FT-ICR	1000000	≈1	$10^{-12}$ (full scan)

Η διακριτική ικανότητα ( $R$ ) εξαρτάται από το λόγο  $m/z$  και την ταχύτητα σάρωσης με την οποία λειτουργεί το όργανο. Για τα όργανα που τα αποτελέσματά τους προκύπτουν μετά από μετασχηματισμό Fourier, όπως το Orbitrap, σημαντικός παράγοντας είναι και το μέγεθος και η σταθερότητα του μαγνητικού πεδίου καθώς και από η ακρίβεια μέτρησης της συχνότητας που παράγεται.

Η ευαισθησία του κάθε αναλυτή εξαρτάται από την ικανότητα ιοντισμού της κάθε ουσίας.

### 2.3.1 Υβριδικός αναλυτής Orbitrap

Ο αναλυτής μάζας Orbitrap είναι ακριβής και μικρού μεγέθους ανιχνευτής. Ήταν ο πρώτος υψηλής απόδοσης ανιχνευτής που βασίστηκε στην τροχιακή «παγίδευση» των ιόντων σε ηλεκτροστατικά πεδία.

Οι μέχρι τότε αναλυτές μάζας που χρησιμοποιούσαν «παγίδες» ιόντων είχαν αρκετά μειονεκτήματα όσον αφορά την απόδοση (χαμηλή ακρίβεια, περιορισμένη γραμμική περιοχή, μειωμένη ικανότητα φόρτισης κλπ), την πολυπλοκότητα της οργανολογίας τους και το κόστος τους.

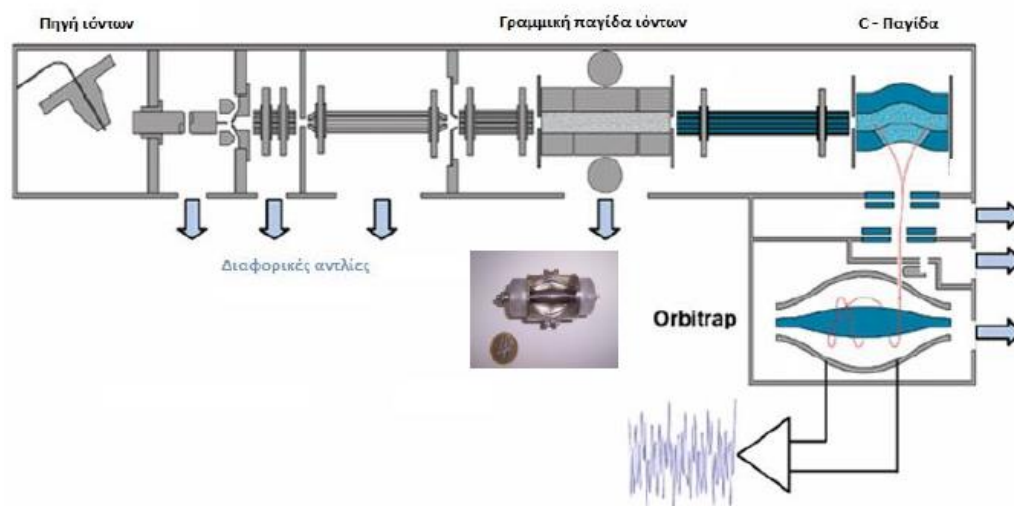
Ο αναλυτής μαζών Orbitrap κατάφερε να ξεπεράσει πολλά από τα μειονεκτήματα των παλαιότερων ανιχνευτών και είναι πλέον αναπόσπαστο κομμάτι των σύγχρονων φασματομετρικών αναλύσεων μάζας.

Έχει πολύ καλύτερη διακριτική ικανότητα, ακρίβεια μάζας, χωρητικότητα φορτίων, εύρος γραμμικότητας, μικρό μέγεθος όσον αφορά την οργανολογία και χαμηλότερο κόστος σε σχέση με άλλους αναλυτές.

### **Αρχή λειτουργίας**

Μετά την έκλουσή τους από την πηγή ιοντισμού του φασματογράφου μάζας, τα ιόντα παγιδεύονται στον αναλυτή μαζών LTQ. Εκεί μπορούν να αναλυθούν με χρήση μεθόδων σαρώσεως MS και MS<sup>n</sup>.

Στη συνέχεια, εκχέονται αξονικά και παγιδεύονται σε παγίδα ιόντων C-type (C-Trap), από την οποία μεταφέρονται στο Orbitrap (Εικόνα 8).



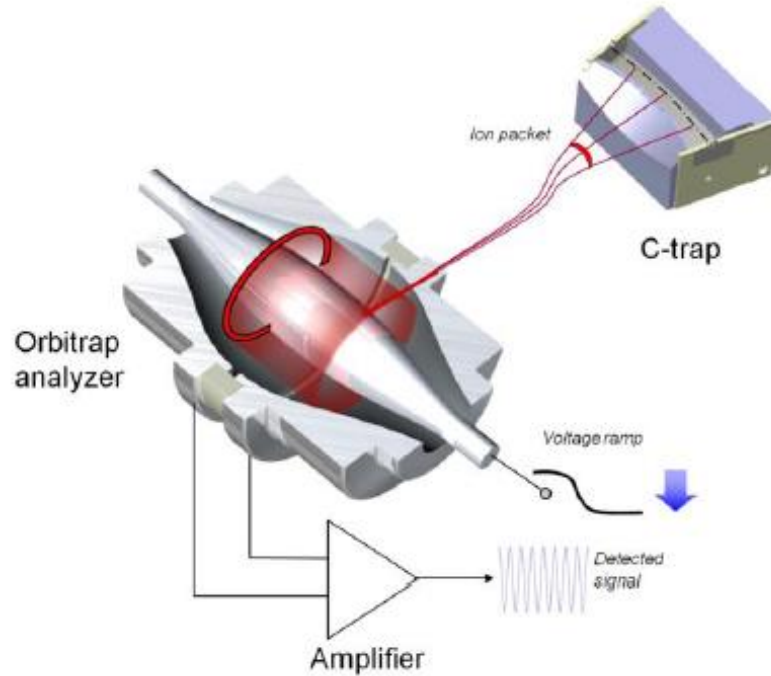
Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση αναλυτή LTQ-Orbitrap.

Το Orbitrap αποτελείται από τρία ηλεκτρόδια κωνικού σχήματος, δύο εξωτερικά κι ένα κεντρικό που στηρίζει την παγίδα και την κατευθύνει στο χώρο.

Όταν εφαρμοστεί τάση μεταξύ των εξωτερικών και του κεντρικού ηλεκτροδίου, δημιουργείται ένα αυστηρώς γραμμικό ηλεκτρικό πεδίο και επιτρέπει σε αρμονικές ταλαντώσεις.

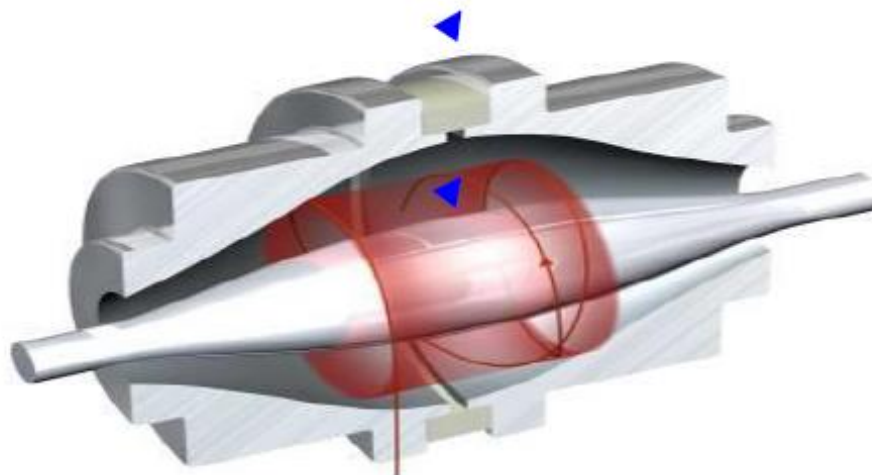
Ταυτόχρονα, το ακτινικό τμήμα του πεδίου έλκει ισχυρά ιόντα προς το κεντρικό ηλεκτρόδιο.

Έτσι, μετά από απότομη άνοδο του δυναμικού, τα ιόντα μετακινούνται από τη C-Trap στο Orbitrap, όπου παγιδεύονται και κινούνται κυκλικά γύρω από το κεντρικό ηλεκτρόδιο ενώ παράλληλα ταλαντώνονται κατά μήκος του οριζόντιου άξονα ως προς το κεντρικό ηλεκτρόδιο (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Σύζευξη της παγίδας C με τον υβριδικό αναλυτή Orbitrap. Μικρά πακέτα ιόντων μεταφέρονται από την παγίδα C στο Orbitrap με απότομη αλλαγή του δυναμικού.

Τα ιόντα είναι παγιδευμένα σε υπερκενό και έχουν πολύ μεγάλη κινητική ενέργεια. Όταν έχουν καθοριστεί σωστά οι παράμετροι, τα ιόντα παραμένουν μέσα στην παγίδα σε σχεδόν κυκλικές σπείρες (Εικόνα 10).

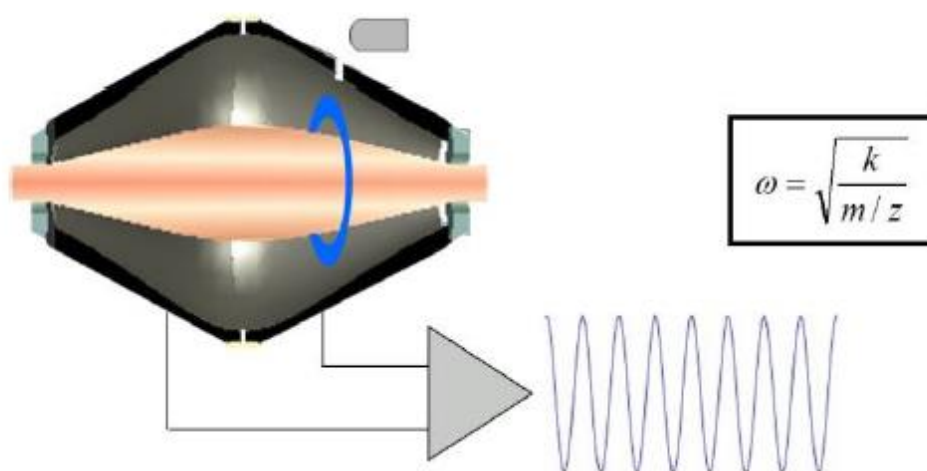


Εικόνα 10: Απεικόνιση τροχιακού αναλυτή μαζών Orbitrap.

Τα εξωτερικά ηλεκτρόδια δρουν ως ανιχνευτές των αρμονικών αξονικών ταλαντώσεων σε μορφή ρεύματος, το οποίο αποτυπώνεται και μετά από ενίσχυση του αρχικού σήματος και χρήση αλγόριθμου μετατροπής Fourier, δημιουργείται ένα ψηφιακό σήμα (φάσμα συχνοτήτων).

Διαφορετικά ιόντα ταλαντεύονται σε διαφορετικές συχνότητες, κάτι που επιτρέπει το διαχωρισμό τους.

Το φάσμα συχνοτήτων που λαμβάνεται ως αποτέλεσμα της αναλυτικής μεθόδου, μετατρέπεται με ευκολία σε φάσμα μαζών, αφού η συχνότητα ταλάντωσης έχει άμεση σχέση με το λόγο μάζας/φορτίου, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Μετατροπή φάσματος συχνοτήτων σε φάσμα μαζών.

Υπάρχουν δύο τρόποι ανάλυσης μαζών:

1. Fourier Transform (FT) mode, όπου καταγράφονται οι συμφασικές ταλαντώσεις στον οριζόντιο άξονα (image current detection)
2. Mass Selective Instability (MSI) mode, όπου μετά την έγχυσή τους, τα ιόντα συλλέγονται πάνω σε έναν ανιχνευτή.

Ο αναλυτής Orbitrap, όπως αναφέρεται στη μέθοδο λειτουργίας του, είναι στην πραγματικότητα ένας αναλυτής μαζών με μετασχηματισμό Fourier.

#### **Πλεονεκτήματα χρήσης αναλυτή Orbitrap**

Με τη χρήση του συγκεκριμένου οργάνου, επιτυγχάνεται εξαιρετική ακρίβεια μάζας με μεγάλη διακριτική ικανότητα λόγω της μεγάλης ακρίβειας που μπορεί να επιτευχθεί στις μετρήσεις της συχνότητας, δυναμικό εύρος και δυνατότητα ανίχνευσης.

Επιτρέπει την ανάπτυξη μιας γρήγορης, αξιόπιστης και με μεγάλη ευαισθησία μεθόδου ανίχνευσης και ταυτοποίησης ενώσεων, ακόμα κι αν αυτές περιέχονται σε πολύπλοκα μείγματα.

Όλα τα παραπάνω επιτυγχάνονται από ένα όργανο μικρού όγκου και σχετικά χαμηλού κόστους σε σχέση με άλλα φασματομέτρα μετασχηματισμού Fourier, κάτι που επιτρέπει την ακόμα πιο ευρεία χρήση του από περισσότερα εργαστήρια, αφού είναι πολύ πιο ευπρόσιτο και εύχρηστο από άλλα όργανα αντίστοιχων δυνατοτήτων

Πιο αναλυτικά, τα χαρακτηριστικά του οργάνου περιλαμβάνουν:

1. Ακρίβεια μάζας σε λειτουργία ρουτίνας < 3 ppm, με εξωτερική βαθμονόμηση και < 1 ppm, με εσωτερική βαθμονόμηση
2. Εύρος μαζών m/z 50-2000 και 200-4000 με εξωτερική και εσωτερική βαθμονόμηση αντίστοιχα
3. Διακριτική ικανότητα 60,000 σε m/z = 400 με ρυθμό σάρωσης 1 Hz, ελάχιστη διακριτική ικανότητα 7,500 και μέγιστη > 100,000 σε m/z = 400
4. Μεγάλο δυναμικό εύρος > 4.000 σε μια σάρωση
5. Ευαισθησία  $10^{-15}$  g (full scan)
6. Παράλληλη MS και MS<sup>n</sup> ανάλυση, όπου n = 1-10
7. Πολλαπλές τεχνικές διάσπασης, π.χ. CID, PQD, HCD, ETD, MALDI

Το Orbitrap προτιμάται λόγω της μεγάλης διακριτικής ικανότητάς του και της υψηλής ακρίβειας μάζας που επιτρέπει καθώς και λόγω της δυνατότητας ποσοτικοποίησης ακόμα και πεπτιδίων.

Έχει μεγάλο εύρος εφαρμογών, με ιδιαίτερη έμφαση στο πεδίο της πρωτεομικής (proteomics), μεταβολομικής (metabolomics) και λιπιδωμικής (lipidomics) ανάλυσης.

Επίσης, η περιβαλλοντική ανάλυση αξιοποιεί τα πλεονεκτήματα του αναλυτή Orbitrap για παρακολούθηση επιπέδων ρύπανσης σε οικοσυστήματα.

Άλλη μια διαδεδομένη χρήση αυτού του αναλυτή βρίσκεται στη δημιουργία βιβλιοθηκών για διάφορα μόρια που εξετάζονται σε αναλύσεις ρουτίνας (screening) και για την ανάλυση δειγμάτων από τρόφιμα.

#### **2.4 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ ΣΕ «ΣΕΙΡΑ» (TANDEM)**

Με τη φασματομετρία μαζών σε «σειρά» (Tandem Mass Spectrometry) μπορεί να ληφθεί φάσμα ιόντων από προεπιλεγμένο θραύσμα του αρχικού μορίου. Στην αρχή της ανάλυσης, συνήθως με μαλακή πηγή ιόντων, παράγονται ιόντα και μερικά θραύσματα της μητρικής ουσίας. Αυτά προχωρούν στον πρώτο αναλυτή μαζών του οργάνου κι εκεί γίνεται συλλογή του επιλεγμένου ιόντος (πρόδρομο ιόν – precursor ion). Έπειτα, το πρόδρομο ιόν προωθείται σε κυψελίδα αλληλεπίδρασης και εκεί διασπάται αυθόρμητα, αντιδρά με ένα αέριο σύγκρουσης ή αλληλοεπιδρά με δέσμη ακτίνας λέιζερ υψηλής έντασης ώστε να γίνει παραγωγή θραυσμάτων, που ονομάζονται προϊόντα ιόντα (product ions). Αυτά τα ιόντα προχωρούν στο δεύτερο αναλυτή μαζών και ανιχνεύονται από τον αντίστοιχο ανιχνευτή.



### 3. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ

Η επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου που αναπτύσσεται είναι απαραίτητο βήμα ώστε να εξασφαλιστεί η ποιότητα των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από αυτή. Μέσω της διαδικασίας αυτής λαμβάνονται τα απαραίτητα δεδομένα που στηρίζουν την ικανότητα και την αξιοπιστία της μεθόδου μετά την εφαρμογή της.

Υπάρχουν συγκεκριμένοι κανονισμοί και οδηγίες π.χ. GLP (Good Laboratory Practice, Ορθή Εργαστηριακή Πρακτική), ISO 17025, που κατευθύνουν τους ερευνητές ως προς τα πειράματα που πρέπει να πραγματοποιηθούν ώστε να αποδειχθεί η ορθότητα της υπό ανάπτυξη μεθόδου, πριν αυτή αρχίσει να χρησιμοποιείται σε αναλύσεις ρουτίνας.

Οι πιο βασικές παράμετροι επικύρωσης και κριτήρια αποδοχής για μια αναλυτική μέθοδο περιλαμβάνουν τις παρακάτω έννοιες:

#### **α. Ακρίβεια (Accuracy) και Ορθότητα (Trueness):**

Τα πειραματικά αποτελέσματα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο κοντά στην πραγματική τιμή (ή μια παραδεκτή ως πραγματική τιμή). Προσδιορίζεται με χρήση πιστοποιημένων υλικών αναφοράς ή με ανάλυση δειγμάτων καθαρού υποστρώματος που έχει εμβολιαστεί με γνωστές συγκεντρώσεις του προσδιοριζόμενου συστατικού.

Η ορθότητα μπορεί να εκφραστεί ως ανάκτηση του συστατικού, που υπολογίζεται από τον τύπο:

$$R\% = \frac{C_{\text{μέτρησης}}}{C_{\text{πραγματική}}} * 100\%$$

Ποσοτικά, η ακρίβεια υπολογίζεται μετά από 3-6 αναλύσεις σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις εντός τους εύρους ποσοτικοποίησης και μπορεί να εκφραστεί με το σχετικό σφάλμα μέτρησης, σύμφωνα με τη σχέση:

$$\text{Σχετικό σφάλμα \%} = \frac{\text{Μέση ευρεθείσα τιμή} - \text{Θεωρητική τιμή}}{\text{Θεωρητική τιμή}} * 100$$

#### **β. Πιστότητα (Precision) και Επαναληπτικότητα**

Η πιστότητα είναι μέτρο του ορθού υπολογισμού της συγκέντρωσης της υπό προσδιορισμό ουσίας μετά από επαναλαμβανόμενες αναλύσεις. Τα τυχαία σφάλματα είναι οι σημαντικότεροι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την πιστότητα και για αυτό ελέγχονται μέσω των τριών κατηγοριών της επαναληπτικότητας.

Η μια κατηγορία είναι η επαναληψιμότητα (Repeatability), που αναφέρεται τα αποτελέσματα της εφαρμογής της πειραματικής διαδικασίας σε διαφορετικά δείγματα μέσα στην ίδια μέρα και εκφράζεται από τη σχετική τυπική απόκλιση

(Relative Standard Deviation, RSD) ή το συντελεστή διακύμανσης (Coefficient of Variance, CV) με τον παρακάτω τύπο:

$$\text{RSD (\%CV)} = \frac{SD \times 100}{\bar{x}}$$

Η δεύτερη κατηγορία αφορά την ενδιάμεση επαναληπτικότητα (Intermediate precision), που αναφέρεται στα αποτελέσματα της εφαρμογής της πειραματικής διαδικασίας σε διαφορετικά δείγματα και διαφορετικές ημέρες από το ίδιο εργαστήριο.

Η τρίτη κατηγορία αφορά την αναπαραγωγικότητα (Reproductability), που είναι έκφραση της επαναληπτικότητας των αποτελεσμάτων όταν τα πειράματα πραγματοποιηθούν σε διαφορετικά εργαστήρια.

#### **γ. Εκλεκτικότητα (Selectivity) και Διακριτικότητα/Εξειδίκευση (Specificity)**

Μια μέθοδος είναι εκλεκτική όταν είναι ικανή να μετρά με μεγάλη ακρίβεια το συγκεκριμένο συστατικό για το οποίο έχει αναπτυχθεί παρουσία παρεμποδίσεων που μπορεί να υπάρχουν στο υπό ανάλυση δείγμα. Ο έλεγχος της εκλεκτικότητας γίνεται με ανάλυση τυφλού δείγματος που περιέχει το υπόστρωμα στο οποίο θα γίνονται οι αναλύσεις χωρίς παρουσία της συγκεκριμένης ουσίας και το σήμα που θα λαμβάνεται θα πρέπει να είναι μηδενικό.

Η εξειδίκευση σχετίζεται με τη μέτρηση μόνο του ορισμένου συστατικού με προκαθορισμένα επίπεδα ακρίβειας και επαναληψιμότητας.

#### **δ. Γραμμικότητα (Linearity) και Εύρος (Range)**

Η γραμμικότητα συνδέει αναλογικά τα αποτελέσματα των μετρήσεων με τη συγκέντρωση των υπό προσδιορισμό ουσιών που περιέχονται στο δείγμα και είναι μια εξαιρετικά σημαντική ιδιότητα μιας αναλυτικής τεχνικής. Προσδιορίζεται σε 3-6 πειράματα με τουλάχιστον 5 πρότυπα δείγματα που καλύπτουν το αναμενόμενο εύρος συγκεντρώσεων της γραμμικής περιοχής υπό καθαρές πρότυπες συνθήκες και εκφράζεται από το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης (Correlation Coefficient, R). Ο συντελεστής αυτός είναι μέτρο της απόκλισης από την καμπύλη αναφοράς και η τιμή του πρέπει να κυμαίνεται από 0.98 έως 1.00 στη γραμμική περιοχή.

Η γραμμική περιοχή καλύπτει ένα συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων (από τη χαμηλότερη έως την υψηλότερη συγκέντρωση για τις οποίες εμφανίζεται ακρίβεια, επαναληψιμότητα και γραμμικότητα) και είναι ορισμένη για το όργανο και τις συνθήκες της ανάλυσης.

#### **ε. Όριο ανίχνευσης (Limit of detection, LOD) και Όριο ποσοτικοποίησης (Limit of Quantitation, LOQ)**

Τα δύο παραπάνω όρια είναι μέτρα της ευαισθησίας της μεθόδου, δηλαδή της αξιοπιστίας της σε χαμηλές συγκεντρώσεις των υπό προσδιορισμό ουσιών.

Ως όριο ανίχνευσης ορίζεται η ελάχιστη συγκέντρωση της ουσίας που αναλύεται που μπορεί να ανιχνευτεί με βεβαιότητα 99.6%. Πρακτικά χρησιμοποιείται η συγκέντρωση που έχει ως αποτέλεσμα κορυφή με ύψος δύο ή τρεις φορές

μεγαλύτερο από αυτό του θορύβου της βασικής γραμμής για τον υπολογισμό του ορίου ανίχνευσης με την παρακάτω σχέση:

$$\text{LOD} = 3 \frac{S}{N}$$

Όπου  $\frac{S}{N}$ : λόγος σήματος προς θόρυβο (signal-to-noise ratio)

Ως όριο ποσοτικοποίησης ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση του αναλυόμενου συστατικού που παράγει κορυφές πάνω από το θόρυβο της βασικής γραμμής με επαναληψιμότητα και εμβαδό που μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά. Το ύψος αυτών των κορυφών είναι συνήθως 10 – 20 φορές πιο υψηλό από τη βασική γραμμή.

Το όριο ποσοτικοποίησης μπορεί να υπολογιστεί από τη σχέση:

$$\text{LOQ} = 10 \frac{S}{N}$$

Τα δύο όρια, ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης συνδέονται με τη σχέση:

$$\text{LOQ} = 3 \text{ LOD}$$

Όσο χαμηλότερα είναι τα παραπάνω όρια, τόσο πιο ευαίσθητη είναι μια αναλυτική μέθοδος και χαμηλά όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης επιδιώκονται κατά την ανάπτυξη της μεθόδου.

#### **στ. Ανθεκτικότητα (Ruggedness) και Ευρωστία (Robustness)**

Η ανθεκτικότητα είναι δείγμα της ικανότητας αναπαραγωγής της μεθόδου υπό ποικίλες πειραματικές συνθήκες. Μια ανθεκτική μέθοδος μπορεί να ανταποκριθεί σε μικρές μεταβολές και να αντισταθμίζει αστοχίες κατά την πειραματική διαδικασία (λάθη του χειριστή ή βλάβες της οργανολογίας).

Η ευρωστία είναι ο τρόπος εξέτασης της επιρροής των διαφόρων παραγόντων στα αποτελέσματα της ανάλυσης. Πραγματοποιούνται δοκιμές για τις κρίσιμες λειτουργικές παραμέτρους σε ένα ρεαλιστικό εύρος και προσδιορίζονται οι ποσοτικές μεταβολές στα αποτελέσματα ανάλογα με την αλλαγή. Όσο διατηρείται η επίδραση της παραμέτρου στα προκαθορισμένα όρια ανοχής, η μέθοδος είναι εύρωστη για τη συγκεκριμένη παράμετρο και γενικότερα μια εύρωστη μέθοδος παραμένει ανεπηρέαστη μπροστά σε μικρές τροποποιήσεις κρίσιμων λειτουργικών παραμέτρων.

#### **ζ. Σταθερότητα (Stability)**

Η σταθερότητα είναι μέτρο της απόκλισης των αποτελεσμάτων σε προκαθορισμένο χρονικό διάστημα. Προσδιορίζεται με επαναλαμβανόμενες αναλύσεις του ίδιου δείγματος, σε δύο τουλάχιστον συγκεντρώσεις. Από τα αποτελέσματα αυτών των αναλύσεων μπορεί να υπολογιστεί η τυπική απόκλιση.

## 4. ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

### 4.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

#### 4.1.1 Ορισμός και κατηγορίες αντιβιοτικών

Ως αντιβιοτικά ορίζουμε χημειοθεραπευτικές ουσίες φυσικής ή συνθετικής προέλευσης που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση διαφόρων λοιμώξεων αναστέλλοντας την ανάπτυξη μικροοργανισμών ή καταστρέφοντάς τους. Τα αντιβιοτικά έχουν εκλεκτική τοξικότητα, εκμεταλλεύονται δηλαδή τις βιοχημικές διαφορές μεταξύ των μικροοργανισμών και του ανθρώπου-ξενιστή ώστε να δρουν έναντι του εισβάλλοντα μικροοργανισμού χωρίς να προκαλέσουν βλάβη στα ανθρώπινα κύτταρα. Χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση λοιμώξεων που προκαλούνται από διάφορα είδη βακτηρίων αλλά μπορούν να βρουν εφαρμογή και σε μυκητιάσεις, κατά πρωτόζωων και έλμινθων.

Στον Πίνακα 3 αναφέρονται οι κυριότερες ομάδες αντιβιοτικών βάσει των χημικών τους δομών και οι αντίστοιχοι μηχανισμοί δράσης τους κατά των παθογόνων μικροοργανισμών.

Πίνακας 3: Κατηγορίες αντιβιοτικών και μηχανισμός δράσης.

Κατηγορία Χημικής Δομής	Μηχανισμός δράσης
β-Λακτάμες <ul style="list-style-type: none"><li>• Πενικιλίνες</li><li>• Κεφαλοσπορίνες</li><li>• Καρβαπενέμες</li></ul>	Αναστολείς σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος
Μακρολίδες/Κετολίδες	Αναστολείς ριβοσωμικού συστήματος πρωτεϊνοσύνθεσης
Τετρακυκλίνες/Γλυκυκλίνες	Αναστολείς ριβοσωμικού συστήματος πρωτεϊνοσύνθεσης
Κινολόνες	Αναστολείς σύνθεσης ή λειτουργίας των πυρηνικών οξέων
Σουλφοναμίδια	Αναστολείς δομικών και λειτουργικών ενδοκυτταρικών στοιχείων που σχετίζονται με το διάμεσο μεταβολισμό
Αμινογλυκοσίδες	Αναστολείς ριβοσωμικού συστήματος πρωτεϊνοσύνθεσης
Ιμιδαζόλια	Αναστολείς σύνθεσης ή λειτουργίας των πυρηνικών οξέων
Πεπτίδια	Αναστολείς σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος
Λινκοσαμίδες	Αναστολείς ριβοσωμικού συστήματος πρωτεϊνοσύνθεσης

#### 4.1.2 Διαφορετικοί τρόποι δράσης αντιβιοτικών

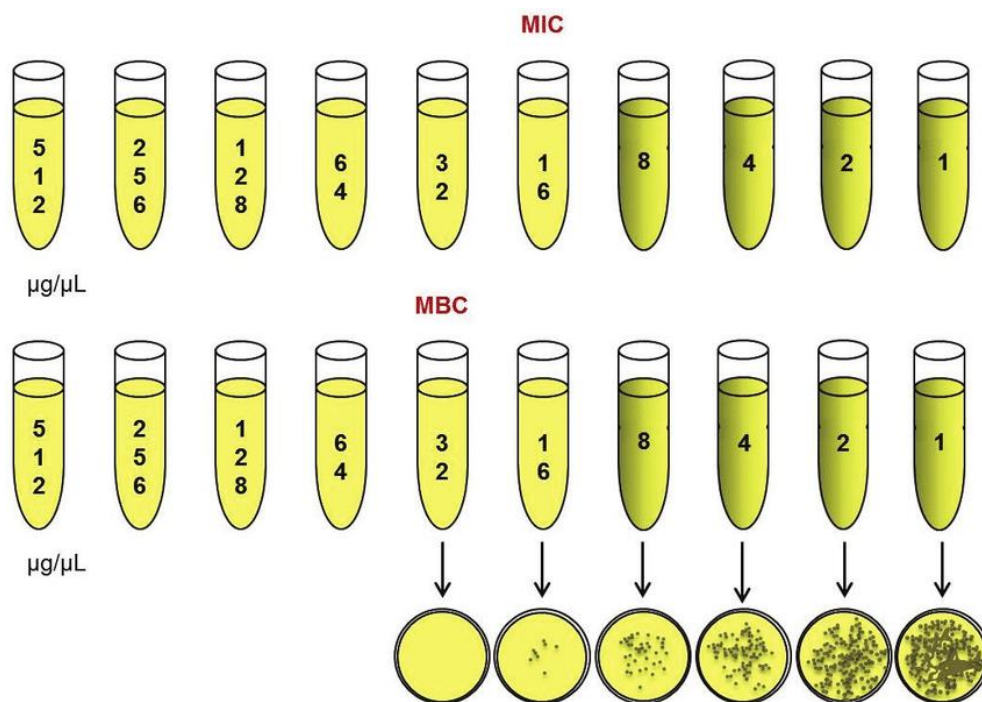
Τα αντιβιοτικά κατατάσσονται σε βακτηριοστατικά και βακτηριοκτόνα, χωρίς η κατάταξη αυτή να είναι απόλυτη. Υπάρχει περίπτωση ένα αντιμικροβιακό να δρα ως βακτηριοκτόνο έναντι ενός παθογόνου και ως βακτηριοστατικό έναντι ενός άλλου παθογόνου.

**Βακτηριοστατικά:** σε θεραπευτικά επίπεδα αναστέλλουν την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των βακτηρίων στον ξενιστή, ώστε να περιοριστεί η εξάπλωση της λοίμωξης μέχρι να κινητοποιηθεί το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενή και να αντιμετωπίσει το παθογόνο.

Για τα βακτηριοστατικά φάρμακα, ως ποσοτικός δείκτης της *in vitro* ευαισθησίας χρησιμοποιείται η **Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση** (Minimum Inhibitory Concentration, **MIC**), δηλαδή η χαμηλότερη αντιμικροβιακή συγκέντρωση που αποτρέπει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού μετά από 24 ώρες επώασης.

**Βακτηριοκτόνα:** σε θεραπευτικά επίπεδα, φονεύουν τα παθογόνα χωρίς να απαιτείται συμβολή του ανοσοποιητικού συστήματος του ασθενή. Είναι φάρμακα επιλογής σε πολύ σοβαρές λοιμώξεις και ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς.

Για τα βακτηριοκτόνα φάρμακα, καθορίζεται η **Ελάχιστη Βακτηριοκτόνος Συγκέντρωση** (Minimum Bactericidal Concentration, **MBC**), δηλαδή η χαμηλότερη συγκέντρωση αντιμικροβιακού παράγοντα που οδηγεί σε 99,9% μείωση στον αριθμό των αποικιών του παθογόνου μετά από ολονύκτιες επώσεις αραιωμάτων.



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση MIC και MBC.

### **Εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση φονικότητα**

Για κάποιους αντιμικροβιακούς παράγοντες, π.χ. αμινογλυκοσίδες, εμφανίζεται σημαντική αύξηση στην αποτελεσματικότητά τους όταν η συγκέντρωση του αντιβιοτικού στο αίμα αυξάνεται 4-64 φορές πάνω από την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) του φαρμάκου για τον συγκεκριμένο παθογόνο.

Για φάρμακα που εμφανίζουν τέτοιου είδους φονικότητα, ενδείκνυται η χορήγηση με bolus έγχυση άπαξ ημερησίως ώστε να επιτυγχάνονται υψηλά μέγιστα επίπεδα και να προωθείται η ταχεία φόνευση του λοιμογόνου.

### **Εξαρτώμενη από το χρόνο (ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση) φονικότητα**

Σε άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες, π.χ. β-λακτάμες, για την κλινική αποτελεσματικότητα, έχει μεγαλύτερη σημασία το χρονικό διάστημα κατά το οποίο οι συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο αίμα παραμένουν πάνω από την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC).

Για αυτού του είδους φάρμακα, ενδείκνυται οι εκτεταμένες (γενικά 3 έως 4 ώρες) ή συνεχείς (24ώρες) εγχύσεις ώστε να παραταθεί ο χρόνος που τα επίπεδα του φαρμάκου βρίσκονται πάνω από τη MIC και να αυξηθεί το θεραπευτικό αποτέλεσμα με τη φόνευση περισσότερων βακτηρίων.

### **Μετά-αντιβιοτικό αποτέλεσμα**

Σε κάποιους αντιμικροβιακούς παράγοντες, π.χ. φθοριοκινολόνες, τετρακυκλίνες, εμφανίζεται το μετά-αντιβιοτικό αποτέλεσμα, δηλαδή ένα φαινόμενο κατά το οποίο παρατηρείται εμμένουσα καταστολή της ανάπτυξης των βακτηρίων παρόλο που τα επίπεδα του αντιβιοτικού έχουν πέσει κάτω από τη MIC.

Για τέτοιου είδους φάρμακα, συχνά απαιτείται μόνο μια δόση ημερησίως, κάτι που βοηθά στη μείωση των ανεπιθύμητων ενεργειών στον ασθενή.

Με τον όρο **αντιμικροβιακό φάσμα** περιγράφεται η αποτελεσματικότητα ενός αντιβιοτικού έναντι των διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών. Το αντιμικροβιακό φάσμα μπορεί να είναι στενό, εκτεταμένο ή ευρύ, ανάλογα με τον αριθμό των ειδών μικροοργανισμών που μπορούν να αντιμετωπιστούν από τον συγκεκριμένο χημειοθεραπευτικό παράγοντα.

Τα αντιμικροβιακά φάρμακα μπορεί να χορηγηθούν σε συνδυασμούς ώστε να προκύψει **συνέργεια** (αθροιστική ή δυναμική) στο θεραπευτικό αποτέλεσμά τους. Μια τέτοια θεραπευτική προσέγγιση έχει το πλεονέκτημα της τελικά αυξημένης αποτελεσματικότητας σε σχέση με τους επί μέρους παράγοντες αλλά είναι αρκετά σπάνιο φαινόμενο και ενδείκνυται μόνο για ορισμένες περιπτώσεις.

Μεγάλη προσοχή πρέπει να δίνεται κατά τη συγχορήγηση αντιμικροβιακών παραγόντων στους μηχανισμούς δράσης τους ώστε να μην εμφανίζεται ανταγωνισμός μεταξύ τους και επηρεάζεται τελικά αρνητικά το κλινικό αποτέλεσμα, αφού το ένα φάρμακο θα εμποδίζει τη δράση του άλλου.

### 4.1.3 Μικροβιακή αντίσταση, τρόπος χρήσης αντιβιοτικών και πιθανές επιπλοκές

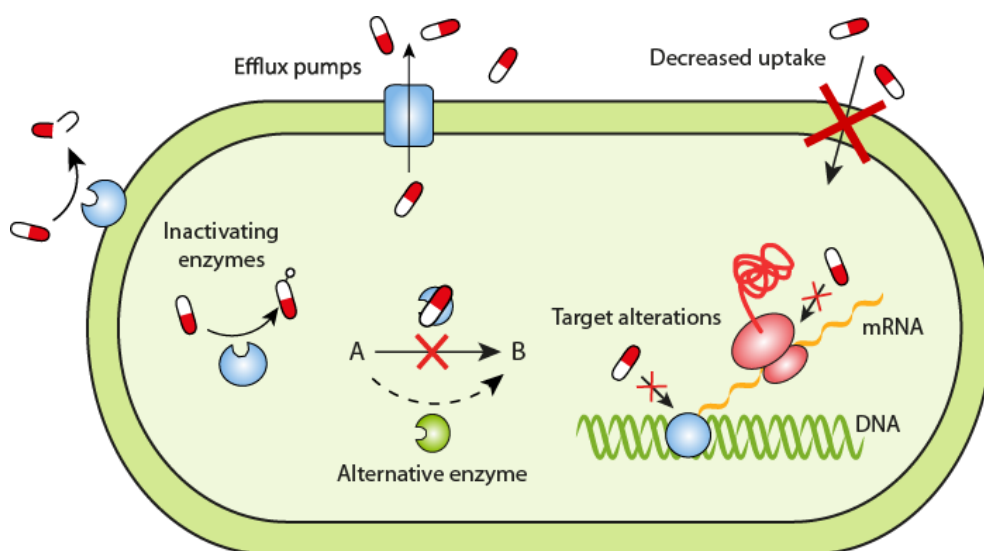
#### Μικροβιακή αντίσταση

Ένας μικροοργανισμός θεωρείται ανθεκτικός σε ένα αντιβιοτικό όταν η μέγιστη ποσότητα του φαρμάκου που μπορεί να χορηγηθεί στον ασθενή δεν είναι ικανή να αναστείλει την ανάπτυξη του παθογόνου.

Τα βακτήρια μπορεί να είναι εγγενώς ανθεκτικά ή να έχουν αναπτύξει ανοχή σε ένα αντιβιοτικό λόγω αλόγιστης χρήσης του ή παλαιότερης ανεπαρκούς σε δοσολογία ή χρονική διάρκεια φαρμακευτικής αγωγής με αυτό το φάρμακο.

Τα μικρόβια αποκτούν αντίσταση στα αντιβιοτικά με δυο τρόπους:

- α. αυτόματη μετάλλαξη που οδηγεί σε μεταβολή της μικροβιακής γενετικής πληροφορίας
- β. επίκτητη ανοχή (κληρονομούμενες γενετικές πληροφορίες από τον ένα οργανισμό σε άλλο με τη μορφή πλασμιδίων αντίστασης) και επιλογή των ανθεκτικών στελεχών



Εικόνα 13: Μηχανισμοί ανάπτυξης αντίστασης σε αντιβιοτικά

Η μικροβιακή ανοχή εκφράζεται με μια ποικιλία τρόπων:

1. τη μεταβολή της δομής των σημείων δράσης των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων με αποτέλεσμα τη μειωμένη πρόσδεσή τους σε αυτά, π.χ. ερυθρομικίνη
2. την παρεμπόδιση της μεταφοράς του φαρμάκου στο σημείο δράσης λόγω μειωμένης διαπερατότητας του τοιχώματος ή της μεμβράνης του μικροβίου ή αυξημένης εκροής του φαρμάκου λόγω ύπαρξης αντλιών εκροής στο παθογόνο, π.χ. τετρακυκλίνες

3. την παράκαμψη μεταβολικής οδού που στοχεύει το αντιμικροβιακό, π.χ. σουλφοναμίδες
4. την ενζυμική αδρανοποίηση που προκαλείται από ικανότητα του μικροβίου να συνθέτει ένζυμα, π.χ. β-λακταμάσης ή κεφαλοσπορινάσης, που καταστρέφουν το αντιβιοτικό, σε αυτή την περίπτωση τις πενικιλίνες και τις κεφαλοσπορίνες αντίστοιχα.

### **Χρήση αντιβιοτικών**

Το κάθε αντιβιοτικό έχει συγκεκριμένες ενδείξεις άρα η επιλογή του καταλληλότερου ανά περίπτωση φαρμάκου βασίζεται στους παρακάτω παράγοντες:

1. Γνώση της ταυτότητας του μικροοργανισμού που προκαλεί τη λοίμωξη (απαιτείται ταυτοποίηση του λοιμογόνου πριν χορηγηθεί θεραπευτική αγωγή)
2. Ευαισθησία του μικροοργανισμού στον συγκεκριμένο αντιμικροβιακό παράγοντα
3. Περιοχή της λοίμωξης (μπορεί να υπάρχουν φυσικοί φραγμοί που δυσχεραίνουν την ανάπτυξη κατάλληλων επιπέδων αντιβιοτικού στη θέση της λοίμωξης)
4. Ιδιοσυγκρασιακοί παράγοντες ασθενή (ανοσοποιητικό σύστημα, νεφρική λειτουργία, ηπατική λειτουργία, αιμάτωση, ηλικία, φύλο, κύηση/γαλουχία)
5. Ασφάλεια φαρμάκου
6. Κόστος θεραπείας

Η κακή χρήση των αντιβιοτικών έχει προκαλέσει το πολύ σημαντικό πρόβλημα της ανάπτυξης πολυανθεκτικών βακτηρίων. Πλέον έχει μειωθεί δραστικά ο αριθμός των αντιβιοτικών που είναι αποτελεσματικά στη θεραπεία μικροβιακών λοιμώξεων, ένα πολύ ανησυχητικό φαινόμενο.

### **Επιπλοκές της αντιμικροβιακής θεραπείας**

Παρά την εκλεκτικότητα των αντιμικροβιακών παραγόντων όσον αφορά τη δράση τους κατά των παθογόνων και όχι κατά του ξενιστή, όπως κάθε φάρμακο, μπορούν να προκαλέσουν ανεπιθύμητες ενέργειες στον ασθενή στον οποίο χορηγούνται.

Οι πιο σημαντικές κατηγορίες ανεπιθύμητων ενεργειών είναι:

1. Υπερευαισθησία/Ανοσολογικές αντιδράσεις: συχνό φαινόμενο για αρκετά αντιβιοτικά, μπορεί να είναι αλλεργικές ή ιδιοσυγκρασιακές. Απαιτείται η προσεκτική λήψη ιατρικού ιστορικού και ιδιαίτερη σκέψη κατά τη χορήγηση αντιβιοτικών σε ασθενείς που έχουν εμφανίσει σύνδρομο Stevens-Jonson ή τοξική επιδερμική νεκρόλυση μετά από χορήγηση κάποιου τέτοιου παράγοντα.



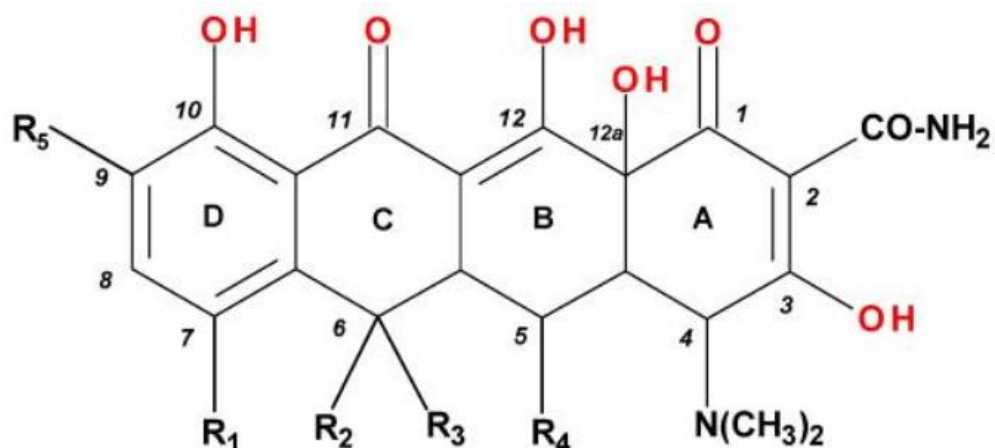
2. Άμεση τοξικότητα: σε χορήγηση υψηλών συγκεντρώσεων ορισμένων αντιμικροβιακών, π.χ. αμινογλυκοσίδες, μπορούν να επηρεαστούν άμεσα κυτταρικές διεργασίες στον ξενιστή με αποτέλεσμα την εμφάνιση τοξικότητας σε αυτόν.
3. Υπερλοιμώξεις: η αντιμικροβιακή θεραπεία, ιδιαίτερα αν αποτελείται από αντιβιοτικό ευρέως φάσματος ή συνδυασμό φαρμάκων, μπορεί να οδηγήσει σε κάποια επιλοίμωξη λόγω μεταβολών της φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας του ξενιστή, επιτρέποντας την ανεξέλεγκτη και υπερβολική ανάπτυξη ευκαιριακών οργανισμών, ιδιαίτερα μυκήτων ή ανθεκτικών στα χορηγημένα αντιβιοτικά βακτηρίων. Τέτοιες λοιμώξεις αντιμετωπίζονται πιο δύσκολα αφού απαιτούν δευτερεύουσες θεραπείες με εξειδικευμένους αντιμολυσματικούς παράγοντες.

## 4.2 ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ ΚΑΙ ΤΙΓΕΚΥΚΛΙΝΗ ΩΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ

### 4.2.1 Συνοπτική ιστορία τετρακυκλινών

Η πρώτη τετρακυκλίνη, αουρεομυσίνη (χολετετρακυκλίνη), απομονώθηκε από το βακτήριο *Streptomyces aureofaciens* το 1948. Ακολούθησε η ανακάλυψη της τετραμυσίνης (οξυτετρακυκλίνη), που παράγεται από το *Streptomyces rimosus* το 1950 και η για πρώτη φορά σύνθεση της τετρακυκλίνης, που προήλθε μετά από χημικές αλλαγές στο βασικό σκελετό της χολετετρακυκλίνης το 1953 (Nguyen *et al*, 2014).

Τα τρία αυτά μόρια (χολετετρακυκλίνη, οξυτετρακυκλίνη, τετρακυκλίνη) αποτελούν την πρώτη γενιά τετρακυκλινών και αποτέλεσαν ένα τεράστιο βήμα για την αντιμετώπιση μικροβιακών λοιμώξεων.



Εικόνα 14: Βασική χημική δομή τετρακυκλινών.

Οι τετρακυκλίνες πήραν το όνομά τους από τους τέσσερεις αρωματικούς δακτυλίους του πυρήνα ναφθαλενίου που χαρακτηρίζει το σκελετό τους (Nguyen et al, 2014).

Μετά την επιτυχία των τετρακυκλινών πρώτης γενιάς στην κλινική πράξη, ερευνητές προσπάθησαν να βελτιώσουν τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες, το εύρος του αντιμικροβιακού φάσματος και την ασφάλεια των φαρμάκων αυτών, μειώνοντας την τοξικότητα των μορίων αυτών.

Η έρευνα που ακολούθησε με στόχο τα παραπάνω, οδήγησε στη δημιουργία της *δεύτερης γενιάς* τετρακυκλινών, με βασικούς εκπροσώπους τη μεθακυκλίνη (1966), τη δοξυκυκλίνη (1967) και τη μινοκυκλίνη (1972).

Η προσπάθεια για βελτίωση των ιδιοτήτων των τετρακυκλινών οδήγησε στην ανακάλυψη κι άλλων ημισυνθετικών ή πλήρως συνθετικών αναλόγων που ανήκουν στη δεύτερη και στην ακόμα νεότερη τρίτη γενιά των τετρακυκλινών.

Η *τρίτη γενιά* περιλαμβάνει τα μόρια τιγκεκυκλίνη, ομαδακυκλίνη, σαρεκυκλίνη και εβερακυκλίνη με σημαντικά βελτιωμένες ιδιότητες σε σχέση με τις προηγούμενες (Rusu et al, 2021).

#### **4.2.2 Γενικές πληροφορίες για την τιγκεκυκλίνη**

Η τιγκεκυκλίνη είναι ένα ευρέως φάσματος αντιβιοτικό που ανήκει στην ομάδα των γλυκυκυκλινών (ATC code: J01AA12), δομικών αναλόγων των τετρακυκλινών.

Οι γλυκυκλίνες σχεδιάστηκαν και αναπτύχθηκαν ειδικά ώστε να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα εμφάνισης αντίστασης στη δράση των τετρακυκλινών μέσω έκφρασης αντλιών εκροής και ριβοσωμικής προστασίας από κάποια είδη μικροοργανισμών (Sum et al, 1994).

Πιο συγκεκριμένα η τιγκεκυκλίνη είναι δομικό ανάλογο της ημισυνθετικής τετρακυκλίνης μινοκυκλίνης και ανακαλύφθηκε το 1993 (Wyeth Pharmaceuticals LLC, USA). Δρα όπως και οι υπόλοιπες τετρακυκλίνες, αναστέλλοντας την πρωτεϊνσύνθεση των βακτηρίων. Η χαρακτηριστική δομή της έχει ως αποτέλεσμα να μην υπάρχει διασταυρούμενη αντίσταση μεταξύ της τιγκεκυκλίνης και άλλων αντιβιοτικών. Ήταν η πρώτη τετρακυκλίνη τρίτης γενιάς και η νεότερη που χρησιμοποιήθηκε στην κλινική πράξη μετά από 30 τουλάχιστον χρόνια ενώ έλαβε έγκριση για κυκλοφορία το 2005 από τον FDA και το 2006 από τον EMA.

#### **4.2.3 Κλινικές εφαρμογές**

Η χρήση της τιγκεκυκλίνης ενδείκνυται για τη θεραπεία πολύ σοβαρών λοιμώξεων από ευαίσθητα στην τιγκεκυκλίνη παθογόνα, μόνο σε περιπτώσεις που δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάποιο άλλο αντιβιοτικό λόγω αυξημένης θνησιμότητας που έχει παρατηρηθεί μετά τη χρήση της (Black box warning - FDA Drug Safety Communication, 2010).

Η τιγκεκυκλίνη χορηγείται σε ενήλικες ενώ η χρήση της δεν ενδείκνυται σε παιδιά και εφήβους κάτω των 18 ετών. Πολύ σπάνια έχει χρησιμοποιηθεί σε παιδιά, σε έκτακτες καταστάσεις που δεν υπήρχε καμία άλλη λύση, αφού γενικότερα δεν

ενδείκνυται η χρήση τετρακυκλινών σε μικρές ηλικίες και για αυτό δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα για αυτό τον πληθυσμό.

Οι ασθένειες για τις οποίες έχει λάβει άδεια η τιγκεκυκλίνη ως θεραπεία περιλαμβάνουν (*Tyggacil ΦΟΧ και SPC, 2016*):

- α) επιλεγμένες λοιμώξεις του δέρματος και μαλακών μορίων (cSSSI), εξαιρουμένων των λοιμώξεων διαβητικού ποδός,
- β) περίπλοκες ενδο-κοιλιακές λοιμώξεις (cIAI)
- γ) πνευμονία της κοινότητας (CAP).

Το ανιμικροβιακό αυτό μπορεί να ληφθεί με ασφάλεια από ασθενείς που εμφανίζουν αλλεργία στις πενικιλίνες (*Dixit et al, 2014*).

### **Προτεινόμενος τρόπος χορήγησης**

Η τιγκεκυκλίνη έχει κακή βιοδιαθεσιμότητα σε από του στόματος (*per os*) χορήγηση, οπότε χρησιμοποιείται μόνο παρεντερικά.

Το προτεινόμενο θεραπευτικό σχήμα είναι 100 mg ως εναρκτήρια δόση και συνέχεια της θεραπείας με χορήγηση 50 mg ανά 12 ώρες μέσω ενδοφλέβιας έγχυσης (*IV infusion*) που διαρκεί από 30 λεπτά μέχρι μια ώρα (*Tyggacil ΦΟΧ και SPC, 2016*).

Ανάλογα με τη λοίμωξη, η τιγκεκυκλίνη θα πρέπει να λαμβάνεται από 5-14 ημέρες για λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων και ενδο-κοιλιακές λοιμώξεις (*Slover et al, 2007*) ενώ σε πνευμονία της κοινότητας απαιτούνται τουλάχιστον 7-14 μέρες μέχρι να διακοπεί η θεραπεία (*Tyggacil SPC, 2016*).

Στις εξαιρετικά σπάνιες περιπτώσεις που απαιτείται η χορήγηση της τιγκεκυκλίνης σε παιδιά ή εφήβους, το προτεινόμενο δοσολογικό σχήμα είναι 1.2 mg/kg ανά 12 ώρες με μέγιστη δόση τα 50 mg τη μέρα για παιδιά από 8 έως 11 ετών και 50 mg ανά 12 ώρες για εφήβους από 12 έως 17 ετών (*Mastralia et al, 2017*).

Για ηλικίες μικρότερες των 8 ετών δεν υπάρχουν δεδομένα ασφαλείας και αποτελεσματικότητας, οπότε δεν πρέπει να χρησιμοποιείται σε αυτή την ηλικιακή ομάδα (*Tyggacil ΦΟΧ και SPC, 2016*).

### **Άλλες χρήσεις**

Η τιγκεκυκλίνη χρησιμοποιείται επίσης, εκτός των παραπάνω ενδείξεων, ως εμπειρική θεραπεία τελευταίας λύσης (*rescue therapy*) σε μορφή μονοθεραπείας κατά λοιμώξεων από πολυανθεκτικά βακτήρια που δεν ανταποκρίνονται σε κάποιο άλλο αντιβιοτικό ή σε συνδυασμούς με άλλα αντιβιοτικά, συνήθως μεροπενέμη ή κολιστίνη (*Dixit et al, 2014; Cai et al, 2016; Tsala et al, 2018; Ruiz et al, 2020*), κατά πολυανθεκτικών βακτηρίων (*Sajad et al, 2021*).

Παραδείγματα τέτοιων λοιμώξεων είναι πνευμονίες σχετιζόμενες με χρήση αναπνευστήρα, ενδονοσοκομειακές πνευμονίες (*Zhou et al, 2020*), βακτηραιμία, λοιμώξεις που σχετίζονται με τη χρήση ουροκαθετήρα, οστεομυελίτιδα και άλλες (*Sajad et al, 2021*).

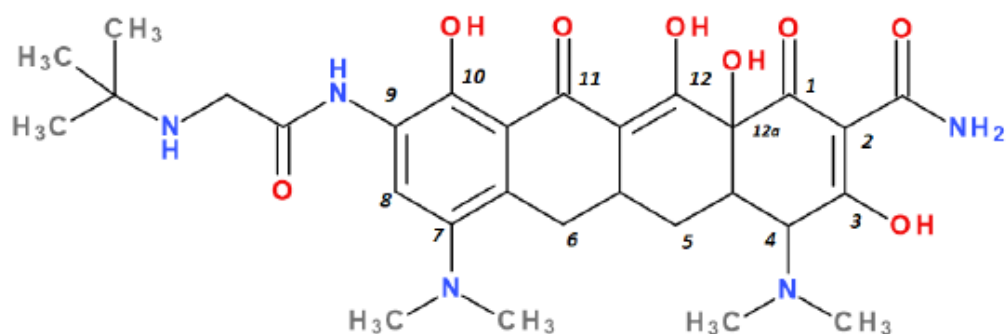
Ερευνάται και η χρήση της σε περιπτώσεις λοιμώξεων του διαβητικού ποδός, ενδοσσοκομειακών λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος, λοιμώξεων από Gram(-) βακτήρια ανθεκτικά στην καρβαπενέμη σε ασθενείς μετά από μεταμόσχευση ήπατος (Sajad et al, 2021), λοιμώξεων από *Clostridium difficile* και μηνιγγίτιδας από πολυανθεκτικά βακτήρια (Mei et al, 2016).

Πέρα από το αντιμικροβιακό της αποτέλεσμα, η τιγκεκυκλίνη έχει δείξει *in vivo* και *in vitro* δραστηριότητα κατά της μυελοειδούς λευχαιμίας (Škrtić et al, 2011) και άλλων ειδών καρκίνου όπως ο μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα, ο καρκίνος του γαστρεντερικού συστήματος (Arora et al, 2018), το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (Messner et al, 2020), το παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα (Jie et al, 2020) και το γλοιοβλάστωμα, αν και δεν έχει ακόμα χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτική αγωγή για αυτές τις ασθένειες.

#### 4.2.4 Φυσικοχημικές ιδιότητες και σχέση δομής - δράσης

Ο χημικός τύπος της τιγκεκυκλίνης είναι  $C_{29}H_{39}N_5O_8$  και το μοριακό της βάρος είναι 585.65 Da.

Το όνομά της κατά IUPAC είναι (4*S*,4*aS*,5*aR*,12*aR*)-9-[[2-(*tert*-butylamino)acetyl]amino]-4,7-bis(dimethylamino)-1,10,11,12*a*-tetrahydroxy-3,12-dioxo-4*a*,5,5*a*,6-tetrahydro-4*H*-tetracene-2-carboxamide και η δομή της φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 15):



Εικόνα 15: Χημική δομή της τιγκεκυκλίνης (Rusu et al, 2021).

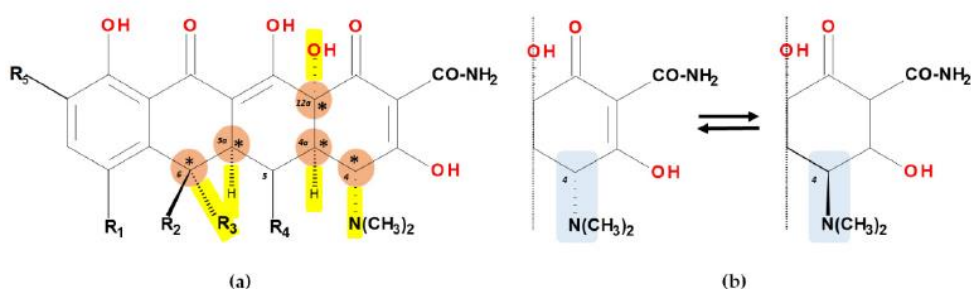
Συντηρείται ο βασικός σκελετός των τετρακυκλινών, που είναι παράγωγο ναφθαλενίου (Nguyen et al, 2014) με τέσσερις δακτυλίους (Εικόνα 14) ενώ αλλαγές έχουν γίνει στους υποκαταστάτες, και ιδιαίτερα στον άνθρακα 7 (C-7) και στον άνθρακα 9 (C-9) (Sum et al, 1994):

- Στη θέση 7, έχει γίνει προσθήκη υποκαταστάτη διμέθυλ-άμινο ομάδας, που ως υποκαταστάτης είναι δότης ηλεκτρονίων.
- Στη θέση 9, έχει προστεθεί ένας υποκαταστάτης γλυκυλ-αμιδίου και συγκεκριμένα ένα τριτοταγές βουτυλ-γλυκυλαμίδιο (Rusu et al, 2021).

Στον πυρήνα ναφθαλενίου, από τον C10 έως τον C12 (κετο-ενολικό) και από τον C1 έως τον C3 υπάρχει ένα σύστημα συζευγμένων ηλεκτρονίων (Rusu et al, 2021).

Η τιγκεκυκλίνη είναι οπτικά ενεργή, με χειρικά κέντρα της άνθρακες C4, C4a, C5, C6 και C12a (Rusu et al, 2021). Σε όξινες (pH 2-6) και ιδιαίτερα σε ήπια όξινες συνθήκες, σε διάφορους διαλύτες, δημιουργούνται εύκολα επιμερή με διαφορετικές τοξικολογικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες και παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες (Bayliss et al, 2019).

Εξαιρετικής σημασίας είναι η 4-β-επιτιγκεκυκλίνη, που έχει πολύ μικρότερη αντιμικροβιακή δράση, μόνο το 5% της αρχικής (MacGowan et al, 2008). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δυσκολία στην επιλεκτική βιοσύνθεση του δραστικού επιμερούς της τιγκεκυκλίνης (Rusu et al, 2021). Αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός ότι τα επιμερή μπορούν να σχηματιστούν και in vivo, μετά από χορήγηση του αντιβιοτικού.

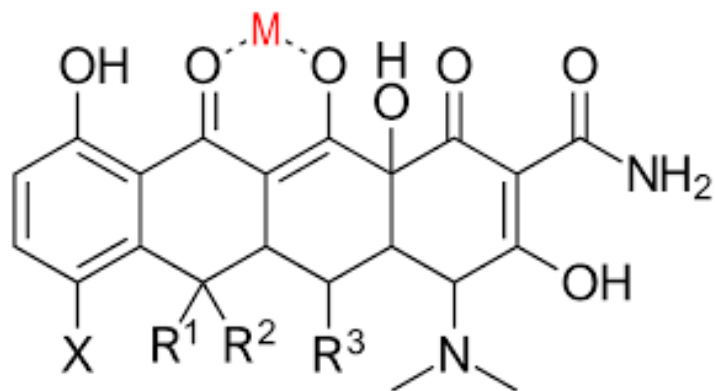


Εικόνα 16: Χειρικά κέντρα τετρακυκλινών και δημιουργία 4-επιμερούς (Rusu et al, 2021).

Η τιγκεκυκλίνη είναι αμφοτερική ένωση λόγω της ταυτόχρονης παρουσίας υδροξυλικών ομάδων, του κετο-ενολικού συστήματος των C10-C12 και διμεθυλάμινο υποκαταστατών, δηλαδή σχηματίζει εύκολα άλατα με οξέα και βάσεις. Το πιο σύνηθες άλας είναι αυτό με το υδροχλωρικό οξύ. Ανάλογα με το διαλύτη, η τιγκεκυκλίνη εμφανίζεται σε ιοντική ή μη-ιοντική μορφή. Σε ουδέτερο pH, παίρνει τη μορφή αμφιτεριόντος (zwitterion). Έχει πέντε βασικές ομάδες ιοντισμού και έτσι πέντε τιμές  $pK_a$  (Rusu et al, 2021).

Σε μορφή λυοφιλοποιημένης σκόνης ως υδροχλωρικό άλας τιγκεκυκλίνης έχει χαρακτηριστικό πορτοκαλί χρώμα (Tygacil SPC, 2016) και διαλύεται εύκολα στο νερό (διαλυτότητα: 14.55 mg/L στους 25 °C).

Όπως και οι υπόλοιπες τετρακυκλίνες, η τιγκεκυκλίνη δρα ως χηλικός παράγοντάς (Barbour et al, 2009), σχηματίζοντας σταθερά, δυσδιάλυτα σύμπλοκα όταν βρεθεί σε περιβάλλον με διάφορα μεταλλικά ιόντα ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Al^{3+}$ ). Αυτή η ιδιότητα οφείλεται της δραστικές ομάδες που είναι πλούσιες σε ηλεκτρόνια και μπορούν να πρωτονιωθούν ή να αποπρωτονιωθούν. Λόγω της παρουσίας της διμεθυλάμινο ομάδας στη θέση 7, η τιγκεκυκλίνη συμπλοκοποιείται περισσότερο με ιόντα  $Ca^{2+}$  (Rusu et al, 2021). Αυτό εξηγεί και τη συσσώρευσή της σε ιστούς πλούσιους σε ασβέστιο, όπως τα οστά και τα δόντια.



Εικόνα 17: Συμπλοκοποίηση τετρακυκλινών με ιόντα μετάλλων.

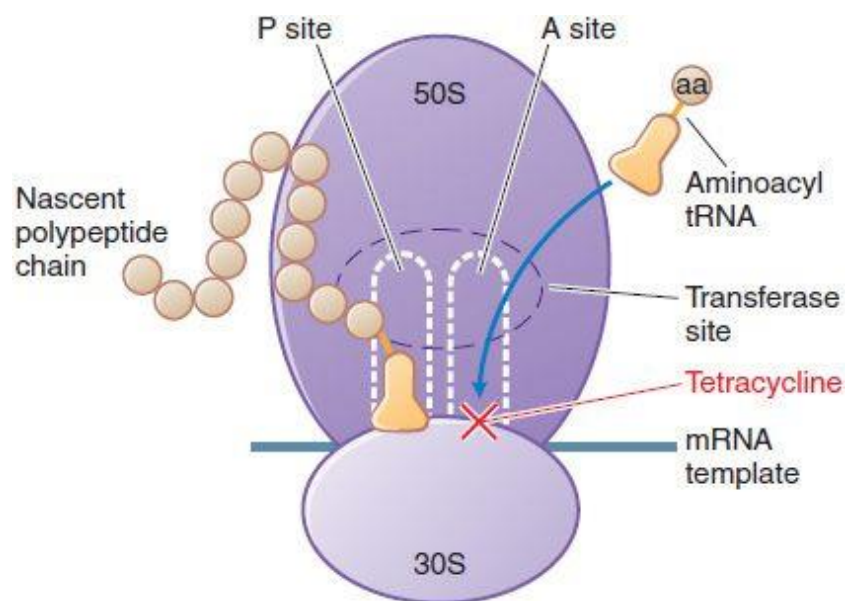
Η δημιουργία αυτών των συμπλόκων δυσχεραίνει την απορρόφηση των περισσότερων τετρακυκλινών μετά από του στόματος χορήγηση ενώ για τη συγκεκριμένη ουσία ενδείκνυται μόνο η παρεντερική χορήγηση λόγω μειωμένης βιοδιαθεσιμότητας. Με per os φαρμακοτεχνικές μορφές δημιουργούνται σύμπλοκα τιγκεκυκλίνης αδιάλυτα στο ύδωρ, τα οποία είναι αδύνατο να απορροφηθούν από το γαστρεντερικό σύστημα και να περάσουν στην κυκλοφορία του ασθενή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην μπορούν να αναπτυχθούν τα απαιτούμενα επίπεδα στους ιστούς-στόχους και έτσι να μην εμφανίζεται η αντιμικροβιακή δράση της τιγκεκυκλίνης κατά των παθογόνων που προκαλούν τη λοίμωξη.

Για τη διατήρηση της βιολογικής δραστηριότητας είναι απαραίτητο το άτομο αζώτου της γλυκυλαμιδο- ομάδας στη θέση 9. Επίσης, η στερεοχημεία των C4, C4<sub>a</sub>, C5, C5<sub>a</sub>, C6 και C12<sub>a</sub> είναι ορισμένη για να επιτυγχάνεται το αντιμικροβιακό αποτέλεσμα όλων των τετρακυκλινών (Rusu et al, 2021). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η αντιμικροβιακή δράση και η φαρμακοκινητική της τιγκεκυκλίνης επηρεάζονται σημαντικά από την ικανότητα συμπλοκοποίησης με μεταλλικά κατιόντα ασβεστίου, μαγνησίου και σιδήρου. Αυτή η ικανότητα οφείλεται στο κετο-ενολικό σύστημα της θέσεις 11 και 12, στην ενόλη της θέσης 1 και του καρβοξαμιδίου στη θέση 2 (Εικόνα 17).

#### 4.2.5 Μηχανισμός δράσης και ανάπτυξη αντοχής

Οι γλυκυκλίνες έχουν ως μηχανισμό δράσης την πρόσδεση στην υπομονάδα 30S των βακτηριακών ριβοσωμάτων στον τόπο 16S, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση των μορίων του αμινο-ακυλ tRNA από το να ενσωματωθούν στη θέση A του ριβοσώματος (Εικόνα 18). Επειδή η τιγκεκυκλίνη αλληλεπιδρά στο σκελετό του rRNA του ριβοσώματος, δεν επηρεάζεται από αλλαγές στην αλληλουχία των βάσεων, με αποτέλεσμα το μεγάλο αντιμικροβιακό εύρος της (Nguyen et al, 2014).

Η πρόσδεση αυτή του αντιβιοτικού μορίου οδηγεί στην αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης του μικροβίου, αφού δεν μπορούν να ενσωματωθούν αμινοξικά υπολείμματα και να επιμηκυνθεί η πρωτεϊνική αλυσίδα. Αυτό καθιστά δύσκολο έως ανέφικτο τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων.



Εικόνα 18: Μηχανισμός δράσης τιγκεκυκλίνης.

Η υποκατάσταση του άνθρακα-9 στον κύριο σκελετό των τετρακυκλινών, αυξάνει πέντε φορές τη συγγένεια σύνδεσης της τιγκεκυκλίνης στο ριβόσωμα σε σχέση με της τετρακυκλίνες, όπως η μινοκυκλίνη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη δραστηριότητα της τιγκεκυκλίνης κατά των βακτηρίων και την παράκαμψη της προστασίας του ριβοσώματος (Slover et al, 2007).

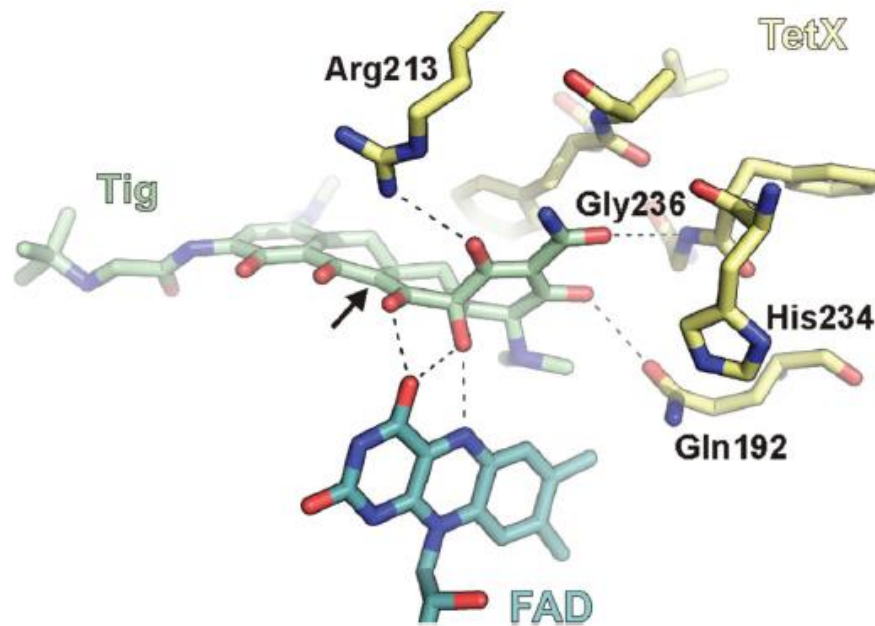
Η παρουσία της ογκώδους πλευρικής αλυσίδας προκαλεί στερεοχημική παρεμπόδιση που αποτρέπει την πρόσδεση του αμινο-ακυλ tRNA στη θέση A ενώ ταυτόχρονα δυσχεραίνει την αποβολή του αντιβιοτικού από το βακτηριακό κύτταρο, μειώνοντας την πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας του μικροβίου κατά του συγκεκριμένου αντιβιοτικού μέσω ειδικών για τις τετρακυκλίνες αντλιών εκροής (Barbour et al, 2009).

Τα σύμπλοκα τετρακυκλινών με ιόντα  $Mg^{2+}$  φαίνεται να αναστέλλουν τη βακτηριακή ανάπτυξη, πάλι με πρόσδεση στην 30S υπομονάδα των βακτηριακών ριβοσωμάτων.

### **Ανάπτυξη αντοχής**

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται ανάπτυξη αντίστασης και στην τιγκεκυκλίνη. Σε στελέχη *Klebsiella pneumoniae* και άλλα Gram-αρνητικά βακτήρια έχουν παρατηρηθεί μεταλλάξεις που οδηγούν στην υπερέκφραση αντλιών εκροής π.χ. Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) pumps (Elnasser et al, 2020; Sajad et al, 2021), με αποτέλεσμα το αντιβιοτικό να χάνει τη δράση του έναντι αυτών των μικροοργανισμών. Κάτι αντίστοιχο εμφανίζεται και σε κάποια Gram-θετικά βακτήρια, της στον *Staphylococcus aureus*, με την υπερέκφραση των πρωτεϊνών μεταφορέων Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE) (Rusu et al, 2021).

Άλλος ένας τρόπος αντίστασης είναι οι μεταλλάξεις σε γονίδια των ριβοσωμάτων και μεταλλάξεις στο 16S rRNA, με αποτέλεσμα σε μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης του αντιβιοτικού στη θέση δράσης του. Σε αερόβια βακτήρια, FAD-εξαρτώμενες μονοξυγενάσες μπορούν να τροποποιήσουν χημικά το μόριο της τιγκεκυκλίνης (προσθέτουν υδροξύλιο στη θέση C11), κάτι που αλλάζει τη δομή της και την ικανότητά της να συμπλέκεται με ιόντα μαγνησίου.



Εικόνα 19: Υπολείμματα της TetX πρωτεΐνης αναγνωρίζουν τους υποκαταστάτες στους δακτυλίους A και B της τιγκεκυκλίνης ώστε να δράσουν ως διαμεσολαβητές της FAD μονοξυγενάσης, που θα προκαλέσει υδροξυλίωση στη θέση C11 και μετέπειτα διάσπαση του μορίου (Nguyen et al, 2014).

Η μεταβολή αυτή οδηγεί σε μείωση της χημικής συγγένειας του μορίου με τα ριβοσώματα ενώ ταυτόχρονα είναι πιο επιρρεπής σε αποδόμηση, ακόμα και χωρίς την παρουσία κατάλληλων ενζύμων.

Αυτός ο τύπος αντίστασης μπορεί να μεταφερθεί μέσω πλασμιδίων (γονίδιο tetX) από ένα ανθεκτικό βακτήριο σε άλλο, με αποτέλεσμα την εξάπλωση της αντίστασης στην τιγκεκυκλίνη (Nguyen et al, 2014; Rusu et al, 2021; Sajad et al, 2021).

Η παρουσία γονιδίων AcrB, RamR και TetA γονιδίων σχετίζεται με μειωμένη ανταπόκριση των βακτηρίων στην τιγκεκυκλίνη (Elnasser et al, 2020).

Ένας τελευταίος τρόπος αντίστασης περιλαμβάνει την αύξηση της συμπλοκοποίησης της τιγκεκυκλίνης με ιόντα  $Mg^{2+}$  πριν την είσοδό της στο βακτηριακό κύτταρο, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να διαπεράσει τη μεμβράνη του και να φτάσει στη θέση δράσης της.



#### 4.2.6 Αντιμικροβιακό φάσμα

Η τιγκεκυκλίνη θεωρείται σε θεραπευτικές δόσεις βακτηριοστατικό αντιβιοτικό με ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα, της και οι μητρικές τετρακυκλίνες. Έχει της βελτιωμένη δράση κατά των Gram-θετικών και Gram-αρνητικών πολυανθεκτικών βακτηρίων σε σχέση με της προηγούμενες γενιές τετρακυκλινών.

Πίνακας 4: Αντιμικροβιακό φάσμα τιγκεκυκλίνης (Tygacil SPC, 2016).

Παθογόνο
<b>Συνήθως ευαίσθητα είδη</b>
<b>Θετικά κατά Gram Αερόβια</b>
<i>Enterococcus</i> spp.†
<i>Staphylococcus aureus</i> *
<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i> *
Ομάδα <i>Streptococcus anginosus</i> * (συμπεριλαμβανομένων <i>S. anginosus</i> , <i>S. intermedius</i> και <i>S. constellatus</i> )
<i>Streptococcus pyogenes</i> *
<i>Viridans</i> group streptococci
<b>Αρνητικά κατά Gram Αερόβια</b>
<i>Citrobacter freundii</i> *
<i>Citrobacter koseri</i>
<i>Escherichia coli</i> *
<i>Klebsiella oxytoca</i> *
<b>Αναερόβια</b>
<i>Clostridium perfringens</i> †
<i>Peptostreptococcus</i> spp.†
<i>Prevotella</i> spp.
<b>Είδη για τα οποία η επίκτητη αντοχή μπορεί να αποτελεί πρόβλημα</b>
<b>Αρνητικά κατά Gram Αερόβια</b>
<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Enterobacter cloacae</i> *
<i>Klebsiella pneumoniae</i> *
<i>Morganella morganii</i>
<i>Proteus</i> spp.
<i>Providencia</i> spp.
<i>Serratia marcescens</i>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<b>Αναερόβια</b>
<i>Bacteroides fragilis</i> group†
<b>Συγγενώς ανθεκτικοί μικροοργανισμοί</b>
<b>Αρνητικά κατά Gram Αερόβια</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
* υποδηλώνεται είδος έναντι του οποίου η δραστηριότητα θεωρείται ότι έχει καταδειχθεί ικανοποιητικά σε κλινικές μελέτες.

Στον Πίνακα 4 αναφέρονται τα είδη βακτηρίων κατά των οποίων είναι δραστική η τιγκεκυκλίνη αλλά και κάποια στα οποία δεν εμφανίζει δραστικότητα.

Οι οργανισμοί κατά των οποίων εμφανίζει δραστικότητα περιλαμβάνουν ανθεκτικούς στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* (MRSA), πολυανθεκτικούς στρεπτόκοκκους π.χ. *Streptococcus anginosus* grp, ανθεκτικούς στη βανκομυκίνη εντερόκοκκους (VRE) π.χ. *Enterococcus faecalis*, gram-αρνητικά βακτήρια που

παράγουν εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάση π.χ. *Escherichia coli* (ESBL στελέχη), *Klebsiella pneumoniae*, το *Actinobacter baumannii* και πολλούς αναερόβιους οργανισμούς (Dixit et al, 2014; Fan et al, 2020).

Υπάρχουν και κάποια παθογόνα για τα οποία η τιγκεκυκλίνη φαίνεται να δρα ως βακτηριοκτόνο, όπως η *Legionella pneumophila*, ο *Streptococcus pneumoniae* (Rusu et al, 2021), ο *Haemophilus influenzae* και η *Neisseria gonorrhoeae* (Slover et al, 2007).

Η τιγκεκυκλίνη εμφανίζει περιορισμένη δραστικότητα έναντι κάποιων Gram-αρνητικών βακτηρίων όπως τα είδη *Klebsiella* και *Enterobacter* (Barbour et al, 2009).

Αυτή η αντιμικροβιακή ουσία δεν εμφανίζει καμία δραστικότητα κατά των *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Providencia spp.*, και *Morganella morganii* (Slover et al, 2007; Barbour et al, 2009; Dixit et al, 2014).

Ανάλογα με την επικράτηση της επίκτητης αντοχής στα τοπικά στελέχη, μπορεί να είναι αμφισβητήσιμη η δραστικότητα του φαρμάκου αυτού για τους συγκεκριμένους μικροοργανισμούς. Θα πρέπει αυτός ο παράγοντας να λαμβάνεται υπόψιν όταν γίνεται η επιλογή του αντιμικροβιακού από τους ιατρούς (Tygacil SPC, 2016).

#### 4.2.7 Φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική

##### Φαρμακοκινητικές παράμετροι

Στόχος της χορήγησης φαρμακευτικής αγωγής είναι η επίτευξη κατάλληλων επιπέδων της φαρμακευτικής ουσίας στα σημεία-στόχους για ορισμένο χρονικό διάστημα ώστε να δράσει σωστά και να υπάρξει το επιθυμητό θεραπευτικό αποτέλεσμα.

Οι παράγοντες που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων του φαρμάκου μετά τη λήψη του από τον ασθενή και για την εκτίμηση της δραστικότητάς του είναι:

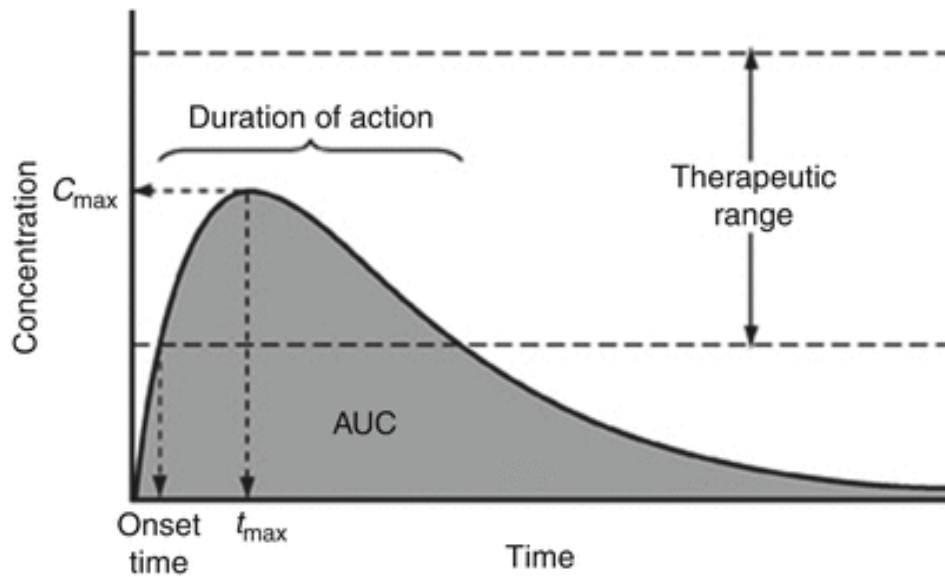
- η μέγιστη συγκέντρωση,  $C_{max}$
- ο χρόνος που αντιστοιχεί στη μέγιστη συγκέντρωση,  $t_{max}$
- η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη, AUC
- η κάθαρση του φαρμάκου από τον οργανισμό του ασθενή, CL
- η συγκέντρωση του φαρμάκου σε κατάσταση ισορροπίας,  $C_{ss}$
- ο όγκος κατανομής του φαρμάκου στον οργανισμό,  $V_D$  και όταν βρίσκεται στη σταθερή κατάσταση,  $V_{ss}$

Η **επιφάνεια κάτω από την καμπύλη (AUC)** αντικατοπτρίζει την ποσότητα του φαρμάκου που υπάρχει στον οργανισμό σε σχέση με το χρόνο που έχει περάσει και η μέτρησή της είναι πάρα πολύ σημαντική φαρμακοκινητική παράμετρος. Μπορεί να υπολογιστεί από τον τύπο:

$$AUC_{t_1-t_2} = \frac{c_1 - c_2}{2} * (t_2 - t_1)$$

Όπου  $c_1, c_2$ : διαδοχικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου

$t_1, t_2$ : αντίστοιχοι χρόνοι δειγματοληψίας



Εικόνα 20: Σχηματική απεικόνιση καμπύλης συγκέντρωσης φαρμάκου στο πλάσμα ως προς το χρόνο μετά από *per os* χορήγηση ενός φαρμάκου. Απεικονίζονται οι βασικές φαρμακοκινητικοί παράμετροι  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  και AUC.

Κατά τον προσδιορισμό του κατάλληλου δοσολογικού σχήματος λαμβάνονται επίσης υπόψη η Κατώτατη Αποτελεσματική Συγκέντρωση (Minimum Effective Concentration-MEC) και η μέγιστη ανεκτή συγκέντρωση (Maximum Tolerated Concentration-MTC) ώστε τα επίπεδα του φαρμάκου να παραμένουν στο θεραπευτικό εύρος της συγκεκριμένης θεραπευτικής ουσίας.

Στις περιπτώσεις των αντιβιοτικών, ανάλογα με το είδος τους (βακτηριοστατικό ή βακτηριοκτόνο), αντί για την MEC χρησιμοποιείται η τιμή MIC ή η τιμή MBC που έχει υπολογιστεί για το συγκεκριμένο μόριο έναντι του παθογόνου που προκαλεί τη λοίμωξη.

#### **Συγκεκριμένες τιμές φαρμακοκινητικών παραμέτρων της τιγεκυκλίνης**

Έχει παρατηρηθεί ότι η δράση της τιγεκυκλίνης είναι χρονοεξαρτώμενη και παρουσιάζεται παρατεταμένο μετα-αντιβιοτικό αποτέλεσμα (Slover *et al*, 2007) μετά από χορήγηση δόσης 3 mg/kg (Zhou *et al*, 2020).

Η τιγεκυκλίνη προσδένεται μη-τυπικά και μη- γραμμικά σε πρωτεΐνες σε ποσοστό 71% - 89% (Barbour *et al*, 2009; Mukker *et al*, 2014), με εμφάνιση ενός ιδιαίτερου φαινομένου. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του αντιβιοτικού στο αίμα, τόσο περισσότερο μειώνεται το κλάσμα της ελεύθερης τιγεκυκλίνης.

Επίσης, η πρόσδεση στις πρωτεΐνες του αίματος φαίνεται να εξαρτάται από το pH (Barbour *et al*, 2009). Επιπλέον η περιεκτικότητα του αίματος σε αλβουμίνη επηρεάζει σημαντικά το ποσοστό πρόσδεσης της αντιμικροβιακής αυτής ουσίας.

Η τιγεκυκλίνη παρουσιάζει μεγάλο όγκο κατανομής (7 – 10 L/kg), γεγονός που υποδεικνύει ότι το αντιβιοτικό κατανέμεται γρήγορα και εκτενώς της ιστούς (*Muralidharan et al, 2005; Hoffmann et al, 2007*).

Πίνακας 5: Όγκοι κατανομής σε κλινικές μελέτες.

Όγκος κατανομής $V_D$ (L)	Όγκος κατανομής σε κατάσταση ισορροπίας $V_{ss}$ (L)	Κλινική μελέτη
-	7.43 ± 2.10 /kg	Conte Jr et al, 2005
7 – 10 /kg	8 /kg	Muralidharan et al, 2005
7 – 9 /kg	-	Greer N. et al, 2006
2.5 – 7.0 /kg	9.1 /kg	Agwuh et al, 2006
-	568	Rodvold et al, 2006
-	3.16 ± 0.5 /kg	Ruiz et al, 2020
-	229.9	Zhou et al. 2020
438.6	-	De Pascale et al, 2020

Ο όγκος κατανομής φαίνεται να αλλάζει σημαντικά σε βαριά ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς εθελοντές, στους οποίους είχαν πραγματοποιηθεί οι αρχικές μελέτες (*Xie et al, 2014; Xie et al, 2017; Borsuk-De Moor et al, 2018; Ruiz et al, 2020*).

#### **Κατανομή σε ιστούς:**

Το μοντέλο που χρησιμοποιείται περισσότερο από τους ερευνητές για να περιγράψει την κινητική της τιγεκυκλίνης είναι το δι-διαμερισματικό, με κεντρικό διαμέρισμα το πλάσμα και περιφερικό διαμέρισμα τους υπόλοιπους ιστούς στους οποίους κατανέμεται το αντιβιοτικό (*Agwuh et al, 2006*). Η φαρμακοκινητική της είναι γραμμική (*Barbour et al, 2009*), με την κατανομή της να είναι μηδενικής τάξης ενώ η απέκκρισή της να ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης (*Ruiz et al, 2020*).

Μετά από ενδοφλέβια έγχυση, η τιγεκυκλίνη διεισδύει εύκολα και σε μεγάλος εύρος σε διάφορους ιστούς (*Barbour et al, 2009*) αλλά έχει χαμηλή συγκέντρωση στο πλάσμα.

Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εμφανίζονται στη χοληδόχο κύστη, στον μυελό των οστών, τους θυρεοειδείς αδένες, στους σιελογόνους αδένες, στον σπλήνα και στα νεφρά (*Rodvold et al, 2006; Barbour et al, 2009*). Επιτυγχάνονται ικανοποιητικές συγκεντρώσεις στο δέρμα, της πνευμονικούς ιστούς, στο ήπαρ και τα οστά (*De Pascale et al, 2020*).

Μπορεί επίσης να εισχωρήσει γρήγορα στα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα, φτάνοντας τη μέγιστη συγκέντρωση μετά από μια ώρα (*Barbour et al, 2009*).

Αυτή η ιδιότητα είναι εξαιρετικής σημασίας, καθώς παθογόνα όπως ο *Staphylococcus aureus*, μπορούν να επιβιώσουν μέσα σε αυτά και να προκαλέσουν δευτερεύουσες λοιμώξεις αν δεν έχει επιτευχθεί η κατάλληλη συγκέντρωση του αντιβιοτικού στο εσωτερικό αυτών των κυττάρων (Yang et al, 2021).

Η διαφορά στις συγκεντρώσεις πλάσματος και ιστών έχει αποτυπωθεί με τους παρακάτω λόγους: για τη χοληδόχο κύστη, η συγκέντρωση φαίνεται να είναι 23 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή του πλάσματος, στον πνεύμονα ο λόγος είναι 2:1 ενώ στο κόλον η σχέση είναι 2.6:1 (Slover et al, 2007).

Σε ασθενείς που βρίσκονται σε κρίσιμη κατάσταση φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά η κατανομή του φαρμάκου λόγω της διαταραγμένης κυκλοφορίας του αίματος (Zhou et al, 2020) και υπάρχει μεγάλη διακύμανση στις  $C_{min}$  που επιτυγχάνει η τιγεκυκλίνη σε αυτούς τους ασθενείς (Fan et al, 2020).

Η τιγεκυκλίνη λόγω του μεγέθους και της λιποφιλικότητάς της ( $\log P=0.8$ ), δεν μπορεί να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, κάτι που αποδεικνύεται από το 5.5 – 40 % της συγκέντρωσης της τιγεκυκλίνης στο πλάσμα που καταφέρνει τελικά να ανιχνευτεί στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (Barbour et al, 2009; Slover et al, 2007). Παρόλα αυτά, σε κλινική μελέτη (Mei et al, 2016) με αρχική ενδοκοιλιακή και συνέχεια με ενδοφλέβια χορήγηση του αντιβιοτικού παρατηρήθηκε ότι η τιγεκυκλίνη θα μπορούσε να γίνει θεραπεία επιλογής σε μηνιγγίτιδα από πολυανθεκτικά βακτήρια, αναπτύσσοντας κατάλληλες συγκεντρώσεις στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό.

Δεδομένα από αρκετά μεγάλο αριθμό φαρμακοκινητικών/φαρμακοδυναμικών (PK/PD) και κλινικών μελετών (Agwuh et al, 2006; MacGowan, 2008; Barbour et al, 2009; Xie et al, 2017; Yao et al, 2020; Fan et al, 2020) έχουν δείξει ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο λόγος της περιοχής κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης στο πλάσμα ανά το χρόνο της την ελάχιστη βακτηριοστατική συγκέντρωση (AUC/MIC) για την πρόβλεψη της απόκρισης της ασθενή σε θεραπεία με αυτό το αντιβιοτικό. Προτείνεται εναλλακτικά και η χρήση της σχέσης  $AUC_{0-12h} * V/MIC$  για τον ίδιο σκοπό (Zhou et al, 2020).

Για θετικό θεραπευτικό αποτέλεσμα στις ενδείξεις του φαρμάκου έχουν τεθεί οι παρακάτω στόχοι (breakpoints) από την EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) λόγου  $AUC_{0-24}/MIC$  :

- α) επιλεγμένες λοιμώξεις του δέρματος και μαλακών μορίων (cSSSI):  $\geq 17.9$
- β) περίπλοκες ενδο-κοιλιακές λοιμώξεις (cIAI):  $\geq 6.96$
- γ) πνευμονία της κοινότητας (CAP):  $\geq 4.5$

Τα breakpoints που προτείνονται για ασθενείς με επιλεγμένες λοιμώξεις του δέρματος και μαλακών μορίων ή περίπλοκες ενδο-κοιλιακές λοιμώξεις είναι χαμηλότερα από τα αντίστοιχους στόχους για άλλες τετρακυκλίνες ( $\geq 25$ ), κάτι που μπορεί να οφείλεται στον μεγαλύτερο όγκο κατανομής της τιγεκυκλίνης (Barbour et al, 2009).

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6) αναφέρονται οι τιμές  $c_{max}$  και AUC στο πλάσμα σύμφωνα με διάφορες κλινικές μελέτες:

Πίνακας 6: Τιμές  $c_{max}$  και AUC τιγεκυκλίνης όπως αυτές εμφανίζονται στη βιβλιογραφία.

Μέγιστη συγκέντρωση $c_{max}$ (μg/mL)	Επιφάνεια κάτω από την καμπύλη AUC (μg * h/mL)	Κλινική μελέτη
0.72 ± 0.24	1.73 ± 0.64 (0-12h)	Conte Jr et al, 2005
0.82 ± 0.05	2.19 ± 0.32 (0-12h)	Sun et al, 2005
1.17 ± 0.18	4.98 ± 0.95	Muralidharan et al, 2005
0.6 – 1.5	5	Greer N. et al, 2006
0.62 ± 0.09	3.1 ± 0.4	Agwuh et al, 2006
1.45	5.19	Rodvold et al, 2006
0.621 σε υγιείς 0.794 και 0.837 σε ασθενείς με cIAI 0.4 σε ασθενείς με cSSI	3.07 σε υγιείς 3.16 σε ασθενείς με cIAI 2.24 σε ασθενείς με cSSI	MacGowan et al, 2008
1.55 ± 0.55	7.94 ± 2.46 σε ασθενείς 1.73 ± 0.64 σε υγιείς	Xie et al, 2014
-	4.713	Mei et al, 2016
2.2	-	Barco et al. 2020
0.34 [0.15 – 1.03]	3.61 [2.55 – 10.39]	De Pascale et al, 2020

#### Απέκκριση:

Η κάθαρση της τιγεκυκλίνης ( $CL_{TGC}$ ) είναι από 0,2 – 0,3 L/hr/kg και μπορεί να αυξηθεί σε ασθενείς με μεγαλύτερο σωματικό βάρος ή αυξημένη κάθαρση κρεατινίνης ( $CL_{CR}$ ) (Xie et al 2017; Zhou et al 2020). Αύξηση στη δόση του φαρμάκου δεν φαίνεται να επηρεάζει την κάθαρση του φαρμάκου (Barbour et al, 2009).

Ο χρόνος ημίσειας ζωής ( $t_{1/2}$ ) του φαρμάκου στον οργανισμό είναι πολύ μεγάλος, από 27 - 67 h και εμφανίζει αρκετά μεγάλη διακύμανση. Η διακύμανση αυτή μάλλον οφείλεται στις διαφορές στην πρόσδεση στις πρωτεΐνες του πλάσματος ή/και σε διάφορους ιστούς, ανάλογα με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού (Hoffmann et al, 2007; Barbour et al, 2009).

Η βασική οδός απέκκρισης της τιγεκυκλίνης και των μεταβολιτών της είναι η χολική - 59% της δόσης του αντιβιοτικού απομακρύνεται μέσω χολής/κοπράνων - ενώ δευτερεύουσα οδός είναι η νεφρική - 33% της δόσης απομακρύνεται στα ούρα, 22% της ολικής δόσης ως αμετάβλητη τιγεκυκλίνη (Hoffmann et al, 2007; MacGowan, 2008). Για αυτό το λόγο είναι πάρα πολύ σημαντική η στενή παρακολούθηση ασθενών που εμφανίζουν χολόσταση (Tygacil SPC, 2016).

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται οι τιμές για την κάθαρση και το χρόνο ημίσειας ζωής του φαρμάκου όπως αυτές αποτυπώνονται σε κλινικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί.

Πίνακας 7: Τιμές κάθαρσης και χρόνου ημίσειας ζωής τιγκεκυκλίνης σε διάφορες έρευνες.

Κάθαρση CL <sub>TC</sub> (L/h)	Χρόνος ημίσειας ζωής t <sub>1/2</sub> (h)	Κλινική μελέτη
-	15 ± 0.6	Conte Jr et al, 2005
-	44.9 ± 13.5	Sun et al, 2005
0.2 – 0.3 /kg	37 - 67	Muralidharan et al, 2005
-	36	Greer N. et al, 2006
~0.2 / kg	22 σε μια δόση 100 mg 66 σε πολλαπλές δόσεις 100 mg	Agwuh et al, 2006
21.8	~27	Rodvold et al, 2006
16.5 σε υγιείς 18.3 και 15.9 σε ασθενείς με cIAI	-	MacGowan et al, 2008
0.19 - 0.34 /kg	11 - 46	Barbour et al, 2009
7.50 ± 1.11	-	Mei et al, 2016
22.1	-	Borsuk-De Moor et al, 2018
23.1	-	Zhou et al, 2020
42.1	7.2	De Pascale et al, 2020
0.18 ± 0.13 / kg		Ruiz et al, 2020
-	60.7 ± 23.4	Fan et al, 2020

#### Μεταβολισμός:

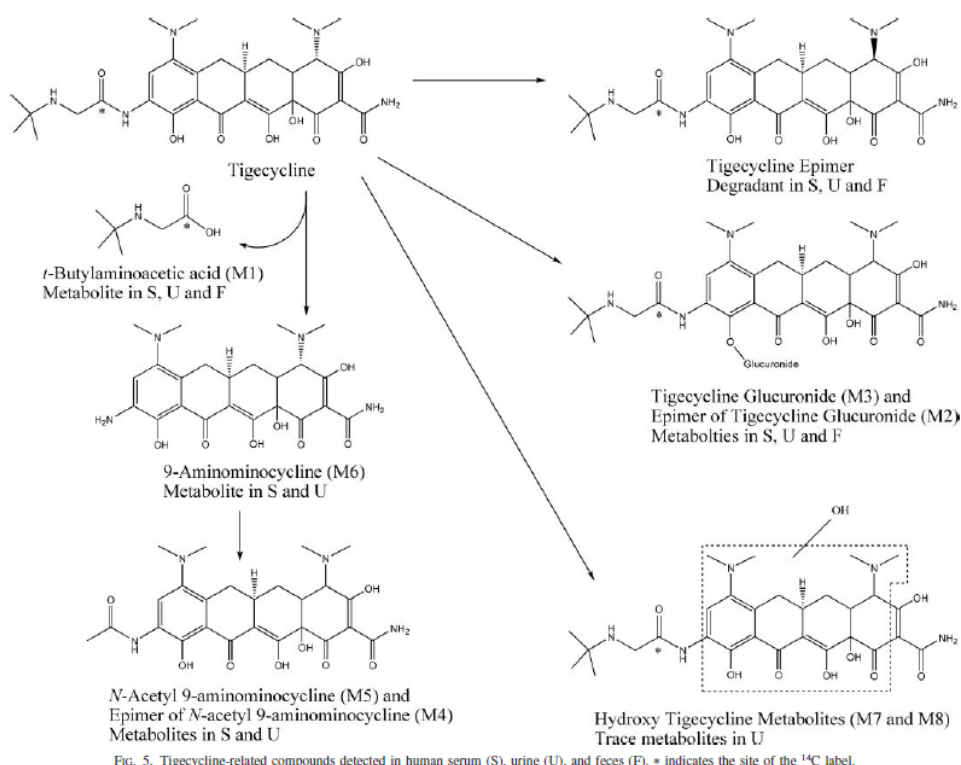
Γενικά, η τιγκεκυκλίνη δεν μεταβολίζεται εκτενώς πριν την απέκκριση (λιγότερο από 20% της αρχικής δόσης).

Έχουν ανακαλυφθεί οχτώ μεταβολίτες του φαρμάκου αυτού στον άνθρωπο ενώ δύο κύρια μεταβολικά μονοπάτια έχουν ταυτοποιηθεί.

- Το πρώτο είναι η γλυκουρονιδίωση του μητρικού μορίου στο επιμέρες (μεταβολίτες M2 και M3).
- Το δεύτερο είναι η υδρόλυση της αμιδικής πλευρικής ομάδας t-βούτυλαμινοακέτυλ- ώστε να παραχθούν οι μεταβολίτες M1 και M5.

Ο μεταβολίτης M5 μπορεί να μεταβληστεί περαιτέρω και να παραχθούν οι μεταβολίτες M4 και M6 μέσω ακετυλίωσης (Agwuh et al, 2006; Slover et al, 2007; Hoffmann et al, 2007; MacGowan, 2008).

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 20) απεικονίζονται σχηματικά οι χημικές δομές των μεταβολιτών της τιγκεκυκλίνης που απομακρύνονται από το πλάσμα, τα ούρα και τα κόπρανα από μων που έχουν λάβει το αντιβιοτικό.



Εικόνα 21: Χημικές δομές μεταβολιτών τιγκεκυκλίνης (Hoffmann et al, 2007).

### Παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη φαρμακοκινητική:

Η φαρμακοκινητική της τιγκεκυκλίνης δε φαίνεται να επηρεάζεται από την ηλικία, το φύλο ή τη νεφρική λειτουργία. Ακόμα και ασθενείς με μειωμένη νεφρική λειτουργία ή που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση δεν χρειάζονται προσαρμογή στη δόση που τους χορηγείται (Agwuh et al, 2006; Slover et al, 2007; MacGowan, 2008; Barbour et al, 2009; Lu et al, 2020; Li et al, 2020).

Παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές είναι το σωματικό βάρος σε σχέση με τον δείκτη μάζας σώματος (Body Mass Index, BMI) (Xie et al, 2017; Zhou et al, 2020; Yao et al, 2020) και η μειωμένη ηπατική λειτουργία. Σε τέτοιες περιπτώσεις, μπορεί να χρειαστεί προσαρμογή των δόσεων.

Για σοβαρή ηπατική δυσλειτουργία (Child Pugh C) προτείνεται η χορήγηση αρχικής δόσης 100 mg και η συντήρηση με μειωμένες δόσεις των 25 mg ανά δωδεκάωρο (Slover et al, 2007; Tygacil SPC, 2016; Li et al, 2020) ενώ σε παχύσαρκους ασθενείς εξετάζεται το ενδεχόμενο δοσολογικού σχήματος με αυξημένες δόσεις: 200 mg ως αρχική και 100 mg ανά δωδεκάωρο για συντήρηση των θεραπευτικών επιπέδων (Xie et al, 2017; Yao et al, 2020).



### **Πιθανές αλληλεπιδράσεις με άλλες φαρμακευτικές ουσίες:**

Η τιγκεκυκλίνη δεν δρα ως αναστολέας ή επαγωγέας κάποιου κυττοχρωματικού ενζύμου αφού δε μεταβολίζεται από κάποια από της έξι ισομορφές του κυττοχρώματος P450, κάτι που περιορίζει της πιθανότητες αλληλεπίδρασης με άλλα φάρμακα (*Slover et al, 200; Barbour et al, 2009*).

Η φαρμακευτική αυτή ουσία είναι υπόστρωμα της Ρ-γλυκοπρωτεΐνης, οπότε αν συγχορηγηθεί με της ουσίες που επηρεάζουν την Ρ-gr (αναστολείς π.χ. κετοκοναζόλη ή ενισχυτές π.χ. ριφαμπικίνη), μπορεί να προκληθούν αλλαγές στη φαρμακοκινητική της τιγκεκυκλίνης (*Barbour et al, 2009; Tygacil SPC, 2016*).

Η βασική αλληλεπίδραση που εμφανίζει η τιγκεκυκλίνη είναι με τη βαρφαρίνη, αφού μειώνει την κάθαρσή της (*Tygacil SPC, 2016*), κάτι που οδηγεί σε αύξηση του φαρμακολογικού της αποτελέσματος άρα και του χρόνου προθρομβίνης. Όταν γίνεται συγχορήγηση των δύο αυτών φαρμάκων, θα πρέπει να ελέγχεται προσεκτικά η ικανότητα πήξης του ασθενή (*Zimmerman et al, 2008; Barbour et al, 2009*).

Εμφανίζεται και αλληλεπίδραση με αντισυλληπτικά χάπια, η οποία μειώνει τη δραστηριότητά τους. Μπορεί να υπάρχει ανάγκη χρήσης μιας επιπλέον μεθόδου αντισύλληψης κατά τη διάρκεια θεραπείας μιας γυναίκας με τιγκεκυκλίνη (*Tygacil ΦΟΧ, 2016*).

Ερευνάται η συγχορήγηση χηλικών παραγόντων που δεσμεύουν τα ιόντα  $Mg^{2+}$  και  $Ca^{2+}$  αφού φαίνεται με αυτό τον τρόπο να μειώνεται η MIC της τιγκεκυκλίνης. Κάτι τέτοιο θα επέτρεπε τη χορήγηση χαμηλότερων δόσεων στους ασθενείς με ίδιο φαρμακολογικό αποτέλεσμα με ταυτόχρονη μείωση των πιθανών τοξικών επιδράσεων στον οργανισμό τους (*Deitchman et al, 2019*).

Δυναμική συνέργεια ως προς το αντιμικροβιακό αποτέλεσμα εμφανίζεται στη συγχορήγηση τιγκεκυκλίνης με κολιστίνη και μεροπενέμη, για αυτό και χρησιμοποιούνται μαζί αυτές οι τρεις ουσίες ως συνδυαστικό θεραπευτικό σχήμα (*Tsala et al, 2018*) σε έκτακτες καταστάσεις.

Παρατηρείται φυσικοχημική αστάθεια όταν η τιγκεκυκλίνη χορηγείται από τον ίδιο καθετήρα με την αμφοτερικίνη Β ή το λιπιδικό της σύμπλεγμα, τη διαζεπάμη, την εσομεπραζόλη, την ομεπραζόλη και ενδοφλέβια διαλύματα που μπορούν να αυξήσουν το pH σε τιμές μεγαλύτερες του 7, δηλαδή σε αλκαλικές συνθήκες (*Tygacil SPC, 2016*).

#### 4.2.8 Ανεπιθύμητες ενέργειες και τοξικότητα στον ξενιστή

Η βασική ανησυχία με τη χρήση της τιγκεκυκλίνης είναι η αυξημένη θνησιμότητα με τη χρήση της σε σχέση με άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες αναφοράς (*Tygacil SPC, 2016*).

Από τα δεδομένα που είχαν συλλεχθεί φαίνεται ότι οι θάνατοι ήταν αποτέλεσμα επιδείνωσης της λοίμωξης, επιπλοκών της λοίμωξης ή άλλα υποκείμενα νοσήματα. Αυτή η παρατήρηση οδήγησε στην έκδοση black box warning από τον FDA (*FDA Drug Safety Communication, 2010*) και η χρήση της τιγκεκυκλίνης περιορίστηκε μόνο της περιπτώσεις που δεν υπάρχει κάποια εναλλακτική λύση για την αντιμετώπιση της λοίμωξης.

Πέρα από την αυξημένη θνησιμότητα, η τιγκεκυκλίνη, ως τετρακυκλίνη, εμφανίζει της τυπικές ανεπιθύμητες ενέργειες της ομάδας.

Συχνά εμφανίζονται διαταραχές του γαστρεντερικού συστήματος με κύριες τη ναυτία και τον εμετό ενώ έχει παρατηρηθεί ότι οι γυναίκες μεταξύ 18 και 50 ετών έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης αυτών (*Sajad et al, 2021*). Υπάρχει συσχετισμός μεταξύ της δόσης που χορηγείται και την εμφάνιση των συγκεκριμένων ανεπιθύμητων ενεργειών (*MacGowan, 2008*).

Η μέγιστη ανεκτή δόση είναι 100 mg για υγιή άτομα που δεν έχουν λάβει τροφή και 200 mg για άτομα που είχαν λάβει πρώτα γεύμα, αφού η κατανάλωση τροφής μειώνει την εμφάνιση των γαστρεντερικών ενοχλήσεων χωρίς να επηρεάζει τη φαρμακοκινητική του αντιβιοτικού (*Barbour et al, 2009; Sajad et al, 2021*).

Πέρα από την χορήγηση μετά από γεύμα, για την αντιμετώπιση αυτών των διαταραχών μπορεί να χορηγηθεί προφυλακτικά κάποιο αντιεμετικό όπως η μετοκλοπραμίδη, η οντανσετρόνη, η προχλορπεραζίνη, η σουκραλφάτη ή το τριμεθοβενζαμίδιο (*Muralidharan et al, 2005; Barbour et al, 2009*).

Άλλες χαρακτηριστικές για τις τετρακυκλίνες ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνουν τα συμπτώματα φωτοτοξικότητας, την ερυθραιμία και τα δερματικά εξανθήματα.

Λόγω της ισχυρής πρόσδεσης σε οστικούς ιστούς μέσω συμπλοκοποίησης με τα ιόντα ασβεστίου και την εναπόθεσή της τιγκεκυκλίνης σε αυτούς (*Agwuh et al, 2006*), προκαλείται αλλαγή στο χρώμα των δοντιών και στα παιδιά αναστέλλεται την ανάπτυξη των οστών.

Σπάνια μπορεί να εμφανιστεί τοξικότητα στα νεφρά, το ήπαρ (*Ruiz et al, 2020*), με μεγαλύτερη συχνότητα στις γυναίκες (*Fan et al, 2020*) καθώς και το πάγκρεας, ιδιαίτερα σε ασθενείς που πάσχουν από κυστική ίνωση (*Hemphil et al, 2016*).

Άλλος ένας κίνδυνος από τη χορήγηση αυτού του αντιβιοτικού είναι η επιλοίμωξη από *Clostridium difficile*, που οδηγεί σε ψευδομεμβρανώδη κολίτιδα (*Tygacil SPC, 2016*) ή υπερλοιμώξεις από άλλα παθογόνα που είναι εγγενώς ανθεκτικά στην τιγκεκυκλίνη, όπως η *Pseudomonas aeruginosa*, τα είδη *Proteus*, *Providencia* ή *Morganella* μέσα στις πρώτες 8 μέρες θεραπείας (*Pournaras et al, 2016*). Η θεραπεία με τιγκεκυκλίνη μπορεί να επιτρέψει και την ανάπτυξη μυκήτων (*Tygacil SPC, 2016*).

Κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι η τιγκεκυκλίνη μπορεί να προκαλέσει διαταραχές στην πήξη του αίματος, με μείωση των επιπέδων ινωδογόνου στο πλάσμα και αύξηση του χρόνου προρθομβίνης και μερικώς ενεργοποιημένης θρομβοπλαστίνης (Slover et al, 2007).

Σε χορήγηση πολύ υψηλών δόσεων τιγκεκυκλίνης (200 mg αρχική δόση με 100 mg δόσεις ανά δώδεκα ώρες), έχει παρατηρηθεί οξεία μεταβολική οξείδωση χωρίς χάσμα ανιόντων, μια πολύ απειλητική για τη ζωή κατάσταση.

#### **Αναπαραγωγική τοξικότητα**

Μετά από τα αποτελέσματα μελετών σε ζώα, η τιγκεκυκλίνη κατηγοριοποιείται ως τερατογόνο κλάσης D λόγω πρόκλησης ανωμαλιών στα οστά και μειωμένου βάρους στα έμβρυα. Για αυτό το λόγο πρέπει να χορηγείται με προσοχή σε εγκύους (Slover et al, 2007; Tygacil SPC, 2016).

Επίσης, δεν είναι γνωστό αν η τιγκεκυκλίνη περνά στο μητρικό γάλα άρα ο θηλασμός κατά τη διάρκεια θεραπευτικής αγωγής με αυτό το αντιβιοτικό πρέπει να τίθεται υπό συζήτηση με τον θεράποντα ιατρό (Tygacil ΦΟΧ και SPC, 2016).

Δεν υπάρχουν ενδείξεις για αρνητική επίδραση της τιγκεκυκλίνης στην γονιμότητα των ατόμων που τη λαμβάνουν (Tygacil SPC, 2016).

## 5 ΧΡΗΣΗ ΕΥΡΗΜΑΤΩΝ – ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανασκόπηση βιβλιογραφικών δεδομένων για το αντιβιοτικό τιγκεκυκλίνη καθώς και η ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθοδολογίας που θα επιτρέπει την ανίχνευση των επιπέδων του αντιβιοτικού αυτού στο πλάσμα ασθενών που νοσηλεύονται λόγω κάποιας σοβαρής λοιμώξεως και χρησιμοποιείται το φάρμακο αυτό στη θεραπεία τους.

Η αναλυτική μέθοδος που αναπτύχθηκε, έχει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που την καθιστούν χρήσιμη και κατάλληλη. Είναι αρκετά απλή σαν διαδικασία (προκατεργασία και ανάλυση δειγμάτων), χωρίς να απαιτεί πολύ χρόνο και δεν έχει πολύ υψηλό κόστος σε αναλώσιμα ώστε να μπορεί να χρησιμοποιείται και να παρέχει πολύτιμες πληροφορίες στους θεράποντες ιατρούς για να σχεδιάζεται καλύτερα η αγωγή των ασθενών.

Η γνώση των πραγματικών επιπέδων που έχουν επιτευχθεί μετά τη χορήγηση του αντιβιοτικού στον πάσχοντα, επιτρέπει την παρακολούθηση και προσαρμογή της θεραπείας ώστε να επιτευχθεί το καλύτερο θεραπευτικό αποτέλεσμα και να υπάρχουν καλύτερες εκβάσεις.

Μετά από ανάγνωση αρκετών επιστημονικών άρθρων και με γνώση της οργανολογίας που διαθέτουν το εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής και το εργαστήριο Περιβαλλοντικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, επιλέξαμε να αναπτύξουμε μια τεχνική βασιζόμενη στις αρχές της Υγρής Χρωματογραφίας με συζευγμένη Φασματοσκοπία Μάζας (LC-MS/MS).

Πραγματοποιήθηκαν εργαστηριακά πειράματα για την εύρεση των κατάλληλων συνθηκών ανάλυσης (εκλουστικό σύστημα, στήλες χρωματογραφίας, φασματομετρικές συνθήκες, θερμοκρασία, αποθήκευση προτύπων και δειγμάτων) και των περιορισμών της μεθόδου (όρια ανίχνευσης, εκλεκτικότητα).

Τελικά, η μέθοδος εφαρμόστηκε σε ελάχιστα κλινικά δείγματα από τη Β' Παθολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων ώστε να διαπιστωθεί η επιτυχία της στο υπόστρωμα για το οποίο αναπτύχθηκε.

## B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ – ΥΛΙΚΑ - ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Για τον διαχωρισμό των συστατικών του αίματος χρησιμοποιήθηκε φυγόκεντρος Optima XPN (Beckman Coulter, USA).

Κατά την παρασκευή των διαλυμάτων και την επεξεργασία των δειγμάτων χρειάστηκαν:

- ογκομετρική φιάλη των 50 mL,
- σωληνάρια Eppendorf των 2mL,
- αυτόματες πιπέτες 1-10μL, 10-100μL, 100-1000μL και αντίστοιχα tip
- vortex mixer
- φυγόκεντρος Eppendorf (Eppendorf SE, Hamburg, Germany)
- πλαστική σύριγγα 5 mL
- υάλινη μικροπιπέτα
- πλαστική πιπέτα Παστέρ
- υάλινα φιαλίδια
- πλαστικά φιαλίδια τύπου falcon 5 mL και 10 mL

Δείγματα και πρότυπα διαλύματα αποθηκεύτηκαν σε κατακόρυφο καταψύκτη βαθιάς κατάψυξης (-80°C).

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπερ-υψηλής πίεσης με ανιχνευτή μάζας **LTQ-Orbitrap FT (UHPLC-LTQ/Orbitrap MS)**. Το όργανο αυτό αποτελείται από:

- έναν αυτόματο δειγματολήπτη (Accela AS autosampler, model 2.1.1),
- μια αντλία αυτόματης ροής δείγματος (Accela quaternary gradient U-HPLC-pump, model 1.05.0900),
- μια στήλη χρωματογραφίας (Hypersil GOLD PFP reverse phase analytical column, 50mm x 2.1 mm i.d., 1.9μm, ThermoFischer Scientific Inc., Bremen, Germany)
- ένα φασματόμετρο μαζών LTQ Orbitrap XL 2.5.5 SP1 (ThermoFischer Scientific Inc., Bremen, Germany).

Η γραμμική παγίδα ιόντων (LTQ), που είναι μέρος του υβριδικού αναλυτή μαζών, ήταν εξοπλισμένη με πηγή ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού (Ion Mas Electrospray Ionization, ESI) με ικανότητα λειτουργίας σε μέθοδο θετικών ή αρνητικών ιόντων.

Ο έλεγχος του χρωματογραφικού συστήματος και η επεξεργασία του φάσματος μαζών που παραγόταν από το όργανο πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού προγράμματος Xcaliber v.2.1 (ThermoElectron, San Jose, CA, USA).

## **2. ΠΡΟΤΥΠΗ ΕΝΩΣΗ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΔΙΑΛΥΤΕΣ**

Ως πηγή του αντιβιοτικού τιγκεκυκλίνη χρησιμοποιήθηκε φιαλίδιο του πρωτότυπου σκευάσματος Tygacil 50mg (Pfizer Europe, Belgium), που χρησιμοποιείται στην κλινική πρακτική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή και επεξεργασία των διαλυμάτων και των δειγμάτων περιλαμβάνουν μεθανόλη (FischerScientific, Leicester, UK) και κεκαθαρμένο ύδωρ (FischerScientific, Leicester, UK). Για τα πειράματα επιλέχθηκαν διαλύτες υψηλής καθαρότητας, κατάλληλοι για αναλύσεις με υγρή χρωματογραφία (LC-MS Grade).

Χρησιμοποιήθηκε επίσης και φορμικό οξύ (Merck, Datmstadt, Germany) για ρύθμιση του pH.

## **3. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ**

Κατά το σχεδιασμό, την ανάπτυξη και την επικύρωση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν κλινικά δείγματα από την Β Παθολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Κάποια από τα δείγματα αφορούσαν άτομα τα οποία δε λάμβαναν τιγκεκυκλίνη και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες και κατά την δημιουργία της καμπύλης αναφοράς.

Τα υπόλοιπα ήταν από ασθενείς υπό φαρμακευτική αγωγή με το συγκεκριμένο αντιβιοτικό και χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμή της μεθόδου υπό πραγματικές συνθήκες.

## **4. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ**

Τα πρότυπα διαλύματα εργασίας με τιγκεκυκλίνη παρασκευάστηκαν με την παρακάτω διαδικασία:

- Αρχικά, έγινε προσθήκη με σύριγγα ύδατος LC-MS grade στο φιαλίδιο του Tygacil για πλήρη διάλυση της τιγκεκυκλίνης, η οποία βρίσκεται σε μορφή λυοφιλοποιημένης κόνεος. Με αυτό τον τρόπο ολοκληρώθηκε η δημιουργία διαλύματος που περιέχει τα 50 mg του αντιβιοτικού.
- Έπειτα ακολούθησε η απομάκρυνση του διαλύματος από το φιαλίδιο και η μετακίνηση του στην ογκομετρική φιάλη, όπου αραιώθηκε με προσθήκη ύδατος μέχρι τελικό όγκο 50 mL για την παρασκευή πρότυπου πυκνού διαλύματος παρακαταθήκης 1000 ppm (1mg/mL).
- Από το πυκνό πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης, ακολούθως παρασκευάστηκαν με αραιώση σε ύδωρ τα πρότυπα διαλύματα εργασίας σε φιαλίδια από γυαλί ή πλαστικό, ανάλογα με τον όγκο που απαιτούνταν του τελικού διαλύματος. Οι συγκεντρώσεις διαλυμάτων εργασίας που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας ήταν 5 ppm, 20 ppm και 100 ppm.

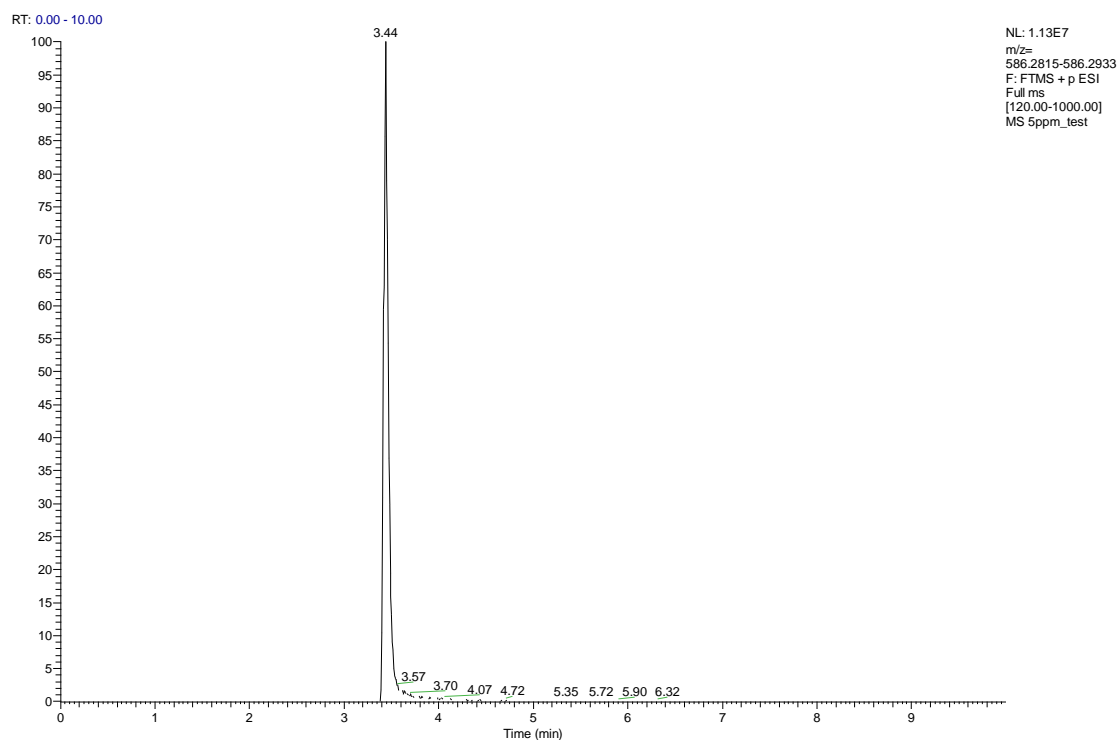
Η αποθήκευση των πρότυπων διαλυμάτων (πυκνού παρακαταθήκης και εργασίας σε διαφορετικές συγκεντρώσεις) έγινε σε αεροστεγή πλαστικά και γυάλινα φιαλίδια σε κατακόρυφο καταψύκτη με θερμοκρασία -80°C.

## 5. ΜΕΘΟΔΟΣ

### 5.1 ΑΡΧΙΚΗ ΔΟΚΙΜΗ

Το πρώτο βήμα κατά την ανάπτυξη της μεθόδου ήταν η δοκιμαστική ανάλυση του προτύπου υδατικού διαλύματος τιγκεκυκλίνης με συγκέντρωση 5 ppm, ώστε να επιβεβαιωθεί η δυνατότητα ανίχνευσης του αντιβιοτικού από το αναλυτικό όργανο.

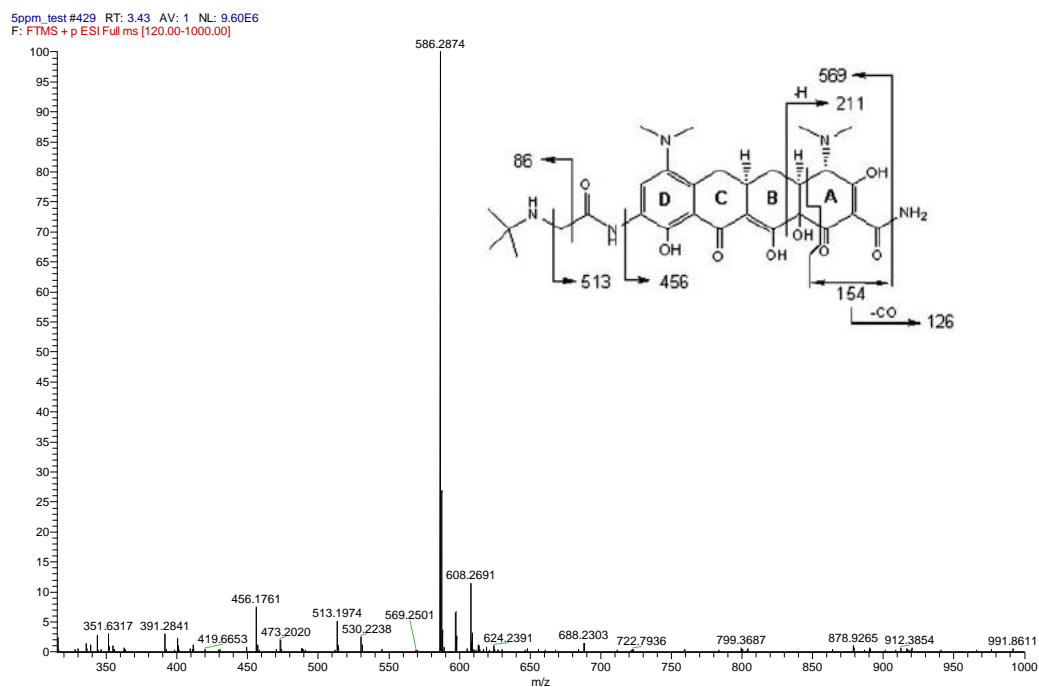
Ως αποτέλεσμα της δοκιμής αυτής εμφανίστηκε μια οξεία και καθαρή κορυφή στο χρωματογράφημα και ο χρόνος έκλουσης του πρώτου αυτού δείγματος ήταν τα 3.44 min στην αρχική αναλυτική στήλη Hypersil GOLD PFP (Εικόνα 22).



Εικόνα 22: Χρωματογράφημα με κορυφή τιγκεκυκλίνης 5 ppm.

Αντίστοιχα, στο φάσμα μάζας που προέκυψε από το Orbitrap σε full scan mode εμφανίστηκαν καθαρά το μητρικό ιόν της τιγκεκυκλίνης  $[M+H]^+$  που αναμέναμε λόγω της μεθόδου θετικού ιοντισμού κατά την ανάλυση, με  $m/z$  586 ως βασική κορυφή και τα υπόλοιπα θραύσματα που προκύπτουν από τη διάσπασή της, με  $m/z$  569, 513 και 456 (Εικόνα 23).

Παρατίθεται το φάσμα (Εικόνα 23) και ο σκελετός τις τιγκεκυκλίνης, στον οποίο βρίσκονται σημειωμένα τα διάφορα σημεία διάσπασης του μορίου και ο λόγος m/z που αναμένεται να δώσει το κάθε θραύσμα (Hoffman et al, 2007).



Εικόνα 23: Φάσμα μάζας με το μητρικό ιόν και τα θραύσματα της τιγκεκυκλίνης σε Full Scan mode.

## 5.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ / ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΟ ΠΛΑΣΜΑ

Για την ανάπτυξη της μεθόδου προετοιμάστηκαν τρεις σειρές διαλυμάτων.

Η υδατική σειρά περιλαμβάνει διαλύματα τιγκεκυκλίνης σε ύδωρ σε ορισμένες συγκεντρώσεις ώστε να γίνει ένας πρώτος έλεγχος της διακριτικής ικανότητας του οργάνου ως προς την τιγκεκυκλίνη.

Η σειρά εμβολιασμένου (spiked) πλάσματος προσπαθεί να προσομοιάσει τις πραγματικές συνθήκες που είναι πιθανόν να εμφανιστούν κατά την ανάλυση νοσοκομειακών δειγμάτων και χρησιμοποιήθηκε για να προετοιμαστεί η καμπύλη αναφοράς πάνω στην οποία θα βασίζεται η ανάλυση των κλινικών δειγμάτων από ασθενείς που λαμβάνουν τιγκεκυκλίνη ως μέρος της θεραπευτικής τους αγωγής.

Η υδατική σειρά matrix matched χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη επίδρασης του υποστρώματος και αποτελείται από τιγκεκυκλίνη σε καθορισμένες συγκεντρώσεις σε τελικό όγκο 200 μL υδατικής φάσης και με προσθήκη 600 μL μεθανόλης.

### 5.2.1 Προετοιμασία προς ανάλυση δειγμάτων

Η γενική μέθοδος περιλαμβάνει τη δημιουργία δειγμάτων τελικού όγκου 800 μL σε σωληνάρια Erpendorf, τα οποία θα αποτελούνται από 200μL υδατική φάση, στα οποία προστίθενται 600 μL μεθανόλης.



Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- Το κάθε δείγμα αναδεύεται σε vortex για 15 δευτερόλεπτα ώστε να ομογενοποιηθεί πλήρως.
- Έπειτα ακολουθεί φυγοκέντριση 10 λεπτά σε 11.000 στροφές και απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού αφού μετά τη φυγοκέντριση εμφανίζεται καθίζηση στερεού υλικού στο κάτω μέρος του σωληνάριου Eppendorf.
- Το υγρό αυτό συλλέγεται σε γυάλινα φιαλίδια με πώμα που επιτρέπει τη λειτουργία του αυτόματου δειγματολήπτη.
- Τελικό βήμα πριν την ανάλυση είναι η οξίνιση του κάθε δείγματος με μια σταγόνα φορμικού οξέος και η εισαγωγή του φιαλιδίου με το δείγμα στο σύστημα υγρής χρωματογραφίας (UHPLC) με ανιχνευτή μαζών LTQ/Orbitrap FT.

Για τα δείγματα με πλάσμα απαιτείται προκατεργασία ώστε να απομονωθεί το πλάσμα που θα αναλυθεί από το ολικό αίμα που παρέχεται από το νοσοκομείο. Αρχικά πρέπει να γίνει η φυγοκέντριση του φιαλιδίου vacutainer με επικάλυψη EDTA/K<sup>+</sup> που χρησιμοποιείται κατά τη συλλογή του δείγματος αίματος για 5 λεπτά σε 2.400 στροφές.

Το πλάσμα μετά το τέλος της φυγοκέντρισης ανέρχεται στην επιφάνεια και μπορεί εύκολα να απομονωθεί με αυτόματη πιπέτα και να αποθηκευτεί σε πλαστικούς σωλήνες Eppendorf.

Η προκατεργασία αυτή πρέπει να πραγματοποιηθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα από τη στιγμή της αιματοληψίας και αν δεν χρησιμοποιηθεί κατευθείαν το πλάσμα για ανάλυση, μπορεί να αποθηκευτεί σε βαθιά κατάψυξη.

### **5.2.2 Ανάλυση δειγμάτων**

#### ***A) Χρωματογραφικός διαχωρισμός***

Για επιτυχημένο χρωματογραφικό διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε τελικά αναλυτική στήλη Hypersil GOLD PFP reverse phase analytical column (ThermoFischer Scientific, Bremen), που είναι κατάλληλη για χρωματογραφικές αναλύσεις αντίστροφης φάσης με ιδιαίτερη ευαισθησία σε αλογονομένα μόρια ή μόρια με πολικές ομάδες π.χ. υδροξύλια.

Κατά την ανάλυση των δειγμάτων ο όγκος δειγματοληψίας ήταν 5  $\mu$ L, η ταχύτητα ροής ήταν 400 $\mu$ L/min χωρίς μεταβολή και η συνολική διάρκεια της έκλουσης ήταν 5.5 min. Η θερμοκρασία της στήλης ήταν ρυθμισμένη στους 35°C και η πίεση ήταν υψηλή, σε εύρος από 7000 έως 15000 PSI.

Για τον διαχωρισμό των δειγμάτων, ακολουθήθηκε βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης, με κινητή φάση αποτελούμενη από ύδωρ (διαλύτης A) και μεθανόλη (διαλύτης B) με προσθήκη φορμικού οξέος σε περιεκτικότητα 0.1%.

Για τα πρώτα 3 λεπτά, η αναλογία ύδατος προς μεθανόλη ήταν 70:30, από το 3<sup>ο</sup> μέχρι το 4<sup>ο</sup> λεπτό ο διαλύτης έκλουσης αποτελούταν από 100% μεθανόλη και από το 4<sup>ο</sup> λεπτό μέχρι τα 5.5 η αναλογία ύδατος προς μεθανόλη ήταν ξανά 70:30 (Εικόνα 24).

	Time	A%	B%
0	0.00	70.0	30.0
1	0.30	70.0	30.0
2	3.00	0.0	100.0
3	4.00	0.0	100.0
4	4.10	70.0	30.0
5	5.50	70.0	30.0
6		100.0	0.0

Εικόνα 24: Παράμετροι βαθμιδωτού προγράμματος έκλουσης όπως εμφανίζονται στο λογισμικό που ελέγχει το όργανο.

### **B) Φασματομετρία μάζας**

Για την τιγκεκυκλίνη επιλέχθηκε η ανάλυση σε εύρος μαζών  $m/z$  300-1000 ενώ έγινε λήψη φάσματος μαζών πλήρους σάρωσης (full scan mode).

Η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο παρακολούθησης συγκεκριμένου ιόντος (Single Ion Monitoring - SIM), που είναι πιο ευαίσθητη και αποδοτική σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Το υπό μελέτη αντιβιοτικό ανιχνεύεται στη μέθοδο θετικών ιόντων, με μητρικό ιόν  $[M+H]^+$ , έτσι βελτιστοποιήθηκαν οι παράμετροι του οργάνου ώστε να λαμβάνεται το βέλτιστο σήμα. Βάση δίνεται στο λόγο  $S/N$ , όπου  $S$  το σήμα και  $N$  ο «θόρυβος» από τη λειτουργία του οργάνου. Οι τιμές των παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν τελικά αναγράφονται αναλυτικά στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8: Τιμές βασικών παραμέτρων του αναλυτή μάζας LTQ-Orbitrap.

Παράμετρος	Θετικός ιοντισμός
Spray voltage	3.5 V
Sheath gas flow	35 au
Auxiliary gas flow	10 au
Capillary voltage	50 V
Capillary temperature	320°C
Tube lens voltage	90 V
Resolution	60000

Η ακρίβεια μάζας των ιόντων σε σχέση με τη θεωρητική μάζα ήταν  $\pm 5$  ppm, με εξωτερική καμπύλη αναφοράς βασισμένη σε πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης.

## 6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 6.1 ΑΡΧΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Πριν την ανάπτυξη της μεθόδου, έγινε σύγκριση αναλυτικών μεθοδολογιών από ήδη δημοσιευμένες εργασίες (Xie et al, 2014; Ozcimen et al, 2014; Borsuk-De Moor et al, 2018; Barco et al, 2020; Yao et al, 2020).

Έτσι επιλέχθηκε ως οργανικός διαλύτης η μεθανόλη και η αναλογία 3:1 οργανικής/υδατικής φάσης που χρησιμοποιήθηκε για την matrix-matched υδατική σειρά, τη σειρά εμβολιασμένου πλάσματος και την επεξεργασία των κλινικών δειγμάτων.

Η μεθανόλη προτιμήθηκε σε σχέση με το ακετονιτρίλιο λόγω της ικανότητάς της να ανακτά την τιγκεκυκλίνη από την υδατική φάση σε ικανοποιητικό επίπεδο, του χαμηλού της κόστους και της σχετικής ευκολίας ως προς τη διαχείρισή της κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Όπως αποδείχθηκε από τις αρχικές δοκιμές, σημαντικό ρόλο παίζει η διατήρηση σωστού pH στο προς ανάλυση δείγμα. Οι πρώτες δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν χωρίς φορμικό οξύ, παρήγαγαν κορυφές διευρυμένες, με ουρά (peak tailing) ή με διάσπαση (split).

*Πίνακας 9: Υπολογισμοί για τη δημιουργία της υδατικής σειράς.*

Επιθυμητή συγκέντρωση (ppm)	Όγκος πρότυπου (μL)	Συγκέντρωση πρότυπου (ppm)	Όγκος ύδατος (μL)
0.1	10	10	990
0.25	25	10	975
0.5	50	10	950
0.75	75	10	925
1	10	100	990
2.5	25	100	975
5	50	100	950

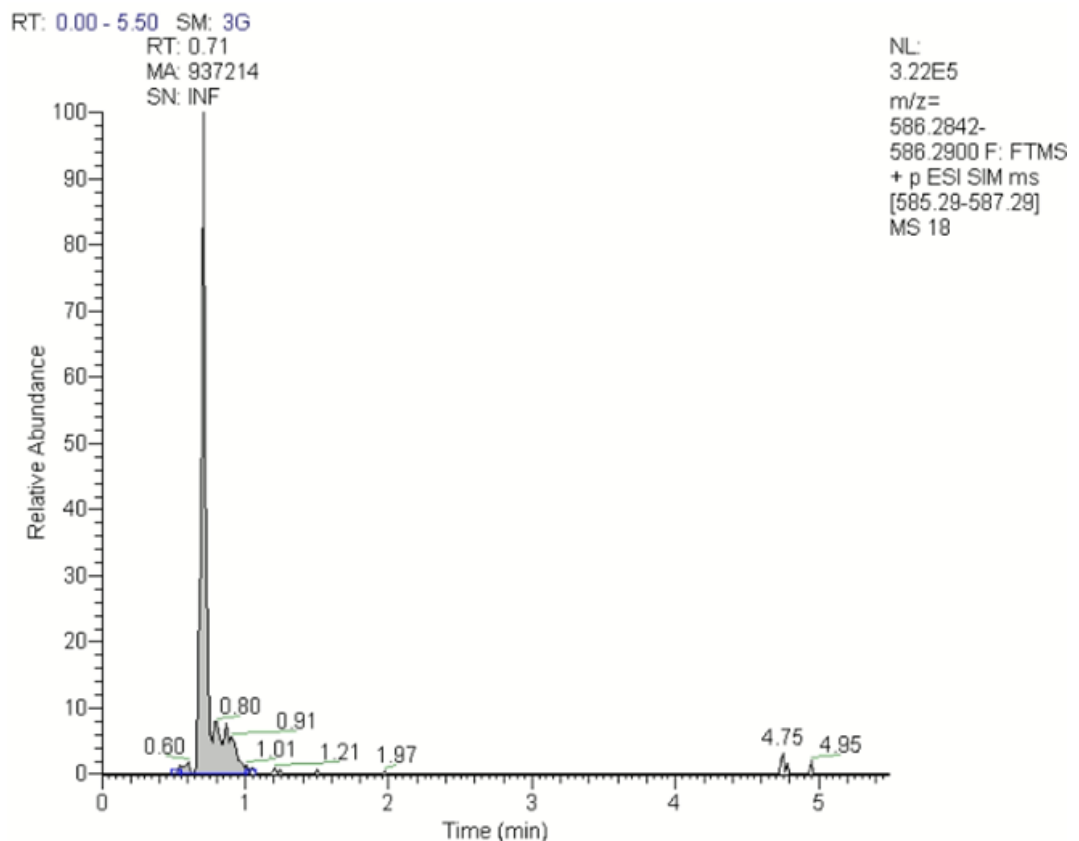
Ανατρέχοντας στη βιβλιογραφία, φαίνεται ότι η τιγκεκυκλίνη προσδιορίζεται καλύτερα όταν βρίσκεται σε όξινη συνθήκη. Έτσι, σε επόμενες δοκιμές χρησιμοποιήθηκε φορμικό οξύ για διατήρηση χαμηλού pH στα υπό ανάλυση δείγματα (Ozcimen et al, 2014; Shao et al, 2017; Barco et al, 2020; Yao et al, 2020).

Για τη ρύθμιση του pH προτιμήθηκε το φορμικό οξύ έναντι του τριχλωροξικού οξέος λόγω της μικρότερης συγκράτησής του στη χρωματογραφική στήλη. Η χρήση του φορμικού οξέος οδηγεί σε μικρότερη καταστροφή της στήλης και χαμηλότερο carryover που θα μπορούσε να επηρεάσει αποτελέσματα άλλων αναλύσεων.

Όσον αφορά την επιλογή της κατάλληλης στήλης, πέρα από την Hypersil GOLD PFP reverse phase που προτιμήθηκε τελικά, έγινε και δοκιμή με την SpeedCore PFP analytical column (50 mm × 2.1 mm, 2.6 μm particle size; Fortis Technologies, Cheshire, UK). Η στήλη αυτή, παρόλο που έχει μικρότερο κόστος, άρα θα ήταν μια επιθυμητή επιλογή για τις αναλύσεις, δεν επέτρεπε τον σωστό διαχωρισμό της τιγκεκυκλίνης. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να μην μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αυτή τη μεθοδολογία.

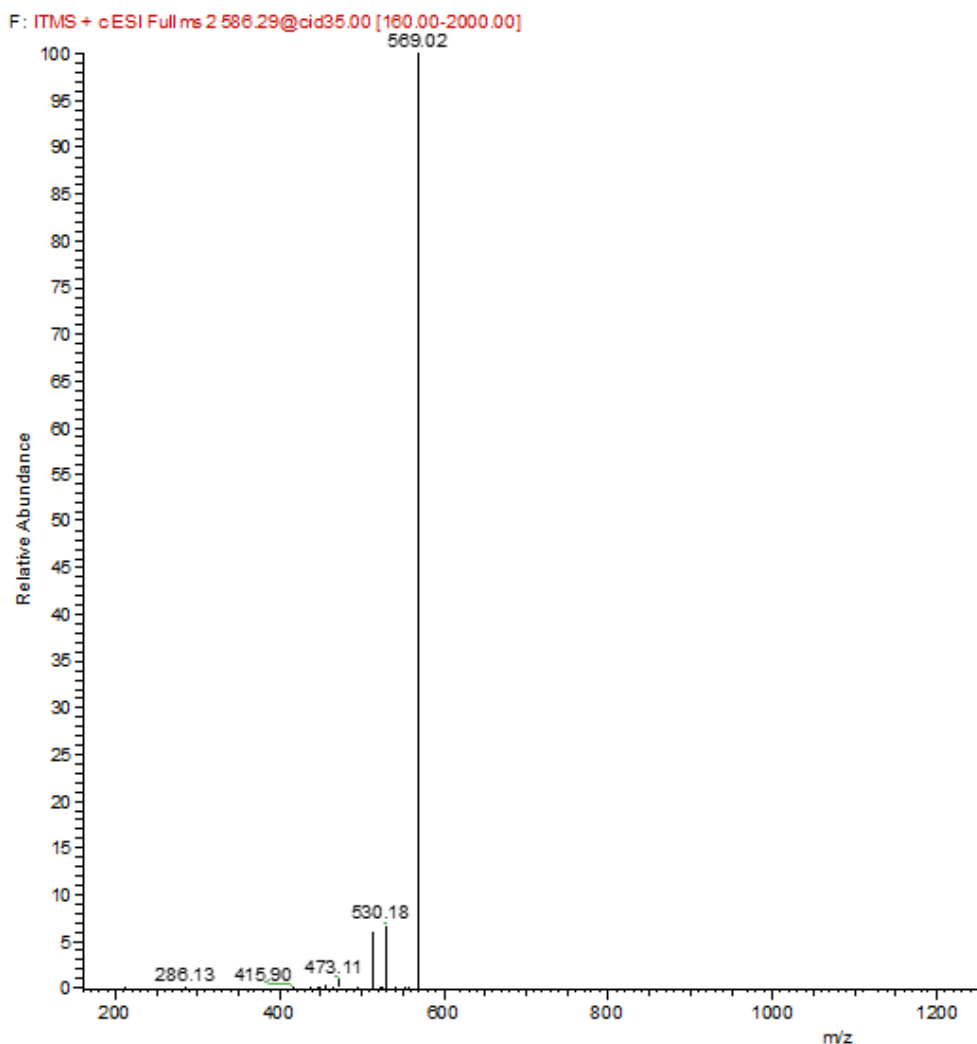
Η Hypersil GOLD PFP που επιλέχθηκε τελικά περιέχει πενταφθοροφαίνυλο στατική φάση, κάτι που της επιτρέπει μεγαλύτερη απόδοση και εκλεκτικότητα σε σχέση με τις κλασικές C18 στήλες που χρησιμοποιούνται ευρέως σε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς ανάστροφης φάσης. Είναι κατάλληλη για πολλές διαφορετικού τύπου ενώσεις με έμφαση σε αυτές που περιέχουν πολικές ομάδες, όπως τα υδροξύλια, τα καρβοξύλια και οι νιτροομάδες καθώς και για αλογονομένα πολικά μόρια λόγω της ομάδας φθορίου που είναι συζευγμένη στη στατική φάση. Εμφανίζει μεγάλη ευαισθησία και παρέχει ικανοποιητικό διαχωρισμό, με καλοσηματισμένες κορυφές για το συγκεκριμένο αντιβιοτικό χωρίς να επηρεάζεται αρνητικά η ταχύτητα της ανάλυσης.

Μετά από τις παραπάνω παρατηρήσεις, στις δοκιμές με δείγματα όξινου pH μέσω ρύθμισης με φορμικό οξύ και χρησιμοποιώντας την Hypersil GOLD PFP reverse phase analytical column, παράχθηκαν οξείες καμπύλες τιγκεκυκλίνης σε χρόνο έκλουσης τα 0.71 min στη δεύτερη και τελική στήλη (Εικόνα 25).



Εικόνα 25: Κορυφή έκλουσης τιγκεκυκλίνης 5 ppm.

Ο λόγος  $m/z$  για το βασικό ιόν της τιγκεκυκλίνης  $[M+H]^+$  μετά από ανάλυση στο LTQ-Orbitrap σε SIM mode ήταν ίσος με 586.29 (Εικόνα 25) και η κορυφή θραύσματος που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση είναι η  $m/z$  513.2 μαζί με την  $m/z$  569.2 (Εικόνα 23).



Εικόνα 26: Θραύσματα μετά από MS/MS διάσπαση της τιγκεκυκλίνης.

Έπειτα από MS/MS ανάλυση, χρησιμοποιώντας ως πρόδρομο ιόν το βασικό θραύσμα με  $m/z$  586.29 παράγεται βασική κορυφή με  $m/z$  569.02, που προκύπτει από απομάκρυνση της αμίνης του C2 και θραύσμα προϊόντος με  $m/z$  473.11, που πιθανότατα προκύπτει από απομάκρυνση του τερτ-βουτυλάμινο οξικού οξέος από τον υποκαταστάτη του C9 (Εικόνα 26).

Η μέθοδος θραυσματοποίησης που χρησιμοποιήθηκε για την MS<sup>2</sup> ανάλυση ήταν η CID (Collision Induced Dissociation).

## 6.2 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

### 6.2.1 Επίδραση υποστρώματος

Ο όρος επίδραση υποστρώματος (matrix effect) αναφέρεται στη σύνθετη επίδραση του συνόλου των συστατικών που είναι δυνατόν να περιέχονται σε ένα δείγμα στο τελικό σήμα που παράγεται και ανιχνεύεται από το όργανο.

Η τεχνική LC/MS που χρησιμοποιεί ως πηγή ιοντισμού τον ψεκασμό σε ηλεκτρικό πεδίο (ESI) είναι ιδιαίτερα ευάλωτη σε αυτό το φαινόμενο διότι τα συνεχκλούμενα μόρια του υποστρώματος αλληλοεπιδρούν με τους αναλύτες κατά τη διάρκεια του ιοντισμού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα στη μεταβολή (αύξηση ή μείωση) του τελικού σήματος που λαμβάνεται από τους αναλυτές.

Για την εκτίμηση της έκτασης της επίδρασης υποστρώματος πρέπει να πραγματοποιηθεί σύγκριση της κλίσης που προκύπτει από τη καμπύλη βαθμονόμησης με πρότυπα διαλύματα αναφοράς προσομοίωσης υποστρώματος (matrix-matched standards) με την κλίση που προκύπτει από την αντίστοιχη καμπύλη προτύπων διαλυμάτων των αναλυτών σε διαλύτη.

Η αναλογία των δύο αυτών κλίσεων, «υποστρώματος» προς «διαλύτη» (matrix/solvent slope), είναι δείκτης για το αν το υπόστρωμα επηρεάζει θετικά ή αρνητικά το σήμα της κορυφής.

Η τιμή της αναλογίας πρέπει να κυμαίνεται από το 0.8 έως το 1.2 για να μην είναι σημαντική η επίδραση του υποστρώματος, ενώ έξω από αυτό το εύρος τιμών, θεωρείται ότι είναι ισχυρή η επίδραση και επηρεάζεται σημαντικά το σήμα.

*Πίνακας 10: Υπολογισμοί για τη matrix-matched υδατική σειρά δειγμάτων.*

Επιθυμητή συγκέντρωση (ppm)	Όγκος πρότυπου (μL)	Συγκέντρωση πρότυπου (ppm)	Όγκος ύδατος (μL)
0.06	10	5	190
0.125	20	5	180
0.25	40	5	160
0.625	25	20	175
1.25	50	20	150

Μετά από σύγκριση των αποτελεσμάτων των δειγμάτων της υδατικής σειράς matrix matched και τις σειράς εμβολιασμένου πλάσματος, δεν εμφανίζεται σημαντική επίδραση του υποστρώματος στα αποτελέσματα που λαμβάνονται κατά την ανάλυση.

### 6.2.2 Κατασκευή καμπύλης αναφοράς

Η καμπύλη αναφοράς για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων της τιγκεκυκλίνης σε άγνωστα δείγματα κατασκευάστηκε από πρότυπα διαλύματα προσομοίωσης υποστρώματος (σειρά εμβολιασμένου πλάσματος) με τα εξής σημεία: 250 ppb, 500 ppb, 750 ppb, 1 ppm, 2.5 ppm και 5 ppm.

Τα παραπάνω σημεία επιλέχθηκαν γιατί αντικατοπτρίζουν το πιθανό εύρος γραμμικότητας του οργάνου UHPLC/LTQ-Orbitrap για το συγκεκριμένο αντιβιοτικό.

Ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα κατά την προετοιμασία της καμπύλης:

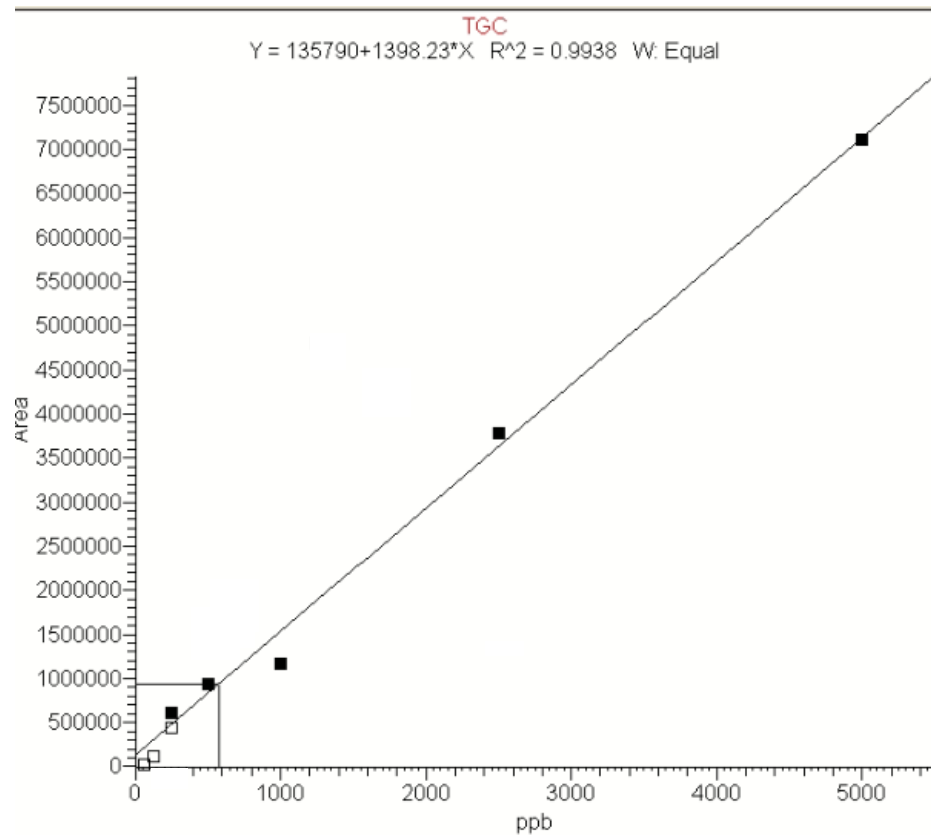
1. Υπολογίστηκαν οι απαιτούμενες συγκεντρώσεις και ποσότητες προτύπων διαλυμάτων που πρέπει να χρησιμοποιηθούν ώστε να προκύψουν οι επιθυμητές τελικές συγκεντρώσεις δειγμάτων καθώς και η αντίστοιχη ποσότητα καθαρού πλάσματος που είναι απαραίτητη.

*Πίνακας 11: Υπολογισμοί για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης.*

Επιθυμητή συγκέντρωση (ppm)	Όγκος πρότυπου (μL)	Συγκέντρωση πρότυπου (ppm)	Όγκος πλάσματος (μL)
0.25	10	5	195
0.5	10	10	190
0.75	15	20	185
1	10	20	190
2.5	5	100	195
5	10	100	190

2. Σε σωληνάρια Eppendorf έγινε αρχικά προσθήκη των ποσοτήτων πλάσματος, έπειτα του προτύπου διαλύματος τιγκεκυκλίνης και τέλος 600 μL μεθανόλης.
3. Κάθε σωληνάριο αναδεύτηκε έντονα με vortex και έπειτα φυγοκεντρήθηκε.
4. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης έγινε συλλογή του υπερκείμενου υγρού και αποθήκευσή του σε γυάλινα φιαλίδια έγχυσης.
5. Σε κάθε φιαλίδιο έγχυσης έγινε προσθήκη μιας σταγόνας φορμικού οξέος και έπειτα τοποθετήθηκε στη θέση εισαγωγής δειγμάτων του οργάνου UHPLC/LTQ-Orbitrap.

Από την ανάλυση των παραπάνω δειγμάτων προέκυψε η παρακάτω καμπύλη βαθμονόμησης, τελικά από 5 σημεία – αφαιρέθηκε το 750 ppb λόγω πειραματικού σφάλματος (Εικόνα 27):



Εικόνα 27: Γραφική παράσταση καμπύλης βαθμονόμησης τιγκεκυκλίνης.

### 6.2.3 Γραμμικότητα μεθόδου

Η γραμμικότητα της μεθόδου αποδεικνύεται από την τιμή του συντελεστή συσχέτισης ( $R^2$ ) της καμπύλης αναφοράς, που είναι ίση με 0.99 και πλησιάζει πάρα πολύ την επιθυμητή τιμή 1 (Εικόνα 27).

### 6.2.4 Εκλεκτικότητα

Πραγματοποιήθηκε δοκιμή με τυφλό (blank) δείγμα πλάσματος από υγιείς εθελοντές που δεν λάμβαναν τιγκεκυκλίνη και στο οποίο δεν είχε γίνει εμβολιασμός με το συγκεκριμένο αντιβιοτικό.

Δεν εμφανίστηκε κορυφή στο χρόνο έκλουσης του μορίου, ούτε αντίστοιχο φάσμα μάζας, κάτι που επιβεβαιώνει την εκλεκτικότητα της μεθόδου.



### 6.2.5 Όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

Μετά από πειράματα υδατικών εμβολιασμένων σειρών σε συγκεντρώσεις από 0.05 ppm (50 ppb) έως 5 ppm, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η τιγκεκυκλίνη ανιχνεύεται από τον αναλυτή σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 0.1 ppm (100 ppb) ενώ ποσοτικοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί με ασφάλεια σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 0.5 ppm (500 ppb).

### 6.3 ΤΕΛΙΚΕΣ ΒΕΛΤΙΣΤΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή σε δείγματα που έχουν υποστεί αιμόλυση ή που περιέχουν υπερλιπιδαιμικό πλάσμα, καθώς οι δύο αυτοί παράγοντες μπορεί να επηρεάσουν την ποσότητα του φαρμάκου που ανακτάται τελικά για ανάλυση (Yao et al, 2020).

Λόγω της σπανιότητας της χορήγησης του συγκεκριμένου αντιβιοτικού δεν ήταν δυνατή η λήψη πολλών δειγμάτων από ασθενείς. Παρόλα αυτά, το ένα δείγμα που λάβαμε από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων υπέστη ακριβώς την ίδια προκατεργασία και αναλυτική διαδικασία. Μετά την ανάλυση, έδωσε αποτελέσματα που συνάδουν με αυτά της σειράς εμβολιασμένου πλάσματος που χρησιμοποιήθηκαν για την καμπύλη βαθμονόμησης.

#### 6.3.1 Προκατεργασία κλινικών δειγμάτων

- α. Φυγοκέντριση ολικού αίματος για 5 min σε 2400 στροφές και απομόνωση υπερκείμενου πλάσματος.
- β. Τοποθέτηση 200 μL πλάσματος σε σωληνάριο Eppendorf και προσθήκη 600 μL μεθανόλης
- γ. Ομογενοποίηση σε vortex mixer για 15 s
- δ. Φυγοκέντριση δειγμάτων σε 11000 στροφές για 10 min και απομόνωση του υπερκείμενου υγρού σε γυάλινα φιαλίδια κατάλληλα για χρωματογραφία
- ε. Προσθήκη μιας σταγόνας φορμικού οξέος
- στ. Τοποθέτηση φιαλιδίων στον δίσκο του αυτόματου συστήματος έγχυσης του οργάνου

#### 6.3.2 Χρωματογραφικός διαχωρισμός

Στήλη: Hypersil Gold PFP reverse phase analytical column (50mm x 2.1mm, 1.9μm)  
Κινητή φάση: ύδωρ και μεθανόλη με φορμικό οξύ 0.1% σε βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης

Υπόλοιπες συνθήκες: ταχύτητα ροής 400 μL/min, χρόνος ανάλυσης 5.5 min

#### 6.3.3 Φασματομετρία μάζας

Μέθοδος ποσοτικοποίησης: Single Ion Monitoring (SIM)

Μέθοδος ιοντισμού: Θετικού ιόντος

Πηγή ιόντων: Ηλεκτροψεκασμού (ESI) με θερμοκρασία 320°C, τάση ψεκασμού ιόντων (ion spray voltage) 3.5V, τάση στα τριχοειδή (capillary voltage) 50V, τάση στο φακό του σωλήνα (tube lens voltage) 90V

Ζεύγος ιόντων: m/z 586.3 → 513.2

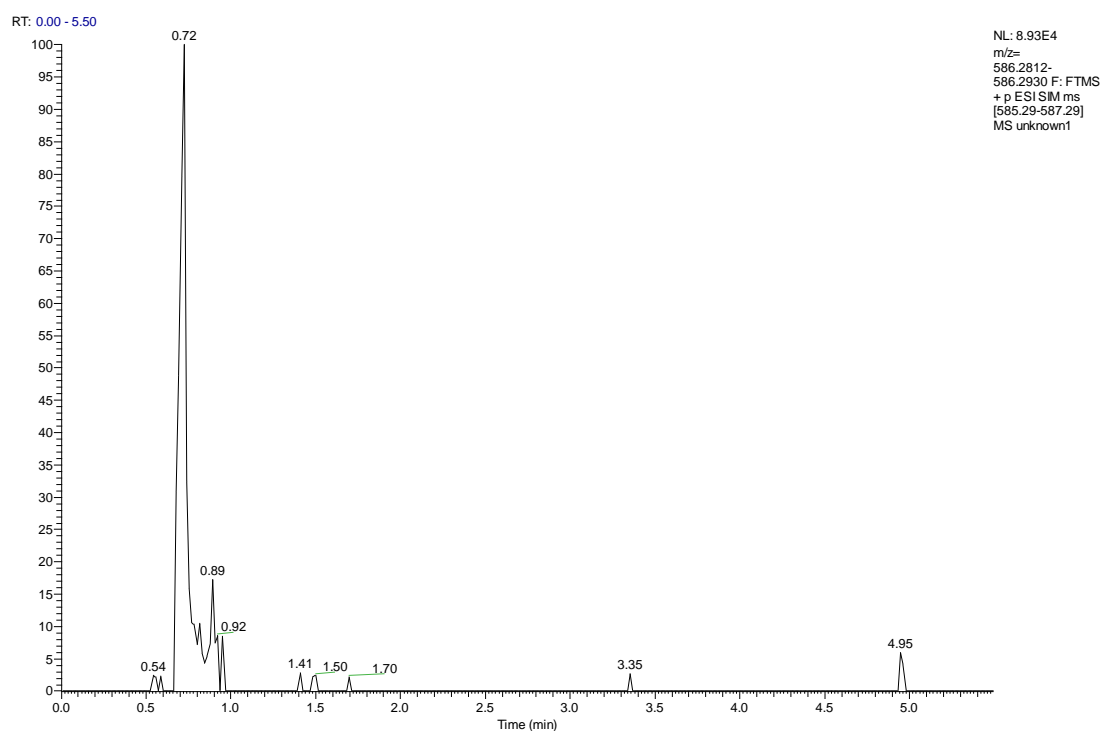
### 6.3.4 Αποτελέσματα εφαρμογής μεθόδου σε κλινικό δείγμα

#### Υγρή χρωματογραφία

Από την ανάλυση του κλινικού δείγματος προέκυψε το παρακάτω χρωματογράφημα (Εικόνα 28).

Εμφανίζεται καλοσηματισμένη κορυφή σε χρόνο έκλουσης 0.72 min, που συνάδει με τον χρόνο έκλουσης που εμφανίζει η τιγκεκυκλίνη κατά την ανάπτυξη της μεθόδου.

Από την πρώτη αυτή εικόνα είχαμε μια καλή ένδειξη για την ύπαρξη τιγκεκυκλίνης στο άγνωστο δείγμα.



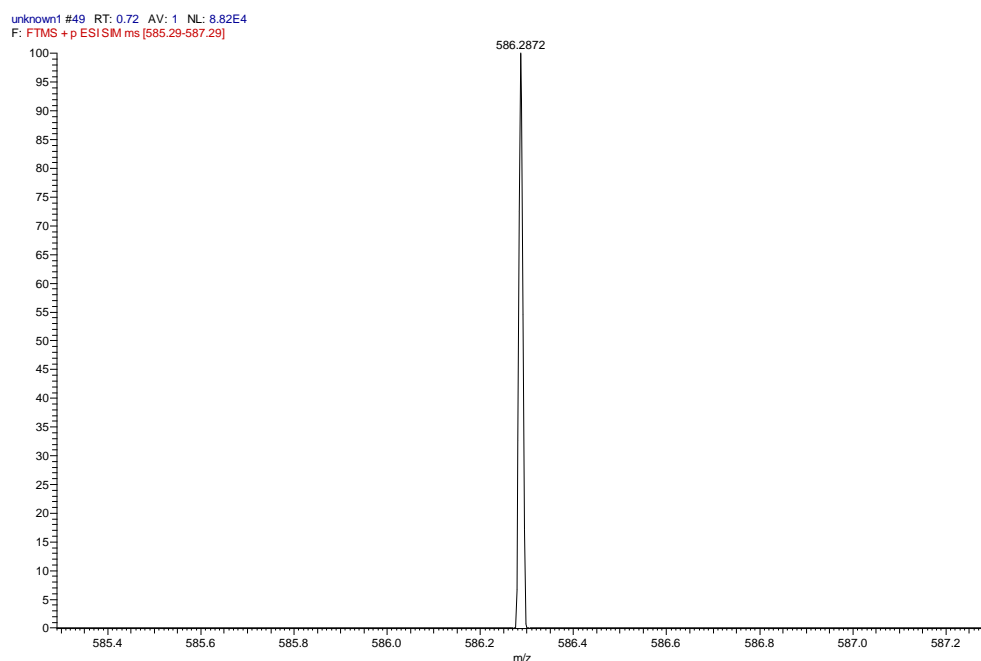
Εικόνα 28: Χρωματογράφημα αγνώστου δείγματος.

Η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη υπολογίζεται αυτόματα από το όργανο και είχε μέγεθος 426681.55. Χρησιμοποιώντας αυτή την πληροφορία και την εξίσωση της καμπύλης αναφοράς μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση της τιγκεκυκλίνης που περιέχεται σε αυτό το κλινικό δείγμα, η οποία τελικά ήταν 295 ppb.

Η συγκέντρωση αυτή (περίπου 0.3 ppb) είναι πολύ κοντά στο κάτω όριο των τιμών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την δημιουργία της καμπύλης βαθμονόμησης αλλά εμπεριέχεται στο εύρος γραμμικότητας της μεθόδου.

## Φασματομετρία μάζας

Για την πλήρη ταυτοποίηση της ουσίας που αντιστοιχεί σε αυτή την κορυφή ως τιγκεκυκλίνη, πέρα από το χρωματογράφημα λάβαμε και φάσμα μάζας σε SIM mode, αναζητώντας το βασικό ιόν  $[M+H]^+$  που προκύπτει από τον θετικό ιοντισμό της τιγκεκυκλίνης κατά τη διάρκεια της φασματομετρικής ανάλυσης με  $m/z$  586.2 (Εικόνα 29).



Εικόνα 29: Φάσμα μάζας (SIM mode) αγνώστου δείγματος.

Όντως εμφανίζεται κορυφή σε  $m/z$  586.28 που αντιστοιχεί στο βασικό ιόν της τιγκεκυκλίνης, η οποία είναι ακριβώς ίδια με την βασική κορυφή που λάβαμε στο Full Scan φάσμα του υδατικού διαλύματος τιγκεκυκλίνης 5 ppm στις αρχικές δοκιμές.

Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει την ύπαρξη τιγκεκυκλίνης στο υπό ανάλυση κλινικό δείγμα.

## ΜΕΡΟΣ Γ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ/ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

### Τιγκεκυκλίνη

Η τιγκεκυκλίνη έχει ευρύ αντιβιοτικό φάσμα με δράση έναντι και πολυανθεκτικών βακτηρίων χωρίς μεγάλο κόστος, πράγμα που την καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμη στην κλινική πράξη σε κρίσιμες περιπτώσεις.

Η MIC<sub>90</sub> για μια ποικιλία πολυανθεκτικών (MDR) παθογόνων όπως ο ανθεκτικός στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* (MRSA), ο ανθεκτικός στη μεθικιλίνη *Staphylococcus epidermidis* (MRSE), τα ανθεκτικά στη βανκομυκίνη είδη *Enterococcus* (VRE), τα MDR είδη *Actinobacter* και *Enterobacteriaceae* κυμαίνεται από 0.12 έως 4 µg/mL (Ozcimen et al, 2014).

Πίνακας 12: Διεθνή *in vitro* breakpoints τιγκεκυκλίνης για ορισμένα είδη βακτηρίων (Sajad et al, 2021).

Bacterial family/species	International breakpoints standard	Broth microdilution (mg/L)	Disk diffusion (mm)
<i>Enterobacteriaceae</i>	EUCAST	S ≤ 0.5, R > 0.5	S ≥ 18, R < 18
	FDA	S ≤ 2, R ≥ 8	S ≥ 19, R ≤ 14
	BSAC	S ≤ 1, R > 2	S ≥ 24, R ≤ 19
<i>Staphylococcus</i> spp.	EUCAST	S ≤ 0.5, R > 0.5	S ≥ 18, R < 18
	FDA	S ≤ 0.5	S ≥ 19
	BSAC	S ≤ 0.5, R > 0.5	S ≥ 26, R ≤ 25
<i>Enterococcus</i> spp.	EUCAST	S ≤ 0.25, R > 0.25	S ≥ 18, R < 18
	FDA	S ≤ 0.25	S ≥ 19
	BSAC	S ≤ 0.25, R > 0.5	S ≥ 21, R < 20
<i>Streptococcus</i> groups A, B, C and G	EUCAST	S ≤ 0.125, R > 125	S ≥ 19, R < 19
	FDA	S ≤ 0.25	S ≥ 19
	BSAC	S ≤ 0.25, R > 0.5	S ≥ 25, R < 19
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	EUCAST	-	-
	FDA	S ≤ 0.06	S ≥ 19
	BSAC	-	-
<i>Clostridioides difficile</i>	EUCAST	S ≤ 0.25, R > 0.25	-
	FDA	S ≤ 4, R > 16	-
	BSAC	S ≤ 0.25	-
<i>Acinetobacter</i> spp.	EUCAST	-	-
	FDA	S ≤ 2, R ≥ 8	-
	BSAC	S ≤ 1, R > 2	S ≥ 20, R < 20
<i>Pseudomonas</i> spp.	EUCAST	-	-
	FDA	S ≤ 2, R ≥ 8	-
	BSAC	-	-

EUCAST European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, FDA Food and Drug Administration, BSAC British Society for Antimicrobial Chemotherapy, S sensitive, R:Resistance

Λόγω της ανάπτυξης αντοχής σε πολλούς αντιμικροβιακούς παράγοντες, πλέον δεν υπάρχουν αρκετά όπλα στη φαρέτρα των ιατρών για την αντιμετώπιση σοβαρών λοιμώξεων.

Η τιγκεκυκλίνη είναι ένα από τα εναπομείναντα αντιβιοτικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ιδιαίτερα δύσκολες στη θεραπεία βακτηριακές λοιμώξεις, λόγω του φάσματός της και της έλλειψης ανάπτυξης αντοχής εναντίον της.

Σε σχέση με άλλα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ενδοσοκομειακά όπως η αζτρεονάμη, η πιπερακιλλίνη, η ιμιπενέμη, η μεροπενέμη, η λεβοφλοξασίνη, η

κεφτριαζόνη, η τετρακυκλίνη και η τριμεθοπρίμη, πολυανθεκτικά Gram-(-) βακτήρια εμφανίζουν πολύ μικρότερο ποσοστό αντοχής στην τιγκεκυκλίνη (Elnasser et al, 2021).

Μεγάλης σημασίας είναι η δραστηριότητα της τιγκεκυκλίνης κατά των βακτηρίων της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, καθώς αυτά είναι συνήθως υπεύθυνα για την εμφάνιση ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων. Φαίνεται να μην αυξάνεται ιδιαίτερα η ανάπτυξη αντοχής στην τιγκεκυκλίνη, αν και σε πολυανθεκτικά MDR στελέχη μπορεί να χρειαστεί χορήγηση μεγαλύτερων δόσεων λίγο αυξημένων MIC (Pournaras et al, 2016).

Η χρήση της τιγκεκυκλίνης πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή, καθώς λανθασμένη δοσολογία, που δεν επιτρέπει την επίτευξη κατάλληλων επιπέδων στο αίμα και τους ιστούς-στόχους μπορεί να αποβεί θανατηφόρα (Dixit et al, 2014).

Έχουν παρατηρηθεί περιπτώσεις θανάτου μετά από χορήγηση του συγκεκριμένου αντιβιοτικού, λόγω μη επιτυχημένης θεραπείας (Sajad et al, 2021). Για αυτό το λόγο έχει εκδοθεί και black box warning για αυτή την ουσία. Η αποτυχία της αγωγής σε ασθενείς που βρίσκονται σε εντατική θεραπεία συχνά βασίζεται στην πολυπλοκότητα της παθοφυσιολογίας που εμφανίζεται καθώς και στο επιβαρυνόμενο ανοσοποιητικό σύστημα των ασθενών αυτών, που δεν μπορεί εύκολα να καταπολεμήσει και μια ενδονοσοκομειακή λοίμωξη, που συνήθως προκαλείται από πολυανθεκτικά βακτήρια (Fan et al, 2020).

Για να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα της τιγκεκυκλίνης και να βελτιωθεί το κλινικό αποτέλεσμα, μπορεί να συγχρησιμοποιηθεί με άλλα αντιβιοτικά όπως η κολιστίνη και η μεροπενέμη ώστε να δράσουν συνεργιστικά (Cai et al, 2016) και να μειωθούν οι ανεπιθύμητες ενέργειες και η πιθανότητα ανάπτυξης αντοχής. Ιδιαίτερα ο συνδυασμός με κολιστίνη φαίνεται να αποτελεί την επιλογή που αποφέρει τα καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα (Dixit et al, 2014).

Από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση φαίνεται ότι η τιγκεκυκλίνη εμφανίζει αρκετά μεγάλη διακύμανση στις φαρμακοκινητικές της ιδιότητες. Παράγοντες όπως το φύλο, η ηλικία, η φυλή, η νεφρική λειτουργία και η ταυτόχρονη λήψη τροφής δεν φαίνεται να επηρεάζουν τις ιδιότητες αυτές. Έτσι το βασικό δοσολογικό σχήμα καλύπτει τους περισσότερους ασθενείς και δεν χρειάζονται ιδιαίτερες προσαρμογές στις δόσεις (Slover et al, 2007).

Αλλαγές στη φαρμακοκινητική του συγκεκριμένου φαρμάκου εμφανίζονται όταν η κατάσταση των ασθενών χειροτερεύει, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις σοβαρών ασθενειών καθώς και σε διακυμάνσεις του σωματικού βάρους, με έμφαση στο δείκτη μάζας σώματος (Body Mass Index - BMI).

Σημαντική είναι και η ηπατική λειτουργία του ατόμου στο οποίο χορηγείται αυτό το αντιβιοτικό, παρόλο που το φάρμακο δε μεταβολίζεται εκτενώς από το ήπαρ. Στις παραπάνω περιπτώσεις απαιτούνται προσαρμογές στο δοσολογικό σχήμα, ανάλογα με την περίπτωση (Slover et al, 2007).

Μείωση των δόσεων κατά 50% συστήνεται σε περίπτωση σοβαρά μειωμένης ηπατικής λειτουργίας (Child Pugh C) και απαιτείται προσεκτική παρακολούθηση αυτών των ασθενών για την ανταπόκρισή τους στη θεραπευτική αγωγή (*Tyggaciil SPC, 2016*).

Αύξηση των δόσεων προτείνεται σε αυξημένο BMI, σοβαρές λοιμώξεις όπως η σήψη ή το σηπτικό σοκ (*Borsuk-DeMoor et al, 2018*) και για ορισμένα παθογόνα πέρα του MRSA, ώστε να επιτευχθεί το κατάλληλο θεραπευτικό αποτέλεσμα. Ορισμένα παθογόνα εμφανίζουν ενδοκυτταρικές μορφές που μπορεί να παίζουν κεντρικό ρόλο σε επιμένουσες ή επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις οπότε για επιτυχημένη θεραπεία πρέπει να εξασφαλίζεται η παρουσία των κατάλληλων επιπέδων τιγκεκυκλίνης στο εσωτερικό των κυττάρων που περιέχουν τα βακτήρια όπως τα φαγοκύτταρα (πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα) ή τα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα (*Yang et al, 2021*).

Το δοσολογικό σχήμα με αυξημένες δόσεις σε περιπτώσεις μεγάλου BMI και πολύ σοβαρών λοιμώξεων όπως η πνευμονία σχετιζόμενη με τη χρήση αναπνευστήρα ή η νοσοκομειακή πνευμονία (200 mg αρχική δόση και συντήρηση με 100 mg ανά 12 ώρες) φαίνεται να είναι ανεκτό και να οδηγεί σε καλύτερη έκβαση των περιπτώσεων αυτών. Δεν παρατηρείται διαφορά στην ανάπτυξη σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών σε σχέση με τις κλασσικές δόσεις που χορηγούνται (*Xie et al, 2017*).

Γενικότερα, πριν τη χορήγηση της τιγκεκυκλίνης και τον καθορισμό του κατάλληλου δοσολογικού σχήματος πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν πολλαπλοί παράγοντες όπως η ιδιοσυγκρασία του ασθενή (βάρος, ηπατική λειτουργία, υποκείμενα νοσήματα και κατάσταση) και πώς αυτή επηρεάζει τη φαρμακοκινητική της τιγκεκυκλίνης, η θέση της λοίμωξης και το είδος του παθογόνου βακτηρίου που την προκαλεί, με τα μοναδικά χαρακτηριστικά του.

Επίσης, θα πρέπει να αξιολογηθεί η δυνατότητα συγχορήγησής της με κάποιο άλλο αντιβιοτικό, με το οποίο εμφανίζει συνεργιστικά αποτελέσματα ή η πιθανότητα χορήγησης ενός εντελώς διαφορετικού αντιβιοτικού, με μικρότερο βαθμό επικινδυνότητας, αν μπορεί να πετύχει τα ίδια θεραπευτικά αποτελέσματα. Στόχος είναι πάντα το όφελος για τον ασθενή και η μείωση του κινδύνου που φέρει μια αγωγή, οπότε πρέπει να εξετάζονται σχολαστικά όλες οι παράμετροι πριν τη συνταγογράφηση ενός φαρμάκου.

### **Αξία ανίχνευσης επιπέδων στο πλάσμα ασθενών**

Όσον αφορά τη σημασία της μέτρησης των επιπέδων που επιτυγχάνει ένα φάρμακο στο πλάσμα του ασθενή, στον οποίο έχει χορηγηθεί, είναι αδιαμφισβήτητη.

Η γνώση της συγκέντρωσης του φαρμάκου στον οργανισμό ανά πάσα στιγμή επιτρέπει τη στενή παρακολούθηση της θεραπείας και της πορείας του ασθενή. Επιτρέπει επίσης έγκαιρες παρεμβάσεις, αν αυτές χρειαστούν, καθώς μπορεί γρήγορα να επιβεβαιωθεί εάν η φαρμακευτική ουσία έχει φτάσει τα θεραπευτικά επίπεδα-στόχους ή ακόμα κι αν τα έχει ξεπεράσει, φτάνοντας σε τοξικά επίπεδα και προκαλώντας ανεπιθύμητες ενέργειες.

Με αυτό τον τρόπο, μπορεί να εξασφαλιστεί μια καλύτερης ποιότητας θεραπεία, που είναι πιο ασφαλής και πιο αποτελεσματική και να βελτιωθούν οι κλινικές εκβάσεις των ατόμων στους οποίους χορηγείται.

### **Αναλυτική μεθοδολογία**

Για τους παραπάνω λόγους είναι εξαιρετικά χρήσιμο να υπάρχει μια εύκολη και γρήγορη αναλυτική μέθοδος που να επιτρέπει τον προσδιορισμό των επιπέδων του αντιβιοτικού στο πλάσμα των ασθενών όταν τους έχει χορηγηθεί ως φαρμακευτική αγωγή. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να επιτευχθεί πιο αποτελεσματική αντιμετώπιση του παθογόνου και να είναι καλύτερες οι εκβάσεις των ασθενών.

Η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε έδειξε ενθαρρυντικά αποτελέσματα και εμφανίζει τα επιθυμητά χαρακτηριστικά, καθώς δεν απαιτεί πολύπλοκη κατεργασία και χρειάζεται λίγος χρόνος για την ανάλυση. Ολόκληρη η διαδικασία μπορεί να ολοκληρωθεί σε λιγότερο από μια ώρα. Φαίνεται επίσης εκλεκτική για το συγκεκριμένο αντιβιοτικό και το εύρος ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης περιλαμβάνει τις συγκεντρώσεις που αναμένεται να εμφανίζονται στο πλάσμα των ασθενών (250 ppb – 5 ppm) χωρίς να επηρεάζεται η ανάλυση από το υπόστρωμα.

Για την ανάπτυξη και τη βελτιστοποίηση της μεθόδου έγινε αναφορά στη βιβλιογραφία ώστε να ανακαλυφθούν σημαντικές παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά την ανάλυση της τιγκεκυκλίνης (συστήματα διαλυτών, επίδραση του pH, κατάλληλη ποσότητα δείγματος) και να καθοριστούν οι πιθανότερες βέλτιστες συνθήκες.

### **Περιορισμοί της πειραματικής διερεύνησης**

Λόγω της σπανιότητας της χρήσης της τιγκεκυκλίνης στην κλινική πρακτική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, τα δείγματα που λάβαμε για ανάλυση ήταν εξαιρετικά λίγα, οπότε απαιτούνται περισσότερες δοκιμασίες για να εξασφαλιστεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων. Επίσης, επιπλέον πειράματα θα πρέπει να πραγματοποιηθούν για την επικύρωση της μεθόδου, ιδιαίτερα όσον αφορά τη διερεύνηση της σταθερότητας και την επαναληψιμότητας της διαδικασίας.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### «Ανάπτυξη μεθοδολογίας και προσδιορισμός επιπέδων τιγκεκυκλίνης σε αίμα ασθενών.»

Ελευθερία Παπουτσάκη

Η τιγκεκυκλίνη είναι ένα ευρέως φάσματος αντιβιοτικό με δράση έναντι και πολυανθεκτικών βακτηρίων. Ανήκει στην ομάδα των τετρακυκλινών (3<sup>η</sup> γενιά) και δρα μέσω αναστολής της πρωτεϊνοσύνθεσης των βακτηρίων. Αυτό επιτυγχάνεται με πρόσδεσή της στην 30S υπομονάδα του βακτηριακού ριβοσώματος και παρεμποδίζοντας τη διαδικασία της μετάφρασης.

Αυτό το αντιβιοτικό χρησιμοποιείται ενδονοσοκομειακά συνήθως για την αντιμετώπιση πολύ σοβαρών βακτηριακών λοιμώξεων, που περιλαμβάνουν επιλεγμένες λοιμώξεις του δέρματος και μαλακών μορίων (cSSSI), εξαιρουμένων των λοιμώξεων διαβητικού ποδός,, περίπλοκες ενδο-κοιλιακές λοιμώξεις (cIAI) και πνευμονία της κοινότητας (CAP).

Σε αυτή την εργασία αναπτύχθηκε μια αναλυτική μέθοδος για την ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση της τιγκεκυκλίνης σε δείγματα 200 μL πλάσματος από νοσοκομειακούς ασθενείς χρησιμοποιώντας Υγρή Χρωματογραφία συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας (LC-MS/MS). Δημιουργήθηκε μια εξωτερική καμπύλη αναφοράς από πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης και η γραμμική περιοχή της μεθόδου είχε εύρος από 0.25 ppm έως 5 ppm.

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε αναλυτική στήλη Hypersil GOLD PFP reverse phase analytical column, με κινητή φάση ένα μείγμα ύδατος (Διαλύτης Α) και μεθανόλης (Διαλύτης Β) με προσθήκη φορμικού οξέος 0.1% χρησιμοποιώντας ένα βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης. Η ταχύτητα ροής ήταν 400 μL/min και ο χρόνος που απαιτείται για την ολοκλήρωση του χρωματογραφικού διαχωρισμού ήταν 5.5 min.

Η φασματομετρία μάζας πραγματοποιήθηκε σε single ion mode (SIM), με πηγή ιόντων ηλεκτροψεκασμού (ESI) ρυθμισμένη σε θετικό φορτίο. Τα ζεύγη ιόντων που χρησιμοποιήθηκαν για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της τιγκεκυκλίνης ήταν τα  $m/z$  586.3 → 513.2. Η θερμοκρασία ήταν ρυθμισμένη στους 320°C, η τάση ψεκασμού ιόντων (ion spray voltage) ήταν 3.5V, η τάση στα τριχοειδή (capillary voltage) ήταν 50V και η τάση στο φακό του σωλήνα (tube lens voltage) ήταν 90V.

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε μπορεί να βρει εφαρμογή στην κλινική πράξη, ως εργαλείο για τους θεράποντες ιατρούς για την παρακολούθηση των επιπέδων του αντιβιοτικού στους ασθενείς στους οποίους έχει χορηγηθεί. Αυτή η γνώση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την προσαρμογή της θεραπευτικής αγωγής όταν χρειάζεται, ώστε να επιτυγχάνονται καλύτερες κλινικές εκβάσεις για τους ασθενείς.



## ABSTRACT

### **“Development of an analytical methodology and determination of tigecycline in blood of patients.”**

**Eleftheria Papoutsaki**

Tigecycline is a broad-spectrum antibiotic that is active even against multi-drug resistant bacteria. It is part of the tetracycline class (3<sup>rd</sup> generation) of antibiotics and functions by blocking the 30S subunit of the bacterial ribosome. This has the result of blocking the translation process and the production of proteins in the bacteria.

This antibiotic is commonly used in hospitals to treat very severe bacterial infections, including complicated intra-abdominal infections, complicated skin and skin structure infections as well as community-acquired pneumonia.

An analytical method using LC-MS/MS for the determination of tigecycline in 200  $\mu$ L plasma samples from hospital patients was developed. A calibration curve based on external standards was made. The linear range of the calibration curve was from 0.25 ppm to 5 ppm.

Chromatographic separation was achieved on a Hypersil GOLD PFP reverse phase analytical column with a mobile phase consisting of water (Solvent A) and methanol (Solvent B) with 0.1% formic acid using a gradient elution program. The flow rate was 400  $\mu$ L/min and the run time was 5.5 min.

The scanning mode for the mass spectrometer was single ion monitoring (SIM) and the device was using an electrospray ion source (ESI), operated in positive ion mode.

The ion pairs used for the determination of tigecycline were  $m/z$  586.3  $\rightarrow$  513.2.

The temperature was set to 320°C, the ion spray voltage was 3.5V, the capillary voltage was 50V and the tube lens voltage was 90V.

The method developed could be useful in hospital settings, allowing the attending physicians to quickly assess the levels of tigecycline in the plasma of their patients and decide whether any modifications are needed in the treatment plan in order to achieve the best clinical outcomes for their patients.

## BIBΛΙΟΓΡΦΙΑ

1. Agwuh, K. N. (2006). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(2): 256–265.
2. Arora, R., Jain, S., & Rahimi, H. (2018). Evaluating the efficacy of Tigecycline to target multiple cancer-types: A Review. *STEM Fellowship Journal*, 4(1): 5-11.
3. Barbour, A., Schmidt, S., Ma, B., Schiefelbein, L., Rand, K. H., Burkhardt, O., & Derendorf, H. (2009). Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of Tigecycline. *Clinical Pharmacokinetics*, 48(9): 575–584.
4. Barco, S., Mesini, A., Barbagallo, L., Maffia, A., Tripodi, G., Pea, F., Saffioti, C., Castagnola, E., & Cangemi, G. (2020). A liquid chromatography-tandem mass spectrometry platform for the routine therapeutic drug monitoring of 14 antibiotics: Application to critically ill pediatric patients. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 186: 113273.
5. Barkovich, M. (2020). High Performance Liquid Chromatography. <https://chem.libretexts.org/@go/page/307>
6. Bayliss, M. A., Kyriakides, M., Rigdova, K., Grier, S., Lovering, A. M., Noel, A., & MacGowan, A. (2019). Choosing the right anticoagulant: A critical choice when assessing pharmacokinetic parameters for tetracyclines obtained from human blood samples. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(12): 3643–3645.
7. Betancourt, J., & Gottlieb, S. (2020). Liquid chromatography. <https://chem.libretexts.org/@go/page/309>
8. Borsuk-De Moor, A., Rypulak, E., Potręć, B., Piwowarczyk, P., Borys, M., Sysiak, J., Onichimowski, D., Raszewski, G., Czuczwar, M., & Wiczling, P. (2018). Population pharmacokinetics of high-dose tigecycline in patients with sepsis or septic shock. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(4).
9. Cai, Y., Bai, N., Liu, X., Liang, B., Wang, J., & Wang, R. (2016). Tigecycline: Alone or in combination? *Infectious Diseases*, 48(7): 491-502.
10. Center for Drug Evaluation and Research. (2010). FDA Drug Safety Communication: Increased risk of death with Tygacil (tigecycline) compared to other antibiotics used to treat similar infections. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug-safety-communication-increased-risk-death-tygacil-tigecycline-compared-other-antibiotics>
11. Conte, J. E., Golden, J. A., Kelly, M. G., & Zurlinden, E. (2005). Steady-state serum and intrapulmonary pharmacokinetics and pharmacodynamics of Tigecycline. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25(6): 523–529.
12. De Pascale, G., Lisi, L., Ciotti, G. M., Vallecoccia, M. S., Cutuli, S. L., Cascarano, L., Gelormini, C., Bello, G., Montini, L., Carelli, S., Di Gravio, V., Tumbarello, M., Sanguinetti, M., Navarra, P., & Antonelli, M. (2020). Pharmacokinetics of high-dose tigecycline in critically ill patients with severe infections. *Annals of Intensive Care*, 10(1).
13. Deitchman, A. N., Singh, R. S., Rand, K. H., & Derendorf, H. (2018). Enhanced in vitro activity of tigecycline in the presence of chelating agents. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 51(5): 799–802.

14. Dixit, D., Madduri, R. P., & Sharma, R. (2014). The role of Tigecycline in the treatment of infections in light of the New Black Box Warning. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 12(4): 397-400.
15. EMA. (2021). Tygacil. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/tygacil>
16. Fan, G., Jin, L., Bai, H., Jiang, K., Xie, J., & Dong, Y. (2020). Safety and efficacy of tigecycline in intensive care unit patients based on Therapeutic Drug Monitoring. *Therapeutic Drug Monitoring*, 42(6): 835–840.
17. Greer, N. D. (2006). Tigecycline (Tygacil): The first in the glycylicycline class of antibiotics. *Baylor University Medical Center Proceedings*, 19(2): 155–161.
18. Hemphill, M. T., & Jones, K. R. (2016). Tigecycline-induced acute pancreatitis in a cystic fibrosis patient: A case report and literature review. *Journal of Cystic Fibrosis*, 15(1).
19. Hoffmann, M., DeMaio, W., Jordan, R. A., Talaat, R., Harper, D., Speth, J., & Scatina, J. (2007). Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of [14c] tigecycline, a first-in-class glycylicycline antibiotic, after intravenous infusion to healthy male subjects. *Drug Metabolism and Disposition*, 35(9): 1543-1553.
20. Hypersil Gold™ PFP HPLC columns. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/25402-052130>
21. Kiritani, S., Yoshimura, K., Arita, J., Kokudo, T., Hakoda, H., Tanimoto, M., Hasegawa, K. (2021). A new rapid diagnostic system with ambient mass spectrometry and machine learning for colorectal liver metastasis. *BMC Cancer*, 21(1).
22. Leng, B., Yan, G., Wang, C., Shen, C., Zhang, W., & Wang, W. (2021). Dose optimisation based on pharmacokinetic/pharmacodynamic target of Tigecycline. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 25: 315–322.
23. Li, L., Li, X., Xia, Y., Chu, Y., Zhong, H., Li, J., Liang, P., Bu, Y., Zhao, R., Liao, Y., Yang, P., Lu, X., & Jiang, S. (2020). Recommendation of antimicrobial dosing optimization during continuous renal replacement therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 11.
24. Li, M. X., Li, N., Zhu, L. Q., & Liu, W. (2020). Optimization of tigecycline dosage regimen for different infections in the patients with hepatic or renal impairment. *Journal of Chemotherapy*, 32(8): 420–428.
25. MacGowan, A. P. (2008). Tigecycline pharmacokinetic/pharmacodynamic update. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(Supplement 1), i11–i16.
26. Mastrolia, M. V., Galli, L., De Martino, M., & Chiappini, E. (2017). Use of tigecycline in pediatric clinical practice. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 15(6): 605–612.
27. Mei, S., Luo, X., Li, X., Li, Q., Huo, J., Yang, L., Zhu, L., Feng, W., Zhou, J., Shi, G., & Zhao, Z. (2016). Development and validation of an LC-MS/MS method for the determination of Tigecycline in human plasma and cerebrospinal fluid and its application to a pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*, 30(12): 1992–2002.
28. Meßner, M., Schmitt, S., Ardelt, M. A., Fröhlich, T., Müller, M., Pein, H., Huber-Cantonati, P., Ortler, C., Koenig, L. M., Zobel, L., Koeberle, A., Arnold, G. J., Rothenfußer, S., Kiemer, A. K., Gerbes, A. L., Zischka, H., Vollmar, A. M., & Pachmayr, J. (2020). Metabolic implication of Tigecycline as an efficacious

- second-line treatment for sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma. *The FASEB Journal*, 34(9): 11860–11882.
29. Mukker, J. K., Singh, R. P., & Derendorf, H. (2014). Determination of atypical nonlinear plasma–protein-binding behavior of tigecycline using an in vitro microdialysis technique. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(3): 1013–1019.
  30. Muralidharan, G., Micalizzi, M., Speth, J., Raible, D., & Troy, S. (2005). Pharmacokinetics of tigecycline after single and multiple doses in healthy subjects. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(1): 220–229.
  31. Nguyen, F., Starosta, A. L., Arenz, S., Sohmen, D., Dönhöfer, A., & Wilson, D. N. (2014). Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biological Chemistry*, 395(5): 559-575.
  32. Ozcimen, M., Sakarya, Y., Ozcimen, S., Goktas, S., Sakarya, R., Alpfidan, I., & Erdogan, E. (2014). Pharmacokinetics of intravenously administered tigecycline in eye compartments: An experimental study. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 252(12): 1993–1997.
  33. Pournaras, S., Koumaki, V., Spanakis, N., Gennimata, V., & Tsakris, A. (2016). Current perspectives on tigecycline resistance in Enterobacteriaceae: Susceptibility testing issues and mechanisms of resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48(1): 11-18.
  34. Raja, P. M., & Barron, A. R. (2022). 4.5: Photoluminescence, phosphorescence, and fluorescence spectroscopy. <https://chem.libretexts.org/@go/page/55883>
  35. Rodvold, K. A., Gotfried, M. H., Cwik, M., Korth-Bradley, J. M., Dukart, G., & Ellis-Grosse, E. J. (2006). Serum, tissue and body fluid concentrations of tigecycline after a single 100 mg dose. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(6): 1221–1229.
  36. Ruiz, J., Ramirez, P., Villarreal, E., Gordon, M., Sánchez, M. Á., Martín, M., & Castellanos-Ortega, Á. (2020). Effect of pharmacokinetic/pharmacodynamic ratio on tigecycline clinical response and toxicity in critically ill patients with multidrug-resistant gram-negative infections. *SAGE Open Medicine*, 8.
  37. Rusu, A., & Buta, E. L. (2021). The development of third-generation tetracycline antibiotics and new perspectives. *Pharmaceutics*, 13(12): 2085.
  38. Shao, R., Li, X., Hu, Y., Chen, J., Lou, H., & Dai, H. (2017). Determination of tigecycline in human plasma by LC-MS/MS and its application to population pharmacokinetics study in Chinese patients with hospital-acquired pneumonia. *Biomedical Chromatography*, 32(2).
  39. Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2007). Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης (6th ed.). *Αθήνα, Εκδόσεις Κωσταράκη*: 624 – 664, 872–899, 935–977.
  40. Škrtić, M., Sriskanthadevan, S., Jhas, B., Gebbia, M., Wang, X., Wang, Z., Schimmer, A. (2011). Inhibition of mitochondrial translation as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*, 20(5): 674-688.
  41. Slover, C. M., Rodvold, K. A., & Danziger, L. H. (2007). Tigecycline: A novel broad-spectrum antimicrobial. *Annals of Pharmacotherapy*, 41(6): 965-972.
  42. Steiner, F., Paul, C., & Dong, M. W. (2019). HPLC autosamplers: Perspectives, principles, and practices. *LCGC North America*, 37(8): 514-529.
  43. Sum, P., Lee, V. J., Testa, R. T., Hlavka, J. J., Ellestad, G. A., Bloom, J. D., Tally, F. P. (1994). Glycylcyclines. 1. A new generation of potent antibacterial agents

- through modification of 9-aminotetracyclines. *Journal of Medicinal Chemistry*, 37(1): 184-188.
44. Sun, H. K., Ong, C. T., Umer, A., Harper, D., Troy, S., Nightingale, C. H., & Nicolau, D. P. (2005). Pharmacokinetic profile of tigecycline in serum and skin blister fluid of healthy subjects after multiple intravenous administrations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(4): 1629–1632.
  45. Tigecycline. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tigecycline>
  46. Tsala, M., Vourli, S., Georgiou, P., Pournaras, S., Daikos, G. L., Mouton, J. W., & Meletiadi, J. (2018). Triple combination of meropenem, Colistin and Tigecycline was bactericidal in a dynamic model despite mere additive interactions in checkerboard assays against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(2): 387 – 394.
  47. Whalen, K., Finkel, R., & Panavelil, T. A. (2015). Φαρμακολογία (6th ed., Lippincott). Αθήνα: *Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισσιανού*: 477–486, 507–511.
  48. What is HPLC (high performance liquid chromatography)? [https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what\\_is\\_hplc.html](https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what_is_hplc.html)
  49. Xie, J., Roberts, J. A., Alobaid, A. S., Roger, C., Wang, Y., Yang, Q., Sun, J., Dong, H., Wang, X., Xing, J., Lipman, J., & Dong, Y. (2017). Population pharmacokinetics of tigecycline in critically ill patients with severe infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(8).
  50. Xie, J., Wang, T., Wang, X., Cheng, X., Dong, H., Wang, Y., Zheng, X., Zhou, L., Xing, J., & Dong, Y. (2014). Quantitative analysis and pharmacokinetics study of tigecycline in human serum using a validated sensitive liquid chromatography with tandem mass spectrometry method. *Journal of Separation Science*, 37(12): 1396–1403.
  51. Yaghoubi, S., Zekiy, A. O., Krutova, M., Gholami, M., Kouhsari, E., Sholeh, M., Ghafouri, Z., & Maleki, F. (2021). Tigecycline antibacterial activity, clinical effectiveness, and mechanisms and epidemiology of resistance: Narrative review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 41(7): 1003–1022.
  52. Yang, J., Dong, Z., Ren, A., Fu, G., Zhang, K., Li, C., Wang, X., & Cui, H. (2020). Antibiotic tigecycline inhibits cell proliferation, migration and invasion via down-regulating CCNE2 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(7): 4245–4260.
  53. Yang, Q., Xie, J., Wang, H., Zhang, Y., Zhao, Y., Li, S., Zhang, K., & Dong, Y. (2021). Determination of tigecycline in human lung epithelial cells and polymorphonuclear neutrophils by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its application in a cellular pharmacokinetics study. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 35(14).
  54. Yao, F., Wang, Y., Hou, Y., Wang, X., Lan, J., Wu, Z., Wang, Y., & Chen, C. (2020). Establishment and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of Tigecycline in critically ill patients. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2020, 1–9.
  55. Zhou, Y., Xu, P., Li, H., Wang, F., Yan, H., Liang, W., Xiang, D., Zhang, B., & Banh, H. L. (2021). Population Pharmacokinetics and exposure-response analysis of

- Tigecycline in patients with hospital-acquired pneumonia. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 87(7): 2838–2846.
56. Zimmerman, J. J., Raible, D. G., Harper, D. M., Matschke, K., & Speth, J. L. (2008). Evaluation of a potential tigecycline-warfarin drug interac. *Pharmacotherapy*, 28(7): 895-905.
57. Zubarev, R. A., & Makarov, A. (2013). Orbitrap Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 85(11): 5288-5296.
58. Κωνσταντίνου Ε. (2014). Ανάπτυξη και εφαρμογή προσδιορισμού του αντιβιοτικού τιγκεκυκλίνη με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS) σε ήπαρ και σπλήνα από επίμυες., Μεταπτυχιακή διατριβή, *Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης*.
59. Μαρσέλος Μ. (2011). Συνοπτική Φαρμακολογία ΙΙ. *Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων*: 162 – 178.
60. Μαρσέλος Μ. (2015). Βιοχημική Φαρμακολογία, Μηχανισμοί δράσης των φαρμάκων. *Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων*: 186 – 194.
61. Τόλη Β. (2017). Αναλυτική μεθοδολογία προσδιορισμού αντιβιοτικών ενώσεων σε νερά υδατοκαλλιεργειών με τη χρήση LC-LTQ ORBITRAP MS. Μεταπτυχιακή διατριβή, *Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων*.