



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

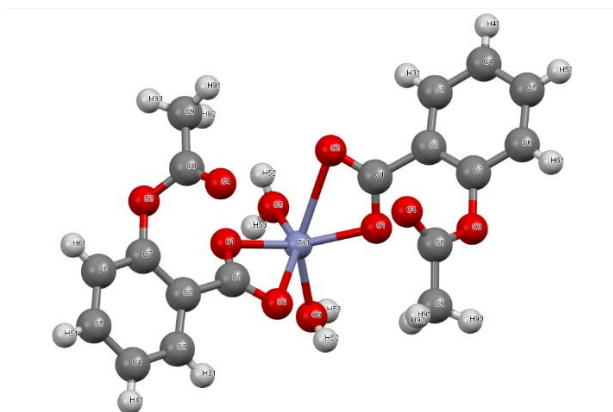
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Δ.Π.Μ.Σ. ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Σύνθεση ανόργανων φορέων βιολογικών συστημάτων



Λέζος Φωτάκης

Χημικός

Επιβλέπων καθηγητής: Σωτήριος Κ. Χατζηκακού

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025

Επιβλέπων καθηγητής: Σωτήριος Κ. Χατζηκακού

Τριμελής Επιτροπή: Σωτήριος Κ. Χατζηκακού

Καλαμπούνιας Άγγελος

Σαΐνης Ιωάννης



Προς
Τα μέλη της Ε.Δ.Ε.
του Δ.Π.Μ.Σ «Ιατρική Χημεία»

Ιωάννινα, 12/9/2025

ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σήμερα Παρασκευή 12 Σεπτεμβρίου και ώρα 12:00, ενώπιον της ορισθείσας τριμελούς εξεταστικής επιτροπής αποτελούμενη από τους κ.κ.:

1.Χατζηκακού Σωτήριο..... (Επιβλέπων)
2.Καλαμπούνια Άγγελος..... (Αξιολογητής 1)
3.Σάινη Ιωάννη..... (Αξιολογητής 2)

πραγματοποιήθηκε η εξέταση της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας του Λέξου Φωτάκη φοιτητή του ΔΠΜΣ «Ιατρική Χημεία», με Α.Μ. 285, με θέμα:

«Σύνθεση ανόργανων φορέων βιολογικών συστημάτων»(Ελληνικά)

«Synthesis of inorganic carriers for biological systems»(Αγγλικά)

Κατά την αξιολόγηση η τριμελής επιτροπή βαθμολόγησε ως ακολούθως:

	Αντικείμενα αξιολόγησης	Επιβλέπων	Αξιολογητής 1	Αξιολογητής 2	Μέσος όρος
1	Κείμενο Διπλωματικής Εργασίας	10	10	10	10
2	Προφορική Παρουσίαση Διπλωματικής Εργασίας	10	10	10	10
3	Ανταπόκριση στις ερωτήσεις των αξιολογητών	10	10	10	10
Συνολικός Βαθμός:					10

Τα ανωτέρω αντικείμενα αξιολόγησης εγκρίθηκαν στην υπ' αριθμ. 43/24-06-2020 Συνεδρίαση της ΕΔΕ του Δ.Π.Μ.Σ «Ιατρική Χημεία».

Βεβαιώνουμε ότι η μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία έχει παρουσιαστεί επιτυχώς και έχουν γίνει τυχόν τροποποιήσεις που υπέδειξε η τριμελής Εξεταστική Επιτροπή. Η μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία κατατέθηκε σε ηλεκτρονική μορφή (pdf). Το αντίγραφο παρέλαβε ο/η

Η Τριμελής Επιτροπή (Υπογραφές):

- 1.
- 2.
- 3.

Η συλλογή και η επεξεργασία των δεδομένων προσωπικού χαρακτήρα που υποβάλλονται πραγματοποιείται σύμφωνα με τα οριζόμενα στις διατάξεις του Ν.4624/19 και του Κανονισμού (ΕΕ)2016/2019. Το Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων συλλέγει και επεξεργάζεται τα δεδομένα προσωπικού χαρακτήρα αποκλειστικά στο πλαίσιο της υλοποίησης του σκοπού της παρούσας διαδικασίας. Για το χρονικό διάστημα που τα προσωπικά δεδομένα θα παραμείνουν στη διάθεση του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων το υποκείμενο έχει τη δυνατότητα να ασκήσει τα δικαιώματά του σύμφωνα με τους όρους του Γενικού Κανονισμού Προστασίας Δεδομένων Προσωπικού Χαρακτήρα 2016/679 (Ε.Ε.) και τα οριζόμενα στα άρθρα 34 και 35 Ν. 4624/2019. Υπεύθυνη Προσωπικών Δεδομένων του Ιδρύματος είναι η κα. Σταυρούλα Σταθαρά (email: dpo@uoi.gr).

Πρόλογος

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες προς το Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «Ιατρική Χημεία» του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την ευκαιρία που μου προσέφερε να διευρύνω τους επιστημονικούς μου ορίζοντες και να εμβαθύνω σε ένα διεπιστημονικό πεδίο ιδιαίτερης σημασίας και προοπτικής.

Ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη οφείλω στον επιβλέποντα καθηγητή μου, Χατζηκακού Κ. Σωτήριο, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας και Διευθυντή του Διδρυματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Ανόργανη Βιολογική Χημεία», για την αμέριστη καθοδήγηση, την υπομονή και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε όλη τη διάρκεια της ερευνητικής πορείας. Η επιστημονική και ανθρώπινη στήριξή του υπήρξε καθοριστική όχι μόνο για την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής, αλλά και για την προσωπική μου εξέλιξη ως ερευνητή.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Μπαντή Ν. Χριστίνα, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων που όχι μόνο με καθοδήγησε σε όλη την πορεία των βιολογικών πειραμάτων και στα πρωτόκολλα ασφαλείας, αλλά με ενέπνευσε να δω το αντικείμενο της Βιολογίας με μια διαφορετική ματιά. Το πέραςμα από τη χημεία στη βιολογία και τη βιοχημεία θα ήταν εξαιρετικά πιο απαιτητικό χωρίς τη δική της συμβολή.

Η ύπαρξη αφοσιωμένων και εμπνευσμένων μεντόρων αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες στην ακαδημαϊκή και επαγγελματική πορεία κάθε ερευνητή. Είχα την τύχη να συνεργαστώ με ανθρώπους που ενσάρκωσαν αυτόν τον ρόλο με τον καλύτερο δυνατό τρόπο, διευκολύνοντας ουσιαστικά την ομαλή μου μετάβαση σε ένα νέο επιστημονικό πεδίο και καθιστώντας την εμπειρία του μεταπτυχιακού βαθιά εκπαιδευτική και ουσιαστική.

Ακολουθώς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον δρ. Χατζηδημητρίου Αντώνιο, καθηγητή του τμήματος Χημείας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, για την επίλυση της κρυσταλλικής δομής της ένωσης με ανάλυση Περίθλασης Ακτινών Χ (XRD).

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Καλαμπούνια Άγγελο, καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και τον κύριο Σαΐνη Ιωάννη, μέλος ΕΔΙΠ του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, που συμφώνησαν να αποτελέσουν μέλη της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης της μεταπτυχιακής διπλωματικής μου εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου στο Εργαστήριο Ανόργανης Βιολογικής Χημείας, για τη συνεργασία, την καθημερινή ανταλλαγή γνώσεων και την υποστήριξη σε πρακτικό και ψυχολογικό επίπεδο. Η παρουσία τους έκανε το ερευνητικό περιβάλλον πιο δημιουργικό και παραγωγικό.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την απέραντη ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια και τη σύντροφο μου, για την αδιάκοπη ηθική στήριξη, την ενθάρρυνση και την αγάπη τους σε κάθε βήμα αυτής της διαδρομής.

Περίληψη

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή διερευνά τη σύνθεση, τον φυσικοχημικό χαρακτηρισμό και τη βιολογική αξιολόγηση ενός καινοτόμου συμπλόκου ψευδαργύρου με ακετυλοσαλικυλικό οξύ (ZnAsp). Το σύμπλοκο συντέθηκε επιτυχώς, επιβεβαιώθηκε μέσω περίθλασης ακτίνων X (XRD) και χαρακτηρίστηκε διεξοδικά με φασματοσκοπικές μεθόδους (ATR-FTIR, UV-Vis, ^1H -NMR, XRF), καθώς και με προσδιορισμό φυσικοχημικών παραμέτρων. Στη συνέχεια ενσωματώθηκε σε υδρογέλη καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης (CMC), με σκοπό τη δημιουργία συστήματος για τοπικές εφαρμογές.

Η βιολογική αξιολόγηση του συμπλόκου και της υδρογέλης ανέδειξε αξιοσημείωτη αντιμικροβιακή δράση έναντι παθογόνων βακτηρίων, όπως τα *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* και *Staphylococcus aureus*. Οι μελέτες τοξικότητας τόσο *in vivo* (δοκιμασία *Artemia salina*) όσο και *in vitro* (σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα HaCaT) υποδεικνύουν ευνοϊκό προφίλ ασφάλειας. Επιπρόσθετα, διερευνήθηκαν η φωτοπροστατευτική ικανότητα (μέσω του δείκτη UPF), η αντιφλεγμονώδης δράση (με δοκιμασία μετουσίωσης αλβουμίνης) και η επουλωτική δράση (μέσω scratch wound assay). Συνολικά, τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι το ZnAsp και η υδρογέλη του συνιστούν πολλά υποσχόμενους υποψήφιους θεραπευτικούς παράγοντες για την αντιμετώπιση λοιμώξεων, τη διαχείριση της φλεγμονής και την προστασία του δέρματος, προσφέροντας μια καινοτόμο θεραπευτική προσέγγιση.

Λέξεις κλειδιά: Αντιμικροβιακή αντοχή, Ψευδάργυρος, Ακετυλοσαλικυλικό οξύ, Μεταλλοφάρμακα, Υδρογέλη, Φωτοπροστασία, Αντιφλεγμονώδης δράση, Επούλωση τραυμάτων, Τοξικότητα.

Abstract

This master thesis investigates the synthesis, physicochemical characterization and biological evaluation of a novel zinc complex with acetylsalicylic acid (ZnAsp). The complex was successfully synthesized, confirmed by X-ray diffraction (XRD) and thoroughly characterized by spectroscopic methods (ATR-FTIR, UV-Vis, ¹H-NMR, XRF) and determination of physicochemical parameters. It was then incorporated into carboxymethyl cellulose (CMC) hydrogels in order to create a system for local applications.

Biological evaluation of the complex and hydrogel showed remarkable antimicrobial activity against pathogenic bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. Toxicity studies both *in vivo* (*Artemia salina* assay) and *in vitro* (in human HaCaT keratinocytes) indicate a favourable safety profile. In addition, photoprotective capacity (via UPF index), anti-inflammatory activity (by albumin denaturation assay) and healing activity (via scratch wound assay) were investigated. Overall, the results demonstrate that ZnAsp and its hydrogel represent promising candidates for infection treatment, inflammation management, and skin protection, offering an innovative therapeutic approach.

Keywords: Antimicrobial resistance, Zinc, Acetylsalicylic acid, Metallodrugs, Hydrogel, Photoprotection, Anti-inflammatory activity, Wound healing, Toxicity.

Περιεχόμενα

A. Εισαγωγή.....	9
Κεφάλαιο 1	9
1.1. Λοιμώδης νόσος	9
1.2. Ανατομία του βακτηριακού κυττάρου	11
1.2.1. Κυτταροπλασματική μεμβράνη.....	13
1.2.2. Κυτταρικό τοίχωμα.....	16
1.2.3. Έλυτρο	19
1.2.4. Μαστίγια.....	19
1.2.5. Βλεφαρίδες	19
1.2.6. Σμήριγγες.....	19
1.2.7. Κυτταρόπλασμα.....	20
1.2.8. Νουκλεοειδές.....	20
1.2.9. Ριβοσώματα	20
1.3. Ο μικροβιακός κύκλος ανάπτυξης	21
1.4. Βακτήρια	23
1.4.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
1.4.2. <i>Escherichia coli</i>	25
1.4.3. <i>Staphylococcus</i>	26
1.5. Βακτηριακή ανθεκτικότητα.....	28
1.6. Φλεγμονή	31
1.7. Η διαδικασία επούλωσης του δερματικού τραύματος	32
1.8. Υπεριώδης Ακτινοβολία και οι επιπτώσεις της στο δέρμα	34
Κεφάλαιο 2	35
2.1. Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAIDs)	35
2.2. Αντιμικροβιακή δράση των NSAIDs.	39
2.3. Ακετυλοσαλικυλικό οξύ	40
2.3.1. Τρόπος δράσης	42
2.3.2. Χορήγηση	42
2.3.3. Φαρμακοκινητική	42
2.3.4. Φαρμακοδυναμική.....	43
2.3.5. Ανεπιθύμητες επιπτώσεις.....	43
2.4. Μεταλλοφάρμακα	44
2.5. Ψευδάργυρος.....	46
2.6. Υδρογέλες ως συστήματα φορέων για τοπική εφαρμογή	47

B. Σκοπός.....	48
Γ. Πειραματικό Μέρος	50
Κεφάλαιο 3	50
3.1. Χημικό πειραματικό μέρος.....	50
3.1.1. Χημικά αντιδραστήρια και διαλύτες	50
3.1.2. Όργανα και σκεύη	50
3.1.3. Σύνθεση	50
3.1.4. Σύνθεση υδρογέλης CMC@ZnAsp (Carboxymethyl cellulose)	51
3.1.5. Διαλυτότητα.....	51
3.1.6. Σημείο τήξης.....	52
3.1.7. Κρυοσκοπία	52
3.1.8. Φασματοσκοπία Υπέρυθρου Μετασχηματισμού Fourier με την τεχνική της Αποσβένουσας Ολικής Ανάκλασης (ATR-FTIR).....	53
3.1.9. Φασματοσκοπία ακτίνων X φθορισμού (XRF).....	55
3.1.10. Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis).....	56
3.1.11. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (¹ H-NMR)	57
3.1.12. Περίθλαση ακτίνων X (XRD)	58
3.2. Φωτοχημικά πειράματα.....	58
3.2.1. Συντελεστής Προστασίας από την Υπεριώδη Ακτινοβολία (UPF) του ZnAsp και του CMC@ZnAsp	58
3.2.2. Συνεχής φωτόλυση	59
3.3. Βιολογικό πειραματικό μέρος	59
3.3.1. Ζώνες αναστολής (IZ)	61
3.3.2. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC)	62
3.3.3. Ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC).....	62
3.3.4. In Vitro Τοξικότητα έναντι Αθάντων Ανθρώπινων Κερατινοκυττάρων (HaCaT).....	62
3.3.5. Μετανάστευση Κερατινοκυττάρων στο περιθώριο πληγής με in vitro δοκιμασία γρατσουνιάς (Scratch Wound Assay)	64
3.3.6. Αντιφλεγμονώδης Δράση με Δοκιμασία Μετουσίωσης Αλβουμίνης	64
3.3.7. Μελέτη της in vivo τοξικότητας με τη μέθοδο γαρίδας άλμης (<i>Artemia salina</i> assay)	65
Δ. Αποτελέσματα	66
Κεφάλαιο 4	66
4.1. Χημικό μέρος	66
4.1.1. Σύνθεση ZnAsp	66
4.1.2. Διαλυτότητα.....	67

4.1.3. Σημείο τήξης.....	68
4.1.4. Κρυοσκοπία	68
4.1.5. Φασματοσκοπία ATR-FTIR.....	68
4.1.6. Φασματοσκοπία XRF	72
4.1.7. Φασματοσκοπία UV-Vis.....	74
4.1.8. Φασματοσκοπία ^1H -NMR	76
4.1.9. Σταθερότητα μέσω UV/Vis	79
4.1.10. Περίθλαση ακτίνων-X (XRD)	81
4.2. Φωτοχημικά πειράματα.....	85
4.2.1. Συντελεστής προστασίας από την Υπεριώδη Ακτινοβολία (UPF) του ZnAsp και του CMC@ZnAsp	85
4.2.2. Συνεχής φωτόλυση	87
4.3. Αντιμικροβιακή μελέτη	88
4.3.1. Προσδιορισμός ζώνης αναστολής (IZ)	88
4.3.2. Προσδιορισμός ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC)	91
4.3.3. Προσδιορισμός ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (MBC).....	93
4.3.4. In vitro τοξικότητα έναντι Αθάνατων Ανθρώπινων Κερατινοκυττάρων (HaCaT) 95	
4.3.5. Μετανάστευση Κερατινοκυττάρων στο περιθώριο πληγής με in vitro δοκιμασία γρατζουνιάς (Scratch Wound Assay)	95
4.3.6. Αντιφλεγμονώδης δράση με δοκιμασία μετουσίωσης αλβουμίνης.....	98
4.3.7. Μελέτη της in vivo τοξικότητας με τη μέθοδο γαρίδας άλμης (Artemia salina assay)	98
E. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	100
ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	101
Z. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	106

A. Εισαγωγή

Κεφάλαιο 1

1.1. Λοιμώδης νόσος

Κάθε κατάσταση με συγκεκριμένα συμπτώματα που επηρεάζει την καλή λειτουργία ενός οργάνου ή/και συστήματος του σώματος, του νου ή του οργανισμού στο σύνολό του θεωρείται «ασθένεια». Εγγενείς ή εξωγενείς παράγοντες μπορεί να συμβάλλουν στην εξασθένηση της λειτουργίας του οργανισμού. Οι ενδογενείς επιδράσεις προέρχονται από το εσωτερικό του ξενιστή και μπορούν να αποδοθούν στη γενετική σύσταση ενός οργανισμού ή σε οποιοδήποτε εσωτερικό ζήτημα παρεμβαίνει στην ικανότητα ενός οργάνου ή συστήματος να λειτουργεί κανονικά. Όταν ο ξενιστής εκτίθεται σε παράγοντες εκτός του οργανισμού, αυτοί χαρακτηρίζονται ως εξωγενείς. Μια ασθένεια που εμφανίζεται μέσω της εισβολής ενός ξενιστή από έναν ξένο παράγοντα του οποίου οι δραστηριότητες βλάπτουν τη φυσιολογική λειτουργία των οργάνων του ξενιστή αναφέρεται ως λοιμώδης νόσος. Οι μικροοργανισμοί είναι οι συνήθεις υπαίτιοι για την πρόκληση των μολυσματικών ασθενειών, η πρόσβαση των οποίων γίνεται κυρίως μέσω του στόματος, των ματιών, των γεννητικών οργάνων, της μύτης και του δέρματος[1].

Τα μικρόβια, που ονομάζονται επίσης μικροοργανισμοί, είναι μικροσκοπικά έμβια όντα που το καθένα ξεχωριστά είναι συνήθως πολύ μικρό για να τα δούμε με γυμνό μάτι. Στην ομάδα αυτή ανήκουν τα βακτήρια, οι μύκητες (ζύμες και μούχλες), τα πρωτόζωα και τα μικροσκοπικά φύκια καθώς και μη κυτταρικές οντότητες που αποκαλούμε ιούς.

Μέχρι πολύ πρόσφατα, πριν την ανακάλυψη του μικροσκοπίου, τα βακτήρια ήταν άγνωστα στους επιστήμονες. Χιλιάδες άνθρωποι έχασαν τη ζωή τους κατά τη διάρκεια επιδημιών, τα αίτια των οποίων δεν είχαν ακόμη ανακαλυφθεί. Βέβαια, δεν είναι όλοι οι μικροοργανισμοί παθογόνοι, αντίθετα αποτελούν ένα μικρό ποσοστό του συνόλου. Χάρη στους μη παθογόνους μικροοργανισμούς διατηρείται η ισορροπία των ζωντανών οργανισμών στο περιβάλλον.

Το έτος 1665 ένας Άγγλος ονόματι Robert Hooke εξέδωσε το πολύ σημαντικό του έργο, την «Μικρογραφία» η οποία περιείχε παρατηρήσεις που είχε κάνει με το μικροσκόπιο. Στο βιβλίο αυτό εισήγαγε την έννοια του κυττάρου εμπνευσμένος από την παρατήρηση με το μικροσκόπιο φλούδα από φελλό, στον οποίο τα κύτταρα έχουν την μορφή μικρών κελιών. Η ανακάλυψη του Hooke έδωσε το έναυσμα για τη θεωρία των κυττάρων, η οποία υποστηρίζει ότι όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί αποτελούνται από μεμονωμένα κύτταρα. Η αντίληψη αυτή αποτέλεσε τη βάση για μεταγενέστερες μελέτες σχετικά με τη σύνθεση και τη λειτουργία των κυττάρων.

Ο Ολλανδός Anton van Leeuwenhoek ήταν ο πρώτος άνθρωπος που είδε ζωντανά μικρόβια κάτω από τους μεγεθυντικούς φακούς των περισσότερων από 400 μικροσκοπίων που κατασκεύασε. Έστειλε μια σειρά επιστολών στη Βασιλική Εταιρεία του Λονδίνου μεταξύ του 1673 και του 1723, στις οποίες περιέγραφε λεπτομερώς τα "ζώωδη μόρια" που παρατηρούσε με το βασικό μικροσκόπιο του με έναν φακό. Ο van Leeuwenhoek σχεδίαζε σχολαστικά τα "ζωικά μόρια" που ανακάλυπτε στα δικά του περιττώματα, στο νερό της βροχής και σε υλικό που έβγαζε από τα δόντια του. Έκτοτε, έχει διαπιστωθεί ότι τα σχέδια αυτά απεικονίζουν βακτήρια και πρωτόζωα.

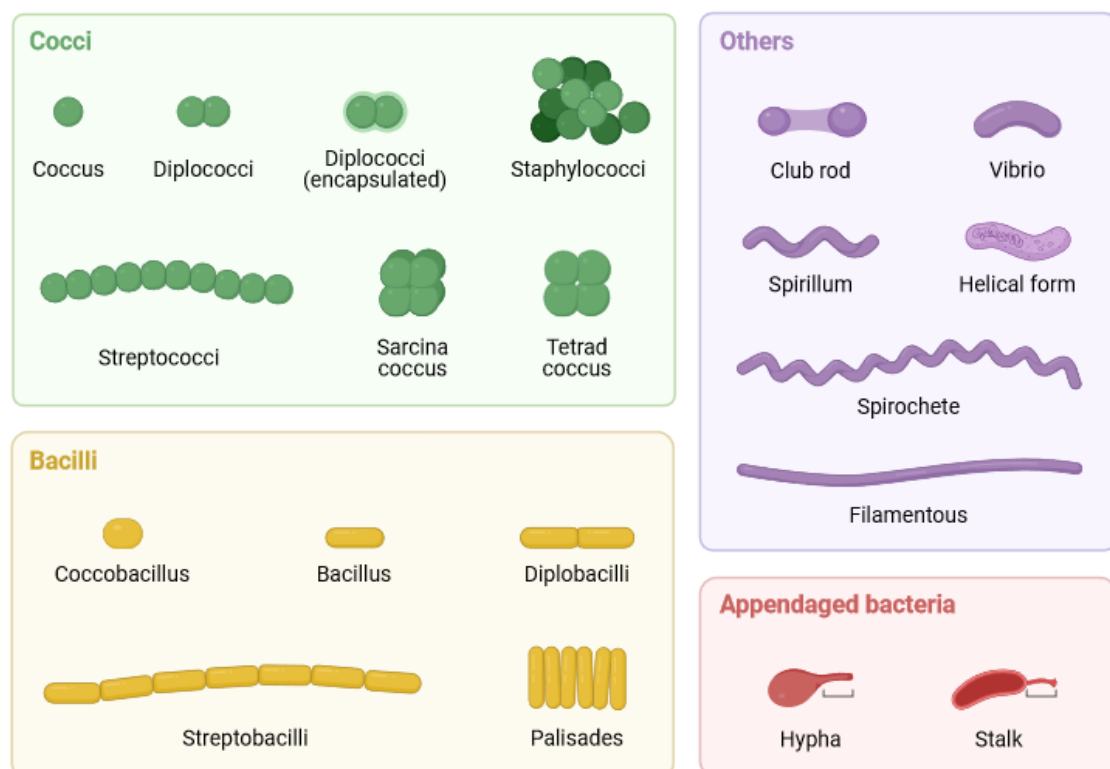
Η περίοδος μεταξύ του 1857 και 1914 ονομάστηκε χρυσή περίοδος της μικροβιολογίας. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, η μικροβιολογία αναγνωρίστηκε ως επιστήμη λόγω των γρήγορων εξελίξεων που έγιναν κυρίως από τον Pasteur και τον Robert Koch. Ο Koch μάλιστα ήταν εκείνος που το 1876 απέδειξε ότι τα βακτήρια είναι ικανά να προκαλέσουν ασθένειες μελετώντας το βακτήριο *Bacillus anthracis* σε βοοειδή. Κατά τη διάρκεια αυτών των ετών, ανακαλύφθηκε ένας αριθμός παραγόντων ασθενειών καθώς και η λειτουργία της ανοσίας τόσο στην πρόληψη όσο και στη θεραπεία των ασθενειών. Κατά τη διάρκεια αυτής της γόνιμης περιόδου, οι μικροβιολόγοι δημιούργησαν εμβολιασμούς και χειρουργικές μεθόδους, ερεύνησαν τη χημική δραστηριότητα των μικροβίων και βελτίωσαν τις μεθόδους για την πραγματοποίηση μικροσκοπίας και καλλιέργειας μικροοργανισμών[2].

1.2. Ανατομία του βακτηριακού κυττάρου

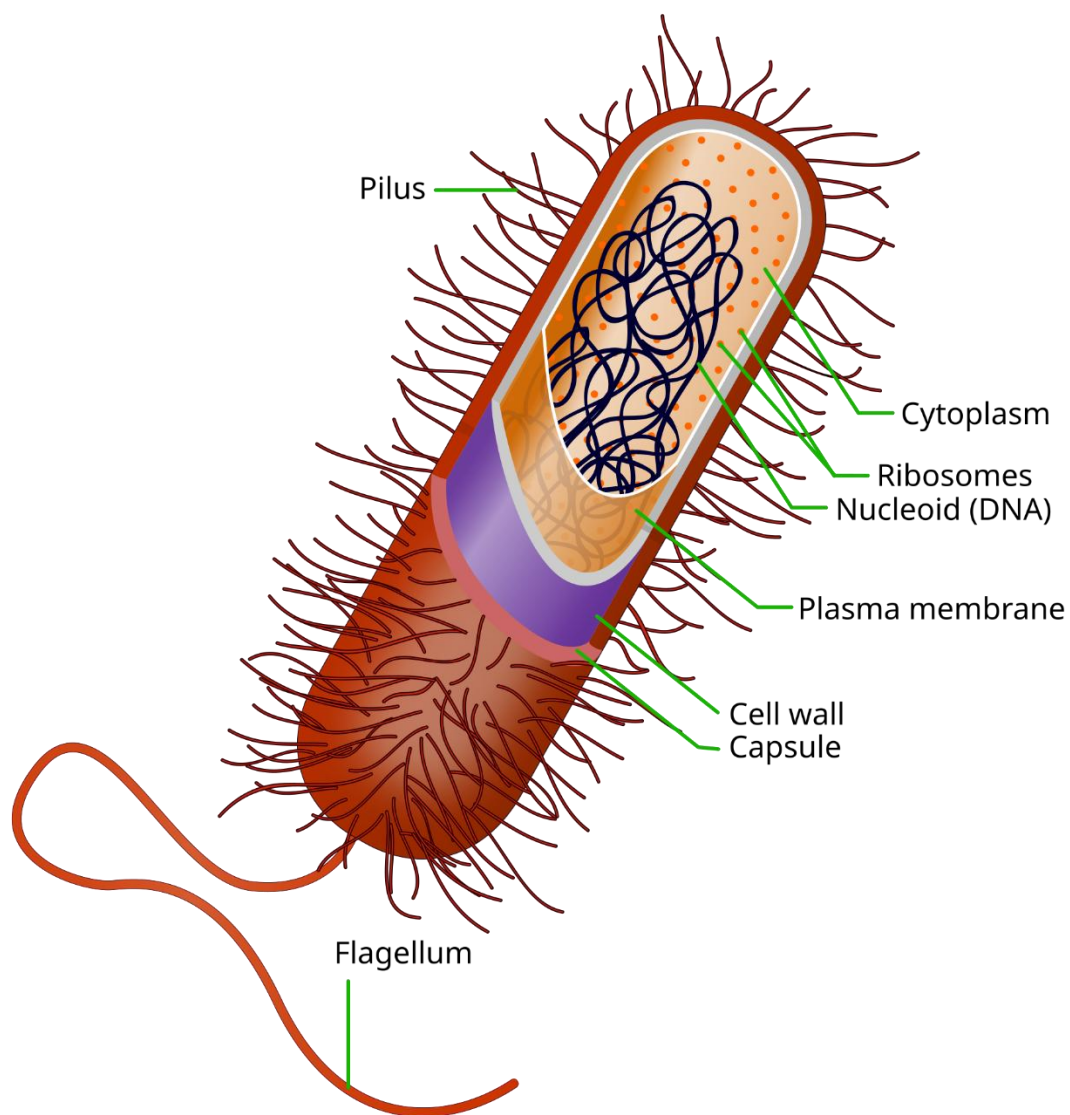
Τα μικρόβια είναι μικροσκοπικοί μονοκύτταροι οργανισμοί των οποίων η καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό υλικό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αποικιών. Οι αποικίες είναι μακροσκοπικά ορατές δομές που αποτελούνται από περίπου 10^8 κύτταρα. Επειδή το γενετικό τους υλικό δεν περικλείεται από πυρηνική μεμβράνη ονομάζονται προκαρυωτικά. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα βακτήρια και τα αρχαία.

Βακτήρια συναντάμε σε διάφορα μεγέθη που κυμαίνονται από 0.2-2.0μm σε διάμετρο και 2-8μm σε μήκος και ορισμένα βασικά σχήματα:

- Σφαιρικό (χαρακτηρίζονται ως κόκκοι)
- Ραβδοειδές (χαρακτηρίζονται ως βάκιλλοι)
- Σπειροειδές (χαρακτηρίζονται ως σπειρύλλια)
- Καμπυλόγραμμαμες ράβδοι (χαρακτηρίζονται ως δονάκια)
- Επιμίκη με πολλές κάμψεις (χαρακτηρίζονται ως σπειροχαίτες)



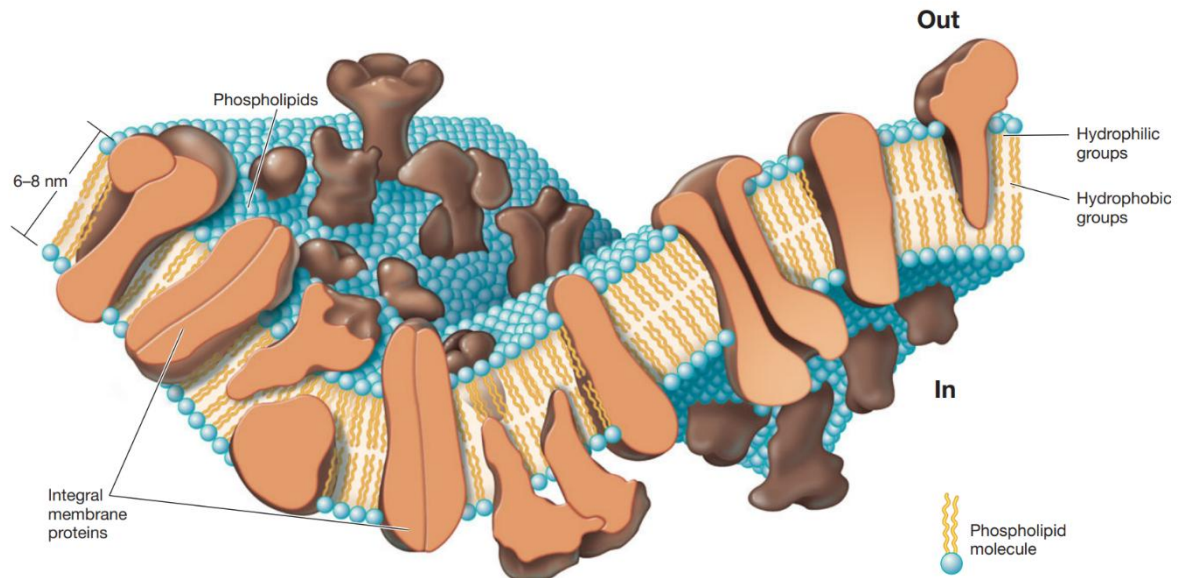
Εικόνα 1. Μορφολογία βακτηριακών κυττάρων[2].



Εικόνα 2. Δομή βακτηριακού κυττάρου[2].

1.2.1. Κυτταροπλασματική μεμβράνη

Παρατηρώντας ένα βακτήριο θα προσέξουμε την ύπαρξη ενός εξωτερικού περιβλήματος, την κυτταροπλασματική μεμβράνη, ένα λεπτό φραγμό που περιβάλλει το κύτταρο και διαχωρίζει το κυτταρόπλασμα από το περιβάλλον του κυττάρου. Η δομή της μεμβράνης αυτής αποτελείται από μια φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα, η οποία είναι υδρόφοβη στο εσωτερικό και υδρόφιλη στο εξωτερικό μέρος.

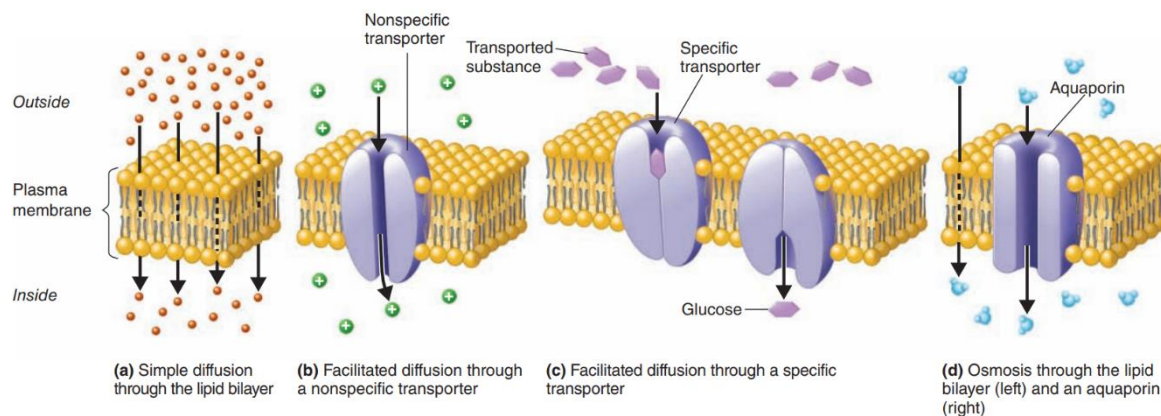


Εικόνα 3. Δομή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.

Η σημαντικότερη λειτουργία της πλασματικής μεμβράνης είναι να χρησιμεύει ως επιλεκτικός φραγμός μέσω του οποίου εισέρχονται και εξέρχονται υλικά στο κύτταρο. Κατά τη λειτουργία αυτή, οι μεμβράνες έχουν επιλεκτική διαπερατότητα, δηλαδή ορισμένα μόρια και ιόντα περνούν μέσα από τη μεμβράνη, ενώ άλλα εμποδίζονται να περάσουν μέσα από αυτή. Ακόμη, η κυτταροπλασματική μεμβράνη περιέχει ένζυμα ικανά να καταλύουν τις χημικές αντιδράσεις διάσπασης θρεπτικών συστατικών και παραγωγής ATP[2].

Οι χημικές ουσίες κινούνται διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης είτε με παθητική μεταφορά, όπου περνούν από την περιοχή υψηλής συγκέντρωσης στην περιοχή χαμηλής συγκέντρωσης χωρίς δαπάνη ενέργειας, είτε με ενεργό μεταφορά, όπου το κύτταρο πρέπει να δαπανήσει ενέργεια για να μετακινήσει ουσίες από τις περιοχές χαμηλής συγκέντρωσης σε περιοχές υψηλής συγκέντρωσης.

Η παθητική μεταφορά περιλαμβάνει την απλή διάχυση, διευκολυνόμενη διάχυση και την ώσμωση[2].

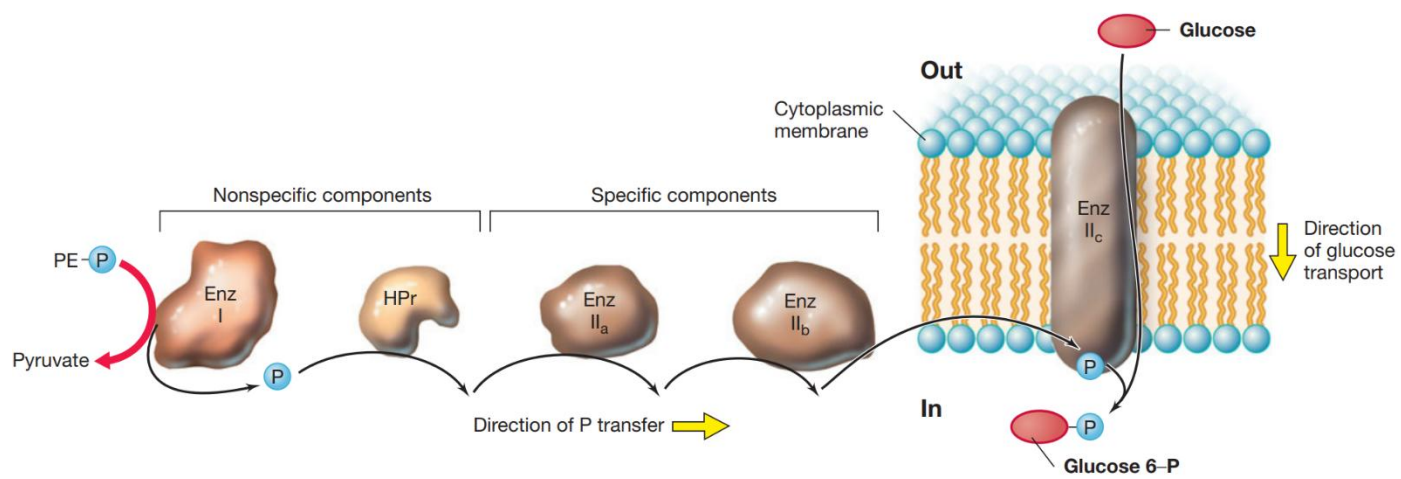


Εικόνα 4. Είδη παθητικής μεταφοράς[2].

Όταν ένα βακτήριο βρίσκεται σε περιβάλλον όπου τα θρεπτικά συστατικά είναι σε χαμηλή συγκέντρωση, πρέπει να χρησιμοποιήσει ενεργές διεργασίες, όπως η ενεργός μεταφορά και η ομαδική μετατόπιση, για να συσσωρεύσει τις απαιτούμενες ουσίες. Το κύτταρο χρησιμοποιεί ATP ως πηγή ενέργειας, για να μεταφέρει υλικά διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης κατά την ενεργό μεταφορά ανάμεσα στα οποία είναι ιόντα όπως Na^+ , K^+ , H^+ , Ca^{2+} και Cl^- καθώς και αμινοξέα και απλοί υδατάνθρακες.

Η ομαδική μετατόπιση απαιτεί ενέργεια που παρέχεται από υψηλής ενέργειας φωσφορικές ενώσεις, όπως το φωσφοενολοπυρουβικό οξύ (PEP). Ένα παράδειγμα ομαδικής μετατόπισης είναι η μεταφορά της γλυκόζης, η οποία χρησιμοποιείται συχνά σε μέσα ανάπτυξης βακτηρίων. Ενώ μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη-μεταφορέας μεταφέρει το μόριο της γλυκόζης διαμέσου της μεμβράνης, μια φωσφορική ομάδα προστίθεται στο σάκχαρο. Αυτή η φωσφορυλιωμένη μορφή της γλυκόζης μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί στις μεταβολικές οδούς του κυττάρου.

Στην Εικόνα 5 μπορούμε να παρατηρήσουμε το μηχανισμό του συστήματος φωσφοτρανσφοράσης της *Escherichia coli*. Για την πρόσληψη γλυκόζης, το σύστημα αποτελείται από πέντε πρωτεΐνες: Τα ένζυμα I, IIa, IIb και IIc, και HPr. Ένας καταρράκτης φωσφορικών λαμβάνει χώρα από το PEP στο ένζυμο IIc και το τελευταίο μεταφέρει και φωσφορυλιώνει το σάκχαρο. Οι πρωτεΐνες HPr και I είναι μη ειδικές και μεταφέρουν οποιοδήποτε σάκχαρο. Τα συστατικά του Enz II είναι ειδικά για κάθε συγκεκριμένο σάκχαρο[3].



Εικόνα 5. Μηχανισμός του συστήματος φωσφοτρανσφεράσης της *Escherichia coli*[3].

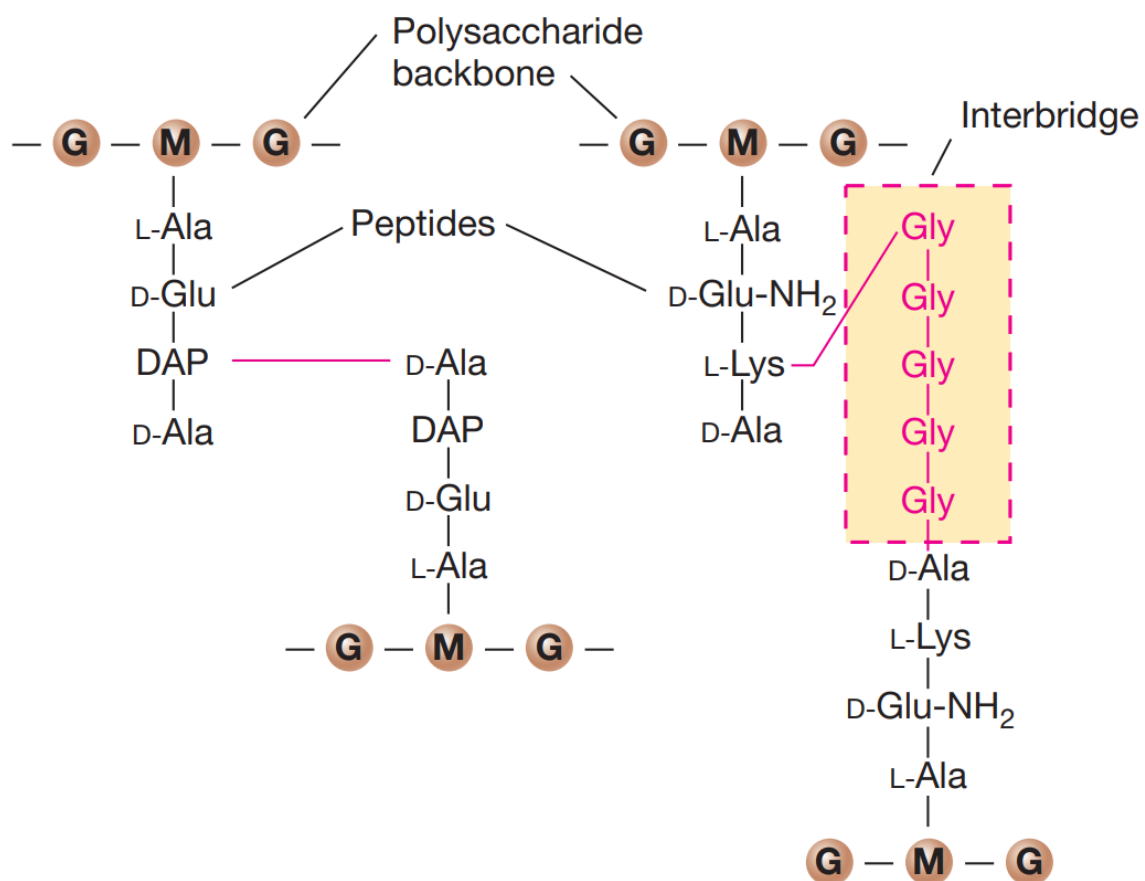
1.2.2. Κυτταρικό τοίχωμα

Εξωτερικά της κυτταρικής μεμβράνης βρίσκεται το κυτταρικό τοίχωμα. Τα βακτηριακά κυτταρικά τοιχώματα είναι πολύπλοκες, δικτυωτές δομές που διατηρούν το σχήμα και τη δομική ακεραιότητα των κυττάρων. Κύριο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος είναι η πεπτιδογλυκάνη. Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελεί εδώ και καιρό αντικείμενο έρευνας λόγω της σημασίας του στα βακτήρια και της έλλειψης παρουσίας του στα ευκαρυωτικά κύτταρα[4]. Η κύρια λειτουργία του κυτταρικού τοιχώματος είναι να εμποδίζει τα βακτηριακά κύτταρα από το να σπάσουν όταν η πίεση του νερού στο εσωτερικό του κυττάρου είναι μεγαλύτερη από εκείνη στο εξωτερικό. Συμβάλλει επίσης στη διατήρηση του σχήματος ενός βακτηρίου και χρησιμεύει ως σημείο αγκύρωσης για το μαστίγιο[2].

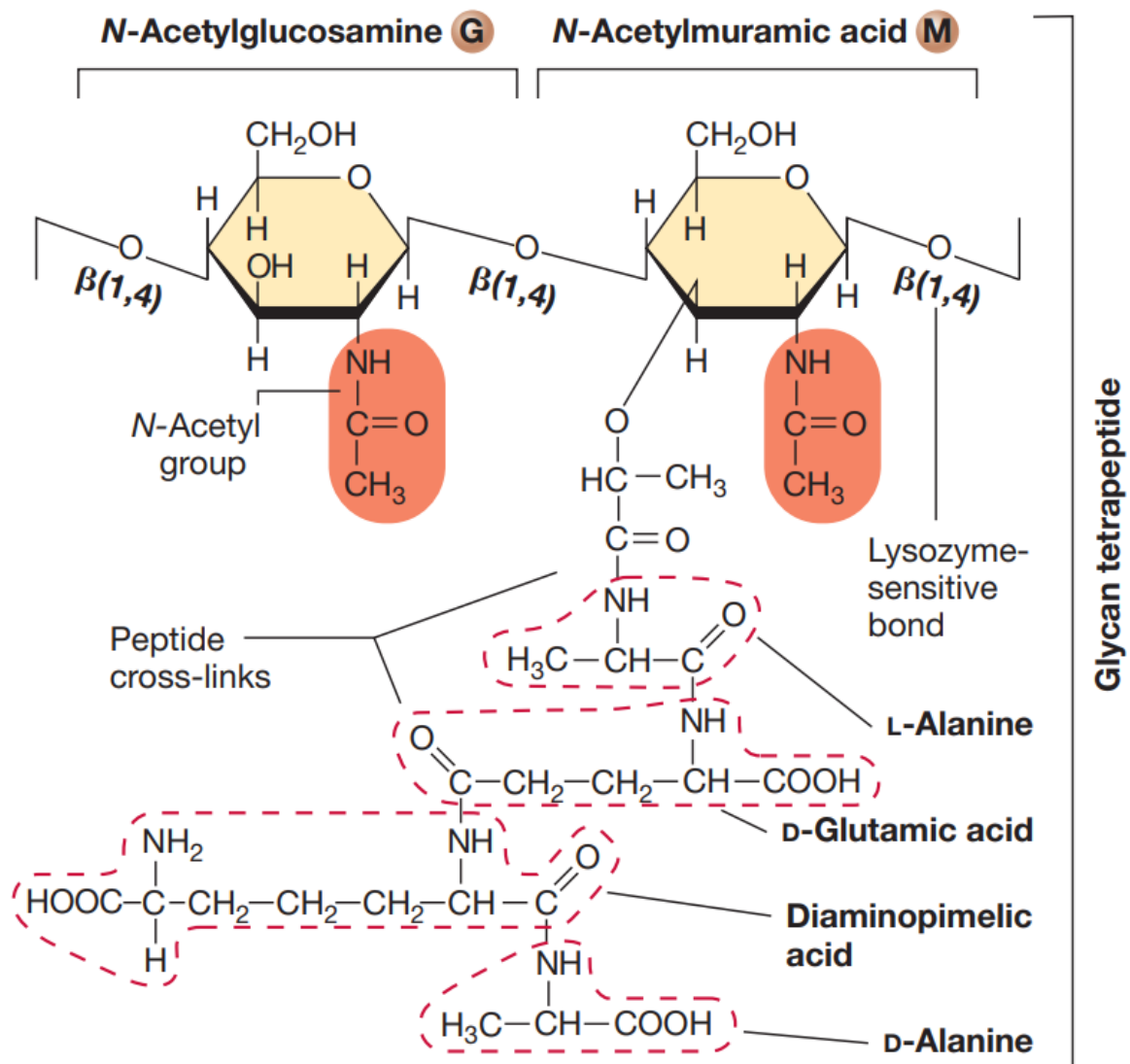
Με βάση τη σύσταση του διακρίνουμε δύο τύπους κυτταρικού τοιχώματος, εκείνον των Gram θετικών και εκείνον των Gram αρνητικών βακτηρίων. Η διάκριση μεταξύ τους γίνεται με τη χρώση κατά Gram, στην οποία τα Gram θετικά βακτήρια βάφονται μώβ/ιώδη ενώ τα Gram αρνητικά βάφονται ροζ/κόκκινα[5].

Στα περισσότερα θετικά κατά Gram βακτήρια, το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από πολλά στρώματα πεπτιδογλυκάνης, σχηματίζοντας μια παχιά, άκαμπτη δομή. Ακόμη περιέχουν τειχοϊκά οξέα, τα οποία αποτελούνται κυρίως από μια αλκοόλη (όπως η γλυκερόλη ή ριβιτόλη) και φωσφορικά. Αντίθετα, τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια έχουν μόνο ένα λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης.

Κάθε μόριο NAM της πεπτιδογλυκάνης συνδέεται με ένα πεπτίδιο το οποίο διαφέρει ανάλογα με το είδος του βακτηρίου. Στα Gram θετικά το μικρό αυτό πεπτίδιο συνήθως αποτελείται από L-αλανίνη, D-γλουταμινικό οξύ, L-λυσίνη και D-αλανίνη ενώ στα Gram αρνητικά η L-λυσίνη αντικαθίσταται με διαμινοπιμελικό οξύ. Οι αλυσίδες NAM-NAG στο στρώμα της πεπτιδογλυκάνης συνδέονται μεταξύ τους με το σχηματισμό δεσμών είτε μέσω της λυσίνης είτε του διαμινοπιμελικού οξέος της μίας αλυσίδας με την προτελευταία D-αλανίνη της επόμενης[3].



Εικόνα 6. Πεπτιδογλυκάνη σε Gram θετικά βακτήρια[3].



Εικόνα 7. Πεπτιδογλυκάνη σε Gram αρνητικά βακτήρια[3].

1.2.3. Έλυτρο

Πολλοί προκαρυώτες εκκρίνουν στην επιφάνειά τους μια ουσία που ονομάζεται γλυκοκάλυκας. Ο βακτηριακός γλυκοκάλυκας είναι ένα παχύρρευστο (κολλώδες), ζελατινώδες πολυμερές που βρίσκεται εξωτερικά του κυτταρικού τοιχώματος και αποτελείται από πολυσακχαρίτες και πολυπεπτίδια. Εάν η ουσία είναι οργανωμένη και είναι σταθερά συνδεδεμένη με το κυτταρικό τοίχωμα, ο γλυκοκάλυκας περιγράφεται ως κάψα ή έλυτρο.

Σε ορισμένα είδη, η κάψα είναι σημαντική για τη συμβολή στην βακτηριακή μολυσματικότητα και συχνά προστατεύει τα παθογόνα βακτήρια από τη φαγοκυττάρωση από τα κύτταρα του ξενιστή[2].

1.2.4. Μαστίγια

Ορισμένα θετικά κατά Gram και αρνητικά κατά Gram βακτήρια έχουν μαστίγια, τα οποία είναι πρωτεϊνικά νημάτια που εκτείνονται σαν μακριές ουρές από τις κυτταρικές τους μεμβράνες. Οι βακτηριακές ουρές, οι οποίες είναι αρκετές φορές μεγαλύτερες από το μήκος του κυττάρου, μεταφέρουν τα μικρόβια. Το μαστίγιο συνδέεται με τα βακτήρια με ένα βασικό σώμα. Στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, το βασικό σώμα συνδέεται τόσο με την εσωτερική όσο και με την εξωτερική κυτταρική μεμβράνη, ενώ στα θετικά κατά Gram βακτήρια υπάρχει μόνο η εσωτερική μεμβράνη. Το βασικό σώμα περιστρέφεται και περιστρέφει το μαστίγιο. Επίσης συντονίζουν την κίνησή τους προς ή μακριά από μια βαθμίδα χημικής συγκέντρωσης με μια κίνηση γνωστή ως χημειοταξία[5].

1.2.5. Προσφυτικές ίνες

Οι προσφυτικές ίνες είναι τριχοειδείς δομές που σχετίζονται με την προσκόλληση των βακτηρίων και συνδέονται με τη λοίμωξη. Αποτελούνται κυρίως από ολιγομερείς πρωτεΐνες πιλίνης, οι οποίες διατάσσονται ελικοειδώς για να σχηματίσουν έναν κύλινδρο. Είναι επίσης αντιγονικές και τα γονίδια που τις κωδικοποιούν βρίσκονται στο βακτηριακό χρωμόσωμα ή σε πλασμίδια. Είναι λεπτότερες και μικρότερες από το μαστίγιο και έχουν μήκος 0,3-1,0 μm, διάμετρο περίπου 7 nm και είναι κατανομημένες σε όλη την επιφάνεια του βακτηριακού κυττάρου[6].

1.2.6. Σμήριγγες

Οι σμήριγγες είναι πολύ μικρότερες σε μήκος από τα μαστίγια και λειτουργούν σαν παράγοντες προσκόλλησης. Αποτελούνται από πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και φωσφορικά άλατα[2].

1.2.7. Κυτταρόπλασμα

Το υλικό που βρίσκεται μέσα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη ενός προκαρυωτικού κυττάρου αναφέρεται ως κυτταρόπλασμα.

Με περιεκτικότητα σε νερό περίπου 80%, τα κύρια συστατικά του κυτταροπλάσματος είναι πρωτεΐνες (ένζυμα), υδατάνθρακες, λιπίδια, ανόργανα ιόντα και διάφορες ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους. Είναι παχύ, υδαρές, ημιδιαφανές και ελαστικό. Το κυτταρόπλασμα των προκαρυωτών περιέχει τρεις κύριες δομές: τα ριβοσώματα, τις εφεδρικές εναποθέσεις που είναι γνωστές ως εγκλείσματα και το νουκλεοειδές, το οποίο περιέχει το DNA[2].

1.2.8. Νουκλεοειδές

Το νουκλεοειδές ενός βακτηριακού κυττάρου περιέχει συνήθως ένα μόνο συνεχές και συχνά κυκλικό νήμα δίκλωνου DNA που ονομάζεται βακτηριακό χρωμόσωμα και σε αυτό περιέχονται οι γενετικές πληροφορίες του κυττάρου που αφορούν τη δομή και τη λειτουργία του. Εκτός από το βακτηριακό χρωμόσωμα, τα βακτήρια συχνά περιέχουν μικρά, συνήθως κυκλικά, δίκλιωνα μόρια DNA που ονομάζονται πλασμίδια. Τα μόρια αυτά αναπαράγονται ανεξάρτητα από το χρωμοσωμικό DNA και είναι γνωστά ως εξωχρωμοσωμικά γενετικά στοιχεία επειδή δεν συνδέονται με το πρωτογενές βακτηριακό χρωμόσωμα. Η ικανότητα ενός βακτηρίου να επιβιώνει σε ένα τυπικό περιβάλλον εξαρτάται από πέντε έως εκατό γονίδια που βρίσκονται σε πλασμίδια, τα οποία μπορούν να προστεθούν ή να αφαιρεθούν χωρίς να προκληθεί βλάβη στον οργανισμό. Ωστόσο, υπάρχουν καταστάσεις στις οποίες τα πλασμίδια ωφελούν τα κύτταρα. Γονίδια που εμπλέκονται στην κατασκευή ενζύμων, στην παραγωγή τοξινών, στην αντοχή σε τοξικά μέταλλα και στην αντοχή στα αντιβιοτικά μπορούν να βρεθούν σε πλασμίδια. Τέλος, γνωρίζουμε ότι ένα βακτήριο μπορεί να μεταφέρει τα πλασμίδια του σε ένα άλλο[2].

1.2.9. Ριβοσώματα

Τα ριβοσώματα αποτελούνται από πρωτεΐνες και RNA και εμπλέκονται στη διαδικασία της μετάφρασης, κατά τη σύνθεση των πρωτεϊνών και αποτελούνται από 2 υπομονάδες, μια μεγάλη υπομονάδα (50S) και μια μικρή υπομονάδα (30S). Τα βακτήρια, τα οποία είναι προκαρυωτικά, έχουν μικρότερα ριβοσώματα (70S) από τα ζώα (80S), τα οποία είναι ευκαρυωτικά[5].

1.3. Ο μικροβιακός κύκλος ανάπτυξης

Στη μικροβιολογία, ανάπτυξη ορίζεται ως η αύξηση του αριθμού των κυττάρων. Τα μικροβιακά κύτταρα έχουν πεπερασμένη διάρκεια ζωής και ένα είδος διατηρείται μόνο ως αποτέλεσμα της συνεχούς αύξησης του πληθυσμού του[3]. Τα βακτήρια αναπαράγονται κανονικά μονογονικά με διχοτόμηση. Ενώ η διχοτόμηση κυριαρχεί ως η κύρια μέθοδος αναπαραγωγής των βακτηρίων, υπάρχουν αρκετές συναρπαστικές εναλλακτικές λύσεις. Η εκβλάστηση προσφέρει έναν μοναδικό τρόπο, όπου ένα γονικό κύτταρο παράγει μια μικρή απόφυση που ωριμάζει σε ένα ξεχωριστό άτομο. Τα κονιδιοσπόρια, που παράγονται από συγκεκριμένα νηματοειδή βακτήρια όπως οι ακτινομύκητες, δρουν ως αυτόνομες αναπαραγωγικές μονάδες, αποσπώνται αλυσιδωτά από το γονικό νημάτιο και βλαστάνουν σε νέα άτομα κατά τη διασπορά. Τέλος, ορισμένα νηματώδη είδη χρησιμοποιούν τον κατακερματισμό, όπου το μητρικό κύτταρο απλώς διασπάται σε μεμονωμένα θραύσματα, καθένα από τα οποία είναι ικανό να ξεκινήσει νέα ανάπτυξη και να σχηματίσει ξεχωριστά κύτταρα.

Αυτές οι ποικίλες στρατηγικές αναπαραγωγής, που διαφέρουν από την τυπική διχοτόμηση, καταδεικνύουν την αξιοσημείωτη προσαρμοστικότητα των βακτηρίων. Η εκβλάστηση παρέχει ένα εναλλακτικό πρότυπο ανάπτυξης, ενώ τα κονιδιοσπόρια διευκολύνουν την εναέρια διασπορά και τη διάδοση στο περιβάλλον. Ο κατακερματισμός, η απλούστερη προσέγγιση, επιτρέπει την ταχεία επέκταση του πληθυσμού υπό ευνοϊκές συνθήκες. Χρησιμοποιώντας αυτές τις ποικίλες μεθόδους, τα βακτήρια εξασφαλίζουν την επιμονή και τον πολλαπλασιασμό τους σε ποικίλα περιβάλλοντα, αναδεικνύοντας την εξελικτική τους επιτυχία και την αξιοσημείωτη ανθεκτικότητά τους[2].

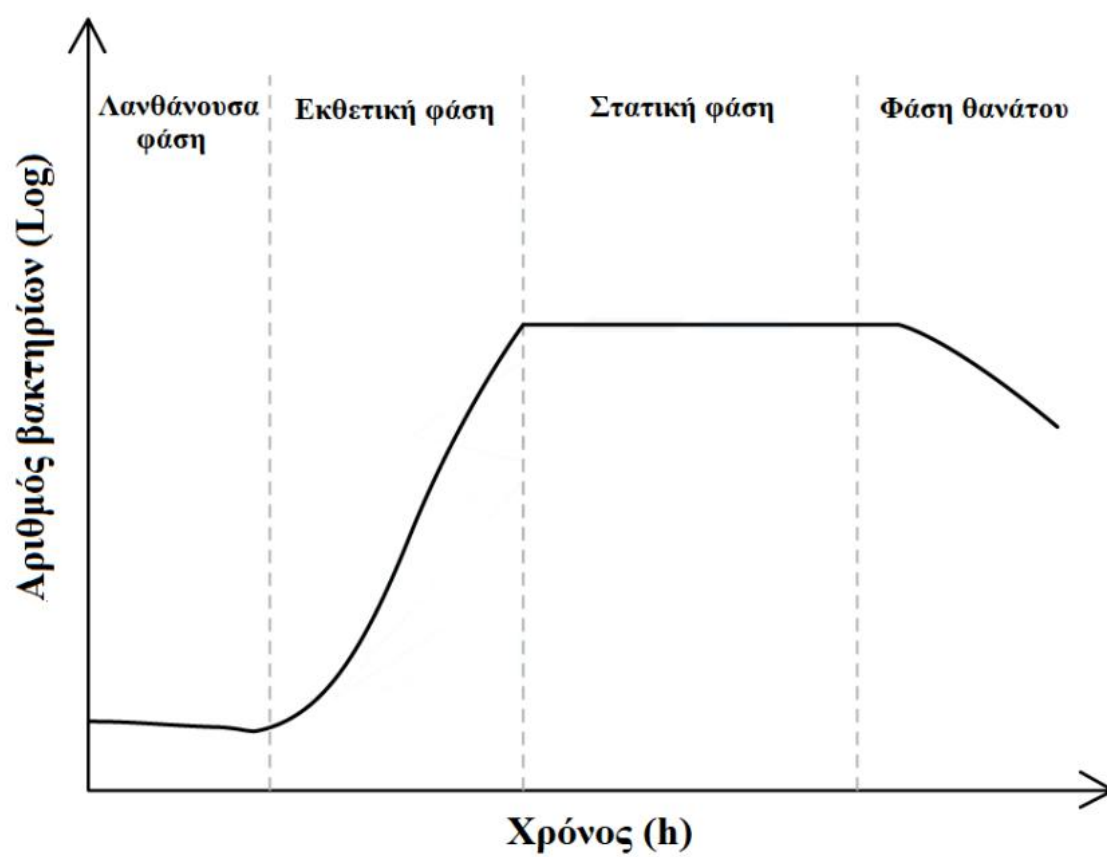
Ο εμβολιασμός ενός υγρού μέσου με βακτήρια και η παρακολούθηση του πληθυσμού τους αποκαλύπτει ένα συναρπαστικό φαινόμενο, την καμπύλη ανάπτυξης των βακτηρίων. Η καμπύλη αυτή αποκαλύπτει τέσσερις διακριτές φάσεις:

Λανθάνουσα φάση: Η αρχική πράξη, που χαρακτηρίζεται από προσαρμογή και σύνθεση ενζύμων, όχι από ταχεία διαίρεση.

Εκθετική φάση: Χαρακτηρίζεται από εκθετική αύξηση του πληθυσμού με αξιοσημείωτο ρυθμό. Τα κύτταρα διπλασιάζονται γρήγορα, επιδεικνύοντας την αναπαραγωγική τους ικανότητα.

Στατική φάση: Καθώς οι πόροι λιγοστεύουν και τα απόβλητα συσσωρεύονται, ακολουθεί μια πράξη εξισορρόπησης. Η κυτταρική διαίρεση επιβραδύνεται, φτάνοντας σε ένα πλατώ, καθώς τα βακτήρια μάχονται για την επιβίωση.

Φάση θανάτου: Με τους πόρους να έχουν εξαντληθεί και τα απόβλητα να φτάνουν σε τοξικά επίπεδα, αρχίζει η αναπόφευκτη παρακμή. Αυτή η καθοδική κλίση αντανακλά την εξασθένηση και το θάνατο των βακτηριακών κυττάρων[2].



Εικόνα 8. Καμπύλη βακτηριακής ανάπτυξης.

1.4. Βακτήρια

1.4.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Η *Pseudomonas aeruginosa*, ένα αρνητικό κατά Gram, προαιρετικά αναερόβιο ραβδωτό βακτήριο, παρουσιάζει διακριτά οπτικά και οσφρητικά χαρακτηριστικά που βοηθούν στην ταυτοποίησή της[7]. Το ευκαιριακό αυτό παθογόνο εκφράζει δύο βασικές χρωστικές ουσίες: τη φλουορεσκεΐνη, υπεύθυνη για την πράσινη φθορίζουσα λάμψη, και την πυοκυανίνη, που συμβάλλει σε μια χαρακτηριστική μπλε απόχρωση. Μαζί, αυτές οι χρωστικές δημιουργούν έναν πρασινογάλαζο χρωματισμό που παρατηρείται εύκολα σε αποικίες και σε επιδέσμους μολυσμένων τραυμάτων.

Επιπλέον, η *P. aeruginosa* παρουσιάζει μια μοναδική οσφρητική υπογραφή που χαρακτηρίζεται από ένα γλυκό άρωμα που μοιάζει με σταφύλι. Αυτό το χαρακτηριστικό άρωμα προκύπτει από την παραγωγή συγκεκριμένων πτητικών οργανικών ενώσεων (VOCs), συμπεριλαμβανομένης της 2-μεθυλο-ισοβορνεόλης. Αξιοποιώντας αυτό το μοναδικό χαρακτηριστικό, οι εκπαιδευμένοι επαγγελματίες υγείας χρησιμοποιούν μερικές φορές την όσφρηση, παράλληλα με την οπτική επιθεώρηση, για την ταχεία ταυτοποίηση της *P. aeruginosa* σε επιθέματα τραυμάτων ή πλάκες αγαρόζης[5].

Ενώ η μειωμένη άμυνα του ξενιστή αναμφίβολα προδιαθέτει τα άτομα σε λοιμώξεις από *P. aeruginosa*, η αποκλειστική απόδοση μεμονωμένων περιπτώσεων στη γενική ανοσοκαταστολή προσφέρει περιορισμένες γνώσεις σχετικά με τις μοναδικές στρατηγικές του βακτηρίου που προκαλούν τη νόσο. Περιπτώσεις όπως οι ασθενείς με AIDS ή τα άτομα που υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία είναι ευαίσθητα σε ένα ευρύ φάσμα παθογόνων, όχι μόνο στην *P. aeruginosa*. Επομένως, για να κατανοήσουμε πραγματικά πώς αυτό το συγκεκριμένο βακτήριο προκαλεί ασθένεια, πρέπει να επικεντρωθούμε σε σενάρια όπου ευδοκιμεί παρά την άθικτη ή μερικώς λειτουργική άμυνα του ξενιστή. Για να αποκτήσουμε βαθύτερη κατανόηση, πρέπει να διερευνήσουμε περιπτώσεις όπου η *P. aeruginosa* ευδοκιμεί ακόμη και όταν το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή είναι μερικώς λειτουργικό, αποκαλύπτοντας τις ιδιαίτερες παθογόνες στρατηγικές της. Στο πλαίσιο αυτό, τρεις ανθρώπινες ασθένειες αποτελούν πολύτιμες ευκαιρίες για να εμβαθύνουμε στη μοναδική παθογένεια της *P. aeruginosa*:

1. Βακτηριαμία τραύματος εγκαύματος: Η εκτεταμένη βλάβη των ιστών και ο μειωμένος δερματικός φραγμός στα εγκαύματα δημιουργούν μια μοναδική οικολογική θέση για τον αποικισμό της *P. aeruginosa* και την επακόλουθη εισβολή στην κυκλοφορία του αίματος. Αυτό το μοντέλο υπερβαίνει τη γενικευμένη ανοσοκαταστολή, αναδεικνύοντας την ικανότητα του βακτηρίου να εκμεταλλεύεται συγκεκριμένα τρωτά σημεία στο περιβάλλον του ξενιστή, όπως οι διαταραγμένοι φυσικοί φραγμοί και οι τροποποιημένες τοπικές ανοσολογικές αποκρίσεις.
2. Λοίμωξη των πνευμόνων από κυστική ίνωση: Οι ασθενείς με κυστική ίνωση φέρουν γενετικές μεταλλάξεις που οδηγούν σε ελαττωματική κάθαρση της βλέννας, με αποτέλεσμα να δημιουργείται στάσιμο περιβάλλον στους πνεύμονες που αποικίζεται εύκολα από *P. aeruginosa*. Αυτό το μοντέλο δίνει έμφαση στην προσαρμογή του βακτηρίου σε συγκεκριμένες συνθήκες του ξενιστή, που διαφέρουν από τη γενικευμένη ανοσοανεπάρκεια. Η μελέτη των χρόνιων λοιμώξεων από *P. aeruginosa* σε ασθενείς με κυστική ίνωση μας επιτρέπει να διερευνήσουμε τις περίπλοκες

αλληλεπιδράσεις του βακτηρίου με το μοναδικό περιβάλλον των πνευμόνων, συμπεριλαμβανομένης της ικανότητάς του να σχηματίζει βιοφίλμ, να αντιστέκεται στην ανοσολογική άμυνα του ξενιστή και να αποφεύγει την αντιβιοτική θεραπεία.

3. Οξεία ελκώδης κερατίτιδα που σχετίζεται με φακούς επαφής: Η παρατεταμένη χρήση φακών επαφής διαταράσσει το επιθήλιο του κερατοειδούς, παρέχοντας ένα σημείο εισόδου και επιτρέποντας τον αποικισμό του φυσιολογικά αποστειρωμένου οφθαλμού με *P. aeruginosa*. Αυτό το μοντέλο αποτελεί παράδειγμα της ευκαιριακής φύσης της *P. aeruginosa* και της ικανότητάς της να ευδοκιμεί σε τοπικά υποβαθμισμένα περιβάλλοντα[7].



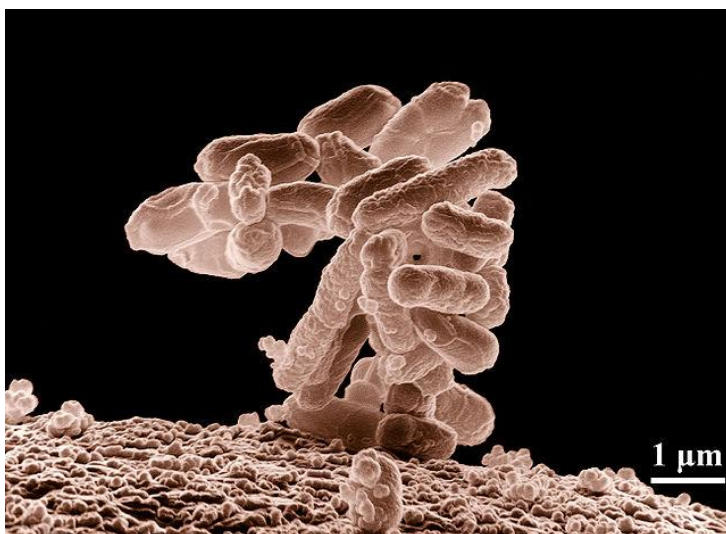
Εικόνα 9. *Pseudomonas aeruginosa* σε κοινό μικροσκόπιο και σε ηλεκτρονικό.

1.4.2. *Escherichia coli*

Το *Escherichia coli*, αρνητικό κατά Gram βακτήριο, μέλος της βακτηριακής οικογένειας των *Enterobacteriaceae*, είναι ο πιο διαδεδομένος κάτοικος των γαστρεντερικών οδών του ανθρώπου, καθώς και ένα από τα πιο σημαντικά παθογόνα. Ο εύκολος χειρισμός του, η άμεσα διαθέσιμη πλήρης αλληλουχία του γονιδιώματος και η αξιοσημείωτη μεταβολική ευελιξία (προαιρετικά αναερόβιο) του το καθιστούν ιδανικό οργανισμό ξενιστή. Πράγματι, το *E. coli* χρησιμεύει ως εργαλείο σε πλήθος βιομηχανικών και ιατρικών εφαρμογών, κατέχοντας τον πολυπόθητο τίτλο του πιο ευρέως χρησιμοποιούμενου μικροοργανισμού στην τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA[8].

Ενώ το *E. coli* συνήθως αποικίζει το ανθρώπινο έντερο αβλαβώς, η ικανότητά του να αποκτά χαρακτηριστικά ιογένεσης μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων (HGT) αποτελεί σημαντική πρόκληση. Αυτό το αξιοσημείωτο φαινόμενο επιτρέπει στο *E. coli* να ανταλλάσσει γενετικό υλικό με άλλα εντερικά βακτήρια μέσω διαφόρων μηχανισμών, μεταξύ των οποίων:

1. Σύζευξη: Τα πλασμίδια, αυτοαναπαραγόμενα κυκλικά τμήματα DNA, λειτουργούν ως φορείς για τη μεταφορά γονιδίων μεταξύ βακτηριακών κυττάρων μέσω της επαφής μεταξύ κυττάρων. Αυτό επιτρέπει στο *E. coli* να αποκτήσει γονίδια που κωδικοποιούν την αντοχή στα αντιβιοτικά, την παραγωγή τοξινών και άλλους παράγοντες μολυσματικότητας από προηγούμενως παθογόνα στελέχη.
2. Λυσογενής μετατροπή: Οι μετριοπαθείς βακτηριοφάγοι, ιοί ικανοί να ενσωματώνουν το DNA τους στο βακτηριακό γονιδίωμα. Κατά την επαγωγή του προφάγου, τα γονίδια αυτά ενσωματώνονται στο χρωμόσωμα του *E. coli*, μετατρέποντας το σε παθογόνο.
3. Εισαγωγή DNA με τη μεσολάβηση τρανσποζονίου: Τα τρανσποζόνια είναι κινητά γενετικά στοιχεία που μπορούν να αποσπώνται από ένα μόριο DNA και να εισάγονται σε ένα άλλο. Αυτό επιτρέπει στο *E. coli* να αποκτά γονίδια μολυσματικότητας απευθείας από άλλα βακτήρια, ακόμη και χωρίς φυσική επαφή[5].



Εικόνα 10. Ηλεκτρονική μικρογραφία χαμηλής θερμοκρασίας συμπλέγματος βακτηρίων *E. coli*.

1.4.3. *Staphylococcus*

Οι σταφυλόκοκκοι είναι μη σπορογόνοι, θετικοί κατά Gram, προαιρετικά αναερόβιοι κόκκοι με διάμετρο περίπου 0.5-1.5 μm . Διαιρούνται σε πολλαπλά επίπεδα σχηματίζοντας ακανόνιστες συστάδες κυττάρων και διασκορπίζονται εύκολα σε σωματίδια σκόνης μέσω του αέρα και σε επιφάνειες. Παρότι οι σταφυλόκοκκοι παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία, δύο είδη έχουν ιδιαίτερη σημασία για την ανθρώπινη υγεία: Οι *Staphylococcus aureus* και *Staphylococcus epidermidis*.

Ο *S. epidermidis*, που χαρακτηρίζεται από τη μη μελαγχρωματική του φύση, αποικίζει κυρίως το δέρμα και τους βλεννογόνους, καθιερώνοντας τον εαυτό του ως μέλος της φυσιολογικής ανθρώπινης μικροβιακής χλωρίδας. Αν και γενικά θεωρείται αβλαβής, διαθέτει τη δυνατότητα να γίνει παθογόνος, ιδίως σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα ή όταν σχετίζεται με ιατρικές συσκευές.

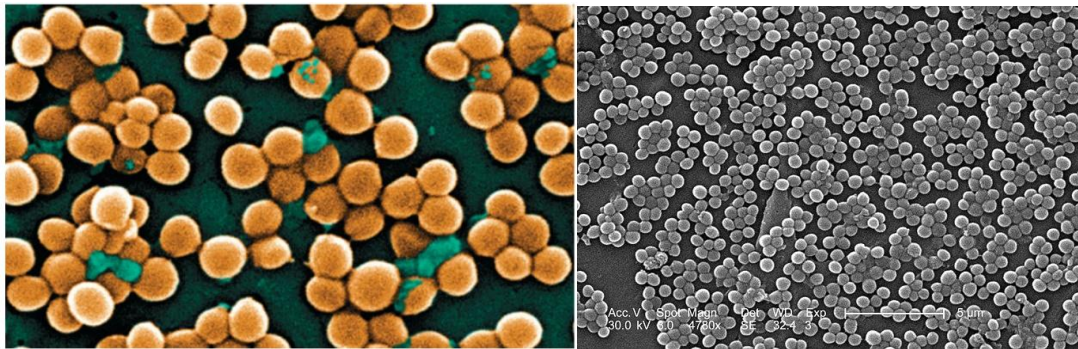
Ο *S. aureus*, που αναγνωρίζεται εύκολα από τη χρυσοκίτρινη χρωστική του, αποικίζει επίσης την ανώτερη αναπνευστική οδό και το δέρμα, συχνά συνυπάρχει με τον *S. epidermidis*. Ωστόσο, διαθέτει σημαντικά μεγαλύτερο παθογόνο δυναμικό, καθώς εμπλέκεται συχνά σε ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων ασθενειών που κυμαίνονται από ήπιες δερματικές λοιμώξεις έως απειλητικές για τη ζωή συστηματικές λοιμώξεις[3].

Ο *S. aureus* παρουσιάζει ένα αξιοσημείωτο βιολογικό χαρακτηριστικό: την ικανότητα να αποικίζει ασυμπτωματικά υγιή άτομα. Το φαινόμενο αυτό, που εκτιμάται ότι υπάρχει στο 30% του ανθρώπινου πληθυσμού, καθιστά τον *S. aureus* συστατικό της φυσιολογικής ρινικής χλωρίδας για πολλά άτομα. Ωστόσο, αυτή η ειρηνική συνύπαρξη κρύβει μια δυνητική απειλή, καθώς ο αποικισμός αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο επακόλουθης λοίμωξης. Οι φορείς του *S. aureus* θεωρούνται σημαντικές δεξαμενές για τα κυκλοφορούντα στελέχη, διευκολύνοντας τη μετάδοση εντός των κοινοτήτων.

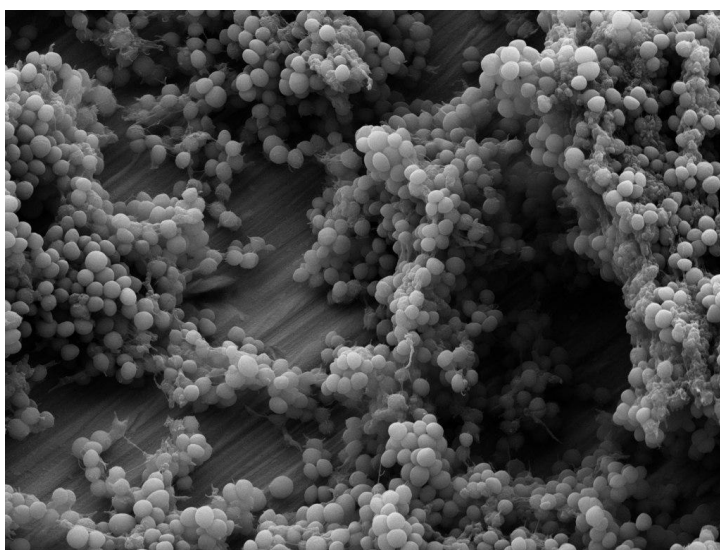
Ο κύριος τρόπος μετάδοσης του *S. aureus* είναι η άμεση επαφή, που συνήθως συμβαίνει μέσω της αλληλεπίδρασης δέρμα με δέρμα με αποικισμένα ή μολυσμένα άτομα. Ωστόσο, η έμμεση μετάδοση μέσω μολυσμένων αντικειμένων και επιφανειών συμβάλλει επίσης στην εξάπλωσή του. Επιπλέον, διάφοροι παράγοντες του ξενιστή διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ευαισθησία στη μόλυνση. Η βλάβη του φυσιολογικού δερματικού φραγμού, η παρουσία υποκείμενων νοσημάτων όπως ο διαβήτης ή το AIDS και η μειωμένη λειτουργία των ουδετερόφιλων μπορεί να προδιαθέσουν σημαντικά τα άτομα σε αποικισμό με *S. aureus* και επακόλουθη λοίμωξη[9].

Ο ανθεκτικός στη μεθικιλίνη *S. aureus* (MRSA) έχει εδώ και καιρό αναγνωριστεί ως παθογόνο που σχετίζεται με την ιατρική περίθαλψη. Ωστόσο, τη δεκαετία του 1990, λοιμώξεις από MRSA, εμφανίστηκαν στις Ηνωμένες Πολιτείες. Παρόλο που τα ποσοστά των νοσοκομειακών λοιμώξεων MRSA έχουν μειωθεί σημαντικά, τα στοιχεία από το National Healthcare Safety Network (Εθνικό Δίκτυο Ασφάλειας Υγείας) και από το σύστημα επιτήρησης του Emerging Infections Program (EIP) υποδηλώνουν ότι η μείωση μπορεί να έχει επιβραδυνθεί τα τελευταία χρόνια[10].

Ο *Staphylococcus epidermidis*, το κορυφαίο είδος των αρνητικών κατά της πηκτάσης (κοαγκουλάσης) σταφυλόκοκκων, έχει αναδειχθεί ως το κυρίαρχο παθογόνο της σήψης στα πρόωρα βρέφη[11]. Είναι επίσης υπεύθυνος για λοιμώξεις σε ασθενείς με νεοπλάσματα ή ανοσοκατασταλμένους, γιατί συνήθως αποικίζουν σε ιατρικές συσκευές όπως καθετήρες και προσθετικές βαλβίδες[12].



Εικόνα 11. *S.aureus* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης (SEM) που απεικονίζει πολυάριθμες συστάδες βακτηρίων MRSA.



Εικόνα 12. Βιοφίλμ *S. epidermidis* σε υπόστρωμα τιτανίου.

1.5. Βακτηριακή ανθεκτικότητα

Τα βακτήρια χρησιμοποιούν ένα πλήθος μεθόδων για να εισβάλουν σε θηλαστικά, να βλάψουν τις περιοχές των ιστών και να αποτρέψουν το ανοσοποιητικό σύστημα να αντιδράσει. Βασική στρατηγική των παθογόνων βακτηρίων είναι η έκκριση πρωτεϊνών μέσω φωσφολιπιδικών μεμβρανών. Η μεταφορά των πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα προς τον περιπλασματικό χώρο πραγματοποιείται μέσω δύο διαφορετικών μονοπατιών. Το πρώτο είναι το GSP (General Secretory Pathway), γνωστό και ως Sec μονοπάτι και το δεύτερο είναι το TAT μονοπάτι (Twin Arginine Targeting pathway). Το Sec μονοπάτι αφορά έναν μηχανισμό μεταφοράς μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης πρωτεϊνών σε μη αναδιπλωμένη (αποδιατεταγμένη) κατάσταση τόσο σε Gram-θετικά όσο και σε Gram-αρνητικά βακτήρια. Η μεταφορά αυτή επιτυγχάνεται μέσω μιας πρωτεΐνης τρανσλοκάσης, γνωστής ως Sec translocase, που εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη. Οι πρωτεΐνες μπορούν να κατευθυνθούν στην τρανσλοκάση είτε με τη βοήθεια της πρωτεΐνης συνοδού SecB είτε μέσω της πρωτεΐνης SRP (Signal Recognition Particle). Αυτό σημαίνει ότι υπάρχουν δύο επιμέρους διαδρομές μέσα στο Sec μονοπάτι: η SecB-εξαρτώμενη και η SRP-εξαρτώμενη.

Σε αντίθεση με το Sec μονοπάτι, το TAT σύστημα μεταφέρει πλήρως αναδιπλωμένες πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια TAT αποτελούν μια εναλλακτική μορφή τρανσλοκάσης, υπεύθυνη για τη μεταφορά συγκεκριμένων λειτουργικών πρωτεϊνών στον περιπλασματικό χώρο.

Τα Gram-αρνητικά βακτήρια έχουν δύο μεμβράνες, γεγονός που απαιτεί εξειδικευμένα συστήματα για την έκκριση πρωτεϊνών. Υπάρχουν τα συστήματα ενός σταδίου, Τύπος I (T1SS), Τύπος III (T3SS), Τύπος IV (T4SS), Τύπος VI (T6SS) και τα συστήματα δύο σταδίων, Τύπος II (T2SS) και Τύπος V (T5SS).

Τα Gram-θετικά βακτήρια έχουν μία μόνο κυτταροπλασματική μεμβράνη και οι πρωτεΐνες πρέπει να διασχίσουν τη μεμβράνη και το παχύ στρώμα πεπτιδογλυκάνης. Το σύστημα μεταφοράς είναι ανήκει στον Τύπο VII (T7SS).

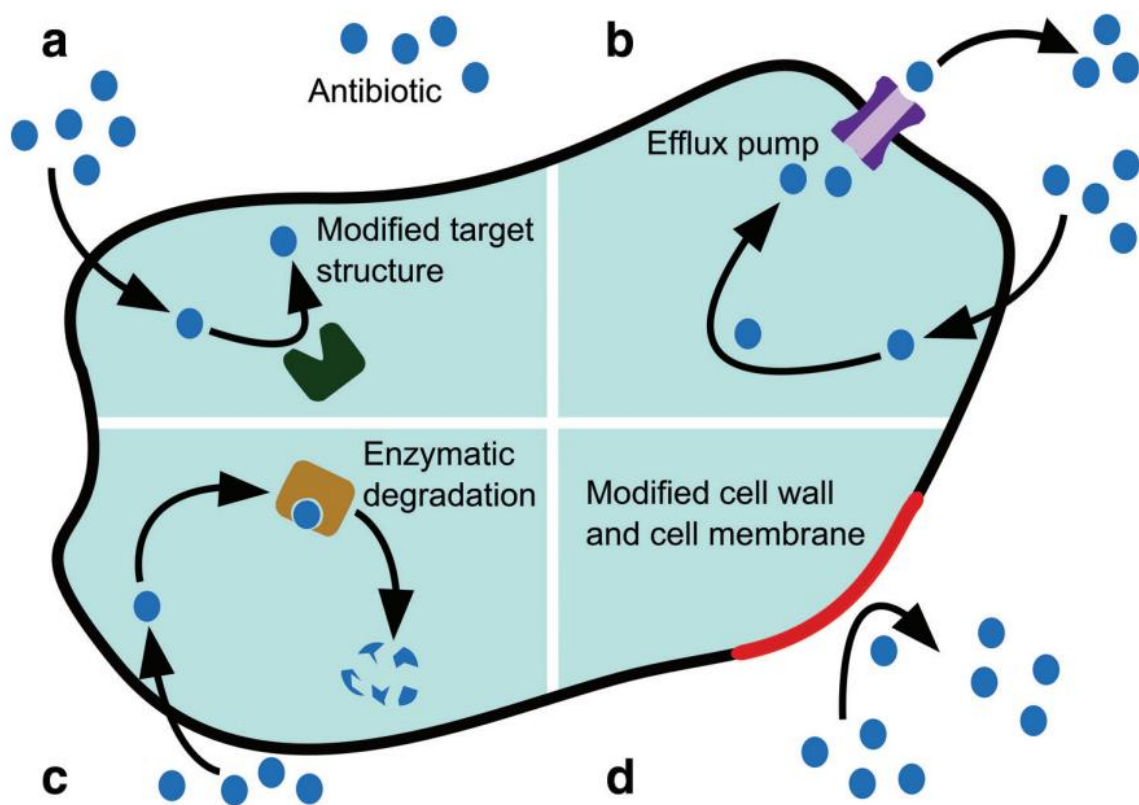
Οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες μπορούν να διαδραματίσουν πολλούς ρόλους στην προώθηση της μόλυνσης, από την ενίσχυση της προσκόλλησης σε ευκαρυωτικά κύτταρα, την απορρόφηση πόρων σε μια περιβαλλοντική θέση, έως την άμεση δηλητηρίαση κυττάρων-στόχων και τη διατάραξη των λειτουργιών τους[13].

Τα αντιβιοτικά είναι ουσίες που είτε σκοτώνουν (βακτηριοκτόνα) είτε καταστέλλουν (βακτηριοστατικά) τα βακτήρια αλληλεπιδρώντας με έναν συγκεκριμένο στόχο εντός του βακτηριακού κυττάρου. Από την ευρεία χρήση των αντιβιοτικών στα τέλη της δεκαετίας του 1940 για τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων, ο επιπολασμός των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων αυξάνεται σταθερά[14], χάρη στην απρόσεκτη και συχνή υπερκατανάλωση τους[15]. Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι υπάρχει παγκόσμιος κίνδυνος για τη δημόσια υγεία από την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά και την αυξανόμενη επικράτηση πολυανθεκτικών βακτηρίων[16]. Σύμφωνα με το Ευρωπαϊκό Κέντρο για την Πρόληψη των Ασθενειών (ECDC) και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), η αντοχή στα αντιβιοτικά είναι μία από τις τρεις κύριες απειλές για την υγεία του 21ου αιώνα παγκοσμίως[17].

Η διασπορά και η μετάδοση της ανθεκτικότητας αυτής λαμβάνει χώρα με δύο κύριες οδούς: την κάθετη και την οριζόντια γονιδιακή μεταφορά. Κατά την κάθετη μεταφορά, γονίδια

ανθεκτικότητας ή μεταλλάξεις μεταβιβάζονται από γονείς σε απογόνους, ενσωματώνοντας την ανθεκτικότητα στο DNA του μικροοργανισμού και διασφαλίζοντας την κληρονομικότητά της στις επόμενες γενιές. Κατά την οριζόντια γονιδιακή μεταφορά, τα γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά αποκτώνται από στενούς συγγενείς ή άλλα είδη και στη συνέχεια μεταδίδονται στους απογόνους[14].

Οι κυριότεροι μηχανισμοί αντίστασης των βακτηρίων σε αντιβιοτικά μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κατηγορίες: τροποποίηση της δομής του στόχου για τη μείωση της συγγένειας με τα αντιβιοτικά, αντλίες εκροής οι οποίες μειώνουν τη συγκέντρωση της αντιμικροβιακής ουσίας στο βακτηριακό κύτταρο, ενζυμική αποικοδόμηση και τροποποιήσεις εντός της κυτταρικής μεμβράνης ελατώνοντας ταυτόχρονα την ικανότητα του φαρμάκου να τη διαπεράσει[18].



Εικόνα 13. Οι μηχανισμοί βακτηριακής αντίστασης σε αντιβιοτικά[18].

1.6. Φλεγμονή

Η φλεγμονή είναι μια εξελικτικά διατηρημένη διαδικασία που ενεργοποιεί ανοσοποιητικά και μη ανοσοποιητικά κύτταρα για την άμυνα του ξενιστή από βακτήρια, ιούς, δηλητήρια και ασθένειες[19]. Προωθεί επίσης την επισκευή και την αποκατάσταση των ιστών καθώς αποτελεί ένα από τα στάδια επούλωσης πληγών[20].

Η διαδικασία επούλωσης του τραύματος αποτελείται από τέσσερις διακριτές φάσεις οι οποίες πρέπει να συμβαίνουν με τη σωστή σειρά, σε συγκεκριμένο χρόνο και να συνεχίζονται για συγκεκριμένη διάρκεια με τη βέλτιστη ένταση. Αυτές είναι η αιμόσταση, η φλεγμονή, ο πολλαπλασιασμός και η αναδιαμόρφωση των ιστών. Πιο συγκεκριμένα, η γρήγορη αιμόσταση, φλεγμονή, η διαφοροποίηση, ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση των μεσεγχυματικών κυττάρων στο σημείο του τραύματος, η αγγειογένεση, η άμεση αναγέννηση του επιθηλιακού ιστού πάνω από την επιφάνεια του τραύματος και η σωστή σύνθεση, διασύνδεση και ευθυγράμμιση του κολλαγόνου για την παροχή αντοχής στον επουλωτικό ιστό είναι όλα απαραίτητα για τη βέλτιστη επούλωση του τραύματος στους ενήλικες[21].

Η ακεραιότητα του δέρματος αποτελεί ένα ζωτικής σημασίας φράγμα που προστατεύει τον οργανισμό από εξωτερικές απειλές, όπως μικροοργανισμούς. Ο τραυματισμός του δέρματος, από τυχόν αμυχές, κοψίματα ή εγκαύματα, διαταράσσει αυτό το φράγμα, αφήνοντας τον οργανισμό ευάλωτο σε μολύνσεις[21].

Η φλεγμονώδης νόσος ορίζεται ως μια παθολογική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτη φλεγμονώδη αντίδραση, όπου η φλεγμονή στρέφεται εναντίον των υγιών κυττάρων και ιστών του ίδιου του οργανισμού, οδηγώντας σε χρόνια ερυθρότητα, πρήξιμο, βλάβη στους ιστούς[22].

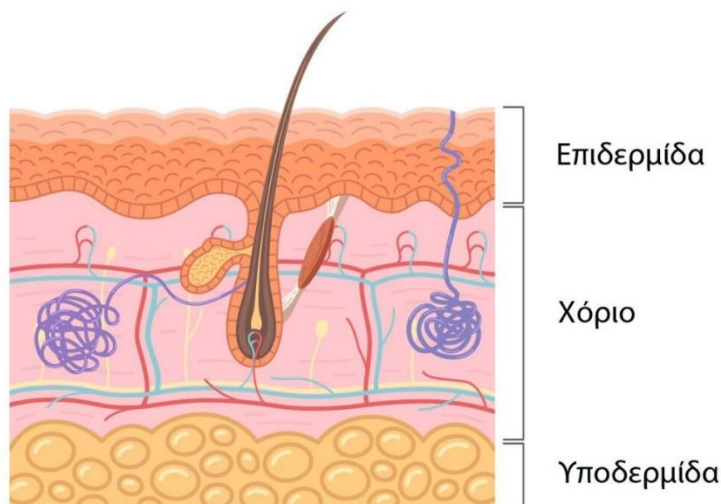
Είναι πλέον γνωστή η σχέση μεταξύ της χρόνιας φλεγμονής, της γήρανσης και των ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία και έχει οδηγήσει στη δημιουργία της θεωρίας του «inflammaging». Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, εκτός από την αυξημένη προφλεγμονώδη κατάσταση, οι ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία συνοδεύονται από μειωμένη ικανότητα αντιμετώπισης ποικίλων στρεσογόνων παραγόντων κατά τη διάρκεια μακροχρόνιας έκθεσης σε διάφορα αντιγόνα, καθώς και σε ελεύθερες ρίζες (ROS) και άλλα τοξικά προϊόντα που παράγονται λόγω οξειδωτικού στρες[23].

Χρειάζεται ακόμη να αναφερθεί ότι οι λοιμώξεις και οι φλεγμονές ευθύνονται για το 25% περίπου των παραγόντων που προκαλούν καρκίνο. Ρίζες οξυγόνου/αζώτου (ROS/RNS), οι οποίες καταστρέφουν το DNA δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της χρόνιας φλεγμονής τόσο από τα φλεγμονώδη όσο και από τα επιθηλιακά κύτταρα οδηγώντας σε ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων[24].

1.7. Η διαδικασία επούλωσης του δερματικού τραύματος

Το δέρμα είναι το μεγαλύτερο όργανο του ανθρώπινου σώματος σε επιφάνεια. Αποτελεί την κρίσιμη δομή που προστατεύει τους εσωτερικούς ιστούς από μηχανικές βλάβες, μικροβιακές λοιμώξεις, υπερϊώδη ακτινοβολία και ακραίες θερμοκρασίες. Αυτό το καθιστά ιδιαίτερα ευάλωτο σε τραυματισμούς, με σημαντικές επιπτώσεις τόσο για τους ασθενείς όσο και για την οικονομία της υγείας. Μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες, οι μη επουλώσιμες πληγές αντιστοιχούν σε περίπου 50 δισεκατομμύρια δολάρια, οι ουλές από χειρουργικές τομές και τραύματα σε σχεδόν 12 δισεκατομμύρια δολάρια, και τα εγκαύματα σε 7,5 δισεκατομμύρια δολάρια σε ετήσιες δαπάνες υγειονομικής περίθαλψης. Ασθενείς με διαβήτη, ηλικιωμένοι και ασθενείς με γενετικές διαταραχές όπως η δρεπανοκυτταρική αναιμία είναι ιδιαίτερα προδιατεθειμένοι σε ανώμαλη επούλωση τραυμάτων που οδηγεί σε μακροχρόνιες επιπλοκές. Ενώ υπάρχουν αρκετές θεραπείες για την επούλωση τραυμάτων, αυτές είναι μόνο μετρίως αποτελεσματικές. Επομένως υπάρχει ανάγκη για πιο αποτελεσματικές θεραπείες.

Η επιδιόρθωση του δέρματος απαιτεί τον περίπλοκο συγχρονισμό πολλών διαφορετικών τύπων κυττάρων σε διαδοχικά βήματα. Στο υγιές δέρμα, η επιδερμίδα είναι το εξωτερικό, αδιαπέραστο στρώμα που αντέχει στο σκληρό εξωτερικό περιβάλλον. Η επιδερμίδα περιέχει επίσης τους σμηγματογόνους αδένες, τους ιδρωτοποιούς αδένες και τους θύλακες των τριχών. Το χόριο είναι πλούσιο σε εξωκυττάρια ουσία (ECM), αγγεία και μηχανοϋποδοχείς, και παρέχει στο δέρμα αντοχή, θρεπτικά συστατικά και ανοσία. Ο υποδόριος λιπώδης ιστός βρίσκεται κάτω από το χόριο και λειτουργεί ως ενεργειακό απόθεμα. Αποτελεί επίσης μια συνεχή πηγή αυξητικών παραγόντων για το χόριο. Εκτός από αυτούς τους τύπους κυττάρων, κάθε στρώμα περιέχει μόνιμα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που επιτηρούν συνεχώς το δέρμα για βλάβες. Όταν το δέρμα τραυματίζεται, πολλαπλοί τύποι κυττάρων μέσα σε αυτά τα τρία στρώματα πρέπει να συντονιστούν σε ακριβή στάδια για να επιτευχθεί η επούλωση.



Εικόνα 14. Τα στρώματα του δέρματος.

Αυτά τα στάδια της αιμόστασης, της φλεγμονής, της αγγειογένεσης, της ανάπτυξης, της επανεπιθηλιοποίησης και της αναδιαμόρφωσης συμβαίνουν σε χρονική αλληλουχία αλλά και

αλληλεπικαλύπτονται. Έτσι, η επιδιόρθωση του δέρματος είναι από τις πιο πολύπλοκες διαδικασίες στο ανθρώπινο σώμα.

Η πρώτη απόκριση σε ένα τραύμα είναι η συστολή των τραυματισμένων αιμοφόρων αγγείων και η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων για τον σχηματισμό θρόμβου ινικής. Ο θρόμβος σταματά τη ροή του αίματος και παρέχει ένα ικρίωμα για τα εισερχόμενα φλεγμονώδη κύτταρα. Τα ουδετερόφιλα επιστρατεύονται αμέσως στον θρόμβο ως πρώτη γραμμή άμυνας κατά των βακτηρίων. Τα μονοκύτταρα επιστρατεύονται εντός 48-96 ωρών μετά τον τραυματισμό και μετατρέπονται σε μακροφάγα που ενεργοποιούνται στους ιστούς στην περιοχή του τραύματος. Το προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα, που περιλαμβάνει κύτταρα Langerhans, δερματικά δένδριτικά κύτταρα και T-λεμφοκύτταρα, ενεργοποιείται επίσης για την καταπολέμηση ιδίων και ξένων αντιγόνων.

Καθώς η φλεγμονώδης φάση τελειώνει, ξεκινά η φάση του πολλαπλασιασμού. Αυτή περιλαμβάνει την αγγειογένεση (τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη διακλάδωση των ενδοθηλιακών κυττάρων για τον σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων), την ανάπτυξη κοκκιώδους ιστού (οι ινοβλάστες πολλαπλασιάζονται, εισβάλλουν στον θρόμβο και ορισμένοι διαφοροποιούνται σε μυοϊνοβλάστες, οι οποίοι συστέλλουν τα χείλη του τραύματος) και την επανεπιθηλιοποίηση (πολλαπλασιασμός επιδερμικών βλαστοκυττάρων για την ανακατασκευή της επιδερμίδας). Τα βλαστοκύτταρα αυτά, αν και συνήθως εξειδικευμένα, γίνονται εξαιρετικά πλαστικά κατά τον τραυματισμό για να επιταχύνουν την επούλωση.

Τέλος, η επούλωση στους ενήλικες έχει ως αποτέλεσμα μια ινώδη ουλή, η οποία αποκαθιστά τη λειτουργία του φραγμού αλλά δεν αναπαράγει την αρχική αρχιτεκτονική του δέρματος, σε αντίθεση με την αναγεννητική επούλωση που παρατηρείται στα έμβρυα. Η υπερβολική δημιουργία ουλής (υπερτροφικές ουλές, χηλοειδή) ή η ανεπαρκής επούλωση (χρόνια τραύματα) αποτελούν σημαντικά κλινικά προβλήματα[25, 26].

1.8. Υπεριώδης Ακτινοβολία και οι επιπτώσεις της στο δέρμα

Η υπεριώδης (UV) ακτινοβολία ταξινομείται σε διαφορετικούς τύπους ανάλογα με το μήκος κύματος και την ενέργειά της. Η UVA έχει τα μεγαλύτερα μήκη κύματος (315-400 nm) και είναι λιγότερο ενεργητική, ενώ η UVB έχει μικρότερα μήκη κύματος (280-315 nm) και υψηλότερη ενέργεια. Μια σημαντική διάκριση έγκειται στον τρόπο διείσδυσής τους στο δέρμα: η ακτινοβολία UVA μπορεί να φτάσει βαθιά στο χόριο, το εσωτερικό στρώμα του δέρματος. Αντίθετα, η ακτινοβολία UVB απορροφάται σχεδόν πλήρως από την επιδερμίδα, το εξωτερικό στρώμα, με πολύ λίγο να φτάνει στο χόριο. Επιπλέον, οι μηχανισμοί πρόκλησης βλάβης διαφέρουν: η UVA παράγει κυρίως ενεργά είδη οξυγόνου, τα οποία έμμεσα βλάπτουν το DNA μέσω φωτοευαισθητοποιών αντιδράσεων. Από την άλλη πλευρά, η UVB απορροφάται απευθείας από το DNA, προκαλώντας μοριακές αναδιατάξεις.

Η UV ακτινοβολία ταξινομείται ως "πλήρης καρκινογόνος παράγοντας" και αποτελεί τον σημαντικότερο τροποποιήσιμο παράγοντα κινδύνου για τον καρκίνο του δέρματος και άλλες δερματικές παθήσεις που επηρεάζονται από το περιβάλλον. Η υπερβολική έκθεση στην UV ακτινοβολία μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρά προβλήματα υγείας, συμπεριλαμβανομένης της ατροφίας του δέρματος, αλλαγών στη μελάγχρωση, ρυτίδων και κακοήθειες. Συνδέεται επιδημιολογικά και μοριακά με τους τρεις πιο διαδεδομένους τύπους καρκίνου του δέρματος: το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα, το πλακώδες καρκίνωμα και το κακόηθες μελάνωμα[27].

Η προστασία του δέρματος από την υπεριώδη ακτινοβολία είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της υγείας του δέρματος και την πρόληψη σοβαρών παθήσεων. Η μελανίνη, μια χρωστική ουσία που υπάρχει φυσιολογικά στην επιδερμίδα, λειτουργεί ως ένα ισχυρό φράγμα κατά της διείσδυσης της UV ακτινοβολίας, δρώντας ως ένα "φυσικό αντηλιακό". Η ευμελανίνη, ένας τύπος μελανίνης, είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στην απορρόφηση των φωτονίων UV. Έτσι, όσο υψηλότερα είναι τα επίπεδα ευμελανίνης στο δέρμα, τόσο λιγότερο διαπερατή είναι η επιδερμίδα από την UV ακτινοβολία[28].

Η φυσική αντίδραση του σώματος στην έκθεση στην UV ακτινοβολία, γνωστή ως προσαρμοστική μελάγχρωση ή μαύρισμα, περιλαμβάνει αύξηση της παραγωγής και συσσώρευσης μελανίνης στην επιδερμίδα. Αυτή η φυσιολογική αντίδραση είναι ζωτικής σημασίας για την προστασία του δέρματος από μεταγενέστερες βλάβες από την UV ακτινοβολία, και τυχόν διαταραχές σε αυτή την οδό συνδέονται με αυξημένη ευαισθησία στον καρκίνο.

Τελικά, η μείωση της έκθεσης στην υπεριώδη ακτινοβολία, είτε από το φυσικό ηλιακό φως είτε από τεχνητές πηγές όπως τα σολάριουμ, θεωρείται η πιο αποτελεσματική στρατηγική για τη μείωση της συχνότητας εμφάνισης μελάνωματος και άλλων καρκίνων του δέρματος. Εκτιμάται ότι η UV ακτινοβολία είναι υπεύθυνη για σχεδόν το 65% των μελανωμάτων και το 90% των μη-μελανωτικών καρκίνων του δέρματος[27].

Κεφάλαιο 2

2.1. Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAIDs)

Στο φαρμακευτικό οπλοστάσιο, τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAIDs) κατέχουν εξέχουσα θέση μεταξύ των φαρμάκων που συνταγογραφούνται παγκοσμίως. Φάρμακα όπως η ιβουπροφένη, η ασπιρίνη, το μεφεναμικό οξύ και το δικλοφενάκ είναι όλα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη. Αυτή η ποικιλόμορφη κατηγορία φαρμάκων παρουσιάζει αντιπυρετικές, αναλγητικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, καθιστώντας τα αποτελεσματικά στη θεραπεία του πυρετού, του πόνου και της φλεγμονής. Κλινικά, ανακουφίζουν τον πόνο σε ένα φάσμα καταστάσεων, που περιλαμβάνει από την εμμηνορρυσιακή και μετεγχειρητική δυσφορία έως τον αρθρικό πόνο. Γνωστά για την αντιφλεγμονώδη δράση τους, τα NSAIDs ασκούν τα αποτελέσματά τους μέσω της αναστολής της σύνθεσης προσταγλανδινών μέσω του αποκλεισμού του ενζύμου κυκλοοξυγενάση (COX). Τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται μια έξαρση της έρευνας που διερευνά τις δυνατότητες των NSAIDs στη θεραπεία και την πρόληψη του καρκίνου, βασιζόμενη στην καθιερωμένη σχέση μεταξύ χρόνιας φλεγμονής και καρκινογένεσης. Οι κυκλοοξυγενάσες (COX) αντιπροσωπεύουν μια κατηγορία ενζύμων που είναι ζωτικής σημασίας για τη βιοσύνθεση των προσταγλανδινών (PGs). Αυτά τα εικοσανοειδή, τα οποία κατηγοριοποιούνται ως λιπιδικές ενώσεις 20 ανθράκων, προέρχονται από την οδό του αραχιδονικού οξέος και εξυπηρετούν ποικίλες φυσιολογικές λειτουργίες σε όλο το σώμα. Ειδικότερα, αναγνωρίζονται ως βασικοί μεσολαβητές της φλεγμονής[29].

Παρόλο που τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα προσφέρουν πολύτιμα θεραπευτικά αποτελέσματα, δεν είναι χωρίς κινδύνους. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες εκδηλώνονται κυρίως στο γαστρεντερικό, το νεφρικό και το καρδιαγγειακό σύστημα. Ευτυχώς, οι περισσότεροι ασθενείς που λαμβάνουν θεραπευτικές δόσεις για μικρή διάρκεια παρουσιάζουν καλή ανεκτικότητα. Ωστόσο, η παρατεταμένη χρήση ή η παρουσία συννοσηροτήτων αυξάνει σημαντικά το προφίλ κινδύνου. Τελικά, η θεραπεία με NSAIDs απαιτεί μια σχολαστική αξιολόγηση της ατομικής σχέσης κινδύνου-οφέλους λαμβάνοντας υπόψη το συγκεκριμένο πλαίσιο υγείας του ασθενούς[30].

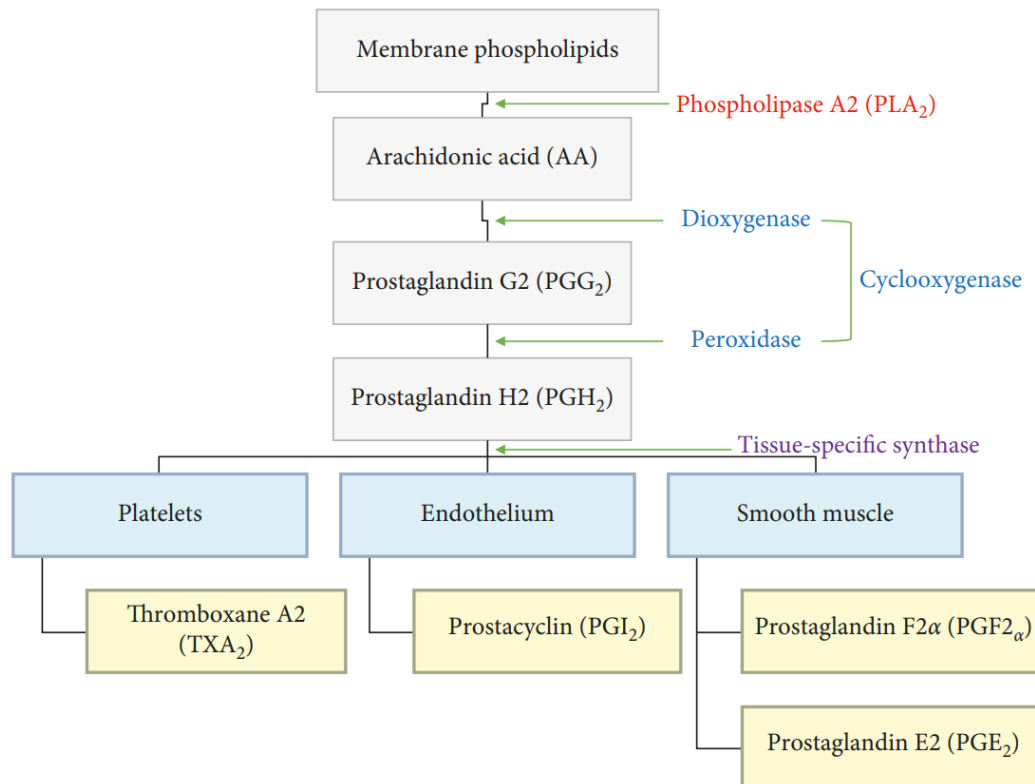
Το αρχικό στάδιο της σύνθεσης των προσταγλανδινών περιλαμβάνει την ενζυμική δράση της φωσφολιπάσης A2 (PLA₂) στα φωσφολιπίδια της μεμβράνης, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος. Αυτή η ενδιάμεση πρόδρομη ουσία υφίσταται στη συνέχεια μεταβολισμό από την COX μέσω μιας διαδικασίας δύο σταδίων. Πρώτον, η δραστηριότητα της διοξυγενάσης της COX μετατρέπει το αραχιδονικό οξύ σε προσταγλανδίνη G₂ (PGG₂). Στη συνέχεια, η PGG₂ μετατρέπεται σε προσταγλανδίνη H₂ (PGH₂) μέσω της δραστηριότητας υπεροξειδάσης του ενζύμου. Τέλος, οι ειδικές για τους ιστούς συνθάσες δρουν στην PGH₂ για τη δημιουργία ενός φάσματος ποικίλων τελικών προϊόντων προσταγλανδίνης, συμπεριλαμβανομένων των PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂ και θρομβοξάνης A₂ (TXA₂)[29].

Η ανακάλυψη στις αρχές της δεκαετίας του 1970 που συνέδεσε την αντιφλεγμονώδη δράση της ασπιρίνης με την αναστολή της σύνθεσης των προσταγλανδινών θεμελίωσε τον μηχανισμό δράσης των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων. Αυτό το κεντρικό ένζυμο στη βιοσύνθεση των προσταγλανδινών, η COX, έγινε ο πρωταρχικός στόχος για τη μετέπειτα ανάπτυξη των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων. Πράγματι, τα

περισσότερα γνωστά NSAIDs παρουσιάζουν ανασταλτική δράση έναντι της COX, ενώ έχουν ταυτοποιηθεί δύο ομόλογες ισομορφές: COX-1 και COX-2[31].

Η COX-1 είναι η πανταχού παρούσα και σταθερά εκφραζόμενη μορφή, που βρίσκεται σε διάφορους τύπους κυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες. Εξυπηρετεί μια κρίσιμη λειτουργία στην παραγωγή προσταγλανδινών που ρυθμίζουν την κυτταρική ομοιόσταση, συμπεριλαμβανομένης της νεφρικής αιματικής ροής και της προστασίας του γαστρικού βλεννογόνου[32].

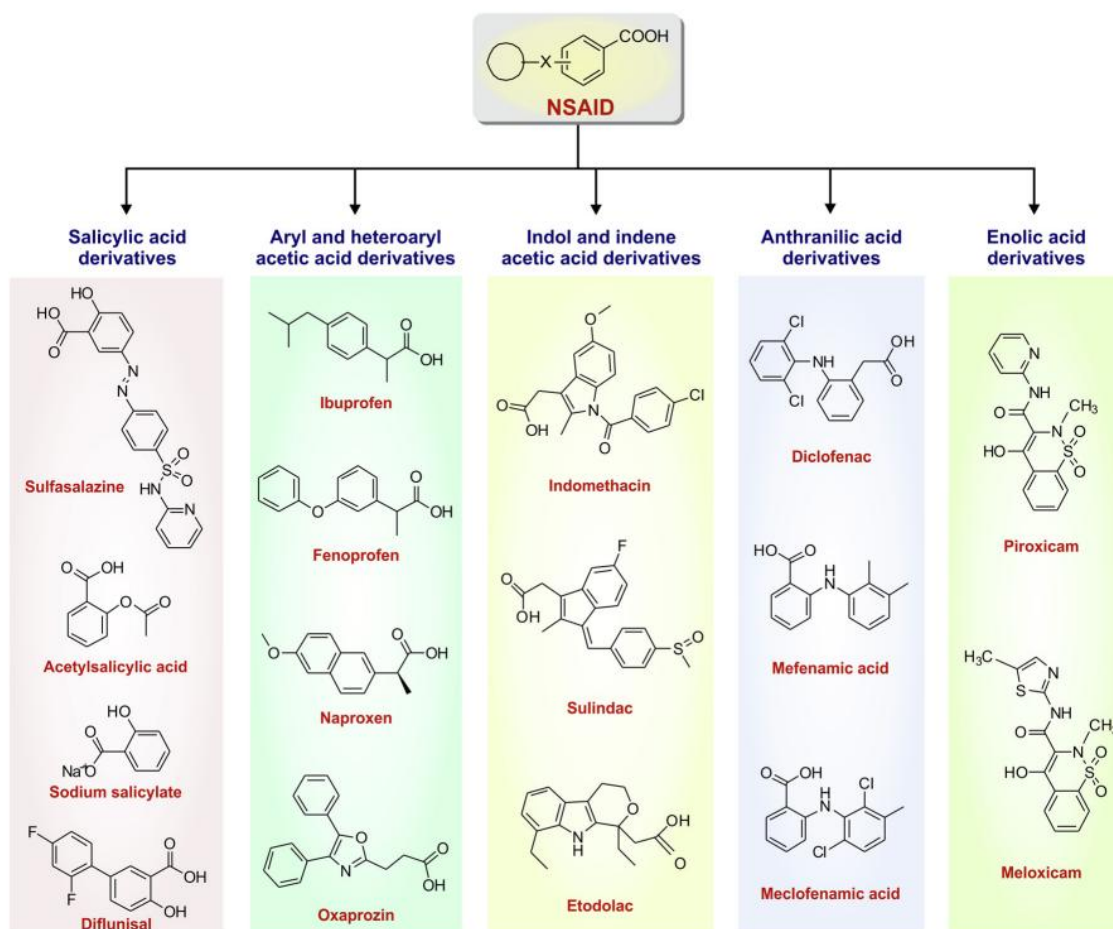
Η COX-2 είναι η επαγόμενη μορφή, που εκφράζεται κυρίως σε φλεγμονώδη κύτταρα όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μακροφάγα και οι αρθρικοί ινοβλάστες μετά από τραύμα του ιστού. Αυτή η μορφή της επιτρέπει να διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη φλεγμονώδη απόκριση[32].



Εικόνα 15. Η οδός του αραχιδονικού οξέος και ο ρόλος της κυκλοοξυγενάσης στη σύνθεση των προσταγλανδινών[29].

Τα (NSAIDs) παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ετερογένεια τόσο στη δομική τους σύνθεση όσο και στους λειτουργικούς τους μηχανισμούς. Συνήθως, υπάρχουν ως ασθενή οργανικά οξέα που χαρακτηρίζονται από μια όξινη ομάδα και μια αρωματική λειτουργική ομάδα. Ένας βασικός παράγοντας που τα διαφοροποιεί είναι η ειδική για κάθε ισομορφή τους εκλεκτικότητα για την αναστολή της συνθάσης του ενδοπεροξειδίου των προσταγλανδινών (PGHS). Μια άλλη προσέγγιση ταξινόμησης εστιάζει στη συστηματική φαρμακοκινητική, λαμβάνοντας υπόψη τη βιοδιαθεσιμότητα των φαρμάκων στον ορό για την κατανόηση της συνολικής τους δράσης εντός του σώματος. Με βάση τη χημική τους δομή, τα NSAIDs μπορούν να ταξινομηθούν σε γενικές γραμμές σε σαλικυλικά, παράγωγα αρυλικού και ετεροαρυλικού οξικού οξέος, παράγωγα ινδολικού/ινδενικού οξικού οξέος, ανθρανιλικά και οξικάμες (ενολικά οξέα).

Η μετατροπή του αραχιδονικού οξέος σε φλεγμονώδη προστανοειδή, όπως οι προσταγλανδίνες και η προστακυκλίνη, βασίζεται σε ένζυμα που ονομάζονται συνθάσες του ενδοπεροξειδίου των προσταγλανδινών (PGHS), κυρίως PGHS-1 και PGHS-2. Τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα ασκούν τα αντιφλεγμονώδη αποτελέσματά τους αναστέλλοντας αυτά τα ένζυμα. Η εκλεκτικότητα των PGHS χρησιμεύει ως βασικός διαφοροποιητικός παράγοντας για τα NSAIDs, επιτρέποντας την ταξινόμησή τους με βάση τις ανασταλτικές αναλογίες. Ο λόγος αυτός υπολογίζεται διαιρώντας την τιμή IC_{50} για την PGHS-1 με την τιμή IC_{50} για την PGHS-2. Ένας λόγος 1 υποδηλώνει ίση αναστολή και των δύο ενζύμων. Λόγοι μικρότεροι από 1 υποδηλώνουν προτίμηση στην αναστολή του PGHS-1, αυξάνοντας δυνητικά τους κινδύνους όπως η γαστρεντερική τοξικότητα. Αντίθετα, αναλογίες μεγαλύτερες από 1 υποδηλώνουν προτίμηση στην αναστολή του PGHS-2, η οποία γενικά συσχετίζεται με την αντιφλεγμονώδη δράση[33].



Εικόνα 16. Ταξινόμηση των NSAIDs με βάση τη δομή τους[33].

2.2. Αντιμικροβιακή δράση των NSAIDs.

Η μελέτη ορισμένων μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων, συμπεριλαμβανόμενων των ακετυλοσαλικυλικού οξέος, diclofenac, piroxicam και naproxen, αποκάλυψε την αντιβιοτική τους δράση σε συγκεντρώσεις σχετικές με την ανθρώπινη φαρμακοκινητική[34]. Το εύρημα αυτό προτρέπει στη διερεύνηση αυτών των καλά ανεκτών φαρμάκων ως πιθανών συμπληρωματικών θεραπειών κατά των λοιμώξεων που σχετίζονται με το βιοφίλμ.

Ο σχηματισμός βιοφίλμ ευνοεί την επιβίωση και την επιμονή τους σε ποικίλα αβιοτικά και βιοτικά περιβάλλοντα. Το 80% των χρόνιων και επαναλαμβανόμενων βακτηριακών λοιμώξεων στον άνθρωπο, ορισμένες από τις οποίες σχετίζονται με σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα, περιλαμβάνουν βιοφίλμ. Τα βιοφίλμ είναι δομημένες κοινότητες μικροβίων που ζουν σε επιφάνειες. Χρησιμοποιούν μια αυτοεκκρινόμενη μήτρα σακχάρων, πρωτεϊνών και DNA για να κολλήσουν μεταξύ τους και να προσκολληθούν στο περιβάλλον τους. Αυτή η μήτρα παρέχει προστασία, διευκολύνει την ανταλλαγή θρεπτικών συστατικών και προωθεί την επικοινωνία μεταξύ των μικροβίων, καθιστώντας τα ιδιαίτερα ανθεκτικά σε προκλήσεις όπως τα αντιβιοτικά και η ανοσολογική άμυνα.

Τα βιοφίλμ δεν λειτουργούν μόνο ως ισχυρή φυσική ασπίδα ενάντια σε εξωτερικές απειλές, αλλά διαθέτουν επίσης ένα ρεπερτόριο αξιοσημείωτων λειτουργιών που ενισχύουν τη βακτηριακή επιβίωση και επιμονή. Οργανώνουν μια συνεχή παροχή θρεπτικών συστατικών που τροφοδοτούν τη μικροβιακή ανάπτυξη, προωθώντας τις συνεργατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κατοίκων. Αυτό το συνεργατικό περιβάλλον διευκολύνει την ανταλλαγή γενετικού υλικού, επιταχύνοντας την προσαρμογή και την εμφάνιση ανθεκτικότητας σε σκληρά περιβάλλοντα, συμπεριλαμβανομένων των ακραίων διακυμάνσεων του pH. Ίσως το πιο σημαντικό, τα βιοφίλμ αναπτύσσουν εξαιρετική ανθεκτικότητα έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων και της άμυνας του ανοσοποιητικού συστήματος, καθιστώντας τις λοιμώξεις που σχετίζονται με αυτά δύσκολο να εξαλειφθούν[35].

2.3. Ακετυλοσαλικυλικό οξύ

Εδώ και αιώνες, οι άνθρωποι στρέφονται στο φλοιό ιτιάς και σε άλλα φυτά γεμάτα σαλικυλικά για να διώξουν τον πόνο. Ακόμη και αρχαίοι θεραπευτές όπως ο Ιπποκράτης και ο Γαληνός κατέγραψαν την παυσίπονη δύναμή της, με τον Γαληνό να σημειώνει επίσης την αντιπυρετική και αντιφλεγμονώδη δράση της. Ενώ αυτές οι παρατηρήσεις προϋπήρχαν των αυστηρών προτύπων της σύγχρονης ιατρικής, η φήμη της ιτιάς διατηρήθηκε ισχυρή, κερδίζοντας τελικά την επιστημονική υποστήριξη. Αν και δεν μπορούσαν να εξηγήσουν πώς λειτουργούσε, οι πρώτοι αυτοί γιατροί αναγνώρισαν τον φλοιό ιτιάς ως ασφαλή και αποτελεσματικό φυτικό σύμμαχο κατά του πόνου.

1763: Ο αιδεσιμότατος Edward Stone σε επιστολή του προς τον κόμη του Macclesfield τεκμηριώνει την επιτυχή χρήση σκόνης φλοιού ιτιάς για τη θεραπεία της ελονοσίας σε 50 ασθενείς. Αυτό σηματοδότησε την εναρκτήρια είσοδο του φλοιού ιτιάς στη σφαίρα της σύγχρονης επιστημονικής ιατρικής.

18ος-19ος αιώνας: Εξελίξεις στις χημικές τεχνικές τροφοδότησαν τον χαρακτηρισμό των ενώσεων εντός του φλοιού της ιτιάς. Το 1826, ο Henri Leroux και ο Johann Buchner απομόνωσαν ανεξάρτητα το δραστικό συστατικό, το οποίο αρχικά ονομάστηκε "σαλικίνη", μια αναφορά στην προέλευσή του από την ιτιά. Οι μετέπειτα προσπάθειες διαφόρων ομάδων βελτίωσαν τη διαδικασία απομόνωσης της σαλικίνης.

1838-1853: Ο Raffaele Piria άνοιξε την πόρτα για περαιτέρω τροποποιήσεις. Ειδικότερα, ο Charles Frederic Gerhardt συνέθεσε το 1853 το ακετυλοσαλικυλικό οξύ, θέτοντας τις βάσεις για τη μελλοντική ανάπτυξη της ασπιρίνης. Αν και ο Gerhardt δεν επιδίωξε τις κλινικές ή εμπορικές εφαρμογές του, η σημασία του παραμένει κομβική.

Μέσα του 19ου αιώνα: Ο MacLagan ενσωμάτωσε καθαρισμένα παράγωγα φλοιού ιτιάς στις πρακτικές τους για τη διαχείριση του πόνου. Ειδικότερα, ανέφερε αποδεδειγμένα θετικά αποτελέσματα στη θεραπεία των ρευματισμών με σαλικίνη.

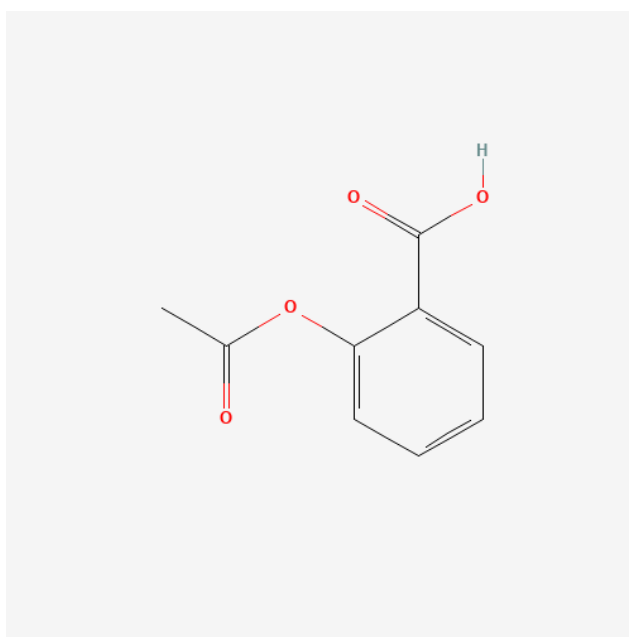
Το 1897, ο Felix Hoffman, χημικός της Bayer, τροποποίησε επιτυχώς το σαλικυλικό οξύ για να δημιουργήσει το ακετυλοσαλικυλικό οξύ, που αργότερα ονομάστηκε "ασπιρίνη". Παραδόξως, ο Heinrich Dreser, εξέχων συνάδελφος της Bayer, αρχικά απέρριψε τις δυνατότητες της αγοράς λόγω των αντιληπτών καρδιακών παρενεργειών. Η απόφαση αυτή, ωστόσο, πιθανότατα προήλθε από την εστίασή του στην προώθηση ενός άλλου νεοσυντιθέμενου φαρμάκου - της ηρωίνης - ως φάρμακο για τον βήχα.

Ευτυχώς, ο Arthur Eichengruen, επιφορτισμένος με την ανάπτυξη προϊόντων, αντιστάθηκε σε αυτή την απόρριψη και υπερασπίστηκε τις δυνατότητες της ασπιρίνης. Υπό την επιμονή του, ο Dreser επανεξέτασε τελικά και επιβεβαίωσε τα θεραπευτικά αποτελέσματα της ασπιρίνης μέσω αυτοπειραμάτων και μελετών σε ζώα. Το κρίσιμο είναι ότι η ασπιρίνη αποδείχθηκε πιο ήπια για το στομάχι σε σύγκριση με το σαλικυλικό οξύ, εδραιώνοντας την απήχρησή της.

Η καινοτομία του Hoffman όχι μόνο έφερε επανάσταση στη διαχείριση του πόνου, αλλά επίσης, κατά τύχη, άνοιξε το δρόμο για τη μετέπειτα ανακάλυψη της ασπιρίνης ως καρδιαγγειακού προληπτικού φαρμάκου. Η διαδικασία ακετυλίωσης που χρησιμοποίησε παίζει κρίσιμο ρόλο σε αυτό το πρόσθετο θεραπευτικό όφελος, εδραιώνοντας περαιτέρω την ιστορική και συνεχιζόμενη σημασία της ασπιρίνης στην ιατρική[36].

1950: Η ασπιρίνη γίνεται το πιο δημοφιλές παυσίπονο στον κόσμο, κερδίζοντας μια θέση στο βιβλίο των ρεκόρ Γκίνες.

1971: Ένας καθηγητής φαρμακολογίας στο Πανεπιστήμιο του Λονδίνου, ο John Vane, έκανε μια σημαντική ανακάλυψη αποκαλύπτοντας το μυστικό όπλο της ασπιρίνης: την ικανότητά της να εμποδίζει τη σύνθεση προσταγλανδινών με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Η ανακάλυψη αυτή, που δημοσιεύθηκε στο Nature New Biology, θα του χάριζε αργότερα το βραβείο Νόμπελ το 1982, το οποίο μοιράστηκε με τους Bengt Samuelsson και Sune Bergström[37].



Εικόνα 17. Η δομή του ακετυλοσαλικυλικού οξέος.

2.3.1. Τρόπος δράσης

Η ασπιρίνη έχει ως βασικό της μηχανισμό την αναστολή του ενζύμου της κυκλοοξυγενάσης (COX), που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή των προσταγλανδινών, των βασικών μεσολαβητών της φλεγμονής. Αυτός ο μοναδικός μηχανισμός μπλοκάρει επίσης μόνιμα τη θρομβοξάνη A₂, εμποδίζοντας τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Ακόμη κατευθύνει τα μόρια του αραχιδονικού οξέος μακριά από την παραγωγή φλεγμονωδών προσταγλανδινών και αντ' αυτού τα ενθαρρύνει να δημιουργήσουν "ενεργοποιούμενες από την ασπιρίνη" ενώσεις όπως οι λιποξίνες, οι ρεσολβίνες και οι μαρεσίνες. Αυτά τα νεοσχηματισμένα μόρια είναι γνωστά για τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές τους, εξηγώντας γιατί η ασπιρίνη μπορεί να έχει ευεργετικά αποτελέσματα πέρα από την απλή ανακούφιση από τον πόνο[38].

2.3.2. Χορήγηση

Η ασπιρίνη μπορεί να χορηγηθεί από το στόμα, από το ορθό και ενδοφλεβίως και είναι διαθέσιμη σε διάφορες δοσολογίες:

Δισκίο: 325 mg, 500 mg

Δισκίο καθυστερημένης αποδέσμευσης: 81 mg, 325 mg, 500 mg, 650 mg

Μασώμενα: 81 mg

Υπόθετο: 60 mg, 120 mg, 200 mg, 300 mg, 600 mg

Ενδοφλέβια: 250 mg, 500 mg[38]

2.3.3. Φαρμακοκινητική

Η απορρόφηση της ασπιρίνης από τον γαστρεντερικό σωλήνα επηρεάζεται σημαντικά από το σκεύασμα της. Τα υγρά σκευάσματα παρουσιάζουν ταχέως ενισχυμένη απορρόφηση σε σύγκριση με τα δισκία λόγω της εύκολα βιοδιαθέσιμης φύσης τους. Εντός του στομάχου, η ασπιρίνη υφίσταται υδρόλυση, μετατρέπόμενη σε σαλικυλικό οξύ, το οποίο διαθέτει στενό θεραπευτικό παράθυρο. Η διατήρηση αυτής της λεπτής ισορροπίας εξασφαλίζει τη βέλτιστη αντιφλεγμονώδη δράση, ελαχιστοποιώντας παράλληλα τις ανεπιθύμητες ενέργειες.

Το pK_a της ασπιρίνης (3.5) υπαγορεύει την κυρίαρχη απορρόφησή της εντός του όξινου περιβάλλοντος του στομάχου. Ωστόσο, όταν φτάνει στο λεπτό έντερο, όπου το pH είναι πιο ουδέτερο, η απορρόφηση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το pH.

Ο οργανισμός αποβάλλει το σαλικυλικό οξύ κυρίως μέσω δύο μεταβολικών οδών, με αποτέλεσμα το σχηματισμό σαλικυλουρικού οξέος και φαινολικού γλυκουρονιδίου του σαλικυλίου. Τελικά, η νεφρική κάθαρση είναι η κεντρική οδός αποβολής και η αποτελεσματικότητά της μπορεί να επηρεαστεί με τον χειρισμό του pH των ούρων. Φάρμακα όπως τα αντιόξινα, με την αλκαλοποίηση των ούρων, ενισχύουν την κάθαρση του σαλικυλικού οξέος. Ωστόσο, είναι ζωτικής σημασίας να αναγνωριστεί το ενδεχόμενο

διαπλακουντιακής μεταφοράς και απέκκρισης από το μητρικό γάλα, που εγκυμονεί κινδύνους για τα αναπτυσσόμενα έμβρυα και τα βρέφη που θηλάζουν[38].

2.3.4. Φαρμακοδυναμική

Σχεδόν το 90% της αναστολής της COX μπορεί να επιτευχθεί με τη χορήγηση 160 έως 325 mg ασπιρίνης. Οι επιδράσεις αυτές διαρκούν περίπου 7 έως 10 ημέρες που συνήθως αντιστοιχεί στη διάρκεια ζωής ενός αιμοπετάλιου. Η αναστολή της προστακυκλίνης μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση υψηλότερων δόσεων. Η αναστολή αυτή λαμβάνει χώρα στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων[38].

2.3.5. Ανεπιθύμητες επιπτώσεις

Είναι ζωτικής σημασίας να αναγνωριστεί ότι η χρήση της ασπιρίνης στο πλαίσιο αυτό παραμένει ένα πολύπλευρο ζήτημα με διάφορους παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη. Ενώ τα πιθανά καρδιαγγειακά οφέλη είναι ενδιαφέροντα, ο αυξημένος κίνδυνος αιμορραγίας καθιστά αναγκαία την προσεκτική αξιολόγηση και την εξατομίκευση των θεραπευτικών προσεγγίσεων. Άλλες πιθανές επιπτώσεις περιλαμβάνουν:

Υπερευαισθησία: Αντιδράσεις που κυμαίνονται από ήπια εξανθήματα έως απειλητική για τη ζωή αναφυλαξία. Για τους ασθματικούς και τα άτομα με χρόνια ρινοκολπίτιδα, ο κίνδυνος φτάνει το 26%. Ο συνδυασμός άσθματος, ρινικών πολυπόδων και ηωσινόφιλης αναπνευστικής φλεγμονής ονομάζεται "τριάδα της ασπιρίνης" ή NERD (NSAID-exacerbated respiratory disease).

Σύνδρομο Reye: Αν και σπάνια, αυτή η δυνητικά θανατηφόρος κατάσταση (θνησιμότητα 30-45%) επηρεάζει κυρίως τα παιδιά. Περιλαμβάνει ηπατική και εγκεφαλική βλάβη που προκαλείται από ιογενή νόσο και ακολουθείται από χρήση ασπιρίνης. Ενώ ο ακριβής μηχανισμός παραμένει υπό συζήτηση, η ευαισθητοποίηση και η αντικατάσταση της ασπιρίνης με ακεταμινοφαίνη για τα παιδιά έχουν μειώσει δραστικά τη συχνότητά του.

Ενδοκρανιακή αιμορραγία: Η χρήση ασπιρίνης ενέχει 1.65 φορές αυξημένο κίνδυνο ενδοκρανιακής αιμορραγίας σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο, τονίζοντας την ανάγκη προσεκτικής εξέτασης σε άτομα με αιμορραγικό κίνδυνο.

Γαστρεντερικές επιπλοκές: Η πιο συχνή παρενέργεια είναι οι γαστρεντερικές διαταραχές, που κυμαίνονται από ήπια γαστρίτιδα έως δυνητικά σοβαρή αιμορραγία[38].

2.4. Μεταλλοφάρμακα

Τα μέταλλα είχαν ιστορικά εξέχοντα ρόλο στην ιατρική, που χρονολογείται από τους αρχαίους πολιτισμούς, ωστόσο ο επίσημος κλάδος της φαρμακευτικής ανόργανης χημείας παραμένει σχετικά νέος στο πεδίο των φυσικών επιστημών. Αυτό το φαινομενικό παράδοξο αναδεικνύει τη συναρπαστική δυαδικότητα αυτού του τομέα, γεφυρώνοντας το χάσμα μεταξύ της καθιερωμένης πρακτικής και της επιστημονικής εξερεύνησης.

Στον πυρήνα της, η φαρμακευτική ανόργανη χημεία εμβαθύνει στις θεραπευτικές και διαγνωστικές εφαρμογές της ανόργανης χημείας, εστιάζοντας κυρίως στην εισαγωγή μεταλλικών ιόντων ή ενώσεων που δεσμεύουν μέταλλα σε βιολογικά συστήματα. Αυτή η σκόπιμη χρήση των μετάλλων, τόσο για διάγνωση όσο και για θεραπεία, έχει αποφέρει σημαντικές προόδους σε διάφορους ιατρικούς τομείς.

Η σύγχρονη ιατρική βασίζεται σε μεγάλο βαθμό σε σκιαγραφικούς παράγοντες με βάση τα μέταλλα σε διαγνωστικές απεικονιστικές μεθόδους όπως η υπολογιστική τομογραφία εκπομπής μονών φωτονίων (SPECT) και η απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού (MRI). Αυτοί οι παράγοντες, που παράγονται εύκολα και χορηγούνται καθημερινά σε αμέτρητα νοσοκομεία, προσφέρουν ανεκτίμητες πληροφορίες για την ανθρώπινη υγεία.

Στις τομογραφίες SPECT, ραδιενεργά ισότοπα μετάλλων που ενσωματώνονται σε σκιαγραφικούς παράγοντες εκπέμπουν ακτίνες γάμμα που ανιχνεύονται από τον τομογράφο. Αυτό επιτρέπει την απεικόνιση διαφόρων διεργασιών μέσα στο σώμα, βοηθώντας στην έγκαιρη ανίχνευση παθολογιών όπως κακοήθεις όγκοι, καρδιακά προβλήματα και αθηροσκλήρωση. Επισημαίνοντας συγκεκριμένες περιοχές ενδιαφέροντος, οι παράγοντες αυτοί προσφέρουν στους γιατρούς κρίσιμες διαγνωστικές πληροφορίες.

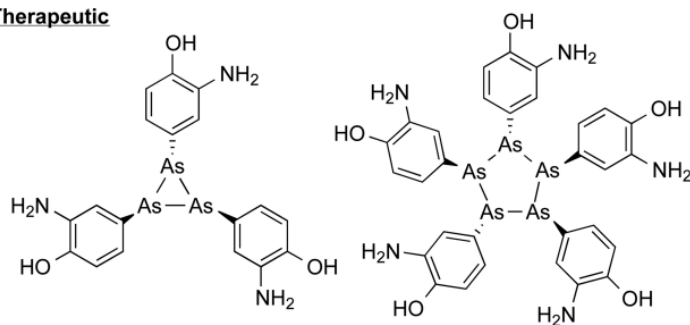
Η μαγνητική τομογραφία, από την άλλη πλευρά, χρησιμοποιεί συγκεκριμένα μεταλλικά ιόντα, κυρίως γαδολίνιο (Gd^{3+}), για να μεταβάλει τις ιδιότητες χαλάρωσης των μορίων νερού εντός των ιστών. Αυτή η μεταβολή στην ένταση του σήματος επιτρέπει λεπτομερείς ανατομικές και λειτουργικές εικόνες, βοηθώντας περαιτέρω στη διάγνωση και τον χαρακτηρισμό ασθενειών.

Πέρα από τις κλινικές εφαρμογές, οι σκιαγραφικοί παράγοντες με βάση τα μέταλλα διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην έρευνα. Οπτικοποιώντας βιολογικές διαδικασίες σε ζωντανούς οργανισμούς, οι παράγοντες αυτοί δίνουν τη δυνατότητα στους ερευνητές να μελετούν την εγκεφαλική δραστηριότητα, να παρακολουθούν τη στόχευση φαρμάκων και να διαφωτίζουν μηχανισμούς ασθενειών. Αυτό τελικά επιταχύνει την ανάπτυξη νέων θεραπειών και προσεγγίσεων εξατομικευμένης ιατρικής.

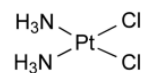
Το Salvarsan, που αναπτύχθηκε από τον Paul Ehrlich, αποτελεί ιστορικό ακρογωνιαίο λίθο της φαρμακευτικής ανόργανης χημείας. Αυτό το αντιμικροβιακό με βάση το αρσενικό, που αποτελεί διάφορες 3-αμινο-4-υδροξυφαινυλο-αρσενικό(III) ενώσεις, σηματοδότησε μια επαναστατική εποχή στην καταπολέμηση των μολυσματικών ασθενειών. Το 1912, η δημοσίευση-ορόσημο του Ehrlich αποκάλυψε την αποτελεσματικότητα του Salvarsan κατά της σύφιλης όπου και παρέμεινε η βασική θεραπεία για τη σύφιλη μέχρι να αντικατασταθεί από την πενικιλίνη στην αρχή του Δευτέρου Παγκοσμίου Πολέμου.

Το πιο γνωστό μεταλλοφάρμακο σήμερα είναι το cisplatin και χρησιμοποιείται στη θεραπεία του καρκίνου[39].

Therapeutic

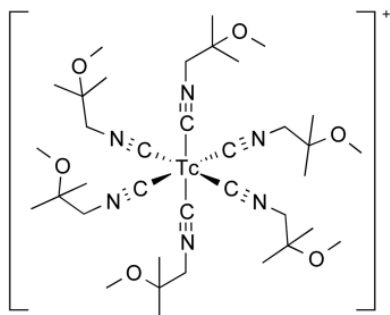


cyclic species as models for **salvarsan**

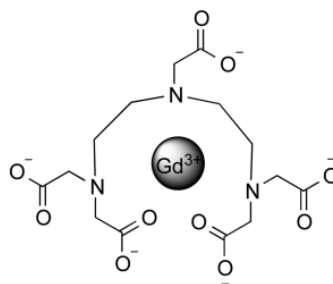


cisplatin

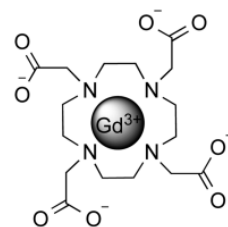
Diagnostic



[^{99m}Tc(sestamibi)]⁺



[Gd(DTPA)]²⁻



[Gd(DOTA)]⁻

Εικόνα 18. Επιλεγμένα παραδείγματα επιτυχημένων θεραπευτικών και διαγνωστικών μεταλλοφαρμάκων.

2.5. Ψευδάργυρος



Εικόνα 19. Κρυσταλλικό θραύσμα ψευδαργύρου

Ο ψευδάργυρος συμβολίζεται με Zn, έχει ατομικό αριθμό 30 και ατομικό βάρος 65.38 και είναι το πρώτο στοιχείο της 12ης ομάδας του περιοδικού πίνακα. Ο ψευδάργυρος είναι ένα ελαφρώς εύθραυστο μέταλλο σε θερμοκρασία δωματίου και έχει γυαλιστερή γκριζωπή όψη όταν αφαιρείται η οξείδωση. Είναι το 24ο πιο άφθονο στοιχείο στο φλοιό της Γης και έχει πέντε σταθερά ισότοπα. Η ανακάλυψη της καθαρής μεταλλικής μορφής του πιστώνεται στον Γερμανό χημικό Andreas Sigismund Marggraf το 1746. Το πιο κοινό μέταλλευμα ψευδαργύρου είναι ο σφαλερίτης (ZnS), ένα θειούχο ορυκτό ψευδαργύρου.

Το δισθενές κατιόν του ψευδαργύρου (Zn^{2+}) συγκαταλέγεται μεταξύ των κρίσιμων ιχνοστοιχείων του ανθρώπινου σώματος, ασκώντας βαθιά επίδραση τόσο στις φυσιολογικές διεργασίες όσο και στις παθολογικές καταστάσεις. Ενώ στις αρχές του 20ού αιώνα υπήρξε συζήτηση σχετικά με τη διατροφική σημασία του Zn^{2+} για τα ανώτερα ζώα, τα οριστικά πειραματικά στοιχεία παρέμεναν ασύλληπτα. Οι Todd et al. (1934) ήταν οι πρώτοι που διαπίστωσαν την αναγκαιότητα του Zn^{2+} για την ανάπτυξη και την υγεία των αρουραίων. Η επανάσταση ήρθε το 1963, όταν οι Prasad et al. συνέδεσαν αποδεδειγμένα την ανεπάρκεια Zn^{2+} με το νανισμό στον άνθρωπο, ανοίγοντας το δρόμο για εκτεταμένη έρευνα στον τομέα αυτό. Έκτοτε, η επιστημονική κοινότητα διασαφηνίζει ενεργά τον πολύπλευρο ρόλο του Zn^{2+} στην ανθρώπινη φυσιολογία, με αποτέλεσμα πληθώρα εξειδικευμένων μελετών.

Ως το δεύτερο πιο άφθονο ιχνοστοιχείο, ο Zn^{2+} συμβάλλει στη δομική ακεραιότητα και την καταλυτική δραστηριότητα περισσότερων από 300 ενζύμων. Το μέσο ανθρώπινο σώμα περιέχει περίπου 2-3 γραμμάρια Zn^{2+} , που αντιστοιχεί σε λιγότερο από 50 mg/kg. Ειδικότερα, το 90% αυτού του βασικού στοιχείου βρίσκεται στο μυϊκό και σκελετικό σύστημα. Ο Zn^{2+} εκτελεί ένα φάσμα ζωτικών λειτουργιών μέσα στο ανθρώπινο σώμα, κυρίως μέσω των επιδράσεών του στη σύνθεση των ενζύμων και των πρωτεϊνών[40]. Η παρουσία του είναι ζωτικής σημασίας για τη σωστή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και για την επούλωση πληγών[41].

2.6. Υδρογέλες ως συστήματα φορέων για τοπική εφαρμογή

Οι υδρογέλες είναι μια κατηγορία υλικών που έχουν προσελκύσει σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων τους και των ευέλικτων εφαρμογών τους σε διάφορους τομείς, ιδίως στη βιοϊατρική μηχανική. Πρόκειται για τρισδιάστατες, διασυνδεδεμένες δομές που αποτελούνται από υδατοδιαλυτά πολυμερή, με το νερό να λειτουργεί ως μέσο διασποράς. Αυτά τα υλικά έχουν την αξιοσημείωτη ικανότητα να διαστέλλονται γρήγορα στο νερό και να συγκρατούν μεγάλους όγκους νερού σε μια διογκωμένη κατάσταση χωρίς να διαλύονται.

Η εγγενής τους υδρόφιλη φύση και η ικανότητά τους να μιμούνται τους φυσικούς ιστούς, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε νερό, της υψηλής πορώδους και της μαλακής σύστασης, τις καθιστούν ιδανικές για βιοϊατρικά. Επιπλέον, οι υδρογέλες μπορούν να λάβουν διάφορες φυσικές μορφές, όπως πλάκες, σωματίδια, νανοσωματίδια, επιστρώσεις και μεμβράνες.

Πολλές υδρογέλες είναι επίσης ευαίσθητες σε ερεθίσματα, πράγμα που σημαίνει ότι μπορούν να ανταποκριθούν σε αλλαγές στο περιβάλλον, όπως η θερμοκρασία, το pH και το ηλεκτρικό πεδίο, τροποποιώντας τις ιδιότητες διόγκωσής τους. Αυτή η "έξυπνη" συμπεριφορά είναι κρίσιμη για προηγμένες εφαρμογές. Η ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν σε μοριακό επίπεδο με βιολογικά συστατικά και οι ρυθμιστικές τους ιξωδοελαστικές ιδιότητες τις καθιστούν ιδιαίτερα ελκυστικές.

Οι υδρογέλες αποτελούν ιδανική επιλογή για εφαρμογές χορήγησης φαρμάκων λόγω των μοναδικών χαρακτηριστικών τους. Συγκεκριμένα, οι υδρογέλες καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης (CMC) έχουν προσελκύσει σημαντική προσοχή για την ανάπτυξη ασφαλών φορέων φαρμάκων, χάρη στη μη-τοξικότητα, την καλή βιοδιασπασιμότητα, τη βιοσυμβατότητα και τη χαμηλή ανοσογονικότητά τους. Η ικανότητά τους να σχηματίζουν διαφανή κολλοειδή διαλύματα στο νερό, όπως στην περίπτωση της CMC, τις καθιστά υποσχόμενα υλικά για κλινικές εφαρμογές ως φορείς φαρμάκων.

Στον τομέα της επούλωσης τραυμάτων, οι υδρογέλες έχουν αναδειχθεί ως καινοτόμα υλικά. Η ικανότητά τους να μιμούνται τη δομή και τη λειτουργία των φυσικών ιστών, σε συνδυασμό με την υψηλή περιεκτικότητά τους σε νερό, την πορώδη δομή και τη μαλακή τους σύσταση, τις καθιστά εξαιρετικά κατάλληλες για εφαρμογές στην ιστομηχανική και την αναγεννητική ιατρική. Για παράδειγμα, υδρογέλες πολυβινυλικής αλκοόλης (PVA) χρησιμοποιούνται ευρέως λόγω της βιοσυμβατότητας, των υδρόφιλων ιδιοτήτων και των βιομηχανικών χαρακτηριστικών τους. Η ευελιξία τους και η σταθερότητά τους σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες τους επιτρέπουν να μιμούνται τους μαλακούς ιστούς και να ελαχιστοποιούν τη φλεγμονή και την ίνωση, ιδιότητες απαραίτητες για εμφυτεύσιμους αισθητήρες. Η χρήση υδρογελών για την επούλωση τραυμάτων υπογραμμίζεται ως μία από τις βιοϊατρικές εφαρμογές των βιοαισθητήρων με βάση τις υδρογέλες.

Επιπλέον, η δυνατότητα προσαρμογής των υδρογελών, όπως οι υδρογέλες καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης (CMC) με τη διασύνδεση μεταλλικών ιόντων, επιτρέπει τη δημιουργία υλικών με βελτιωμένες μηχανικές ιδιότητες και ταχεία απόκριση, ανοίγοντας νέες δυνατότητες για την παρακολούθηση και την επούλωση τραυμάτων στο ανθρώπινο σώμα. Η έρευνα σε αυτόν τον τομέα συνεχίζει να εξελίσσεται, με στόχο την ανάπτυξη ακόμα πιο αποτελεσματικών και ασφαλών υλικών για την υγεία[42, 43].

B. Σκοπός

Η ταχεία εξάπλωση της αντοχής των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά αποτελεί, αναμφισβήτητα, μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις της σύγχρονης ιατρικής επιστήμης. Η συνεχής εμφάνιση και διάδοση πολυανθεκτικών βακτηριακών στελεχών καθιστά επιτακτική την ανάγκη αναζήτησης καινοτόμων θεραπευτικών προσεγγίσεων, καθώς και την ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών παραγόντων. Σε αυτό το πλαίσιο, η ερευνητική κοινότητα εστιάζει στην σύνθεση και αξιολόγηση ενώσεων με ευρύτερο φάσμα δράσης και περιορισμένες παρενέργειες, αλλά και στην ανάπτυξη προηγμένων συστημάτων χορήγησης που ενισχύουν την αποτελεσματικότητα και περιορίζουν την περαιτέρω ανάπτυξη ανθεκτικότητας.

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή στοχεύει στην ανάπτυξη και πλήρη χαρακτηρισμό ενός νέου συμπλόκου ψευδαργύρου με ακετυλοσαλικυλικό οξύ (ZnAsp), το οποίο προσδοκείται να παρουσιάσει ενισχυμένες αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις και φωτοπροστατευτικές ιδιότητες. Η επιλογή του ψευδαργύρου βασίζεται στον καθοριστικό του ρόλο ως ιχνοστοιχείου στη φυσιολογία του ανθρώπου, καθώς και στη γνωστή αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδη δράση του [44, 45]. Το ακετυλοσαλικυλικό οξύ, πέρα από τη συχνή χρήση του ως μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο (ΜΣΑΦ), παρουσιάζει και αντιμικροβιακές ιδιότητες, γεγονός που καθιστά τον συνδυασμό του με ψευδάργυρο εξαιρετικά ενδιαφέρον. Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στην ενσωμάτωση του συντιθέμενου συμπλόκου σε υδρογέλη καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης (CMC), οδηγώντας σε ένα καινοτόμο υλικό με δυνατότητα ελεγχόμενης απελευθέρωσης και τοπικής εφαρμογής, κατάλληλο για την επούλωση τραυμάτων.

Οι επιμέρους στόχοι της μελέτης διαμορφώνονται ως εξής:

- 1. Σύνθεση και Φυσικοχημικός Χαρακτηρισμός:** Η σύνθεση του συμπλόκου ZnAsp και η πλήρης φυσικοχημική του ανάλυση με χρήση σύγχρονων αναλυτικών τεχνικών, όπως περίθλαση ακτίνων Χ (XRD), φασματοσκοπία υπερύθρου (ATR-FTIR), φασματοσκοπία XRF, φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (^1H -NMR), προσδιορισμός διαλυτότητας και σημείου τήξης.
- 2. Φωτοχημική Μελέτη:** Η αξιολόγηση των φωτοπροστατευτικών ιδιοτήτων του συμπλόκου και της υδρογέλης μέσω προσδιορισμού του Δείκτη Υπεριώδους Προστασίας (UPF) και μελέτης της φωτοσταθερότητας υπό UVB ακτινοβολία.
- 3. Αντιμικροβιακή Αξιολόγηση:** Η εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης του ZnAsp και της υδρογέλης έναντι παθογόνων βακτηρίων (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* και *Staphylococcus aureus*) με τη χρήση προσδιορισμού ζώνης αναστολής (IZ), ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) και ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (MBC).
- 4. Μελέτη Τοξικότητας:** Ο προσδιορισμός του τοξικολογικού προφίλ του συμπλόκου και της υδρογέλης τόσο *in vivo* (μέθοδος *Artemia salina*) όσο και *in vitro* (ανθρώπινα κερατινοκύτταρα HaCaT).
- 5. Διερεύνηση Αντιφλεγμονώδους και Επούλωτικής Δράσης:** Η αξιολόγηση της αντιφλεγμονώδους δράσης μέσω της δοκιμασίας μετουσίωσης αλβουμίνης και η μελέτη της επουλωτικής ικανότητας μέσω scratch wound assay σε κερατινοκύτταρα.

Συνολικά, η μελέτη αυτή επιχειρεί να αναδείξει τις δυνατότητες του νέου υλικού για χρήση στην επούλωση τραυμάτων, παρέχοντας πολύπλευρη αξιολόγηση των φυσικοχημικών, φωτοχημικών, αντιμικροβιακών και βιολογικών του ιδιοτήτων.

Γ. Πειραματικό Μέρος

Κεφάλαιο 3

3.1. Χημικό πειραματικό μέρος

3.1.1. Χημικά αντιδραστήρια και διαλύτες

Οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι κατάλληλα για χρήση χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Το αντιδραστήριο Acetylsalicylic acid και Zinc nitrate hexahydrate αγοράστηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich. Τα αντιδραστήρια potassium hydroxide (KOH), dimethyl sulfoxide (DMSO) αγοράστηκαν από τη Riedel-de Haën.

3.1.2. Όργανα και σκεύη

Για τη σύνθεση και τον χαρακτηρισμό χρησιμοποιούνται τα εξής σκεύη: ποτήρια ζέσεως 25, 50 ml, σφαιρική φιάλη 50 ml, ευρύλαιμη κωνική φιάλη 50 ml, δοκιμαστικοί σωλήνες 15ml, τριχοειδή σωληνάκια. Η μέτρηση του σημείου τήξεως πραγματοποιείται μέσω της συσκευής STUART SCIENTIFIC SMP30, ενώ ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους με το οσμόμετρο σημείου πήξης Osmomat 3000 basic. Στην φασματοσκοπία υπερύθρου (4000-400 cm^{-1}), η καταγραφή των φασμάτων γίνεται από το φασματοφωτόμετρο ATR-FT-IR (Cary 630 FTIR) της εταιρείας Agilent Technologies. Τα φάσματα απορρόφησης UV/Vis λαμβάνονται από το φασματοφωτόμετρο UV/Vis σειράς PC UV-1600 της εταιρείας VWR και τα φάσματα των ^1H -NMR, από το όργανο Bruker AC 400 MHz FT-NMR. Επιπλέον όργανα που χρειάζονται κατά τη διάρκεια των πειραμάτων : θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας, αναλυτικός ζυγός της εταιρείας Scatec, πιπέτες ακριβείας (1000, 100 και 10 μL), Vortex από την Sanichem.

3.1.3. Σύνθεση

Για την παρασκευή του συμπλόκου ψευδαργύρου-ακετυλοσαλικυλικού οξέος (ZnAsp), αρχικά ζυγίζονται 0.15 g $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.5 mmol) και σχηματίζεται διάλυμα με δις-απεσταγμένο νερό όπου προστίθεται 1 mL KOH 1N. Αναδεύονται για 30 λεπτά και στη συνέχεια προστίθενται 0.18 g Acetylsalicylic acid (1 mmol). Το τελικό διάλυμα αναδεύεται για 40 λεπτά και φυγοκεντρείται για άλλα 20 λεπτά στα 5000 rpm.

Το προϊόν της αντίδρασης απομονώθηκε με φυγοκέντριση και το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε σε ποτήρι ζέσεως για να προκληθεί κρυστάλλωση. Μετά από μια περίοδο 24-48 ωρών, οι σχηματισμένοι κρύσταλλοι συλλέχθηκαν με φίλτρο, ξηράθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και αποθηκεύτηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες Eppendorf.

3.1.4. Σύνθεση υδρογέλης CMC@ZnAsp (Carboxymethyl cellulose)

Μετά τη σύνθεση και το χαρακτηρισμό της ουσίας, έγινε διασπορά της σε υδρογέλη με τη βοήθεια του πολυμερούς καρβοξυμεθυλσελουλόζης (CMC)[46].

Η υδρογέλη CMC@ZnAsp παρασκευάστηκε ενσωματώνοντας 2mL ZnAsp 10^{-2} M σε 0.02 g CMC. Το διάλυμα υποβλήθηκε σε ανάδευση μέχρις ότου η υδρογέλη να γίνει διαυγής και φυλάσσεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.



Εικόνα 20. Υδρογέλη CMC@ZnAsp.

3.1.5. Διαλυτότητα

Για την μελέτη της διαλυτότητας του συμπλόκου ZnAsp, κατανέμεται ισόποσα ορισμένη ποσότητα ουσίας σε 9 δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν την ίδια ποσότητα διαλύτη. Ακολουθεί έντονη ανάδευση και ήπια θέρμανση. Κατάλληλος θεωρείται ο διαλύτης που μπορεί να διαλύσει πλήρως την προς μελέτη ουσία, με αποτέλεσμα ένα διαυγές διάλυμα. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι οι εξής: μεθανόλη (MeOH), εξάνιο (n-hexane), τολουόλιο (toluene), διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2), χλωροφόρμιο (CHCl_3), ακετόνη (acetone), ακετονιτρίλιο (MeCN), διμέθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO), διμέθυλο-φορμαμίδιο (DMF), δις απεσταγμένο νερό (ddH_2O).

3.1.6. Σημείο τήξης

Για τη μέτρηση του σημείου τήξεως χρησιμοποιούνται ανοιχτά τριχοειδή σωληνάκια BRIS micro haematocrit tubes (Soda Lime Glass, Vitrex Medical A/S), τα οποία τροποποιούνται με χρήση φλόγας, για το κλείσιμο της μίας πλευράς ώστε να συγκρατηθεί το δείγμα. Τα τριχοειδή τοποθετούνται στη συσκευή STUART SCIENTIFIC SMP30, όπου παρατηρείται η τήξη των δειγμάτων με ταυτόχρονη καταγραφή αύξησης της θερμοκρασίας, προκειμένου να προσδιοριστεί η θερμοκρασία τήξης (T_m).

3.1.7. Κρυοσκοπία

Ο προσδιορισμός της σχετικής μοριακής μάζας, με τη μέθοδο της κρυοσκοπίας βασίζεται στην πειραματική μέτρηση της ταπείνωσης του σημείου πήξης (ΔT_f) του διαλύματος, με την εφαρμογή του νόμου:

$$\Delta T_f = K_f \times m = K_f \frac{m_{\text{ουσίας}} \times 1000}{M_{\text{r ουσίας}} \times m_{\text{διαλύτη}}}$$

όπου K_f : σταθερά ταπείνωσης σημείου πήξης, m : κατά βάρος μοριακότητα του διαλύματος.

Το όργανο της κρυοσκοπίας προσδιορίζει τη συνολική οσμωτικότητα ενός υδατικού διαλύματος. Ως οσμωτικότητα ορίζεται η ποσότητα ουσίας ή ο αριθμός των οσμωτικά ενεργών σωματιδίων ανά κιλό διαλύτη (νερό). Μετριέται σε Osmol/kg ή mOsmol/Kg και είναι ανάλογη της πίεσης του σημείου πήξης, όπως φαίνεται από τον παρακάτω τύπο:

$$C_{\text{osm}} = \frac{\Delta T_f}{K_f}$$

όπου C_{osm} η οσμωτικότητα.

Από το μαθηματικό συνδυασμό των δύο σχέσεων, προσδιορίζεται η σχετική μοριακή μάζα[47].

Πειραματικά, λαμβάνεται 1 μL από διάλυμα 2.15 mg ZnAsp σε 215 μL DMSO και αραιώνεται σε 49 μL ddH₂O. Το διάλυμα που προκύπτει μεταφέρεται σε Eppendorf και έπειτα τοποθετείται στο όργανο, Osmomat 3000 basic της Gonotec[48].

3.1.8. Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier με την τεχνική της Αποσβένουσας Ολικής Ανάκλασης (ATR-FTIR)

Η φασματοσκοπία υπερύθρου, βασισμένη στην αλληλεπίδραση της υπερύθρης ακτινοβολίας με την ύλη, αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για τη χαρακτηριστική ανάλυση των μορίων. Αν και η μέση υπερύθρη περιοχή (MIR), που συνήθως εκφράζεται σε κυματαριθμούς (cm^{-1}), είναι η πιο διαδεδομένη, το φάσμα της υπερύθρης ακτινοβολίας εκτείνεται από το άπω υπερύθρο (FIR) ($400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$) έως το εγγύς υπερύθρο (NIR) ($14000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$), παρέχοντας πληροφορίες για ένα ευρύ φάσμα μοριακών δονήσεων. Το FIR είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για τη μελέτη δονήσεων χαμηλής ενέργειας και μοριακών περιστροφών, ενώ το NIR παρέχει πληροφορίες για υπερτονικές και αρμονικές δονήσεις. Εναλλακτικά, τα φάσματα μπορούν να βαθμονομηθούν σε μήκη κύματος (μm), όπου το MIR κυμαίνεται μεταξύ 2.5 και $25\text{ }\mu\text{m}$, το FIR μεταξύ 25 και $300\text{ }\mu\text{m}$, και το NIR μεταξύ 0.8 και $2.5\text{ }\mu\text{m}$ [49]. Οι κυματαριθμοί είναι αντιστρόφως ανάλογοι των μηκών κύματος και συνδέονται με την παρακάτω σχέση:

$$\text{κυματαριθμός } \tilde{\nu} (\text{cm}^{-1}) = \frac{1 \times 10^4}{\text{μήκος κύματος σε } \mu\text{m}}$$

Η φασματοσκοπία υπερύθρου παρέχει ένα μοναδικό παράθυρο στον μοριακό κόσμο, αποκαλύπτοντας τις χαρακτηριστικές δονήσεις των μορίων. Οι ταινίες που παρατηρούνται σε ένα φάσμα IR οφείλονται στις μεταβολές της διπολικής ροπής του μορίου κατά τη διάρκεια των μοριακών δονήσεων, όπως η κάμψη ή η τάση των δεσμών. Η ενέργεια που απορροφάται από το μόριο προκαλεί την διέγερση αυτών των δονήσεων, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για κάθε συγκεκριμένο τύπο δεσμού. Κατ' αυτόν τον τρόπο, η ανάλυση ενός φάσματος IR επιτρέπει την ταυτοποίηση των λειτουργικών ομάδων που αποτελούν το μόριο και την απόκτηση πληροφοριών σχετικά με τη μοριακή του δομή.

Αν και η φασματοσκοπία υπερύθρου παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για την ταυτοποίηση των λειτουργικών ομάδων ενός μορίου, η ακριβής ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης μιας ουσίας μέσω της ανάλυσης των φασμάτων IR είναι ιδιαίτερα δύσκολη. Αυτό οφείλεται στην πολυπλοκότητα των φασμάτων και στην απουσία ενός γενικού συντελεστή μοριακής απορρόφησης. Κατά συνέπεια, η ένταση των ταινιών απορρόφησης εκτιμάται ποιοτικά, περιγράφοντας τις ως ισχυρές (s), μέτριες (m) ή ασθενείς (w). Επιπλέον, το σχήμα των ταινιών μπορεί να ποικίλλει, μερικές φορές εμφανίζονται ως ευρείες ή πλατιές, ενώ άλλες ως στενές, παρέχοντας επιπλέον πληροφορίες για τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις και την περιβάλλουσα χημική διαμόρφωση.

Η φασματοσκοπία υπερύθρου αποτελεί ένα βασικό εργαλείο για την χαρακτηριστική ανάλυση των ενώσεων. Υπάρχουν δύο κύριες τεχνολογίες για την απόκτηση φασμάτων υπερύθρου: τα συμβατικά φασματοφωτόμετρα διασποράς και τα φασματοφωτόμετρα μετασχηματισμού Fourier (FTIR). Τα τελευταία έχουν καταστεί η προτιμώμενη επιλογή λόγω της υψηλής ευαισθησίας και ταχύτητάς τους.

Η λειτουργία των φασματοφωτόμετρων FTIR βασίζεται στον μετασχηματισμό Fourier, μια μαθηματική διαδικασία που επιτρέπει την αποδοτικότερη συλλογή και επεξεργασία των φασματικών δεδομένων. Η τεχνική της Αποσβένουσας Ολικής Ανάκλασης (ATR) είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη στα φασματοφωτόμετρα FTIR. Σε αυτή την τεχνική, το δείγμα έρχεται σε επαφή με έναν κρύσταλλο υψηλού δείκτη διάθλασης, μέσα στον οποίο διεισδύσει ένα μέρος της υπερύθρης ακτινοβολίας. Καθώς η ακτινοβολία διέρχεται από το δείγμα, απορροφάται σε συγκεκριμένες συχνότητες που χαρακτηρίζουν τις μοριακές δονήσεις. Η

ποσότητα της απορροφούμενης ακτινοβολίας εξαρτάται από τη συγκέντρωση της ουσίας στο δείγμα και το βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας, το οποίο με τη σειρά του επηρεάζεται από το μήκος κύματος και τη διαφορά των δεικτών διάθλασης του κρυστάλλου και του δείγματος[50].

Τα φασματοφωτόμετρα FTIR προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα συμβατικά, όπως:

- **Υψηλή ευαισθησία:** Η δυνατότητα ανίχνευσης μικρών ποσοτήτων δείγματος.
- **Ταχύτητα:** Γρήγορη απόκτηση φασμάτων, ιδιαίτερα χρήσιμη σε εφαρμογές σε πραγματικό χρόνο.
- **Πολυπλοκότητα δειγμάτων:** Δυνατότητα ανάλυσης στερεών, υγρών και αερίων δειγμάτων.
- **Ποσοτική ανάλυση:** Αν και η ποσοτική ανάλυση με IR είναι πιο περίπλοκη από άλλες τεχνικές, τα φασματοφωτόμετρα FTIR μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ποσοτικούς προσδιορισμούς υπό συγκεκριμένες συνθήκες[51].

Για τη λήψη φασμάτων υπέρυθρου χρησιμοποιείται το φασματοφωτόμετρο Cary 670 FTIR (Agilent Technologies), στον κρύσταλλο του οποίου τοποθετείται μικρή ποσότητα δείγματος. Τα φάσματα που λαμβάνονται είναι του συμπλόκου ZnAsp στους $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$, με την εφαρμογή του προγράμματος Microlab Expert.

3.1.9. Φασματοσκοπία ακτίνων X φθορισμού (XRF)

Η φασματοσκοπία ακτίνων X φθορισμού (XRF) αποτελεί ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για την ποσοτική και ποιοτική στοιχειακή ανάλυση δειγμάτων, τόσο σε στερεή όσο και σε υγρή φάση, καθώς και σε διαλύματά τους. Σε σύγκριση με άλλες τεχνικές παρόμοιας αναλυτικής ικανότητας, η XRF προτιμάται λόγω μιας σειράς σημαντικών πλεονεκτημάτων.

Μεταξύ αυτών, ξεχωρίζουν η ταχύτητα εκτέλεσης, η μη καταστροφική φύση της μεθόδου, καθώς και η ευρεία ανιχνευσιμότητα στοιχείων, με εξαίρεση εκείνα που βρίσκονται εκτός του φάσματος διερεύνησης της τεχνικής. Επιπλέον, η XRF επιτρέπει την ανάλυση δειγμάτων σε πολύ ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων, από καθαρές ουσίες (100%) έως και ίχνη επιπέδου ppm.

Ένα ακόμη σημαντικό πλεονέκτημα είναι η απλότητα στην προετοιμασία των δειγμάτων, ενώ η ανάλυση των φασμάτων είναι συνήθως άμεση και εύκολη. Η αρχή λειτουργίας της βασίζεται στη διέγερση των ατόμων του δείγματος μέσω ακτινοβολίας X κατάλληλου μήκους κύματος, η οποία προκαλεί την εκπομπή χαρακτηριστικής δευτερογενούς ακτινοβολίας κατά την επαναφορά των διεγερμένων ηλεκτρονίων στη θεμελιώδη κατάσταση.

Το καταγεγραμμένο φάσμα XRF περιλαμβάνει χαρακτηριστικές ενεργειακές κορυφές, η θέση των οποίων επιτρέπει την ποιοτική ταυτοποίηση των στοιχείων που περιέχονται στο δείγμα. Παράλληλα, η ένταση των κορυφών σχετίζεται με τη συγκέντρωση των στοιχείων, επιτρέποντας είτε ημιποσοτική είτε ποσοτική ανάλυση, ανάλογα με τις απαιτήσεις της μελέτης[52].

Για τη φασματοσκοπική ανάλυση της ένωσης ZnAsp μέσω XRF, πραγματοποιήθηκε η παρασκευή στερεών δισκίων με χρήση βορικού οξέος ως υποστηρικτική μήτρα. Το βορικό οξύ επιλέχθηκε ως αδρανές υλικό πλήρωσης λόγω της χαμηλής απορρόφησης στις ακτίνες X και της εξαιρετικής του συμπεριφοράς κατά τη συμπίεση, προσφέροντας ομοιογενή κατανομή του αναλυόμενου δείγματος και αυξημένη μηχανική σταθερότητα του δισκίου.

Συγκεκριμένα, προσεκτικά ζυγισμένη ποσότητα του συμπλόκου αναμίχθηκε με πλεονάζουσα ποσότητα βορικού οξέος και κονιορτοποιήθηκε σε γουδί έως την πλήρη ομογενοποίηση του στερεού μίγματος. Το τελικό μίγμα υποβλήθηκε σε μηχανική συμπίεση μέσω υδραυλικής πρέσας τύπου Scatec, υπό ελεγχόμενες συνθήκες πίεσης, με σκοπό τη διαμόρφωση σταθερών δισκίων κατάλληλων για φασματοσκοπική καταγραφή.

Για τη φασματοσκοπική ανάλυση της υδρογέλης, υποθέτοντας ότι η ξηρή υδρογέλη περιέχει μόνο τα προστιθέμενα συστατικά χωρίς υπολείμματα νερού, ενσωματώσαμε 0,00732 g ZnAsp σε 0,02 g CMC.

Τα φάσματα XRF λήφθηκαν από τον αναλυτή Rigaku NEX QC EDXRF.

3.1.10. Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis)

Η φασματοσκοπία UV-Vis είναι μια αναλυτική τεχνική που βασίζεται στην αλληλεπίδραση της υπεριώδους και της ορατής ακτινοβολίας με την ύλη. Όταν ένα μόριο απορροφά ένα φωτόνιο υπεριώδους ή ορατής ακτινοβολίας, ένα ηλεκτρόνιο από ένα κατειλημμένο μοριακό τροχιακό διεγείρεται σε ένα κενό μοριακό τροχιακό υψηλότερης ενέργειας. Η ενέργεια του απορροφούμενου φωτονίου πρέπει να αντιστοιχεί ακριβώς στη διαφορά ενέργειας μεταξύ των δύο μοριακών τροχιακών.

Η απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της ουσίας που περιέχεται στο διάλυμα και περιγράφεται από το νόμο Lambert-Beer:

$$A = -\log T = \log I_0 / I = \varepsilon \times l \times c$$

όπου A: απορρόφηση, T: διαπερατότητα, I_0 : ισχύς προσπίπτουσας ακτινοβολίας, I: ισχύς εξερχόμενης ακτινοβολίας, ε : συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας, c: συγκέντρωση, l: μήκος διαδρομής (πάχος κυψελίδας)[53].

Πριν από κάθε μέτρηση σε ένα φασματοφωτόμετρο UV-Vis, είναι απαραίτητος ο μηδενισμός του οργάνου. Αυτή η διαδικασία ορίζει ως μηδενική τιμή την απορρόφηση του διαλύτη ή μιας κενής κυψελίδας, εξασφαλίζοντας ότι οι μετρήσεις που θα ακολουθήσουν αντιστοιχούν αποκλειστικά στην απορρόφηση της ουσίας που μας ενδιαφέρει. Αυτό είναι απαραίτητο επειδή ένα ποσοστό της προσπίπτουσας ακτινοβολίας χάνεται πάντα λόγω φαινομένων όπως η απορρόφηση, η σκέδαση και η ανάκλαση από τα οπτικά στοιχεία του οργάνου και το διάλυμα. Ένα τυπικό φασματοφωτόμετρο UV-Vis αποτελείται από μια σταθερή πηγή ακτινοβολίας, μια κυψελίδα για το δείγμα, έναν μονοχρωμάτορα για την επιλογή του επιθυμητού μήκους κύματος, έναν ανιχνευτή που μετατρέπει το φως σε ηλεκτρικό σήμα και έναν καταγραφέα που εμφανίζει το φάσμα απορρόφησης.

Ως πηγή ακτινοβολίας στην περιοχή υπεριώδους (160-340 nm) χρησιμοποιείται λυχνία εκκενώσεως δευτερίου, ενώ στην ορατή περιοχή (340-800 nm) λυχνία πυρακτώσεως βολφραμίου. Ο μονοχρωμάτορας ως διάταξη «φιλτράρει» την ακτινοβολία της πηγής επιτρέποντας τη διέλευση μόνο της επιθυμητής μονοχρωματικής ακτινοβολίας συγκεκριμένου μήκους κύματος. Ο θάλαμος κυψελίδας ανάλογα με τον αριθμό θέσεων που έχει, διακρίνεται σε μονής και διπλής δέσμης. Τα φασματοφωτόμετρα διπλής δέσμης δίνουν την δυνατότητα ταυτόχρονης τοποθέτησης δείγματος και τυφλού, απεικονίζοντας τη διαφορά απορρόφησης μεταξύ των δύο. Το μήκος κύματος στο οποίο εμφανίζεται μέγιστη απορρόφηση ονομάζεται μέγιστο μήκος κύματος $\lambda_{\max}$. Το $\lambda_{\max}$ είναι χαρακτηριστικό για κάθε ένωση και χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό της προσδιορισμό. Με την φασματοσκοπία UV/Vis μελετάται και η σταθερότητα των ενώσεων[54, 55].

Για τη λήψη φασμάτων UV-Vis, παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα ZnAsp (5×10^{-4} M), CMC@ZnAsp (5×10^{-4} M), Asp (5×10^{-4} M) και SalH₂ (2.5×10^{-4} M).

Τα φάσματα λαμβάνονται από το φασματοφωτόμετρο UV/Vis σειράς PC UV 1600 της VWR και του προγράμματος M. Wave professional.

3.1.11. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (^1H -NMR)

Οι πυρήνες των στοιχείων αποτελούνται από πρωτόνια και νετρόνια τα οποία εμφανίζουν ιδιοπεριστροφή ή spin όπως τα ηλεκτρόνια. Πυρήνες με περιττό αριθμό πρωτονίων και νετρονίων δηλαδή πυρήνες που οι ιδιοπεριστροφές πρωτονίων και νετρονίων δεν είναι συζευγμένες, έχουν ολικό spin διάφορο του μηδενός. Δημιουργείται έτσι, ένα μαγνητικό δίπολο η λεγόμενη πυρηνική μαγνητική ροπή. Εάν το μαγνητικό δίπολο βρεθεί σε ένα μεγαλύτερο εξωτερικό μαγνητικό πεδίο B_0 , θα περιστραφεί και θα ευθυγραμμιστεί με το B_0 .

Υπάρχουν $2I+1$ τρόποι προσανατολισμού της μαγνητικής ροπής, όπου I το spin του πυρήνα. Ο ομόρροπος προτιμάται ενεργειακά καθώς οδηγεί σε χαμηλότερη ενέργεια. Αφού προσανατολιστεί, στη συνέχεια εάν ακτινοβοληθεί ο πυρήνας, μπορεί να απορροφήσει ενέργεια ίση με τη διαφορά ΔE και να μεταπέσει στην αντιπαράλληλη κατεύθυνση. Τότε ο πυρήνας βρίσκεται σε συντονισμό, δηλαδή υφίσταται το σωστό συνδυασμό B_0 και ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας για μεταβολή του spin. Η συχνότητα της ακτινοβολίας που προκαλεί τη μετάπτωση λέγεται συχνότητα συντονισμού και περιγράφεται από τη σχέση:

$$\nu_0 = \gamma B_0 / 2\pi$$

όπου γ ο γυρομαγνητικός λόγος, χαρακτηριστικό κάθε πυρήνα.

Για τη λήψη σήματος εφαρμόζεται ραδιοπαλμός 90° στον άξονα z με αποτέλεσμα η μαγνήτιση M_0 να αποκλίνει και σιγά σιγά να πέφτει στο επίπεδο xy , όπου τοποθετείται το πηνίο. Ο όρος μαγνήτιση αναφέρεται στον ολικό προσανατολισμό spin και είναι άνυσμα M_0 στον άξονα z . Τη στιγμή που η μαγνήτιση M_0 προβάλλεται στο επίπεδο xy λαμβάνεται το μέγιστο σήμα. Μετά τον παλμό, όταν σταματήσει η ακτινοβολήση, η M_0 φθίνει χρονικά. Το σήμα που ανιχνεύεται, δηλαδή η αποσβένουσα M_0 του πυρήνα συναρτήσει του χρόνου καλείται ελεύθερη επαγωγική απόσβεση (Free Induction Decay, FID). Στη συνέχεια το φάσμα συναρτήσει του χρόνου $f(t)$ υπόκειται σε μετασχηματισμό κατά Fourier και μετατρέπεται σε φάσμα συναρτήσει συχνότητας $f(\nu)$ [56].

Για την ταυτοποίηση των δειγμάτων και τη μελέτη σταθερότητας, λαμβάνονται φάσματα ^1H -NMR για το σύμπλοκο ZnAsp και την υδρογέλη CMC@ZnAsp σε D_2O .

Αρχικά ζυγίζονται 10 mg δείγματος και διαλύονται σε 400 μL D_2O . Τα διαλύματα μεταφέρονται σε λεπτούς σωλήνες από ειδικό γυαλί οι οποίοι σφραγίζονται με καπάκια και πάραφιλμ. Τέλος τοποθετούνται στο ομογενές μαγνητικό πεδίο του οργάνου.

Το όργανο που χρησιμοποιείται για τις μετρήσεις είναι το Bruker AC 400 MHz FT-NMR και το πρόγραμμα για τη λήψη των φασμάτων το Topspin 2.1.

3.1.12. Περίθλαση ακτίνων X (XRD)

Η περίθλαση ακτίνων X (XRD) αποτελεί την πρωταρχική τεχνική για τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης κρυσταλλικής δομής του ZnAsp σε ατομικό επίπεδο. Όταν μια δέσμη μονοχρωματικών ακτίνων X προσπίπτει σε έναν κρύσταλλο, οι ακτίνες διαθλώνται από τα τακτικά διατεταγμένα άτομα του κρυσταλλικού πλέγματος, παράγοντας ένα χαρακτηριστικό μοτίβο περίθλασης. Η ανάλυση των γωνιών και των εντάσεων των περίθλασης κορυφών επιτρέπει την ακριβή προσδιορισμό των παραμέτρων της κρυσταλλικής δομής, όπως το μέγεθος και το σχήμα της μονάδας κυψέλης, καθώς και τη θέση των ατόμων εντός αυτής [57, 58]. Από αυτές τις πληροφορίες, μπορούμε να κατασκευάσουμε ένα τρισδιάστατο μοντέλο της κρυσταλλικής δομής του ZnAsp, αποκαλύπτοντας λεπτομέρειες όπως τα μήκη των δεσμών, οι γωνίες δεσμών και η συνδετικότητα των ατόμων.

3.2. Φωτοχημικά πειράματα

3.2.1. Συντελεστής Προστασίας από την Υπεριώδη Ακτινοβολία (UPF) του ZnAsp και του CMC@ZnAsp

Οι αντι-UV ιδιότητες των ZnAsp και CMC@ZnAsp αξιολογήθηκαν σύμφωνα με τυποποιημένες τεχνικές ευθυγραμμισμένες με τις αρχές του ISO 23675. Παρασκευάστηκαν διαλύματα ZnAsp (5×10^{-4} M) και CMC@ZnAsp (5×10^{-4} M ως προς το ZnAsp), και η απορρόφησή τους μετρήθηκε σε όλο το φάσμα UV των 290-400 nm (ακτινοβολία UVA και UVB) χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο UV-Vis. Οι τιμές απορρόφησης μετατράπηκαν σε % διαπερατότητα (T%), και δημιουργήθηκε ένα φάσμα διαπερατότητας (T% έναντι μήκους κύματος).

Για την ποσοτικοποίηση του προστατευτικού αποτελέσματος, υπολογίστηκε το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη διαπερατότητας (T%) ως προς το μήκος κύματος. Ο Δείκτης Υπεριώδους Προστασίας (UPF) προσδιορίστηκε με τον υπολογισμό του λόγου των ολοκληρωμάτων της διαπερατότητας επί του μήκους κύματος, στην περιοχή 290–400 nm, χωρίς και με την παρουσία του διαλύματος ZnAsp:

$$UPF = \frac{\int_{290}^{400} T_{ref}(\%) \cdot d\lambda}{\int_{290}^{400} T_{ZnAsp}(\%) \cdot d\lambda}$$

όπου T_{ref} είναι η διαπερατότητα χωρίς την παρουσία ZnAsp ή CMC@ZnAsp, και T_{ZnAsp} ή $T_{CMC@ZnAsp}$ είναι η διαπερατότητα του διαλύματος ZnAsp ή CMC@ZnAsp, αντίστοιχα. Αυτή η τιμή στη συνέχεια ομαλοποιήθηκε σε μια τυπική πυκνότητα εφαρμογής 2 mg/cm^2 , όπως απαιτείται για συνεπή σύγκριση με τυποποιημένες προστατευτικές συνθέσεις.

3.2.2. Συνεχής φωτόλυση

Η φωτοσταθερότητα υπό έκθεση στον ήλιο ή υπεριώδη (UVB) ακτινοβολία είναι απαραίτητη για τη διασφάλιση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας των εμπορικών αντηλιακών[59]. Ενώ η μέση ημερήσια εξωτερική έκθεση είναι τυπικά 1-2 ώρες, αυτή μπορεί να αυξηθεί σημαντικά σε 5-6 ώρες κατά τη διάρκεια των διακοπών[60]. Υπό το πρίσμα αυτού, αξιολογήσαμε τη φωτοσταθερότητα τόσο του CMC@ZnAsp όσο και του ZnAsp υπό ακτινοβολία UVB ($\lambda_{\max} = 280 \text{ nm}$) σε διάλυμα D₂O για μια συνεχή περίοδο 6 ωρών. Η αντίδραση παρακολουθήθηκε χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία ¹H-NMR.

3.3. Βιολογικό πειραματικό μέρος

Για τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης του ZnAsp πραγματοποιούνται πειράματα για την εύρεση των ζωνών αναστολής (Inhibition Zone IZ), της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) και της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration, MIC).

Για τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης της υδρογέλης CMC@ZnAsp πραγματοποιούνται πειράματα για την εύρεση των ζωνών αναστολής (Inhibition Zone IZ) και της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration, MIC).

Η *in vivo* τοξικότητα αξιολογήθηκε σε κύτταρα HaCaT χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία σουλφοροδαμίνης B (SRB) καθώς και με τη μέθοδο γαρίδας άλμης (*Artemia salina* assay).

Ακόμη μελετήθηκε η αντιφλεγμονώδης δράση με δοκιμασία μετουσίωσης αλβουμίνης και τέλος, μελετήθηκε η μετανάστευση κερατινοκυττάρων στο περιθώριο πληγής με την *in vitro* δοκιμασία γρατζουνιάς (Scratch Wound Assay).

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιούνται δύο αρνητικά κατά Gram βακτήρια *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* καθώς και δύο θετικά κατά Gram βακτήρια *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*.

Η διατήρηση των βακτηρίων γίνεται στους -80°C ενώ η ανάπτυξή τους στους 37°C. Η παρασκευή θρεπτικών υλικών πραγματοποιείται σύμφωνα με την American Type Culture Collection (ATCC) και διαφέρει για κάθε βακτήριο.

Συγκεκριμένα για τους *S. aureus* και *S. epidermidis* ζυγίζονται K₂HPO₄ (0.25% , 2.5 g/L), NaCl (0.5% 5 g/L), dextrose (0.25%, 2.5g/l), soytone (0.3%, 3 g/L), tryptone (1.7%, 17 g/L), για την *P. aeruginosa* ζυγίζονται NaCl (1%, 10 g/L), yeast extract (0.5% , 5 g/L), tryptone (1%, 10 g/L), και για την *E.coli* soytone (1% 10 g/L), yeast extract (0.5%, 5 g/L) και NaCl (1%, 10 g/L). Στην περίπτωση των υγρών θρεπτικών υλικών προστίθεται ddH₂O ενώ στα στερεά θρεπτικά υλικά μέσα προστίθεται επιπλέον άγαρ (1.5%, 15 g/L).

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα είναι κύτταρα HaCaT, τα οποία αποτελούν μια αθάνατη ανθρώπινη κυτταρική σειρά κερατινοκυττάρων της επιδερμίδας, η οποία προέρχεται από φυσιολογικά κύτταρα ενηλίκου και έχει ευρέως καθιερωθεί ως μοντέλο μελέτης της ανθρώπινης επιδερμίδας *in vitro*. Παρόλο που τα κύτταρα αυτά έχουν υποβληθεί σε μεταλλάξεις που τους προσδίδουν την ικανότητα αέναης κυτταρικής διαίρεσης,

δεν φέρουν φαινότυπο κακοήθειας και διατηρούν βασικά χαρακτηριστικά των φυσιολογικών επιδερμικών κερατινοκυττάρων, όπως η ικανότητα διαφοροποίησης και απόκρισης σε φλεγμονώδη ή οξειδωτικά ερεθίσματα.

Η κυτταρική σειρά HaCaT χρησιμοποιείται ευρέως σε προκλινικά μοντέλα για τη μελέτη της φλεγμονής, της οξειδωτικής καταπόνησης, της κυτταρικής βιωσιμότητας, της επούλωσης τραυμάτων, καθώς και για την αξιολόγηση της δερματικής τοξικότητας φαρμακευτικών και καλλυντικών προϊόντων. Η ευκολία στην καλλιέργεια, η σταθερότητα της γενετικής και φαινοτυπικής συμπεριφοράς, καθώς και η αναπαραγωγικότητα των αποτελεσμάτων καθιστούν τα κύτταρα HaCaT ένα αξιόπιστο εργαλείο σε μελέτες σχετικές με τη βιολογία του δέρματος.

Ανάλογα με τον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων γίνεται ανακαλλιέργεια στα κύτταρα ανά ~3 μέρες αφήνοντας το 1/3 αυτών στο τρυβλίο. Η διαδικασία που ακολουθείται για την ανακαλλιέργεια είναι η εξής:

- αφαίρεση του θρεπτικού από το τρυβλίο,
- ξέπλυμα των κυττάρων με διάλυμα Phosphate Buffer Saline (PBS) προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του θρεπτικού που έμεινε στο τρυβλίο,
- προσθήκη 1ml θρυψίνης και επώαση στους 37°C για 3-5 λεπτά, προκειμένου να αποκολληθούν τα κύτταρα από το ταπήτιο του τρυβλίου. Η θρυψίνη είναι ένα ένζυμο το οποίο διασπά τις συνδέσεις των κυττάρων με την επιφάνεια προσκόλλησής τους στο τρυβλίο, και για να δράσει απαιτείται πλήρης απομάκρυνση του θρεπτικού αλλιώς ο ορός που περιέχει την απενεργοποιεί.
- Τα κύτταρα ελέγχονται στο μικροσκόπιο και αν δεν έχουν αποκολληθεί τα βοηθάμε μηχανικά χτυπώντας ελαφρώς το τρυβλίο με το χέρι.
- Στη συνέχεια προστίθενται 5 ml από το θρεπτικό DMEM για να απενεργοποιηθεί το ένζυμο και το εναιώρημα κυττάρων αναδεύεται με την πιπέτα κυκλικά προκειμένου να αποκολληθούν τα εναπομείναντα κύτταρα.
- Τέλος κρατείται η επιθυμητή ποσότητα των κυττάρων, ενώ τα υπόλοιπα απορρίπτονται, και προστίθεται θρεπτικό DMEM μέχρι τελικό όγκο 7 ml.

Προκειμένου να δημιουργηθεί μια τράπεζα κυττάρων επιλέγεται η κρυοσυντήρησή τους σε υγρό άζωτο (N₂) (-196°C). Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η παρακάτω:

- τα κύτταρα αποκολλούνται από το τρυβλίο, τοποθετούνται σε σωληνάρια falcon των 15 ml και φυγοκεντρούνται στις 3000 στροφές για 7 min.
- Γίνεται απόρριψη του υπερκείμενου και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται με 950 μl FBS.
- Το παραπάνω κυτταρικό διάλυμα μεταφέρεται σε cryotubes που περιέχουν 50 μl DMSO, το οποίο είναι κρυοπροστατευτικό και εμποδίζει τους παγοκρυστάλλους που δημιουργούνται να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη.
- Τα cryotubes τοποθετούνται στους -80°C για 24 ώρες. Έπειτα μεταφέρονται σε δοχείο που περιέχει υγρό N₂, όπου και διατηρούνται για μακρά χρονικά διαστήματα. Για την

επανακαλλιέργεια των κυττάρων, τα κύτταρα μεταφέρονται από το υγρό N₂ και τοποθετούνται σε ζεστό νερό ώστε να ξεπαγώσουν και κατόπιν μεταφέρονται σε τρυβλίο που περιέχει θρεπτικό DMEM. Μετά από 24 ώρες γίνεται αλλαγή του θρεπτικού προκειμένου να απομακρυνθεί το DMSO καθώς, φυσιολογικά, είναι κυτταροτοξικό.

Όλα τα απαραίτητα σκεύη για τη διεξαγωγή των πειραμάτων (θρεπτικά υλικά, τρυβλία, δοκιμαστικοί σωλήνες, υάλινα μπουκάλια, tips, βαμβakoφόροι στείλεοί, χάρτινα δισκία διαμέτρου 9 mm) αποστειρώνονται σε εργαστηριακό κλίβανο πριν από τη χρήση. Για την εξασφάλιση στείρων συνθηκών και για τον περιορισμό των πιθανών επιμολύνσεων, τα πειράματα διεξάγονται υπό την παρουσία φλόγας ή σε hood με laminar air flow. Όλα τα βιολογικά πειράματα επαναλαμβάνονται τρεις φορές για τη λήψη επαναλήψιμων αποτελεσμάτων.

3.3.1. Ζώνες αναστολής (IZ)

Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος είναι η μέτρηση της διαμέτρου της ζώνης που σχηματίζεται καθώς αναστέλλεται η ανάπτυξη του βακτηρίου λόγω προσθήκης αντιβιοτικού. Αρχικά σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 2ml NaCl 0.9% και τοποθετείται στο UV για μηδενισμό του οργάνου. Στη συνέχεια, λαμβάνεται με στείλεό μικρή ποσότητα βακτηρίων (10⁸ cfu/ml βακτήρια) του μικροβιακού παράγοντα που μελετάται, για την παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος. Αυτή η ποσότητα των βακτηρίων αντιστοιχεί σε απορρόφηση 0.1 στα 620 nm. Στην περίπτωση που η απορρόφηση είναι μεγαλύτερη από 0.1 το εναιώρημα θεωρείται πυκνό κι αραιώνεται με NaCl 0.9%. Στην αντίθετη περίπτωση προστίθεται επιπλέον ποσότητα βακτηρίων. Μετά τον έλεγχο της απορρόφησης, αποστειρωμένος βαμβakoφόρος στείλεός εμβαπτίζεται με περιστροφικές κινήσεις στο μικροβιακό εναιώρημα για 20 sec, έπειτα απλώνεται σε τρυβλίο των 20 ml περιστρέφοντάς το κατά 60°, τουλάχιστον τρεις φορές. Με την ολοκλήρωση αυτού του σταδίου, χάρτινα δισκία διαμέτρου 9 mm, εμβαπτίζονται για 20 sec σε διάλυμα συγκέντρωσης 10⁻³ M της υπό μελέτη ένωσης και σε ddH₂O που αποτελεί το control. Τα δισκία με λαβίδα τοποθετούνται στις θέσεις που έχουν σημειωθεί και αφήνονται για επώαση στους 37°C για 20 hrs. Τέλος με χρήση χάρακα καταγράφεται η διάμετρος των ζωνών και τα τρυβλία σκανάρονται[46].

Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται για τις υδρογέλες με τη διαφορά πως οι ίδιες απλώνονται με πιπέτα στο στερεό θρεπτικό υλικό και αφήνονται για επώαση. Ως control χρησιμοποιείται υδρογέλη CMC.

3.3.2. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC)

Για τη μέτρηση της ανασταλτικής δράσης ενός αντιβιοτικού κρίνεται απαραίτητος ο προσδιορισμός της ελάχιστης ποσότητας του για την αναστολή της ανάπτυξης ενός συγκεκριμένου μικροβίου. Η τιμή αυτής της ποσότητας ορίζεται ως ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Minimum Inhibitory Concentration, MIC). Εξαρτάται από το μικροοργανισμό καθώς και από το ίδιο το αντιβιοτικό. Αρχικά, για τον προσδιορισμό της MIC, προετοιμάζονται δοκιμαστικοί σωλήνες καλλιέργειας. Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα εκτός από το θρεπτικό υλικό προστίθενται αυξανόμενες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού σε τελικό όγκο 2 ml[46]. Χρησιμοποιούνται stock διαλύματα συγκέντρωσης 10^{-2} M. Από την προσθήκη συμπλόκου ZnAsp εξαιρούνται οι δοκιμαστικοί σωλήνες του θετικού και αρνητικού control. Στη συνέχεια, σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα εκτός από αυτόν του αρνητικού control πραγματοποιείται ενοφθαλμισμός (10 μ L) του υπό μελέτη μικροβιακού παράγοντα. Επωάζονται για 20 hrs στους 37°C.

3.3.3. Ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC)

Η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (Minimum Bactericidal Concentration, MBC), θεωρείται η μικρότερη δυνατή συγκέντρωση ενός αντιβιοτικού που επιτρέπει την επιβίωση του 0.01% ενός πληθυσμού βακτηρίων. Για τον προσδιορισμό της MBC λαμβάνονται από τον ζωμό του πειράματος προσδιορισμού της MIC, ο οποίος έχει επωαστεί, 3 μ L για τον εμβολιασμό των τρυβλίων. Τα τρυβλία περιέχουν 10 ml θρεπτικού υλικού. Μετά τον εμβολιασμό τα τρυβλία αφήνονται για επώαση για 20 hrs στους 37°C. Τέλος λαμβάνονται τα αποτελέσματα και τα τρυβλία σκανάρονται[46].

3.3.4. In Vitro Τοξικότητα έναντι Αθάνατων Ανθρώπινων Κερατινοκυττάρων (HaCaT)

Η μέθοδος της σουλφοροδαμίνης B (SRB), που αναπτύχθηκε το 1990, αποτελεί μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική για την in vitro αξιολόγηση της κυτταροτοξικής δράσης ουσιών. Η SRB μπορεί να προσδένεται σε πρωτεϊνικά μέρη του κυττάρου τα οποία έχουν μονιμοποιηθεί με τρι-χλώρο-ακετικό οξύ (trichloroacetic acid, TCA). Είναι μια χρωστική αμινοξανθάνη με δύο θειολικές ομάδες οι οποίες μπορούν και προσδένουν σε βασικά αμινοξικά κατάλοιπα σε όξινες συνθήκες αλλά αποδεσμεύονται από αυτά σε βασικές συνθήκες. Το πλεονέκτημα της χρωστικής είναι η υψηλή ευαισθησία και η χρώση των κυττάρων ανεξάρτητα από την μεταβολική τους κατάσταση. Η έντονη χρώση της SRB επιτρέπει στη μέθοδο να εφαρμοστεί σε τρυβλίο με 96 βοθρία. Η εύρεση της συγκέντρωσης μιας ουσίας που αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων στο 50% είναι σημαντική για να ελεγχθεί η κυτταροτοξική της δράση (Inhibitory Concentration 50%, IC₅₀). Το πρωτόκολλο που ακολουθείται είναι ίδιο μέχρι την αποκόλληση των κυττάρων και την απενεργοποίηση του ενζύμου με θρεπτικό. Μετά γίνεται υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονται στο τρυβλίο μέσω χρήσης της πλάκας Neubauer. Ο αριθμός των κυττάρων (N) που μετρείται επεξεργάζεται ως εξής:

$$(N/4) \times (5.8) \times (10^4),$$

όπου 5.8 είναι τα mL της αραιώσης που πραγματοποιήθηκε και 4 είναι τα τετράγωνα της πλάκας.

Στη συνέχεια, ανάλογα με τον απαιτούμενο αριθμό κυττάρων ανά φρεάτιο για συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές, λαμβάνεται ο κατάλληλος όγκος κυττάρων από την αρχική καλλιέργεια. Αυτά αραιώνονται με θρεπτικό υλικό και διανέμονται στα φρεάτια του τρυβλίου των 96 φρεατίων, σε τελικό όγκο 100 μL ανά φρεάτιο χρησιμοποιώντας πολυπιπέτα.

Τα κύτταρα επωάζονται για 24 ώρες και κατόπιν γίνεται η προσθήκη των προς μελέτη ενώσεων (ZnAsp πριν και μετά την ακτινοβολήση με UV και CMC@ZnAsp πριν και μετά την ακτινοβολήση με UV). Από τα 96 βοθρία τα 12 χρησιμοποιούνται ως control, ενώ τα υπόλοιπα χωρίζονται ως διπλή επανάληψη μέχρι 6 ουσιών σε επτά συγκεντρώσεις σε τελικό όγκο 200 μL . Οι ενώσεις διαλύονται σε DMSO με αρχική συγκέντρωση 10^{-2} M και στη συνέχεια αραιώνονται με θρεπτικό DMEM σε συγκέντρωση 10^{-4} - 10^{-7} M. Αφού τα κύτταρα επωαστούν με τις ουσίες για 48 ώρες, ακολουθεί μια σειρά βημάτων για την ανάλυση της κυτταροτοξικότητας.

Η επώαση των κυττάρων με τις ουσίες γίνεται για 48 ώρες. Κατόπιν αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και προστίθεται κρύο διάλυμα τρι-χλωρο-ακετικού οξέος 10% (50 μL /βοθρίο) και το τρυβλίο επωάζεται για 30 min στους 4°C . Ακολουθούν πλύσεις (5x) με διαβαθμισμένο όγκο δις-απεσταγμένου νερού (ddH_2O) και το τρυβλίο αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 24 ώρες ώστε να στεγνώσει.

Προστίθενται σε κάθε βοθρίο 70 μL της χρωστικής SRB 0.4% w/v διαλυμένη σε διάλυμα 1% οξικού οξέος και το τρυβλίο επωάζεται για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν πλύσεις (5x) με διαβαθμισμένο όγκο διαλύματος οξικού οξέος 1%. Η προσδεμένη στα κύτταρα χρωστική διαλυτοποιείται με 200 μL διαλύματος unbuffered Tris-Base 10 mM και η απορρόφηση μετρείται σε μηχανήμα Elisa (MMP-96 HiPo, Biosan) στα 540 nm. [61].

Κάθε πείραμα επαναλαμβάνεται τρεις φορές για να διασφαλιστεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

3.3.5. Μετανάστευση Κερατινοκυττάρων στο περιθώριο πληγής με in vitro δοκιμασία γρατζουνιάς (Scratch Wound Assay)

Οι ιδιότητες αυτο-ίασης είναι απαραίτητες για την αποτελεσματικότητα των σχηματισμένων υδρογελιών αντηλιακών[62]. Η διαδικασία της επανεπιθηλιοποίησης είναι μια κρίσιμη φάση της επούλωσης τραυμάτων, κατά την οποία τα κύτταρα μεταναστεύουν από τα όρια του τραύματος προς το κέντρο για να διευκολύνουν το κλείσιμο του έλκους.

Η δοκιμή "scratch wound" in vitro βασίζεται στη δημιουργία ενός τεχνητού κενού ή "γρατζουνιάς" σε μια συνρεύουσα μονοστιβάδα κυττάρων. Τα κύτταρα μεταναστεύουν προς το κενό, επουλώνοντας το τραύμα συνδυάζοντας μετανάστευση και πολλαπλασιασμό[46].

Οι επιδράσεις της υδρογέλης, των συστατικών της και των φωτοπροστατευτικών τους ιδιοτήτων στην κυτταρική μετανάστευση αξιολογήθηκαν μετά από 48 ώρες επώασης με κύτταρα HaCaT σε συγκέντρωση 50 μM , η οποία μπορεί να θεωρηθεί ως μη κυτταροτοξική καθώς η βιωσιμότητα των κυττάρων υπερβαίνει το 70%, σύμφωνα με το ISO 10993-5, το οποίο ρυθμίζει τη "Βιολογική αξιολόγηση ιατροτεχνολογικών προϊόντων - Μέρος 5: Δοκιμές για in vitro κυτταροτοξικότητα" [63].

Το ανακτημένο τραύμα (RWA %) ορίζεται ως:

$$RWA(\%) = 100 \times \frac{\text{αρχική περιοχή τραύματος} - \text{τελική περιοχή τραύματος}}{\text{αρχική περιοχή τραύματος}}$$

3.3.6. Αντιφλεγμονώδης Δράση με Δοκιμασία Μετουσίωσης Αλβουμίνης

Η μέθοδος θερμικής αποδιάταξης της αλβουμίνης του αυγού χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της αντιφλεγμονώδους δράσης των παρασκευασμένων δειγμάτων. Η μέθοδος αυτή αξιολογεί την ικανότητα των δειγμάτων να αναστέλλουν την αποδιοργάνωση της τριτοταγούς ή δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών. Η δικλοφενάκη (ένα μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο) χρησιμοποιήθηκε για βαθμονόμηση, σε συγκεντρώσεις 100, 50 και 25 mg/mL . Η δικλοφενάκη αναστέλλει τη θερμική αποδιάταξη της αλβουμίνης του αυγού με τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση[64].

Το μείγμα (2.5 mL) αποτελείται από 0.1 mL αλβουμίνης αυγού από φρέσκο αυγό κότας, 1.4 mL διαλύματος PBS (pH 6.4) και 1 mL διάφορων συγκεντρώσεων άλατος δικλοφενάκης και ZnAsp (0.4 – 4.0 mM) σε δις-απεσταγμένο νερό. Το δις-απεσταγμένο νερό χρησιμεύει ως αρνητικό control. Στη συνέχεια, τα διαλύματα επώαστηκαν στους 37°C για 15 λεπτά και στη συνέχεια θερμάνθηκαν στους 70 °C για 5 λεπτά. Μετά την ψύξη για 10 λεπτά η απορρόφηση των δειγμάτων μετρήθηκε στα 660 nm. Η αντιφλεγμονώδης δράση εκτιμήθηκε ως το ποσοστό αναστολής της μετουσίωσης των πρωτεϊνών και υπολογίστηκε σύμφωνα με την απορρόφηση του Δείγμ (διάλυμα PBS αναμεμειγμένο με αλβουμίνη και τον υπό δοκιμή παράγοντα) έναντι του control (διάλυμα PBS αναμεμειγμένο με αλβουμίνη χωρίς την υπό δοκιμή ένωση). Οι μέσες τιμές και τα όρια εμπιστοσύνης καθορίστηκαν από ανεξάρτητες πειραματικές επαναλήψεις.

3.3.7. Μελέτη της *in vivo* τοξικότητας με τη μέθοδο γαρίδας άλμης (*Artemia salina* assay)

Η γαρίδα άλμης (*Artemia salina*) αποτελεί ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο μοντέλο οργανισμού σε δοκιμασίες τοξικότητας λόγω της ευαισθησίας της σε ένα ευρύ φάσμα χημικών ουσιών. Η δοκιμή θνησιμότητας σε γαρίδες άλμης παρέχει μια πρόωμη εκτίμηση των κυτταροτοξικών, φωτοτοξικών και παρασιτοκτόνων ιδιοτήτων νέων ενώσεων. Η ευρεία γεωγραφική κατανομή, ο σύντομος κύκλος ζωής και η ανεπιλεκτική ανάπτυξη της *A. salina*, σε συνδυασμό με την ευαισθησία της σε τοξικές ουσίες, καθιστούν αυτό το είδος ιδανικό για την αξιολόγηση των φαρμακολογικών δράσεων ποικίλων βιοδραστικών ενώσεων.

Το πρωτόκολλο της δοκιμασίας αυτής είναι το εξής:

- Ποσότητα 1 gr από τα αυγά της γαρίδας άλμης ενυδατώνονται με φρέσκο H₂O για περίπου μια ώρα μέσα σε ένα εκχυλιστικό χωνί. Οι συνθήκες θαλασσινού νερού προσομοιάστηκαν με την διάλυση 17 gr θαλασσινού αλατιού σε 500 ml απεσταγμένου H₂O.
- Το δοχείο ανάπτυξης τους εξοπλίζεται με συνεχή παροχή φρέσκου αέρα σε θερμοκρασία δωματίου και συνεχή παρουσία φωτός. Αφήνονται σε αυτές τις συνθήκες για τουλάχιστον 48 ώρες μέχρι να εκκολαφθούν τα αυγά.
- Αφού εκκολαφθούν τα αυγά, οι προνύμφες της γαρίδας άλμης συλλέγονται με μικροπιπέτα κοντά στην φωτεινή πλευρά του δοχείου ανάπτυξης με τη χρήση σταθερής πηγής φωτός.
- Μετά τη συλλογή τους οι προνύμφες διαχωρίζονται από τα αυγά σε ένα ποτήρι που περιέχει NaCl 0.9% w/v.
- Έπειτα μια κατάλληλη ποσότητα από το διάλυμα με τις προνύμφες (0.5 ml) που περιέχει ~10-12 προνύμφες τοποθετείται σε κάθε βοθρίο ενός τρυβλίου με 24 βοθρία. Η ένωση παρασκευάζεται σε συγκέντρωση 10⁻² M και αραιώνεται με NaCl 0.9% w/v προκειμένου να επιτευχθούν οι τελικές συγκεντρώσεις των ουσιών (500, 1500 και 300 μM) σε τελικό όγκο 1 ml και σε διπλή επανάληψη η κάθε μια.
- Η επιβίωση του πληθυσμού της γαρίδας άλμης παρατηρήθηκε μετά από επώαση με τις ουσίες για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με την βοήθεια στερεοσκοπίου. Οι προνύμφες θεωρήθηκαν νεκρές αν δεν έδειχναν κανένα σημάδι κίνησης για 10 sec παρακολούθησης.

Κάθε πείραμα επαναλαμβάνεται τρεις φορές[65].

Δ. Αποτελέσματα

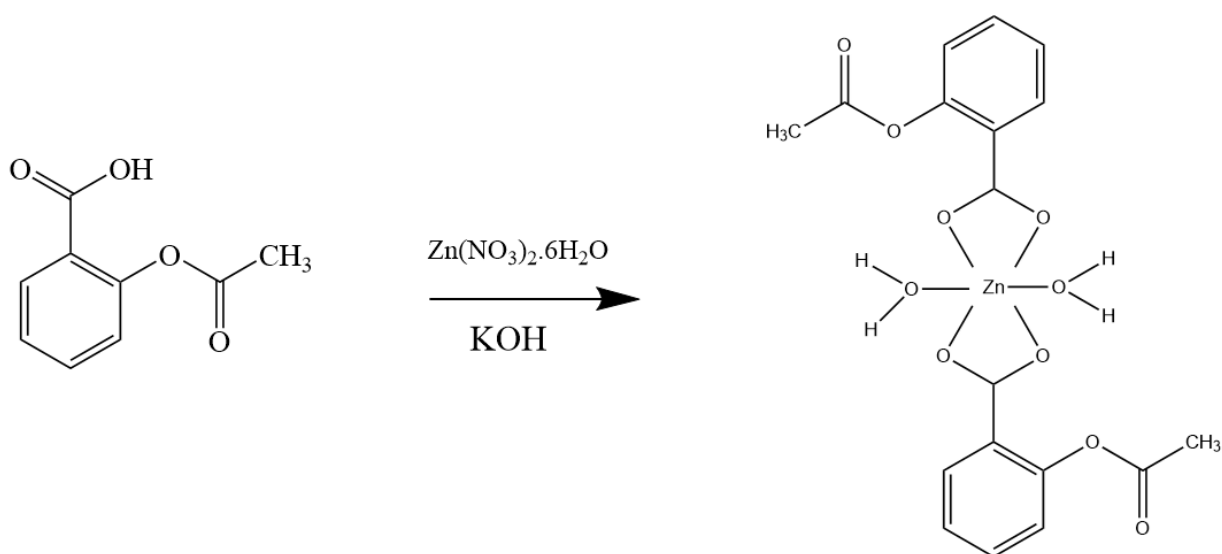
Κεφάλαιο 4

4.1. Χημικό μέρος

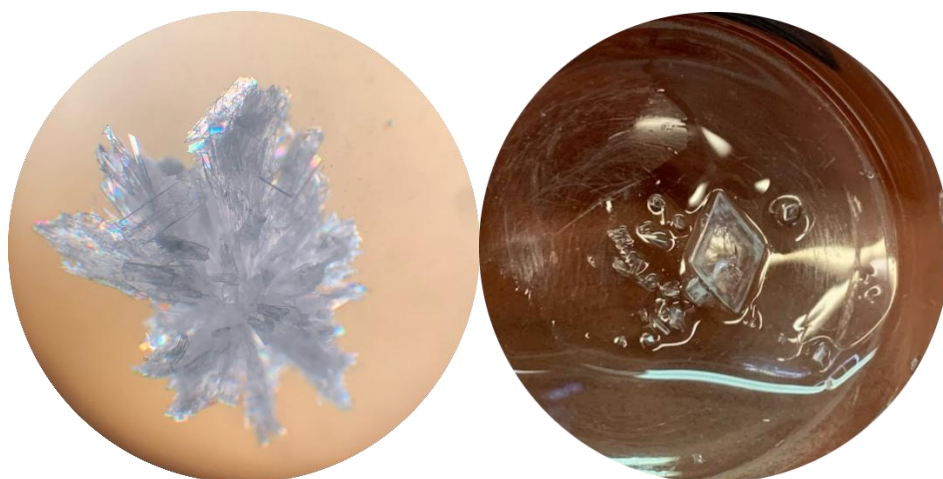
4.1.1. Σύνθεση ZnAsp

Το σύμπλοκο σχηματίστηκε με αντίδραση $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, KOH και ασπιρίνης.

Μετά απο φυγοκέντρηση του σχηματιζόμενου διαλύματος, το υπερκείμενο παραλαμβάνεται και τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως για τις επόμενες 24-48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου για να κρυσταλλώσει.



Εικόνα 21. Η συνθετική πορεία του ZnAsp.



Εικόνα 22. Κρύσταλλοι ZnAsp.

4.1.2. Διαλυτότητα

Για τη διεξαγωγή των βιολογικών πειραμάτων επιλέχθηκε ως καταλληλότερος διαλύτης το ddH₂O καθώς το σύμπλοκο μας είναι πλήρως διαλυτό σε αυτό.

Πίνακας 1. Διαλυτότητα ZnAsp. Πλήρως διαλυτό ++ Μερικώς διαλυτό + Μη διαλυτό –

Διαλύτες	ZnAsp
ddH ₂ O	++
DMSO	++
MeCN	++
MeOH	++
Acetone	++
CHCl ₃	-
CH ₂ Cl ₂	+
Toluene	-
n-hexane	-

4.1.3. Σημείο τήξης

Ο προσδιορισμός των σημείων τήξης του ZnO, ακετυλοσαλικυλικού οξέος (aspirin) και του ZnAsp έγινε υπό αυξανόμενη θερμοκρασία. Οι διαφορετικές θερμοκρασίες τήξης T_m που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα είναι ένδειξη σχηματισμού του νέου συμπλόκου.

Πίνακας 2. Σημεία τήξης ZnO, ακετυλοσαλικυλικού οξέος και του ZnAsp.

Ένωση	T_m
ZnO	>250 °C
Aspirin	136 °C
ZnAsp	87-89 °C

4.1.4. Κρυοσκοπία

Το MW του ZnAsp προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της κρυοσκοπίας σε διάλυμα DMSO/ddH₂O αναλογίας 1:49 με τη χρήση οσμομέτρου σημείου πήξης. Βρέθηκε πως το MW αντιστοιχεί σε 464.1 g/mol με το θεωρητικό να υπολογίζεται 459 g/mol.

Το MW βάρος της αποπρωτονιωμένης ασπιρίνης είναι 179 g/mol, του νερού 18 g/mol και του ψευδαργύρου 65 g/mol.

4.1.5. Φασματοσκοπία ATR-FTIR

Το φάσμα του ZnAsp (Εικόνα 23) υποδεικνύει τον επιτυχή σχηματισμό του συμπλόκου και την συντονισμένη σύνδεση του υποκαταστάτη (ασπιρίνης) με το ιόν ψευδαργύρου.

- 1590-1450 cm^{-1} περίπου: Η πλέον σημαντική παρατήρηση είναι η εμφάνιση των δύο δονήσεων δεσμών στην περιοχή 1590 cm^{-1} και 1450 cm^{-1} περίπου. Αυτές οι δονήσεις αντιστοιχούν στις ασύμμετρες ($\nu_{\text{asym}}(\text{COO}^-)$) και συμμετρικές ($\nu_{\text{sym}}(\text{COO}^-)$) δονήσεις τάσης της καρβοξυλικής ομάδας μετά τον δεσμό της με το μέταλλο. Για το άλας της ασπιρίνης με νάτριο οι δονήσεις είναι $\nu_{\text{asym}}(\text{COO}^-)$: 1609 cm^{-1} και $\nu_{\text{sym}}(\text{COO}^-)$: 1370 cm^{-1} [66].
- Διατήρηση της κορυφής εστέρα: Η δόνηση γύρω στα 1730 cm^{-1} (που αντιστοιχεί στην τάση C=O του εστέρα) παραμένει σχετικά ανεπηρέαστη καθώς η τιμή για το άλας της ασπιρίνης είναι μεταξύ 1767-1750 cm^{-1} [66]. Αυτό υποδηλώνει ότι ο εστερικός δεσμός δεν συμμετέχει στον συντονισμό με το ιόν ψευδαργύρου.
- Περιοχή 600-400 cm^{-1} : Η εμφάνιση νέων, ασθενών ζωνών απορρόφησης σε αυτή την περιοχή μπορεί να αποδοθεί στις δονήσεις τάσης των δεσμών Zn-O [67]. Αυτές οι δονήσεις είναι χαρακτηριστικές των δεσμών μετάλλου-υποκαταστάτη και αποτελούν ισχυρή ένδειξη του σχηματισμού του συμπλόκου.

- Διαφορά ($\Delta\nu$) μεταξύ $\nu_{\text{asym}}(\text{COO}^-)$ και $\nu_{\text{sym}}(\text{COO}^-)$: Η διαφορά [$\Delta\nu = \nu_{\text{asym}}(\text{COO}^-) - \nu_{\text{sym}}(\text{COO}^-)$] μεταξύ των ασύμμετρων και συμμετρικών δονήσεων τάσης του καρβοξυλικού ανιόντος μπορεί να παρέχει πληροφορίες για τον τρόπο σύνδεσης του καρβοξυλικού ανιόντος με το μέταλλο. Από την Εικόνα 23 βλέπουμε ότι η διαφορά είναι $\Delta\nu = 145 \text{ cm}^{-1}$.

Στον Πίνακα 3 βλέπουμε τις τιμές $\Delta\nu$ του άλατος της ασπιρίνης με διάφορους υποκαταστάτες[68].

Άλας	$\nu_{\text{asym}}(\text{COO}^-)$ (cm^{-1})	$\nu_{\text{sym}}(\text{COO}^-)$ (cm^{-1})	$\Delta\nu$ (cm^{-1})	Ερμηνεία
CetPyAsp	1626	1378	248	Ιοντική
BEAsp	1625	1378	244	Ιοντική
TramAsp	1615	1381	229	Ιοντική
LidAsp	1624	1379	245	Ιοντική
NaAsp	1609	1370	239	Ιοντική

Πίνακας 3. $\Delta\nu$ αλάτων της ασπιρίνης με υποκαταστάτη Cetylpyridinium, Benzethonium, Tramadolium, Lidocainium και νάτριο.

Συγκρίνοντας την τιμή $\Delta\nu$ μεταξύ ZnAsp και των αλάτων της ασπιρίνης παρατηρούμε ότι $\Delta\nu_{\text{ZnAsp}} < \Delta\nu_{\text{άλας}}$. Οπότε καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η ένωση ψευδαργύρου με την ασπιρίνη έχει γίνει χηλικά.

Ο σχηματισμός του συμπλόκου ZnAsp αιτιολογείται από την ικανότητα του ιόντος ψευδαργύρου (Zn^{2+}) να λειτουργεί ως Lewis οξύ και να δέχεται ζεύγη ηλεκτρονίων από τους δότες υποκαταστάτες, στην προκειμένη περίπτωση, το καρβοξυλικό ανιόν της ασπιρίνης.

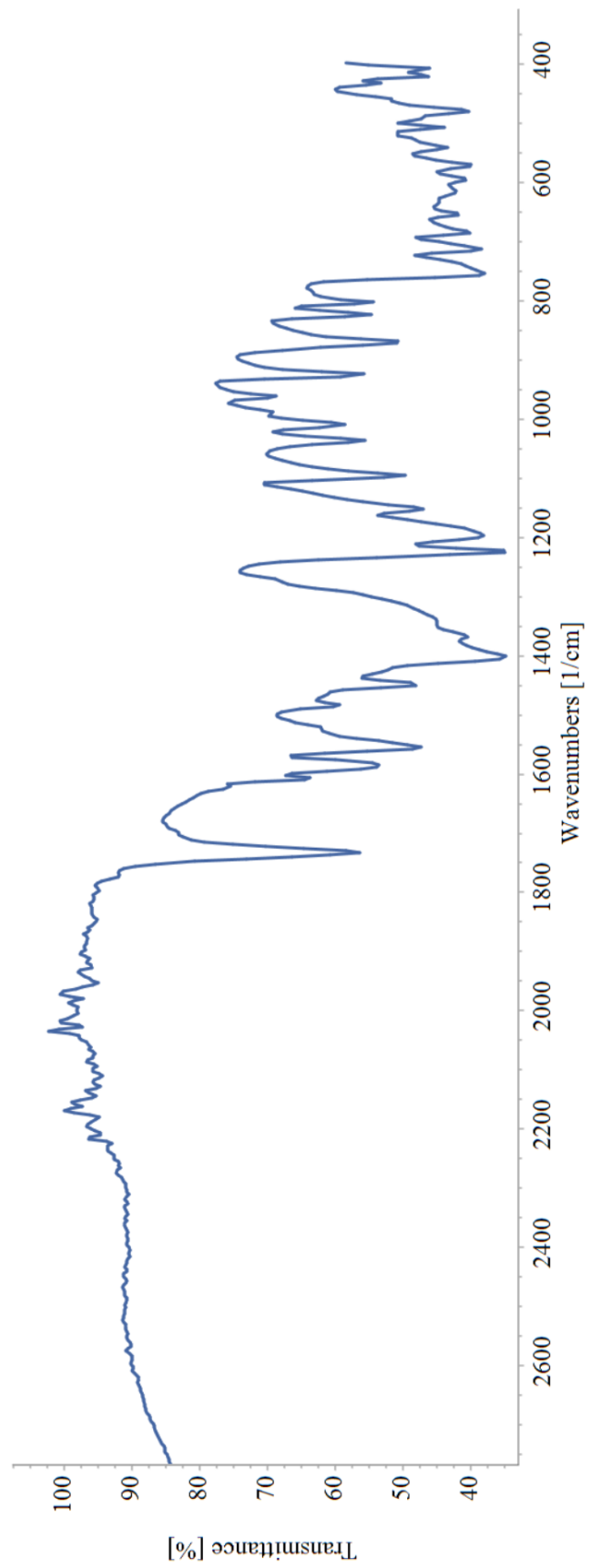
Οι μετατοπίσεις των μηκών κύματος στις χαρακτηριστικές δονήσεις δεσμών είναι άμεση συνέπεια του συντονισμού:

1. Αποπρωτονίωση της Καρβοξυλικής Ομάδας: Η ασπιρίνη, ως καρβοξυλικό οξύ, έχει έναν σχετικά όξινο υδρογόνο στην καρβοξυλική ομάδα. Κατά τον σχηματισμό του συμπλόκου, το ιόν Zn^{2+} δρα ως Lewis οξύ, διευκολύνοντας την αποπρωτονίωση ($-\text{COOH} \rightarrow -\text{COO}^-$) της ασπιρίνης. Αυτή η αποπρωτονίωση οδηγεί στην εξαφάνιση της δόνησης τάσης O-H του καρβοξυλικού οξέος και στην εμφάνιση των ασύμμετρων και συμμετρικών δονήσεων τάσης του καρβοξυλικού ανιόντος ($-\text{COO}^-$).
2. Συντονισμός Καρβοξυλικού Ανιόντος με τον Ψευδάργυρο: Το καρβοξυλικό ανιόν συνδέεται με το ιόν ψευδαργύρου. Αυτή η σύνδεση επηρεάζει τις δυνάμεις των δεσμών C=O και C-O του καρβοξυλίου, οδηγώντας σε:
 - ο Μετατόπιση της καρβονυλικής κορυφής του καρβοξυλίου σε χαμηλότερα μήκη κύματος (προς 1590 cm^{-1} και 1450 cm^{-1} στο ZnAsp) ως $\nu_{\text{asym}}(\text{COO}^-)$

και $\nu_{\text{sym}}(\text{COO}^-)$. Αυτή η μετατόπιση οφείλεται στην εξίσωση των δεσμών C-O στο καρβοξυλικό ανιόν μετά τον συντονισμό με το μέταλλο. Ενώ στο καρβοξυλικό οξύ έχουμε έναν διακριτό διπλό δεσμό C=O και έναν απλό δεσμό C-O, στο καρβοξυλικό ανιόν οι δύο δεσμοί C-O είναι πιο ισοδύναμοι λόγω συντονισμού, με αποτέλεσμα την εμφάνιση δύο δονήσεων, μία ασύμμετρη και μία συμμετρική.

3. Εμφάνιση Δονήσεων Zn-O: Ο άμεσος δεσμός μεταξύ του ιόντος ψευδαργύρου και των ατόμων οξυγόνου του καρβοξυλικού ανιόντος οδηγεί στην εμφάνιση νέων απορροφήσεων στην περιοχή χαμηλών κυματαριθμών ($600\text{-}400\text{ cm}^{-1}$), οι οποίες είναι χαρακτηριστικές των δονήσεων τάσης μετάλλου-οξυγόνου (Zn-O).

Συνοπτικά, οι φασματικές αλλαγές που παρατηρούνται στο ZnAsp σε σχέση με τα άλατα της ασπιρίνης (ιδιαίτερα η μετατόπιση και διάσπαση της καρβοξυλικής κορυφής C=O και η εμφάνιση δονήσεων Zn-O) παρέχουν ισχυρές αποδείξεις για τον επιτυχή σχηματισμό του συμπλόκου ψευδαργύρου, με το καρβοξυλικό ανιόν της ασπιρίνης να λειτουργεί ως υποκαταστάτης.



Εικόνα 23. Φάσμα ATR-FTIR του συμπλόκου ZnAsp.

4.1.6. Φασματοσκοπία XRF

Το φάσμα φθορισμού ακτίνων X (XRF) του συντιθέμενου συμπλόκου ZnAsp, το οποίο προέκυψε από την αντίδραση μεταξύ ψευδαργύρου και ασπιρίνης καθώς και της υδρογέλης CMC@ZnAsp παρουσιάζονται στην Εικόνα 24 και 25. Η ανάλυση του φάσματος αποκαλύπτει την παρουσία χαρακτηριστικών ενεργειακών κορυφών που είναι ενδεικτικές της μοριακής σύνθεσης του συμπλόκου.

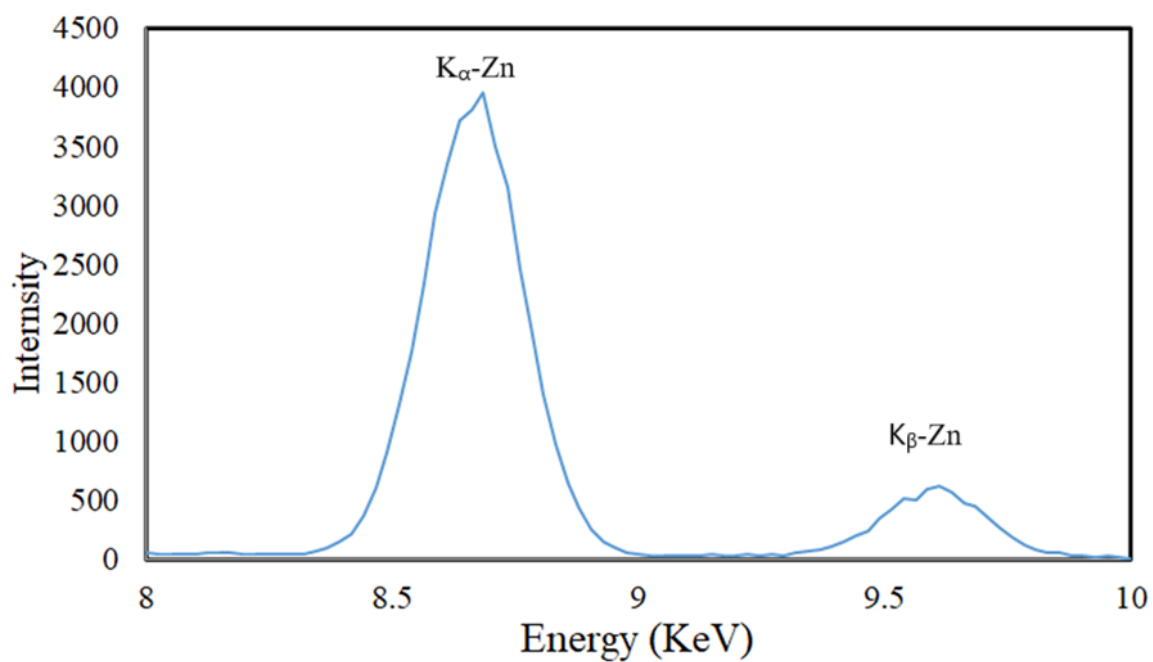
Συγκεκριμένα, παρατηρούνται δύο διακριτές και καλά διαχωρισμένες ομάδες κορυφών. Η κυρίαρχη κορυφή, με μέγιστη ένταση περίπου 3950 μονάδες και κέντρο στην ενέργεια των ~ 8.64 KeV, αποδίδεται χαρακτηριστικά στην εκπομπή K_{α} -Zn ακτίνων X από τον ψευδάργυρο. Η συγκεκριμένη τιμή ενέργειας είναι απόλυτα συνεπής με τις βιβλιογραφικές τιμές για την K_{α} χαρακτηριστική ακτινοβολία του ψευδαργύρου (8.6389 KeV), επιβεβαιώνοντας ισχυρά την παρουσία του ψευδαργύρου στο δείγμα. Η υψηλή ένταση αυτής της κορυφής υποδηλώνει την σημαντική συγκέντρωση του ψευδαργύρου στο σύμπλοκο, όπως αναμένεται από τη φύση του συντιθέμενου υλικού.

Περαιτέρω, παρατηρείται μια δευτερεύουσα κορυφή, με σημαντικά μικρότερη ένταση και κέντρο στην ενέργεια των ~ 9.57 KeV. Αυτή η κορυφή αντιστοιχεί στην εκπομπή Zn ακτίνων X από τον ψευδάργυρο. Η τιμή αυτή είναι επίσης συμβατή με τις γνωστές τιμές για την K_{β} χαρακτηριστική ακτινοβολία του ψευδαργύρου (9.5702 KeV). Η εμφάνιση τόσο των K_{α} όσο και των K_{β} κορυφών επιβεβαιώνει με σαφήνεια την παρουσία του ψευδαργύρου ως το κύριο μεταλλικό συστατικό του συμπλόκου ZnAsp.

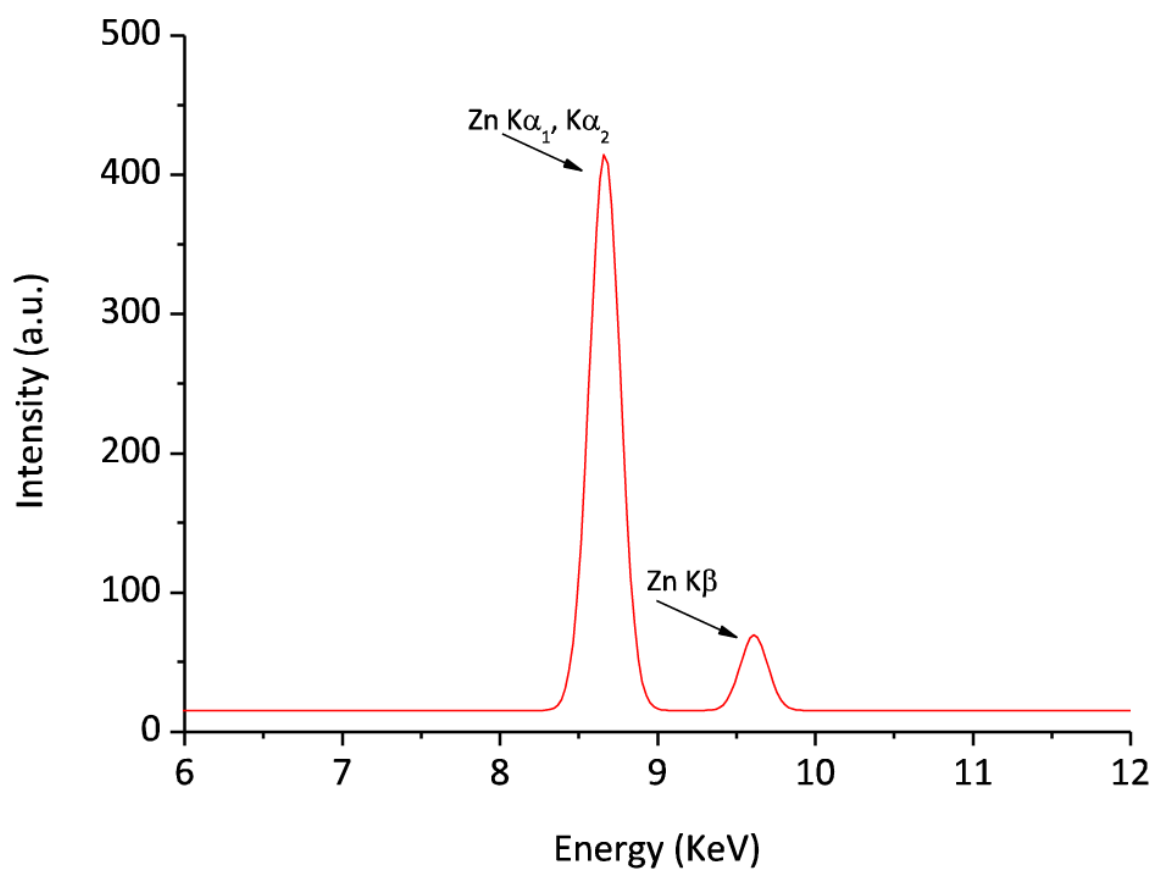
Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι δεν παρατηρούνται άλλες σημαντικές κορυφές στο εξεταζόμενο ενεργειακό εύρος (8-10 KeV), γεγονός που υποδηλώνει την απουσία άλλων μετάλλων σε ανιχνεύσιμα επίπεδα εντός του συμπλόκου. Αυτό αποτελεί ένδειξη της καθαρότητας του συντιθέμενου προϊόντος όσον αφορά την παρουσία άλλων στοιχείων που θα μπορούσαν να δώσουν σήμα στην περιοχή αυτή[52].

Το ποσοστό του Zn στο σύμπλοκο βρέθηκε σε ποσοστό 14.2% με θεωρητική τιμή το 14.16% και στην υδρογέλη σε ποσοστό 3.3% με θεωρητική τιμή το 3.77%

Συνολικά, τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας XRF παρέχουν άμεση και ποιοτική απόδειξη της επιτυχούς ενσωμάτωσης του ψευδαργύρου στο σύμπλοκο ZnAsp, επιβεβαιώνοντας την βασική δομική του σύσταση και αποτελούν ισχυρή ένδειξη της καθαρότητας του συντιθέμενου προϊόντος.



Εικόνα 24. Φάσμα XRF του συμπλόκου ZnAsp.



Εικόνα 25. Φάσμα XRF της υδρογέλης CMC@ZnAsp.

4.1.7. Φασματοσκοπία UV-Vis

Πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπική μελέτη στην υπεριώδη-ορατή (UV/Vis) περιοχή για το σύμπλοκο ZnAsp και την ασπιρίνη, με σκοπό την εκτίμηση της ηλεκτρονιακής δομής και την επιβεβαίωση του σχηματισμού του συμπλόκου.

Από τα φάσματα βρέθηκαν τα $\lambda_{\max}$ και υπολογίστηκαν οι συντελεστές μοριακής απορροφητικότητας (ϵ) από το νόμο Lambert Beer: $A = \epsilon \times l \times c$,

όπου A: απορρόφηση, ϵ : συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας, c: συγκέντρωση, l: μήκος διαδρομής (πάχος κυψελίδας).

Το φάσμα UV/Vis της ασπιρίνης (Εικόνα 26) σε συγκέντρωση 5×10^{-5} M παρουσιάζει μία κύρια ταινία απορρόφησης με μέγιστο ($\lambda_{\max}$) στα 225 nm και μέγιστη απορροφητικότητα ($A_{\max}$) ίση με 0.072. Ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας (ϵ) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας το νόμο Beer-Lambert και βρέθηκε ίσος με $1440 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Αυτή η απορρόφηση αποδίδεται κυρίως σε ηλεκτρονικές μεταπτώσεις $\pi \rightarrow \pi^*$ του αρωματικού δακτυλίου και των καρβονυλικών ομάδων της ασπιρίνης.

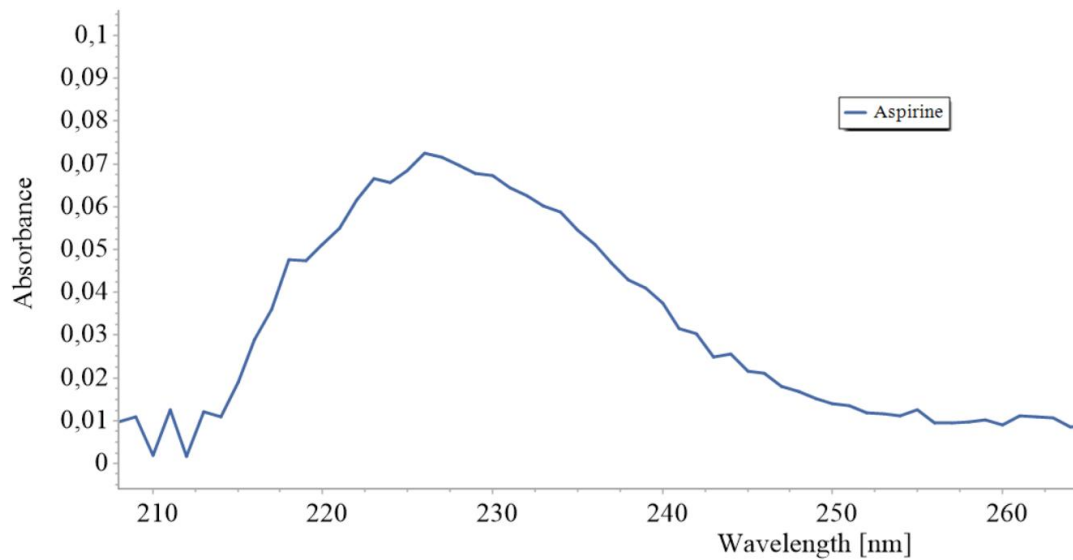
Το φάσμα UV/Vis του συμπλόκου ZnAsp (Εικόνα 27) σε συγκέντρωση 10^{-4} M παρουσιάζει μία έντονη ταινία απορρόφησης με μέγιστο ($\lambda_{\max}$) στα 300 nm και μέγιστη απορροφητικότητα ($A_{\max}$) ίση με 0.54. Ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας (ϵ) βρέθηκε ίσος με $5400 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Η σύγκριση των φασμάτων UV/Vis της ασπιρίνης και του συμπλόκου ZnAsp παρέχει ισχυρές ενδείξεις για τον επιτυχή σχηματισμό του συμπλόκου και τις επακόλουθες αλλαγές στην ηλεκτρονική δομή του υποκαταστάτη:

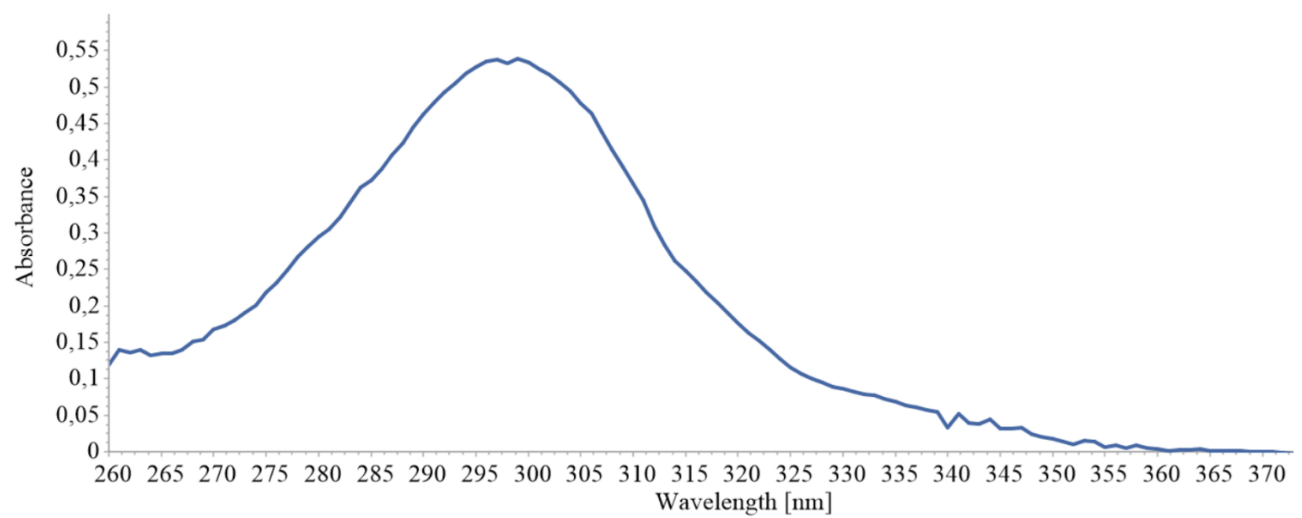
1. Βαθοχρωμική Μετατόπιση ($\lambda_{\max}$): Παρατηρείται μια σημαντική βαθοχρωμική μετατόπιση (red shift) του μέγιστου απορρόφησης από τα 225 nm για την ασπιρίνη στα 300 nm για το σύμπλοκο ZnAsp. Αυτή η μετατόπιση των 75 nm προς μεγαλύτερα μήκη κύματος υποδηλώνει μείωση της ενέργειας της ηλεκτρονικής μετάπτωσης. Είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του υποκαταστάτη (αποπρωτονιωμένη ασπιρίνη) με το ιόν Zn^{2+} , η οποία οδηγεί σε μεταβολές στην ηλεκτρονική δομή και επέκταση του συστήματος συζυγίας ή/και σταθεροποίηση των διεγερμένων ηλεκτρονικών καταστάσεων.
2. Υπερχρωμική Επίδραση (Αύξηση ϵ): Ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας του συμπλόκου ZnAsp ($\epsilon_{\text{ZnAsp}} = 5400 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) είναι σημαντικά μεγαλύτερος από αυτόν της ασπιρίνης ($\epsilon_{\text{aspirin}} = 1440 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Αυτή η υπερχρωμική επίδραση, δηλαδή η αύξηση της έντασης της απορρόφησης, υποδηλώνει ότι η ηλεκτρονική μετάπτωση στο σύμπλοκο είναι πιο επιτρεπτή και, συνεπώς, πιο πιθανή να συμβεί. Η αύξηση της απορροφητικότητας αποτελεί σαφή ένδειξη ότι έχει σχηματιστεί ένα νέο χημικό είδος με ενισχυμένες οπτικές ιδιότητες.

Συμπερασματικά, η συνδυασμένη παρατήρηση της βαθοχρωμικής μετατόπισης και της υπερχρωμικής επίδρασης στα φάσματα UV/Vis της ZnAsp σε σύγκριση με την ασπιρίνη, επιβεβαιώνει κατηγορηματικά τον σχηματισμό του συμπλόκου και υπογραμμίζει τις

σημαντικές τροποποιήσεις στην ηλεκτρονιακή δομή του υποκαταστάτη κατά τη συνένωση με το ιόν ψευδαργύρου.



Εικόνα 26. Φάσμα UV/Vis της ασπιρίνης.

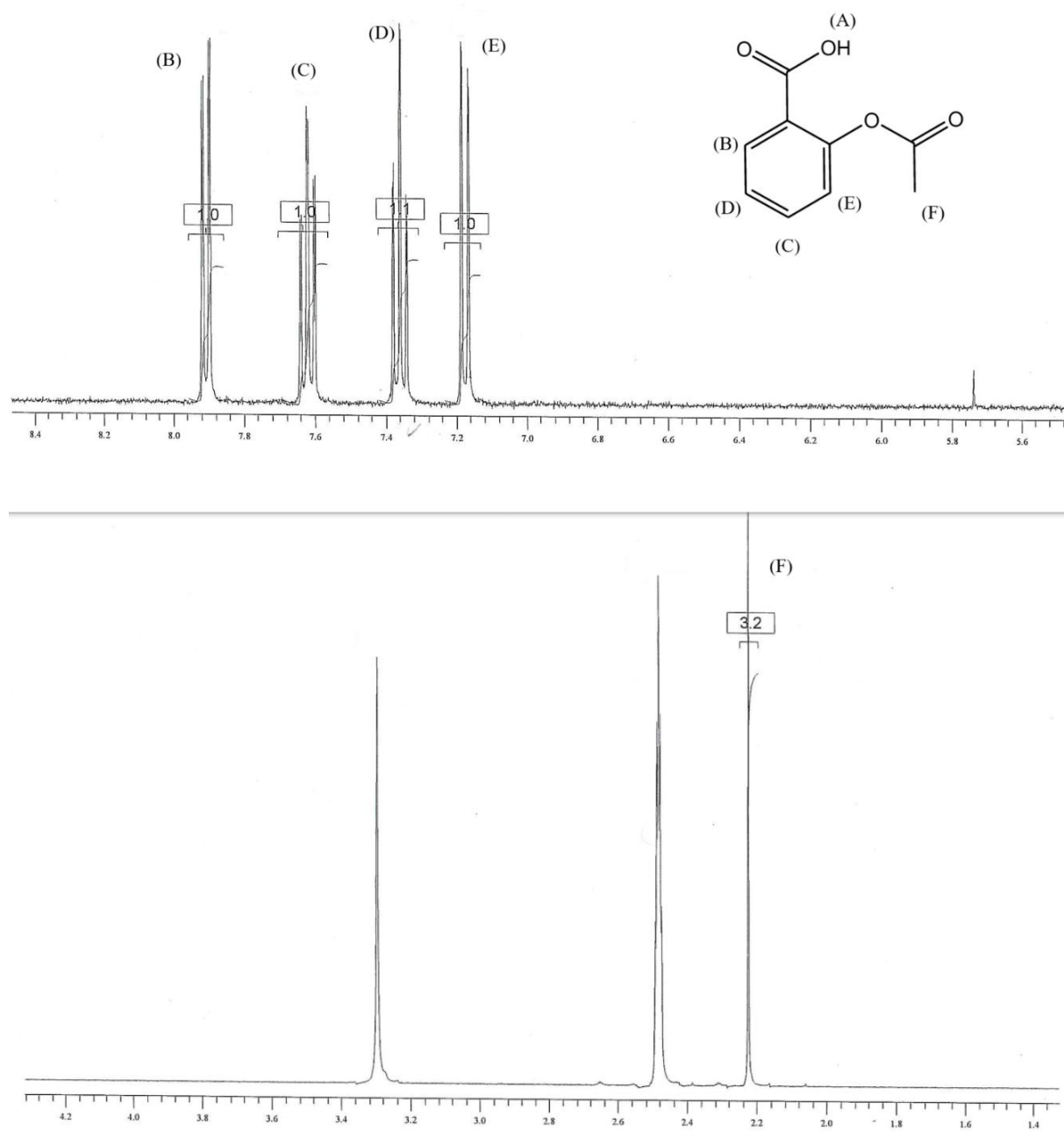


Εικόνα 27. Φάσμα UV/Vis του συμπλόκου ZnAsp.

4.1.8. Φασματοσκοπία ^1H -NMR

Το φάσμα ^1H -NMR της ασπιρίνης (Εικόνα 28) είναι καλά καθορισμένο και η αντιστοίχιση των χημικών μετατοπίσεων είναι συνήθως άμεση.

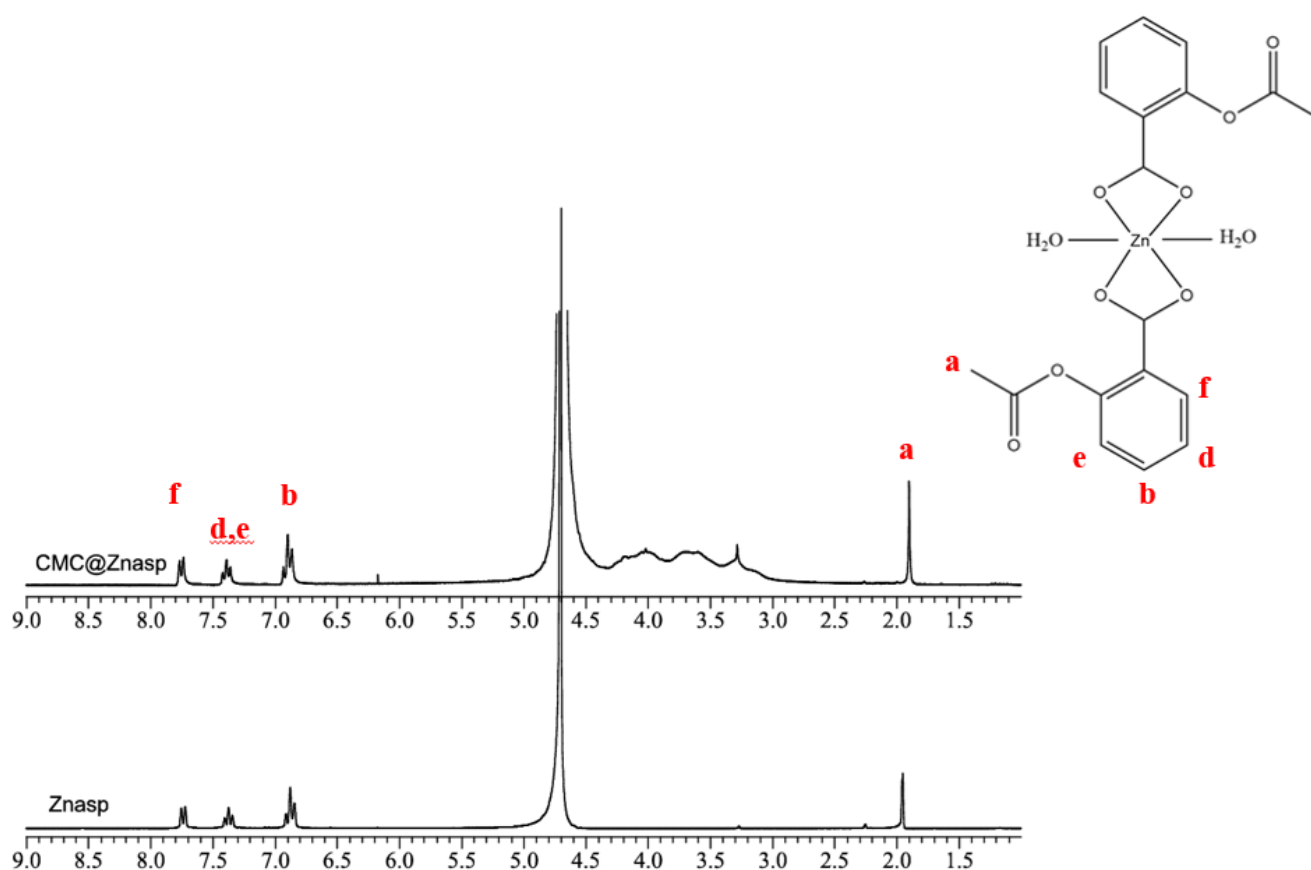
- Ομάδα F ($\delta \approx 2.30$ ppm, 3H, s):
 - ο Αυτό το έντονο μονόλεπτο σήμα αντιστοιχεί στα τρία πρωτόνια της μεθυλομάδας του ακετυλίου ($-\text{OCOCH}_3$). Το ολοκλήρωμα [3.2] είναι επίσης συνεπές με 3 πρωτόνια.
- Ομάδα B ($\delta \approx 7.90$ ppm, 1H, d):
 - ο Το πιο αποθωρακισμένο αρωματικό πρωτόνιο, που βρίσκεται ορθο- στην καρβοξυλική ομάδα. Είναι αναμενόμενο να εμφανίζεται ως διπλέτα λόγω σύζευξης με το πρωτόνιο C.
- Ομάδα C ($\delta \approx 7.60$ ppm, 1H, t/dd):
 - ο Το πρωτόνιο αυτό βρίσκεται μεταξύ δύο άλλων αρωματικών πρωτονίων (B και D) και είναι αναμενόμενο να εμφανίζει ένα μοτίβο τριπλέτας (ή πιο σύνθετης διπλέτας-διπλέτας) λόγω των συζεύξεων.
- Ομάδα D ($\delta \approx 7.40$ ppm, 1H, d):
 - ο Το πρωτόνιο αυτό βρίσκεται ορθο- στην εστερική ομάδα και συζεύγνυται με το πρωτόνιο C. Εμφανίζεται ως διπλέτα.
- Ομάδα E ($\delta \approx 7.20$ ppm, 1H, d):
 - ο Το πιο θωρακισμένο αρωματικό πρωτόνιο, βρίσκεται παρα- στην καρβοξυλική ομάδα και ορθο- στην εστερική. Η διπλέτα υποδηλώνει σύζευξη με το πρωτόνιο D.
- Ομάδα A (COOH , όχι ορατό):
 - ο Το πρωτόνιο της καρβοξυλικής ομάδας (A) είναι γνωστό ότι βρίσκεται σε πολύ χαμηλό πεδίο, συνήθως μεταξύ 10.0–13.0 ppm (ή και πιο κάτω, π.χ., 14–16 ppm αν υπάρχει ισχυρή ενδομοριακή υδρογονοδέσμευση). Δεδομένου ότι το παρεχόμενο φάσμα αρχίζει από τα 8.4 ppm, το σήμα για το πρωτόνιο A δεν είναι ορατό σε αυτό το εύρος[69].



Εικόνα 28. Φάσμα ^1H -NMR της ασπιρίνης.

Το φάσμα του CMC@ZnAsp καταγράφηκε σε D₂O και συγκρίθηκε με αυτό του ZnAsp (Εικόνα 29).

Το απλό σήμα στα 1.905 ppm CMC@ZnAsp αποδίδεται στα πρωτόνια της μεθυλομάδας της ασπιρίνης κάτι που συμφωνεί με την αντίστοιχη ομάδα -CH₃ του ZnAsp, η οποία επίσης εμφανίζεται στις 1.951 ppm. Οι χημικές μετατοπίσεις του CMC@ZnAsp στις περιοχές 6.936–6.868 ppm (t, αρωματικά πρωτόνια H^b), 7.413–7.361 ppm (t, H^{d,e}) και 7.771–7.739 ppm (d, H^f) είναι σύμφωνες με εκείνες που παρατηρούνται στο αρχικό σύμπλοκο ZnAsp (6.913–6.844 ppm για H^b, 7.406–7.344 ppm για H^{d,e} και 7.754–7.723 ppm για H^f)[69]. Επιπλέον, τα σήματα συντονισμού του CMC παρατηρούνται στην περιοχή 4.246–3.161 ppm.



Εικόνα 29. Φάσμα ¹H-NMR των ZnAsp και CMC@ZnAsp σε διαλύτη D₂O.

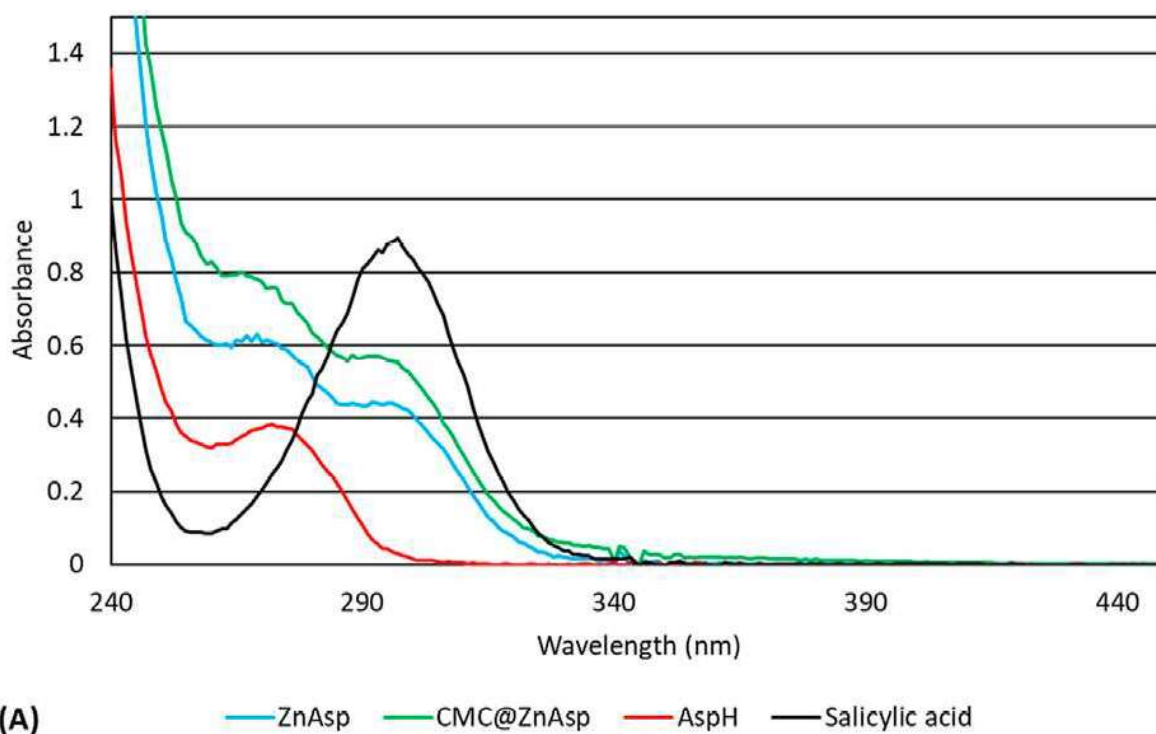
4.1.9. Σταθερότητα μέσω UV/Vis

Μελετήσαμε τη σταθερότητα του ZnAsp, CMC@ZnAsp, της ασπιρίνης και του σαλικυλικού οξέος σε διαφορετικές συνθήκες. Για το λόγο αυτό παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα των ακόλουθων ενώσεων σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις: ZnAsp: 5×10^{-4} M, CMC@ZnAsp: 5×10^{-4} M, Asp: 5×10^{-4} M, SalH₂: 2.5×10^{-4} M.

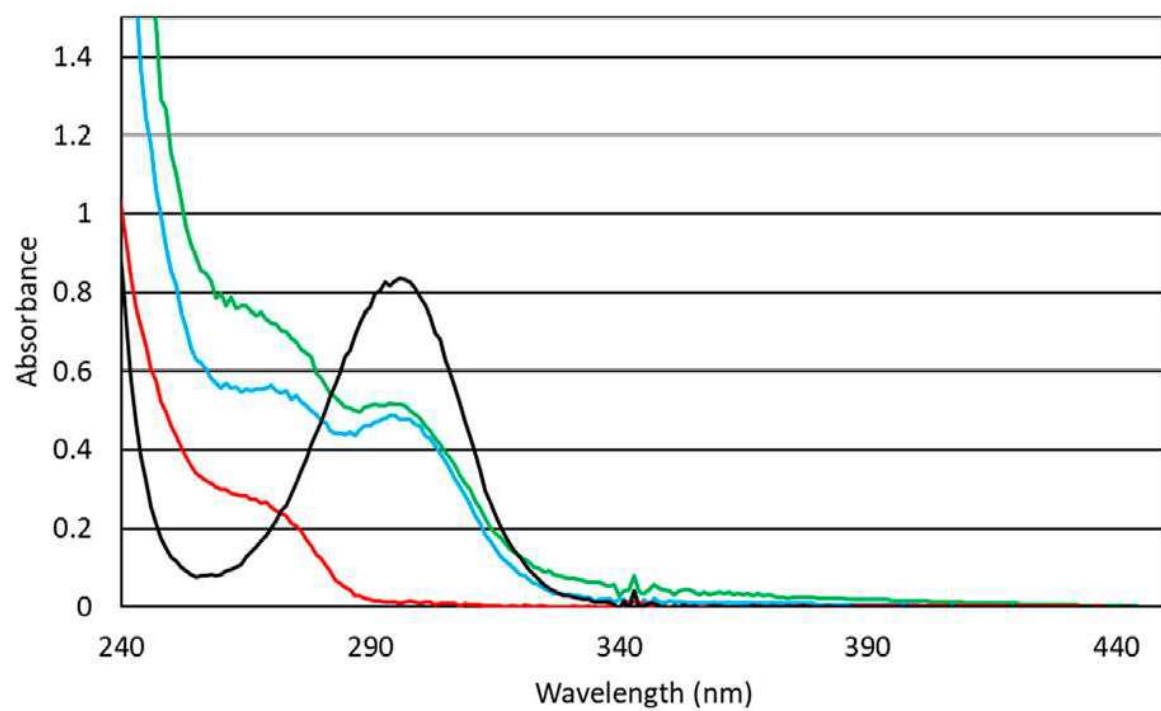
Στην Εικόνα 30-31 τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η δομή του ZnAsp διατηρείται σε διάλυμα, είτε ως ελεύθερο σύμπλοκο είτε όταν διασπείρεται εντός CMC (CMC@ZnAsp).

Ένα παρόμοιο συμπέρασμα προέκυψε όταν τα αντίστοιχα φάσματα καταγράφηκαν σε φυσιολογικό ορό ρυθμισμένο με φωσφορικά άλατα (PBS, pH 7), αντιπροσωπευτικό των συνθηκών κυτταροκαλλιέργειας. Η σταθερότητα αξιολογήθηκε επίσης υπό ήπια όξινες συνθήκες, μιμούμενες το υγιές δέρμα (pH 4.5–5.5), χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου σε pH 5.5.

Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν ότι η δομική ακεραιότητα του συμπλόκου διατηρήθηκε σε όλα τα δοκιμασμένα μέσα, δις-απεσταγμένο νερό (ddH₂O), PBS και ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος-οξικού νατρίου. Η σύνθεση της υδρογέλης CMC@ZnAsp περιλαμβάνει τη διάλυση του ZnAsp σε νερό με την ταυτόχρονη προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας CMC. Η διαδικασία διαρκεί περίπου 3 ώρες. Το φάσμα UV-Vis της υδρογέλης που περιέχει CMC@ZnAsp, που καταγράφηκε μετά από αυτή την περίοδο, είναι πανομοιότυπο με αυτό του ελεύθερου συμπλόκου ZnAsp που καταγράφηκε αμέσως μετά την παρασκευή του.

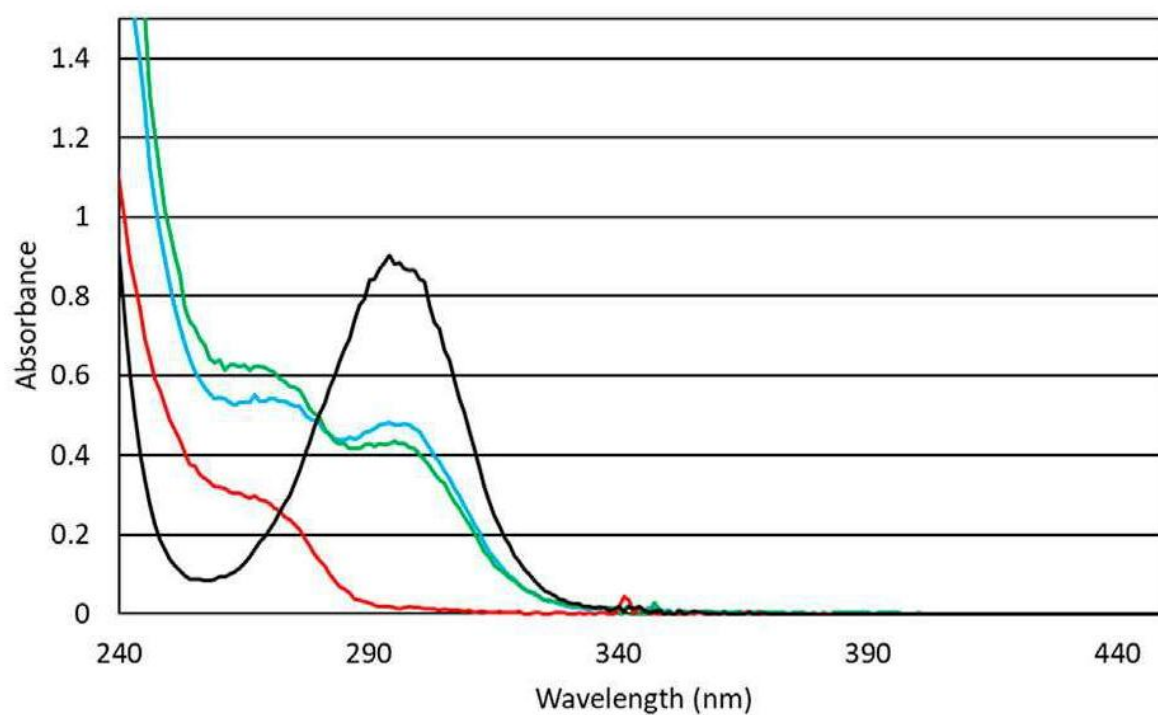


Εικόνα 30. Φάσματα UV/Vis: ZnAsp, CMC@ZnAsp, της ασπιρίνης και του σαλικυλικού οξέος σε ddH₂O (A), PBS (B) και 0.05 M διάλυμα οξικού οξέος-οξικού νατρίου σε pH 5.5 (C).



(B)

— ZnAsp — CMC@ZnAsp — AspH — Salicylic acid



(C)

— ZnAsp — CMC@ZnAsp — AspH — Salicylic acid

Εικόνα 31. Φάσματα UV/Vis: ZnAsp, CMC@ZnAsp, της ασπιρίνης και του σαλικυλικού οξέος σε ddH₂O (A), PBS (B) και 0.05 M διάλυμα οξικού οξέος-οξικού νατρίου σε pH 5.5 (C).

4.1.10. Περίθλαση ακτίνων-X (XRD)

Ο πίνακας 4 παρουσιάζει τις θεμελιώδεις κρυσταλλογραφικές παραμέτρους του συμπλόκου, οι οποίες προέκυψαν από την ανάλυση της περίθλασης ακτίνων-X μονοκρυστάλλου.

- Χημικός Τύπος (Formula): $C_{18}H_{18}O_{10}Zn$. Ο τύπος αυτός αντιστοιχεί στη στοιχειομετρική αναλογία των ατόμων στη μοναδιαία κυψελίδα. Δύο μόρια ασπιρίνης (αφού αποπρωτονιωθεί το καρβοξυλικό οξύ) και δύο μόρια ύδατος συνδέονται με ψευδαργύρο.
- Ομάδα Συμμετρίας (Space Group): $C 2/c$. Αυτή η σήμανση υποδεικνύει ότι η κρυσταλλική δομή ανήκει στο μονοκλινές σύστημα. Το 'C' δηλώνει ότι το πλέγμα είναι βασικό κεντροθετημένο (C-centered), ενώ το '2/c' περιγράφει τις πράξεις συμμετρίας: έναν άξονα διπλής συμμετρίας (2-πλής περιστροφής) και επίπεδο κατοπτρισμού με μετάθεση (glide plane) κάθετο στον άξονα c, με μετατόπιση κατά το μισό του διανύσματος στον άξονα c.
- Διαστάσεις Κυψελίδας (Cell Lengths & Angles):
 - Μήκη: $a=25.353(3) \text{ \AA}$, $b=7.1820(8) \text{ \AA}$, $c=11.1231(13) \text{ \AA}$
 - Γωνίες: $\alpha=90^\circ$, $\beta=108.078(3)^\circ$, $\gamma=90^\circ$. Οι τιμές αυτές επιβεβαιώνουν ότι πρόκειται για μονοκλινές κρυσταλλικό σύστημα, όπου οι δύο γωνίες είναι ορθές και η τρίτη (β) είναι διαφορετική από 90° . Οι αριθμοί σε παρένθεση δηλώνουν την τυπική απόκλιση στην τελευταία μετρούμενη τιμή.
- Όγκος Κυψελίδας (Cell Volume): $1925.37 \text{ \AA}^3$. Αυτός είναι ο συνολικός όγκος της στοιχειώδους κυψελίδας.
- Z: $Z=4$ σημαίνει ότι υπάρχουν τέσσερις (4) μοριακοί τύποι ($C_{18}H_{18}O_{10}Zn$) ανά μοναδιαία κυψελίδα.
- Συντελεστής Αξιοπιστίας (R-factor %): 2.66%. Η τιμή αυτή (ή $R1=0.0266$) είναι ένας δείκτης της ποιότητας της επίλυσης της δομής. Μια τιμή R-factor κάτω του 10% θεωρείται εξαιρετική και υποδηλώνει πολύ υψηλή συμφωνία μεταξύ των πειραματικών δεδομένων περίθλασης και του προτεινόμενου ατομικού μοντέλου.

Πίνακας 4. Κρυσταλλογραφικά δεδομένα.

Formula	$C_{18} H_{18} O_{10} Zn$
Space Group	$C 2/c$
Cell Lengths	a 25.353(3) b 7.1820(8) c 11.1231(13)
Cell Angles	α 90 β 108.078(3) γ 90
Cell Volume	1925.37
Z, Z'	Z : 4 Z' : 0
R-factor (%)	2.66

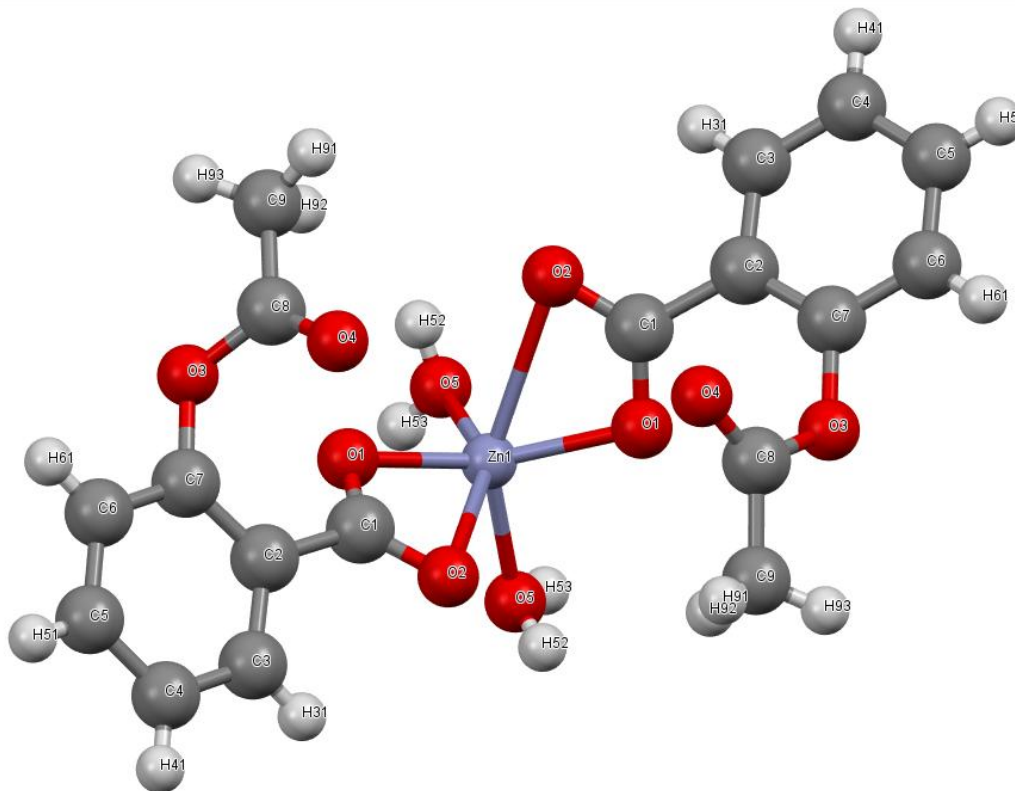
Ο πίνακας 5 παρέχει πληροφορίες για τη γεωμετρία των δεσμών γύρω από το μεταλλικό κέντρο, οι οποίες είναι κρίσιμες για την κατανόηση της χημείας συναρμογής του συμπλόκου.

- Γεωμετρία συναρμογής του ψευδαργύρου:
 - ο Οι δεσμοί Zn-O1 (1.984 Å) και Zn-O5 (2.013 Å) είναι σχετικά κοντοί και ισχυροί, τυπικοί για ομοιοπολικούς δεσμούς συναρμογής μεταξύ ψευδαργύρου και ατόμων οξυγόνου.
 - ο Αντιθέτως, ο δεσμός Zn-O2 (2.528 Å) είναι σημαντικά μακρύτερος και ασθενέστερος.
 - ο Η ταυτόχρονη παρουσία ενός κοντού (Zn-O1) και ενός μακρού (Zn-O2) δεσμού από την ίδια καρβοξυλική ομάδα (όπως επιβεβαιώνεται από τη δομή O1-C1-O2) προς το ίδιο μεταλλικό κέντρο είναι χαρακτηριστική ενός ασύμμετρου διδοντικού τρόπου σύνδεσης. Το καρβοξυλικό άκρο της ασπιρίνης δρα ως χηλικός υποκαταστάτης, όπου το ένα οξυγόνο (O1) συνδέεται ισχυρά, ενώ το άλλο (O2) έχει μια πολύ ασθενέστερη αλληλεπίδραση.
- Χηλικός δακτύλιος και γωνίες:
 - ο Η γωνία O1-Zn-O2 = 56.29° είναι εξαιρετικά οξεία. Αυτή είναι η γωνία δαγκώματος (bite angle) του χηλικού καρβοξυλικού υποκαταστάτη. Η μικρή τιμή της είναι αναμενόμενη, καθώς σχηματίζεται ένας τετραμελής χηλικός δακτύλιος (Zn-O1-C1-O2), ο οποίος από τη φύση του έχει μεγάλη τάση.
 - ο Η γωνία O1-C1-O2 = 121.34° είναι πολύ κοντά στην ιδανική γωνία των 120° για τον sp² υβριδισμένο άνθρακα της καρβοξυλικής ομάδας.
 - ο Οι υπόλοιπες γωνίες γύρω από το ψευδάργυρο, όπως O1-Zn-O5 (98.20°) και O2-Zn-O5 (86.89°), αποκλίνουν σημαντικά από τις ιδανικές γωνίες μιας κανονικής γεωμετρίας (π.χ. 109.5° για τετράεδρο ή 90° για οκτάεδρο). Αυτό αποδεικνύει ότι η σφαίρα συναρμογής του ιόντος ψευδαργύρου παρουσιάζει έντονη παραμόρφωση [70–73].

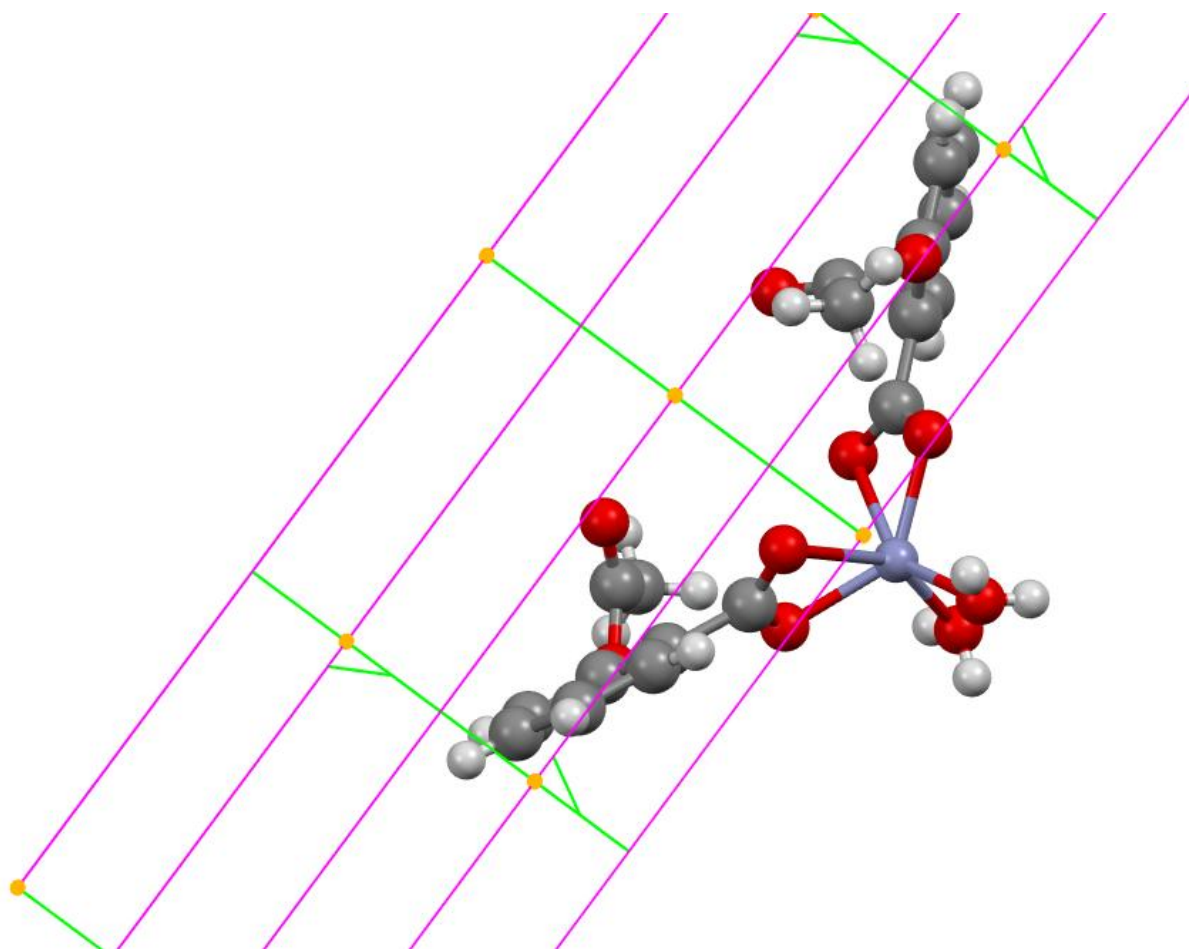
Πίνακας 5. Επιλεγμένα μήκη δεσμών [Å] και γωνίες [°] του συμπλόκου ZnAsp.

Επιλεγμένα μήκη δεσμών [Å]		Επιλεγμένες γωνίες [°]	
Zn-O1	1.984	Zn1-O1-C1	103.54
Zn-O2	2.528	Zn1-O2-C1	78.73
Zn-O5	2.013	O1-Zn1-O2	56.29
C1-O1	1.263(3)	O1-Zn1-O5	98.20
C1-O2	1.240(2)	O2-Zn1-O5	86.89
C1-C2	1.504(3)	O5-Zn1-O5	91.32
O5-H53	0.809	O1-C1-O2	121.34
O5-H52	0.833		

Η δομική ανάλυση αποκαλύπτει ότι το καρβοξυλικό άκρο της ασπιρίνης συνδέεται με το ιόν ψευδαργύρου με έναν ασύμμετρο διδοντικό (χηλικό) τρόπο, σχηματίζοντας έναν τετραμελή δακτύλιο με οξεία γωνία δαγκώματος. Η συνολική γεωμετρία γύρω από το μεταλλικό κέντρο είναι έντονα παραμορφωμένη σε σχέση με τις ιδανικές πολυεδρικές γεωμετρίες.



Εικόνα 32. Κρυσταλλική δομή του ZnAsp.



Εικόνα 33. Στοιχεία συμμετρίας του συμπλόκου ZnAsp.

4.2. Φωτοχημικά πειράματα

4.2.1. Συντελεστής προστασίας από την Υπεριώδη Ακτινοβολία (UPF) του ZnAsp και του CMC@ZnAsp

Η διαπερατότητα είναι το ποσοστό της UV ακτινοβολίας που περνάει μέσα από το δείγμα, ενώ η απορρόφηση και η εξασθένηση είναι το αντίθετο. Όσο χαμηλότερη είναι η διαπερατότητα, τόσο μεγαλύτερη είναι η προστασία από την UV ακτινοβολία.

Από την Εικόνα 34 παρατηρούμε τις χρωματισμένες περιοχές:

1. "χωρίς υλικό" (πορτοκαλί περιοχή):

- Αυτή η περιοχή δείχνει ότι χωρίς κανένα προστατευτικό υλικό, η διαπερατότητα της UV ακτινοβολίας είναι πολύ υψηλή. Στα 290 nm, η διαπερατότητα είναι περίπου 45-50%, και αυξάνεται σταδιακά προς τα 100% καθώς το μήκος κύματος πλησιάζει τα 320 nm. Αυτό υποδηλώνει ότι σχεδόν όλη η UV ακτινοβολία (τόσο UVB όσο και UVA) περνάει, κάτι που είναι αναμενόμενο για την απουσία προστασίας.

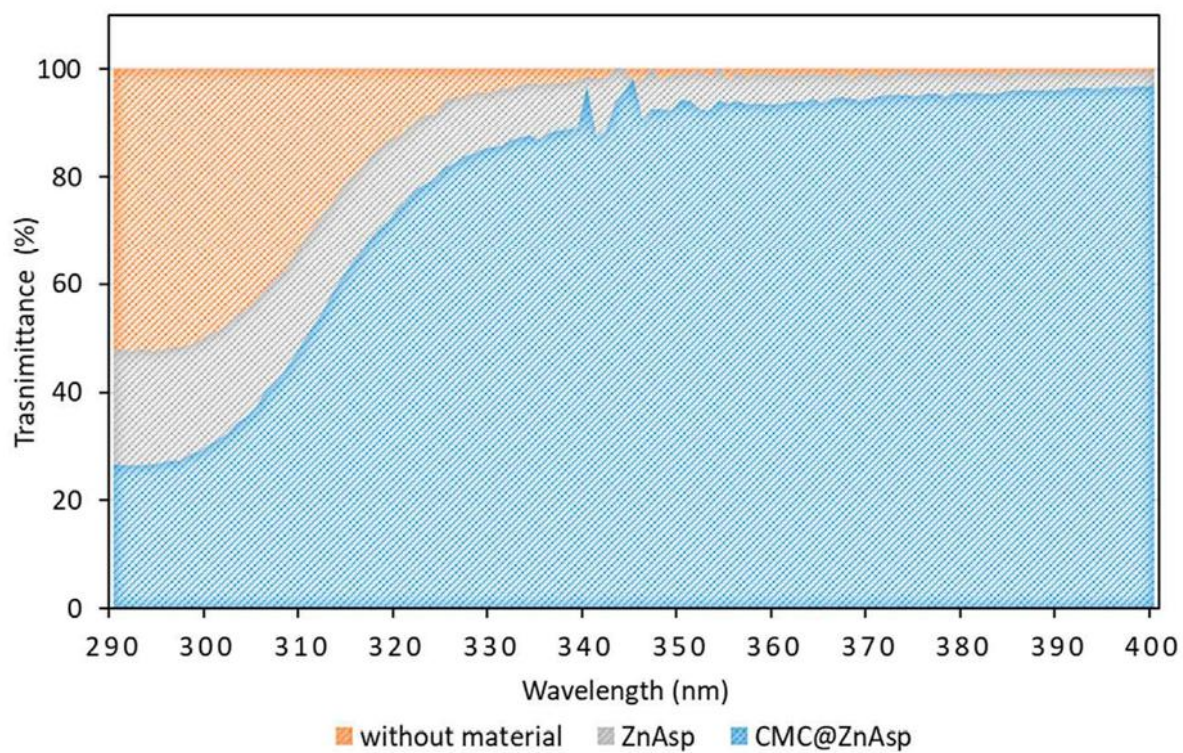
2. "ZnAsp" (γκρι περιοχή):

- Η καμπύλη του ZnAsp δείχνει σημαντική μείωση της διαπερατότητας σε σύγκριση με την περίπτωση "χωρίς υλικό".
- Στην περιοχή UVB (290-320 nm), η διαπερατότητα ξεκινάει από περίπου 25% στα 290 nm και αυξάνεται πιο αργά σε σχέση με την "χωρίς υλικό" καμπύλη, φτάνοντας περίπου το 80% στα 320 nm. Αυτό υποδηλώνει ότι το ZnAsp παρέχει κάποιο επίπεδο προστασίας από την UVB.
- Στην περιοχή UVA (από περίπου 320 nm και μετά), η διαπερατότητα συνεχίζει να αυξάνεται, πλησιάζοντας το 90-95% προς τα 400 nm. Αυτό σημαίνει ότι η προστασία του ZnAsp μειώνεται στην περιοχή της UVA ακτινοβολίας.

3. "CMC@ZnAsp" (μπλε περιοχή):

- Στην περιοχή UVB (290-320 nm), η διαπερατότητα ξεκινά από περίπου 5% στα 290 nm και αυξάνεται σταδιακά, παραμένοντας σημαντικά χαμηλότερη από αυτή του ZnAsp.
- Στην περιοχή UVA (από 320 nm και μετά), όπου το ZnAsp δείχνει μειωμένη προστασία, το CMC@ZnAsp διατηρεί χαμηλότερη διαπερατότητα.

Οι προκύπτουσες τιμές UPF των διαλυμάτων ZnAsp και CMC@ZnAsp ήταν **9.85** και **11.05**, αντίστοιχα. Αυτά τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι η υδρογέλη CMC@ZnAsp παρουσιάζει υψηλότερο UPF σε σύγκριση με το ZnAsp. Επιπλέον, η ενισχυμένη ικανότητα της υδρογέλης να απορροφά και να εξασθενεί την UV ακτινοβολία, αναδεικνύει τη δυνατότητα της για ενσωμάτωση σε σκευάσματα που στοχεύουν στην προστασία από αυτή.

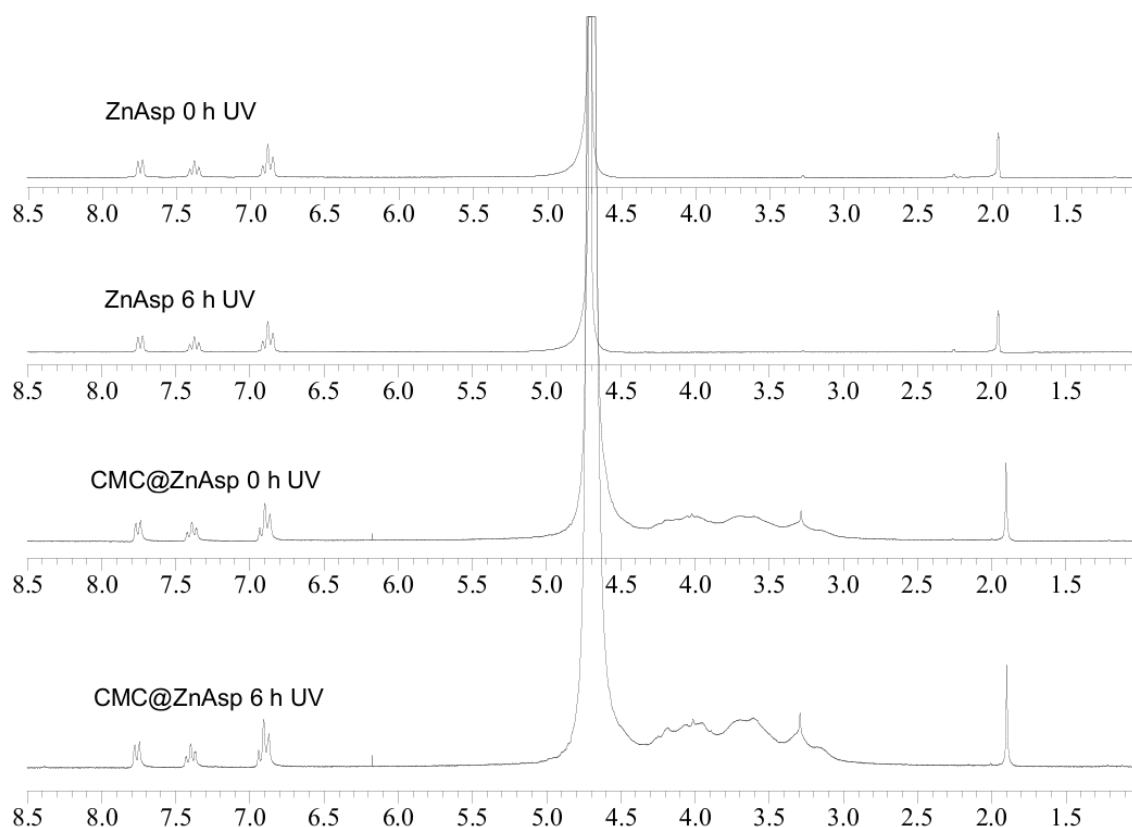


Εικόνα 34. Προσδιορισμός του Παράγοντα Αντιηλιακής Προστασίας (UPF) ως ο λόγος των επιφανειακών εμβαδών χωρίς και με το CMC@ZnAsp και ZnAsp.

4.2.2. Συνεχής φωτόλυση

Η φασματοσκοπία ^1H -NMR είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την παρακολούθηση της σταθερότητας χημικών ενώσεων σε διάλυμα, καθώς είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη σε αλλαγές στην χημική μετατόπιση και το μοτίβο συζεύξεων των πυρήνων υδρογόνου, οι οποίες αντικατοπτρίζουν μεταβολές στο χημικό περιβάλλον.

Από την Εικόνα 35 συμπεραίνουμε ότι δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές μεταξύ των αρχικών φασμάτων των CMC@ZnAsp ή ZnAsp και αυτών που καταγράφηκαν μετά την έκθεση σε UVB, γεγονός που υποδεικνύει ότι τόσο η υδρογέλη CMC@ZnAsp όσο και το σύμπλοκο ZnAsp παραμένουν σταθερά χωρίς να υφίστανται αποδόμηση. Η φωτοσταθερότητα αυτή υποστηρίζει τη δυνητική τους χρήση σε υδρογέλες με φωτοπροστατευτική δράση.



Εικόνα 35. Φάσμα ^1H -NMR του ZnAsp και της υδρογέλης CMC@ZnAsp σε D_2O στις 0 ώρες και μετά από 6 ώρες έκθεσης σε ακτινοβολία UVB.

4.3. Αντιμικροβιακή μελέτη

4.3.1. Προσδιορισμός ζώνης αναστολής (IZ)

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η αντιβακτηριακή δράση του συμπλόκου, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διάχυσης σε δισκίο με άγαρ έναντι των *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* και *E. coli*.

Τα βακτήρια ανάλογα με τη διάμετρο της αναπτυγμένης ζώνης αναστολής ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες. Συγκεκριμένα, χαρακτηρίζονται ως:

ευαίσθητα όταν $IZ \geq 17$ mm

ενδιάμεσα όταν $13 \text{ mm} \leq IZ \leq 16 \text{ mm}$

ανθεκτικά όταν το IZ είναι ≤ 12 mm [74]

Παρατηρώντας λοιπόν τις ζώνες αναστολής, τα Gram θετικά βακτήρια *S. aureus* και *S. epidermidis* είναι ανθεκτικά απέναντι στην ένωση ZnAsp. Όσο για τα Gram αρνητικά, η *P. aeruginosa* είναι ανθεκτική και η *E. coli* είναι ενδιάμεση. Τόσο η ασπιρίνη, όσο και το ZnO δεν παρουσιάζουν καμία ανασταλτική δράση, όπως εκτιμήθηκε μέσω των ζωνών αναστολής.

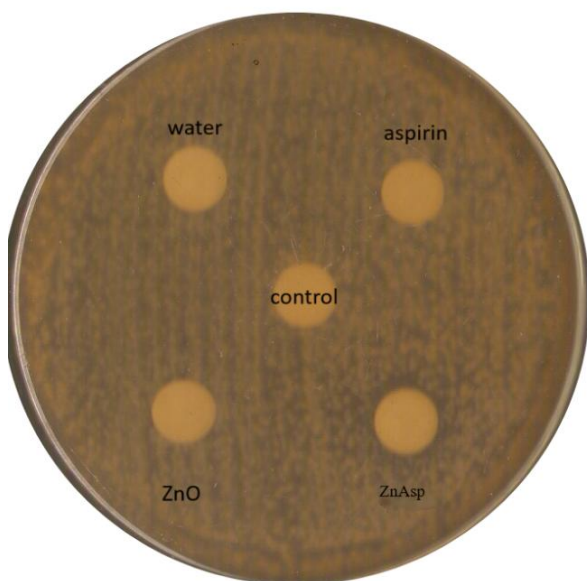
Στην περίπτωση των υδρογελών CMC@ZnAsp, τα Gram θετικά βακτήρια *S. aureus* και *S. epidermidis* είναι ανθεκτικά. Στα Gram αρνητικά, η *P. aeruginosa* είναι ενδιάμεση ενώ η *E. coli* είναι ευαίσθητη. Ξανά, οι υδρογέλες CMC@aspirin και CMC@ZnO δεν παρουσιάζουν καμία ανασταλτική δράση, όπως εκτιμήθηκε μέσω των ζωνών αναστολής.

Πίνακας 6. Ζώνες αναστολής (IZ) για τα ZnAsp, aspirin και ZnO.

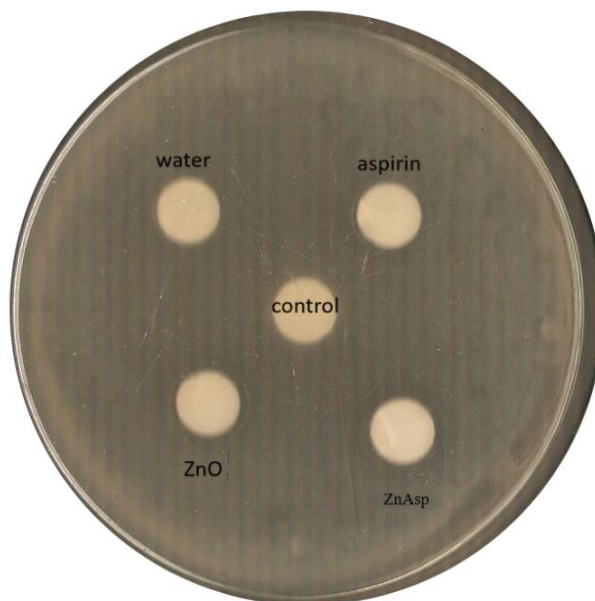
Ένωση	Gram θετικά		Gram αρνητικά	
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
IZ (mm)				
ZnAsp 10^{-2} M	9	9	11.3 ± 0.5	13.6 ± 1.5
Aspirin	9	9	9	9
ZnO	9	9	9	9

Πίνακας 7. Ζώνες αναστολής (IZ) για τα CMC@ZnAsp, CMC@aspirin και CMC@ZnO.

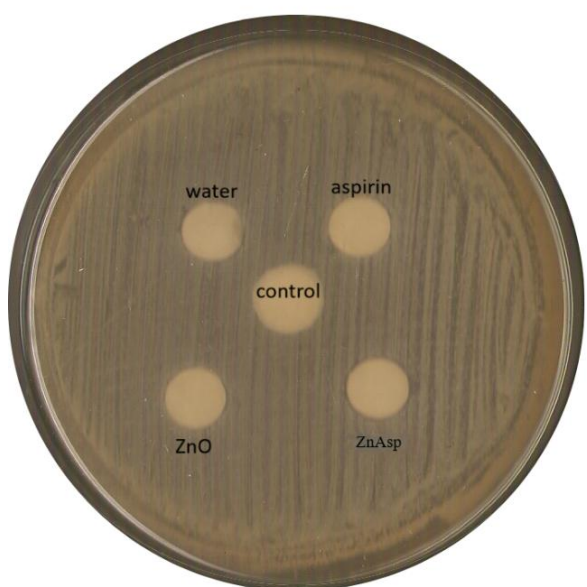
Ένωση	Gram θετικά		Gram αρνητικά	
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
IZ (mm)				
CMC@ZnAsp 10^{-2} M	12.6 ± 1.5	12 ± 1.7	13 ± 1	22 ± 2.6
CMC@aspirin	10	10	10	10
CMC@ZnO	10	10	10	10



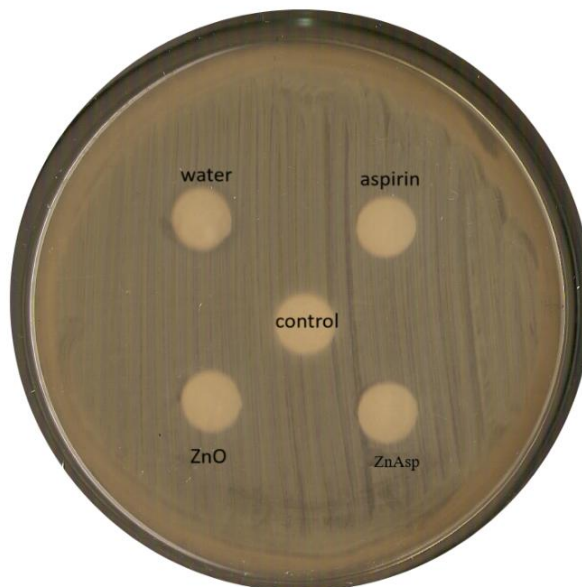
E. coli



P. aeruginosa

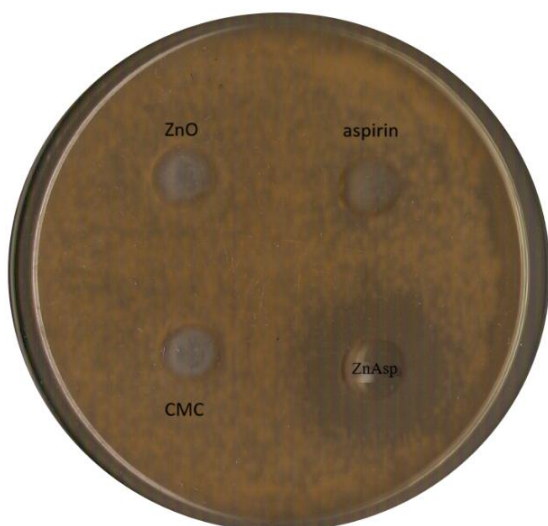


S. aureus

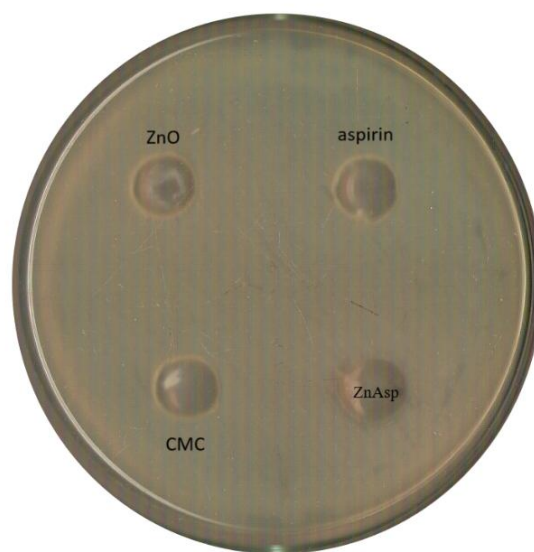


S. epidermidis

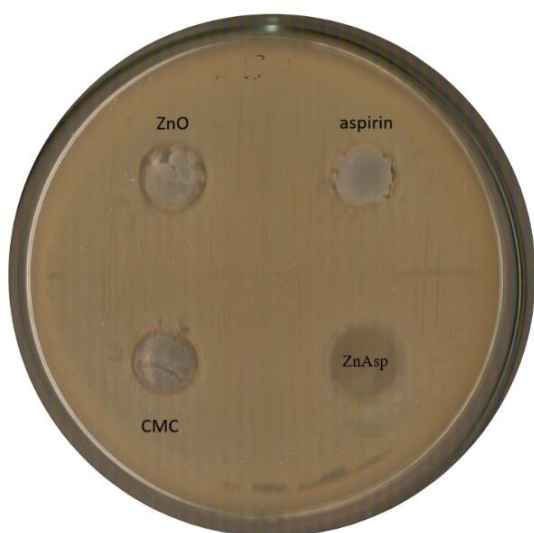
Εικόνα 36. Ζώνες αναστολής (IZ) για τα ZnAsp, aspirin και ZnO.



E. coli



P. aeruginosa



S. aureus



S. epidermidis

Εικόνα 37. Ζώνες αναστολής (IZ) για τα CMC@ZnAsp, CMC@aspirin και CMC@ZnO.

4.3.2. Προσδιορισμός ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC)

Η αντιβακτηριακή αποτελεσματικότητα του ZnAsp καθώς και του CMC@ZnAsp αξιολογήθηκε επίσης από τις τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) έναντι των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων *E. coli* και *P. aeruginosa* και των θετικών κατά Gram βακτηρίων *S. aureus* και *S. epidermidis* κατά την επώασή τους για 20 ώρες.

Από τα αποτελέσματα των MIC προκύπτει ότι η ZnAsp εμφανίζει τη χαμηλότερη ανασταλτική συγκέντρωση έναντι όλων των βακτηριακών στελεχών σε σύγκριση με το σύμπλοκο CMC@ZnAsp και το ZnO, υποδεικνύοντας υψηλότερη αντιβακτηριακή δράση. Η δράση της είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική έναντι του *E. coli* ($472 \pm 85 \mu\text{M}$), ενώ διατηρεί χαμηλές τιμές MIC και έναντι των Gram-θετικών (*S. aureus*: $1582 \pm 326 \mu\text{M}$, *S. epidermidis*: $1600 \pm 427 \mu\text{M}$) και του *P. aeruginosa* ($1602 \pm 471 \mu\text{M}$).

Αντιθέτως, το σύμπλοκο CMC@ZnAsp παρουσιάζει υψηλότερες τιμές MIC σε όλα τα στελέχη, γεγονός που πιθανώς οφείλεται σε μειωμένη διαθεσιμότητα της δραστικής ZnAsp λόγω της επικάλυψης με CMC. Παρόλα αυτά, οι τιμές παραμένουν σε σχετικά χαμηλά επίπεδα για Gram-αρνητικά (*E. coli*: $2235 \pm 279 \mu\text{M}$, *P. aeruginosa*: $6022 \pm 536 \mu\text{M}$) και για Gram-θετικά (*S. aureus*: $4797 \pm 571 \mu\text{M}$, *S. epidermidis*: $4893 \pm 363 \mu\text{M}$).

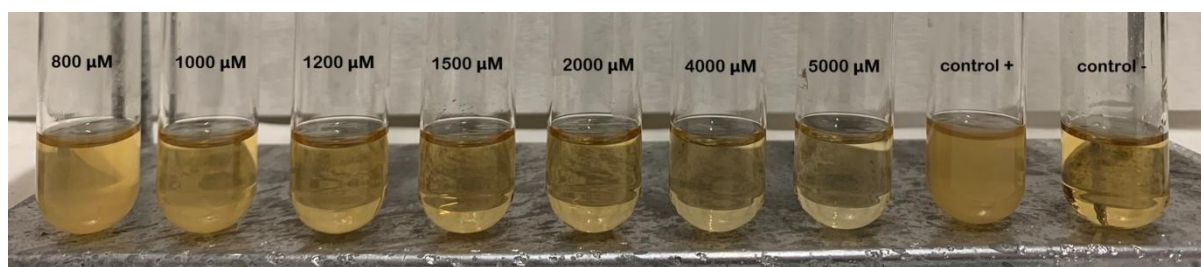
Τέλος, το ZnO παρουσιάζει τις υψηλότερες τιμές MIC, ιδίως έναντι των Gram-αρνητικών (*P. aeruginosa*: $8000\text{--}32000 \mu\text{M}$, *E. coli*: $4000\text{--}8000 \mu\text{M}$), ενώ έναντι των Gram-θετικών (*S. aureus*, *S. epidermidis*) οι τιμές κυμαίνονται σε $2000\text{--}4000 \mu\text{M}$, καθιστώντας το λιγότερο αποτελεσματικό σε σύγκριση με τη ZnAsp[75].

Συνολικά, τα δεδομένα αναδεικνύουν τη ZnAsp ως την πιο δραστική ένωση έναντι όλων των βακτηριακών στελεχών, με σημαντικά χαμηλότερες τιμές MIC συγκριτικά με το σύμπλοκο CMC@ZnAsp και το ZnO.

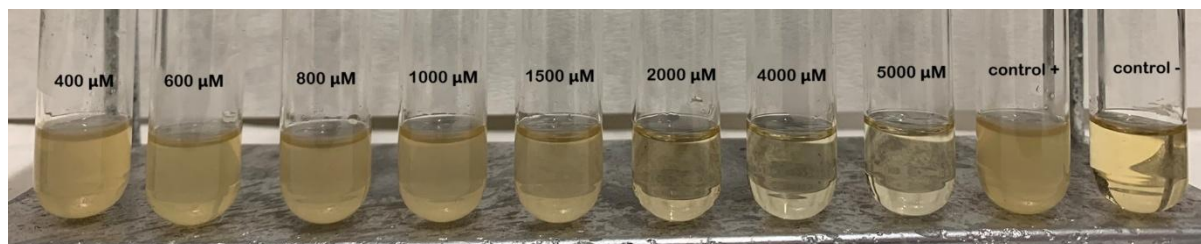
Πίνακας 8. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) των ZnAsp, CMC@ZnAsp και ZnO.

Ένωση	Gram θετικά		Gram αρνητικά	
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
MIC (μM)				
ZnAsp	1582±326	1600±427	1602±471	472±85
CMC@ZnAsp	4797±571	4893±363	6022±536	2235±279
ZnO	2000-4000	2000-4000	8000-32000	4000-8000

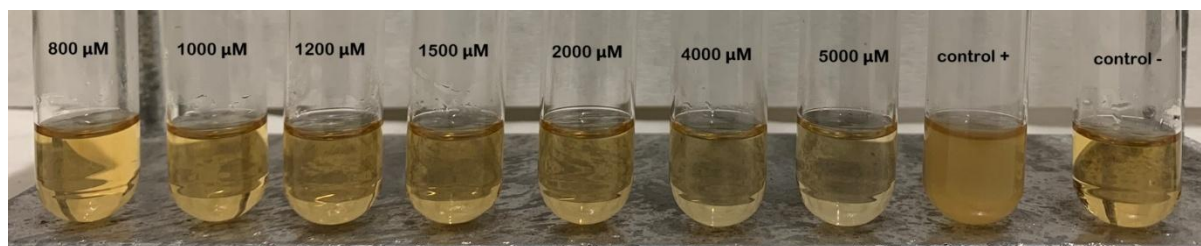
S. aureus



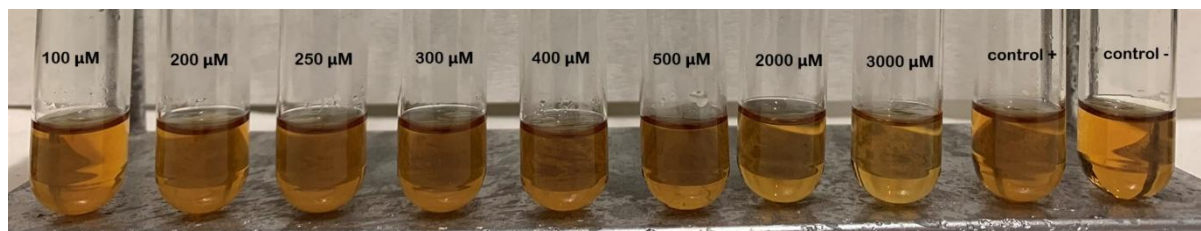
S. epidermidis



P. aeruginosa



E. coli



Εικόνα 38. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) του ZnAsp.

4.3.3. Προσδιορισμός ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (MBC)

Η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) της ένωσης ZnAsp προσδιορίστηκε έναντι τεσσάρων βακτηριακών στελεχών, δύο Gram-θετικών (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) και δύο Gram-αρνητικών (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*). Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα του Πίνακα 9, η τιμή της MBC ανέρχεται στα 4000 μM για τα στελέχη *S. aureus*, *S. epidermidis* και *P. aeruginosa*, ενώ για το στέλεχος *E. coli* η τιμή είναι χαμηλότερη, στα 2000 μM . Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει αυξημένη ευαισθησία της *E. coli* στη ZnAsp συγκριτικά με τα υπόλοιπα στελέχη.

Περαιτέρω αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης πραγματοποιήθηκε μέσω του λόγου MBC/MIC, ο οποίος χρησιμοποιείται για τη διάκριση μεταξύ βακτηριοστατικής και βακτηριοκτόνου δράσης. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, τιμές $\text{MBC/MIC} \leq 2$ υποδηλώνουν βακτηριοκτόνο δράση, ενώ τιμές $\text{MBC/MIC} \geq 4$ χαρακτηρίζουν βακτηριοστατική συμπεριφορά της ένωσης[76].

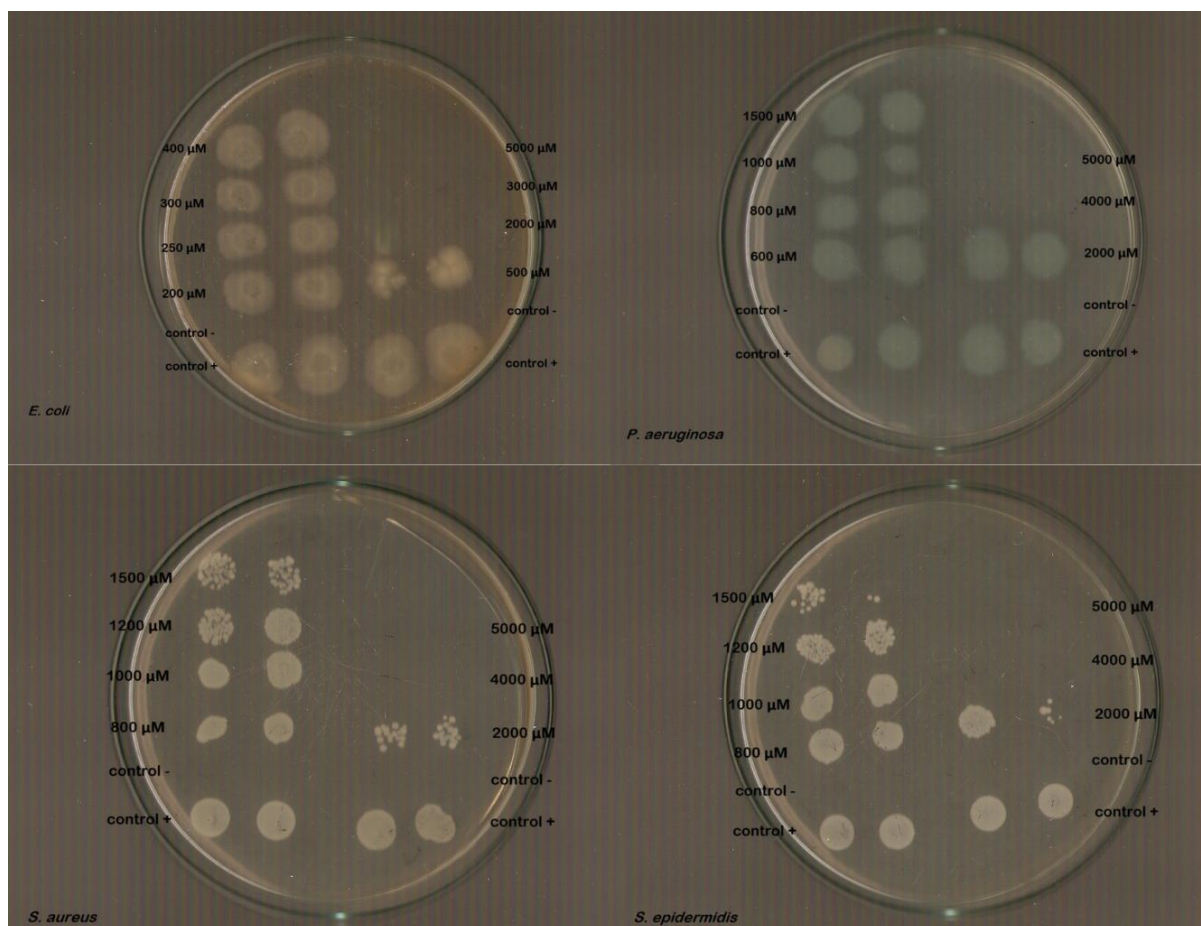
Οι τιμές του λόγου MBC/MIC που παρατηρήθηκαν για τα στελέχη *S. aureus* (2.52), *S. epidermidis* (2.5) και *P. aeruginosa* (2.49) επιβεβαιώνουν οριακή βακτηριοκτόνο δράση της ZnAsp έναντι αυτών των μικροοργανισμών. Αντιθέτως, για το στέλεχος *E. coli*, ο λόγος ανέρχεται σε 4.23, γεγονός που υποδηλώνει βακτηριοστατική δράση.

Για τα γνωστά αντιβιοτικά:

- Tetracycline, οι λόγοι MBC/MIC είναι: *S. aureus* (7.57), *S. epidermidis* (4.53), *P. aeruginosa* (3.21) και *E. coli* (26.6)[77].
- Gentamicin, οι λόγοι MBC/MIC είναι: *S. aureus* (1), *S. epidermidis* (1) και *E. coli* (1)[78].
- Ciprofloxacin, οι λόγοι MBC/MIC είναι: *S. aureus* (1.53), *S. epidermidis* (1.72), *P. aeruginosa* (1.22) και *E. coli* (2.82)[79].

Πίνακας 9. Ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) του ZnAsp.

Ένωση	Gram θετικά		Gram αρνητικά	
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
MBC (μM)				
ZnAsp	4000	4000	4000	2000
MBC/MIC				
ZnAsp	2.52	2.5	2.49	4.23



Εικόνα 39. Ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) του ZnAsp.

4.3.4. In vitro τοξικότητα έναντι Αθάνατων Ανθρώπινων Κερατινοκυττάρων (HaCaT)

Η τοξικότητα αξιολογήθηκε σε κύτταρα HaCaT χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία σουλφοροδαμίνης Β (SRB). Τα κύτταρα επώαστηκαν με ZnAsp και CMC@ZnAsp για 48 ώρες.

Οι τιμές IC_{50} για το CMC@ZnAsp και το ZnAsp ήταν $80.0 \pm 2.4 \mu M$ και $83.3 \pm 2.4 \mu M$ αντίστοιχα. Μετά από ακτινοβολήση με φως UVB για 6 ώρες, οι τιμές IC_{50} ήταν $72.6 \pm 0.8 \mu M$ και $84.4 \pm 2.1 \mu M$ για το ακτινοβολημένο CMC@ZnAsp και ZnAsp αντίστοιχα.

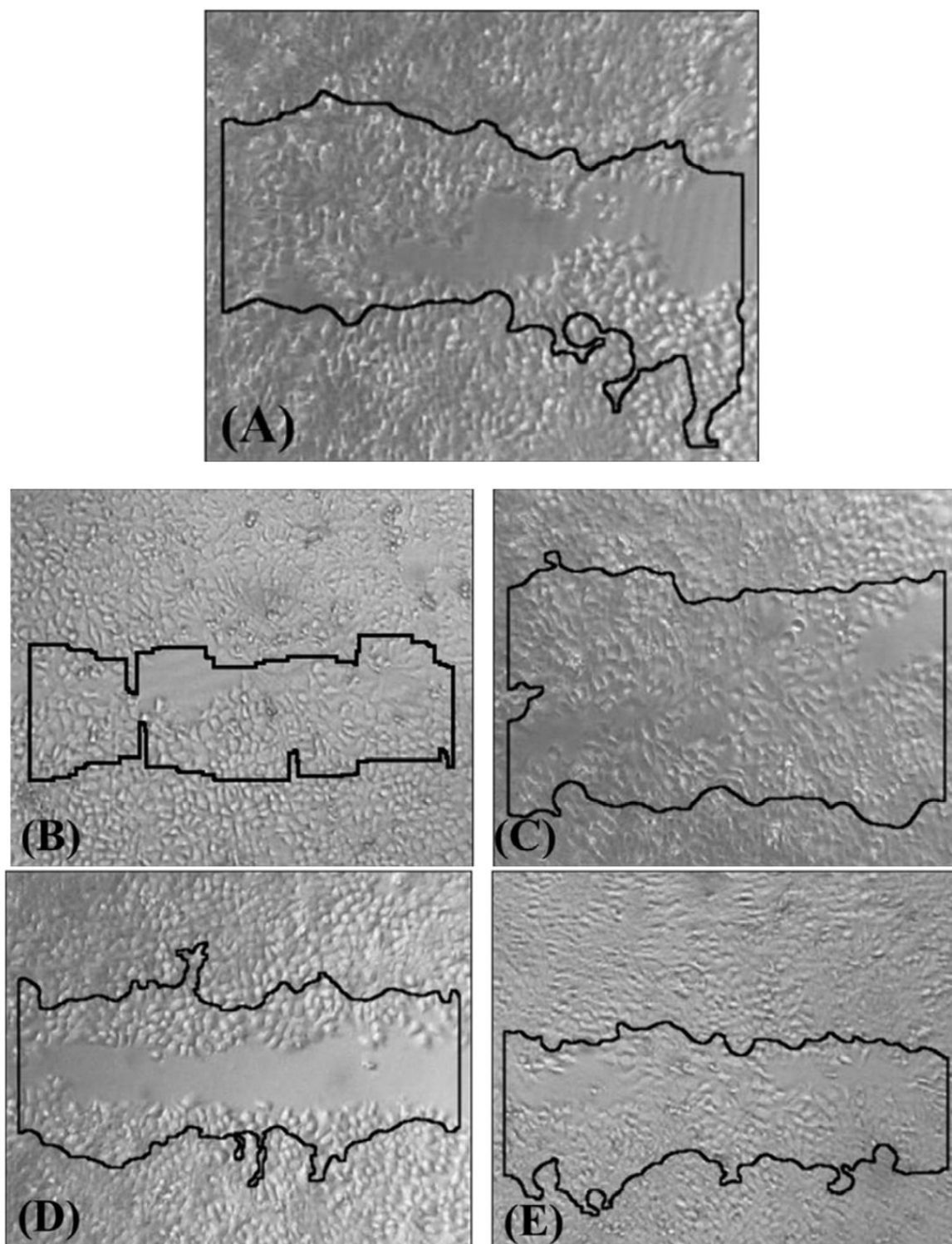
Αυτό υποδηλώνει παρόμοια επίπεδα τοξικότητας και καλή φωτοσταθερότητα, με χαμηλή κυτταροτοξικότητα για την υδρογέλη και το δραστικό συστατικό της.

Αναφορικά, οι τιμές IC_{50} για το ZnO είναι $420 \mu M$ [80] και το σαλικυλικό οξύ $>60 \mu M$ [20].

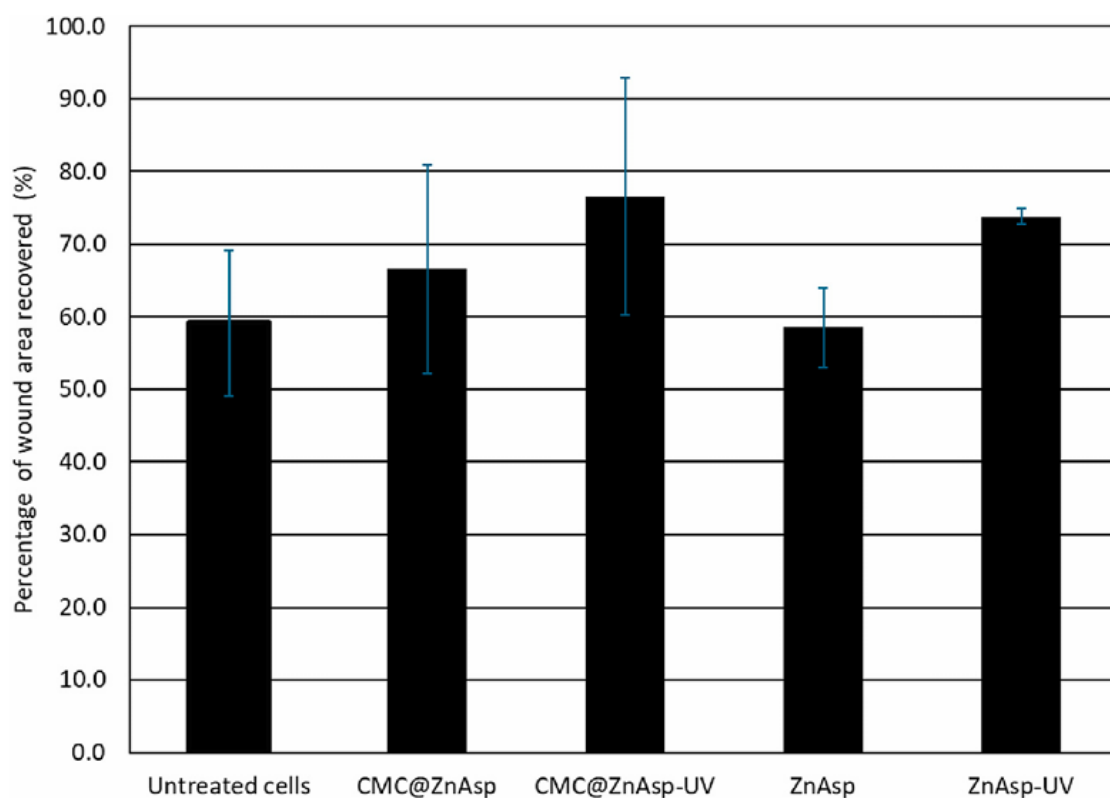
4.3.5. Μετανάστευση Κερατινοκυττάρων στο περιθώριο πληγής με in vitro δοκιμασία γρατζουριάς (Scratch Wound Assay)

Η δοκιμασμένη συγκέντρωση των $50 \mu M$ μπορεί να θεωρηθεί μη κυτταροτοξική, καθώς η βιωσιμότητα των κυττάρων σε αυτό το επίπεδο υπερβαίνει το 70%. Σύμφωνα με το FDA ISO 10993-5 που ρυθμίζει την "Βιολογική αξιολόγηση ιατροτεχνολογικών προϊόντων - Μέρος 5: Δοκιμές για in vitro κυτταροτοξικότητα", εάν το ποσοστό βιωσιμότητας είναι υψηλότερο από 70% μετά από θεραπεία με έναν παράγοντα, αυτός ο παράγοντας θεωρείται μη κυτταροτοξικός.

Μετά από 48 ώρες επώασης, το RWA % ήταν 59.1% στα μη επεξεργασμένα κερατινοκύτταρα, αντίθετα με 66.7% του CMC@ZnAsp, και 76.5% του ακτινοβολημένου CMC@ZnAsp, 58.6% του ZnAsp, και 73.8% του ακτινοβολημένου ZnAsp, υποδηλώνοντας ότι το CMC@ZnAsp και το ZnAsp καθώς και τα αντίστοιχα τους δείχνουν ιδιότητες επούλωσης πληγών στα κύτταρα HaCaT μετά από 48 ώρες επώασης σε συγκέντρωση $50 \mu M$.



Εικόνα 40. Επούλωση πληγών κυττάρων HaCaT στις 48 ώρες, σε σχέση με την αρχική πληγή (0 ώρες, συνεχής γραμμή). (A) σε ανεπεξέργαστα κύτταρα, (B) CMC@ZnAsp, (C) ακτινοβολημένο CMC@ZnAsp, (D) ZnAsp και (E) ακτινοβολημένο ZnAsp στα 50 μ M.



Εικόνα 41. Ιστόγραμμα που δείχνει το ποσοστό RWA (%) μη επεξεργασμένων και επεξεργασμένων κυττάρων με CMC@ZnAsp ή ZnAsp πριν και μετά την ακτινοβολή στα 50 μ M μετά από 48 ώρες επώασης.

4.3.6. Αντιφλεγμονώδης δράση με δοκιμασία μετουσίωσης αλβουμίνης

Η αντιφλεγμονώδης δράση αξιολογήθηκε *in vitro* χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία μετουσίωσης αλβουμίνης, η οποία μετρά την αναστολή της μετουσίωσης πρωτεϊνών.

Η τιμή IC₅₀ της δικλοφενάκης (δηλαδή η συγκέντρωση που απαιτείται για να ανασταλεί κατά 50% η αποδιάταξη της αλβουμίνης του αυγού) βρέθηκε 2.45±0.50 mM.

Το ZnAsp επέδειξε ισχυρότερη αντιφλεγμονώδη δράση από τη δικλοφενάκη, με υπολογιζόμενη τιμή IC₅₀ 1.96±0.26 mM.

4.3.7. Μελέτη της *in vivo* τοξικότητας με τη μέθοδο γαρίδας άλμης (*Artemia salina* assay)

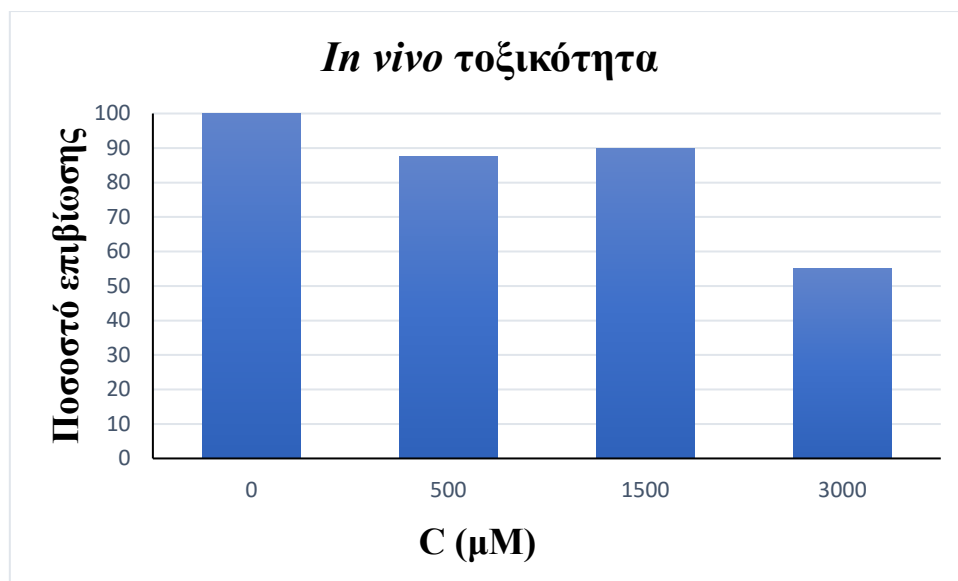
Η τοξικότητα της ένωσης ZnAsp αξιολογήθηκε με βιοδοκιμασία σε *Artemia salina*, μέσω καταμέτρησης ζώντων και μη ζώντων οργανισμών μετά από έκθεση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (500, 1500 και 3000 μM). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στις συγκεντρώσεις 500 και 1500 μM, το ποσοστό επιβίωσης παρέμεινε υψηλό (87,5% και 90% αντίστοιχα), υποδεικνύοντας χαμηλή οξεία τοξικότητα της ένωσης στις εν λόγω δόσεις.

Αντιθέτως, στη συγκέντρωση 3000 μM, το ποσοστό επιβίωσης μειώθηκε σημαντικά στο 55%, γεγονός που υποδηλώνει αυξημένη τοξικότητα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Η απουσία θνησιμότητας στον αρνητικό μάρτυρα (100% επιβίωση) επιβεβαιώνει την καταλληλότητα του πειράματος και αποδίδει την παρατηρούμενη τοξική δράση αποκλειστικά στη ZnAsp.

Συνολικά, τα αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι η ZnAsp παρουσιάζει ασφαλές προφίλ τοξικότητας έναντι της *A. salina* έως και τα 1500 μM (MIC), ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις απαιτείται προσοχή λόγω αυξημένης επίδρασης στην επιβίωση των οργανισμών.

Πίνακας 10. Ποσοστό βιωσιμότητας *Artemia salina* μετά από έκθεση 24 ωρών στο σύμπλοκο ZnAsp.

Συγκέντρωση	Ποσοστό επιβίωσης
Control	100.00%
500 μM	87.50%
1500 μM	90.00%
3000 μM	55.00%



Εικόνα 42. Γραφική απεικόνιση ποσοστού επιβίωσης προνυμφών *Artemia Salina* κατά την μελέτη της *in vivo* τοξικότητας.

Τα ποσοστά επιβίωσης (%) των προνυμφών της *A. salina* αξιολογήθηκαν και στην υδρογέλη CMC@ZnAsp σε συγκέντρωση 50 μM , η οποία αντιστοιχεί στη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της μετανάστευσης των κερατινοκυττάρων στη δοκιμή *in vitro* επούλωσης πληγών με γρατζουνιά.

Επιπλέον, υψηλότερες συγκεντρώσεις 90, 180 και 360 μM δοκιμάστηκαν μετά από περίοδο επώασης 24 ωρών. Δεν παρατηρήθηκε τοξικότητα ακόμη και μετά την ακτινοβολήση τόσο του συμπλόκου όσο και της υδρογέλης.

Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή επιχείρησε την ανάπτυξη και ολοκληρωμένη αξιολόγηση ενός καινοτόμου συμπλόκου ψευδαργύρου με ακετυλοσαλικυλικό οξύ (ZnAsp) και της ενσωμάτωσής του σε υδρογέλη καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης (CMC), με στόχο την αντιμετώπιση της αυξανόμενης μικροβιακής αντοχής και της αποτελεσματικής διαχείρισης φλεγμονωδών καταστάσεων και επούλωσης τραυμάτων.

Το σύμπλοκο ZnAsp συντέθηκε επιτυχώς και χαρακτηρίστηκε πλήρως μέσω ποικίλων φυσικοχημικών και φασματοσκοπικών μεθόδων (XRD, ATR-FTIR, UV-Vis, ¹H-NMR, XRF), επιβεβαιώνοντας τη δομή του και τις ιδιότητές του. Η ενσωμάτωση του συμπλόκου σε μήτρα υδρογέλης CMC πραγματοποιήθηκε με επιτυχία, δημιουργώντας ένα σύστημα κατάλληλο για τοπικές εφαρμογές.

Το σύμπλοκο ZnAsp και η υδρογέλη του επέδειξαν αντιμικροβιακή δράση έναντι ευρέος φάσματος παθογόνων βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* και *Staphylococcus aureus*. Αυτό υπογραμμίζει τις δυνατότητές τους στην καταπολέμηση των λοιμώξεων και ειδικότερα της μικροβιακής αντοχής.

Οι μελέτες τοξικότητας, τόσο *in vivo* (δοκιμασία *Artemia salina*) όσο και *in vitro* (σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα HaCaT), ανέδειξαν ένα ευνοϊκό προφίλ ασφαλείας για το ZnAsp και την υδρογέλη του. Αυτό είναι κρίσιμο για την πιθανή κλινική τους εφαρμογή, διασφαλίζοντας την ασφάλεια χρήσης.

Πέρα από την αντιμικροβιακή δράση, διερευνήθηκαν και άλλες σημαντικές βιολογικές ιδιότητες όπως:

- **Φωτοπροστατευτική ικανότητα:** Αξιολογήθηκε μέσω του δείκτη UPF, αναδεικνύοντας τη δυνατότητα προστασίας από την υπεριώδη ακτινοβολία.
- **Αντιφλεγμονώδης δράση:** Επιδείχθηκε μέσω της δοκιμασίας μετουσίωσης αλβουμίνης.
- **Επουλωτική δράση:** Διερευνήθηκε μέσω της δοκιμασίας κυτταρικής μετανάστευσης (scratch wound assay).

Συμπερασματικά, τα ευρήματα της παρούσας διατριβής υποδεικνύουν ότι το σύμπλοκο ZnAsp και η υδρογέλη του παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες, όπως αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη, φωτοπροστατευτική και επουλωτική δράση, σε συνδυασμό με ευνοϊκό προφίλ ασφαλείας. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν την ένδειξη ότι οι συγκεκριμένες ενώσεις θα μπορούσαν να αποτελέσουν αντικείμενο περαιτέρω μελέτης, με στόχο τη διερεύνηση της πιθανής εφαρμογής τους σε νέες θεραπευτικές στρατηγικές για λοιμώξεις, φλεγμονές και τραύματα του δέρματος.

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Nii-Trebi NI. Emerging and Neglected Infectious Diseases: Insights, Advances, and Challenges. *Biomed Res Int*; 2017. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.1155/2017/5245021.
- [2] Tortora G, Funke B, Case C. *Microbiology : Make the Connection Between Lecture , Lab , and the Real World*. 2013.
- [3] Michael T. Madigan, John M. Martinko, David A. Stahl DPC-B. *Biology of Microorganisms*.
- [4] Dörr T, Moynihan PJ, Mayer C. Editorial: Bacterial Cell Wall Structure and Dynamics. *Front Microbiol* 2019; 10: 4–7.
- [5] Mark Gladwin BT. *Clinical Microbiology Made Ridiculously Simple*. DOI: 10.1055/s-0029-1192888.
- [6] Biology B, Microbes O. Basic Biology of Oral Microbes. *Atlas Oral Microbiol* 2015; 1–14.
- [7] Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: Lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* 2000; 2: 1051–1060.
- [8] Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, et al. *Escherichia coli* in Europe: An overview. *Int J Environ Res Public Health* 2013; 10: 6235–6254.
- [9] Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7: 629–641.
- [10] Kourtis AP, Hatfield ; Kelly, Baggs J, et al. Morbidity and Mortality Weekly Report Vital Signs: Epidemiology and Recent Trends in Methicillin-Resistant and in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections-United States. *Morb Mortal Wkly Rep* 2017; 68: 214–219.
- [11] Dong Y, Speer CP, Glaser K. Beyond sepsis: *Staphylococcus epidermidis* is an underestimated but significant contributor to neonatal morbidity. *Virulence* 2018; 9: 621–633.
- [12] Lee JYH, Monk IR, Gonçalves da Silva A, et al. Global spread of three multidrug-resistant lineages of *Staphylococcus epidermidis*. *Nat Microbiol* 2018; 3: 1175–1185.
- [13] Green ER, Mecsas J. Bacterial secretion systems: An overview. *Virulence Mech Bact Pathog* 2016; 213–239.
- [14] Andersson DI, Hughes D. Selection and transmission of antibiotic-resistant bacteria. *Microb Transm* 2019; 117–137.
- [15] Chakraborty N, Jha D, Roy I, et al. Nanobiotics against antimicrobial resistance: harnessing the power of nanoscale materials and technologies. *J Nanobiotechnology* 2022; 20: 1–25.
- [16] Zhang C, Sun R, Xia T. Adaption/resistance to antimicrobial nanoparticles: Will it be a problem? *Nano Today* 2020; 34: 100909.
- [17] Asenjo A, Oteo-Iglesias J, Alós J-I. What’s new in mechanisms of antibiotic resistance in bacteria of clinical origin? *Enfermedades Infecc y Microbiol Clin (English ed)* 2021; 39: 291–299.

- [18] Mühlberg E, Umstätter F, Kleist C, et al. Renaissance of vancomycin: Approaches for breaking antibiotic resistance in multidrug-resistant bacteria. *Can J Microbiol* 2020; 66: 11–16.
- [19] Furman D, Campisi J, Verdin E, et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med* 2019; 25: 1822–1832.
- [20] Stathopoulou MEK, Banti CN, Kourkoumelis N, et al. Silver complex of salicylic acid and its hydrogel-cream in wound healing chemotherapy. *J Inorg Biochem* 2018; 181: 41–55.
- [21] Guo S, DiPietro LA. Critical review in oral biology & medicine: Factors affecting wound healing. *J Dent Res* 2010; 89: 219–229.
- [22] Van Dyke TE, Sima C. Understanding resolution of inflammation in periodontal diseases: Is chronic inflammatory periodontitis a failure to resolve? *Periodontol 2000* 2020; 82: 205–213.
- [23] Koutsaliaris IK, Moschonas IC, Pechlivani LM, et al. Inflammation, Oxidative Stress, Vascular Aging and Atherosclerotic Ischemic Stroke. *Curr Med Chem* 2021; 29: 5496–5509.
- [24] Misra S, Hascall VC, Markwald RR, et al. Inflammation and Cancer. *Wound Heal Stem Cells Repair Restorations, Basic Clin Asp* 2018; 1: 239–274.
- [25] Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, et al. Wound healing: A cellular perspective. *Physiol Rev* 2019; 99: 665–706.
- [26] Krzyszczyk P, Schloss R, Palmer A, et al. The role of macrophages in acute and chronic wound healing and interventions to promote pro-wound healing phenotypes. *Front Physiol* 2018; 9: 1–22.
- [27] D’Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, et al. UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 12222–12248.
- [28] Kumari R, Joshi S, Upasani VN, et al. Applications of Algae in Cosmetics: An Overview. *Int J Innov Res Sci*; 7. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.15680/IJIRSET.2018.0702038.
- [29] Wong RSY. Role of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) in Cancer Prevention and Cancer Promotion. *Adv Pharmacol Sci*; 2019. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1155/2019/3418975.
- [30] Harirforoosh S, Asghar W, Jamali F. Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: An update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. *J Pharm Pharm Sci* 2013; 16: 821–847.
- [31] Díaz-González F, Sánchez-Madrid F. NSAIDs: Learning new tricks from old drugs. *Eur J Immunol* 2015; 45: 679–686.
- [32] Cashman JN. The mechanisms of action of NSAIDs in analgesia. *Drugs* 1996; 52: 13–23.
- [33] Bindu S, Mazumder S, Bandyopadhyay U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochem Pharmacol*; 180. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.1016/j.bcp.2020.114147.

- [34] Leão C, Borges A, Simões M. Nsaids as a drug repurposing strategy for biofilm control. *Antibiotics* 2020; 9: 1–19.
- [35] Paes Leme RC, da Silva RB. Antimicrobial Activity of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs on Biofilm: Current Evidence and Potential for Drug Repurposing. *Front Microbiol* 2021; 12: 1–7.
- [36] Miner J, Hoffhines A. The discovery of aspirin's antithrombotic effects. *Texas Hear Inst J* 2007; 34: 179–186.
- [37] Connelly D. A history of aspirin. *Clin Pharm* 2014; 6: 166–167.
- [38] Arif H, Aggarwal S. Salicylic Acid (Aspirin). Treasure Island (FL), 2024.
- [39] Mjos KD, Orvig C. Metallodrugs in Medicinal Inorganic Chemistry.
- [40] Yunqi Cheng HC. Aberrance of Zinc Metalloenzymes-Induced Human Diseases and Its Potential Mechanisms. 2021; 1–16.
- [41] Saper RB, Rash R. Zinc: An essential micronutrient. *Am Fam Physician* 2009; 79: 768–772.
- [42] Zhang W, Liu Y, Xuan Y, et al. Synthesis and Applications of Carboxymethyl Cellulose Hydrogels. *Gels*; 8. Epub ahead of print 2022. DOI: 10.3390/gels8090529.
- [43] Tavakoli J, Tang Y. Hydrogel based sensors for biomedical applications: An updated review. *Polymers (Basel)* 2017; 9: 1–25.
- [44] Raghupathi KR, Koodali RT, Manna AC. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. *Langmuir* 2011; 27: 4020–4028.
- [45] Jarosz M, Olbert M, Wyszogrodzka G, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF- κ B signaling. *Inflammopharmacology* 2017; 25: 11–24.
- [46] Stathopoulou MEK, Banti CN, Kourkoumelis N, et al. Silver complex of salicylic acid and its hydrogel-cream in wound healing chemotherapy. *J Inorg Biochem* 2018; 181: 41–55.
- [47] Atkins P de P. *Physical Chemistry*. 2006. Epub ahead of print 2006. DOI: 10.1016/0016-0032(61)90576-2.
- [48] Tsigara AS, Banti CN, Hatzidimitriou A, et al. Tetracycline: structural characterization and antimicrobial properties of its water-soluble di-anionic bi-sodium salt. *Dalt Trans* 2024; 53: 12080–12089.
- [49] Workman J. *The concise handbook of analytical spectroscopy : theory, applications, and reference materials*. 2021. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.4324/9781410612465-8.
- [50] Weisz K. Ultraviolet Spectroscopy. *Nucleic Acids from a to z: a Concise Encyclopedia* 2008; 322.
- [51] Griffiths PR, De Haseth JA. Fourier Transform Infrared Spectrometry: Second Edition. *Fourier Transform Infrared Spectrom Second Ed* 2006; 1–529.
- [52] Wolff NLRWH. *Handbook of Practical X-Ray Fluorescence Analysis*. 2006. Epub ahead of print 2006. DOI: 10.1007/978-3-540-36722-2.

- [53] Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch SR. *Principles of Instrumental Analysis*. 1983. Epub ahead of print 1983. DOI: 10.1016/s0003-2670(00)84936-3.
- [54] Toledo M. UV / VIS Spectrophotometry. *Mettler-Toledo Int* 2025; 56.
- [55] Burgess, C., & Rospigliosi L. Practical Aspects of UV-Visible Spectroscopy. *R Soc Chem*. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.1023/A:1013243914734.
- [56] Gunther H. *NMR Spectroscopy Basic Principles, Concepts, and Applications in Chemistry*. 2013.
- [57] B.D.CULLITY. *Elements of X-Ray Diffraction*. 2001.
- [58] Bunaciu AA, Udriștioiu E gabriela, Aboul-Enein HY. X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications. *Crit Rev Anal Chem* 2015; 45: 289–299.
- [59] Gonzalez H, Tarras-Wahlberg N, Strömdahl B, et al. Photostability of commercial sunscreens upon sun exposure and irradiation by ultraviolet lamps. *BMC Dermatol* 2007; 7: 1–9.
- [60] Diffey BL. An overview analysis of the time people spend outdoors. *Br J Dermatol* 2011; 164: 848–854.
- [61] Banti CN, Papatriantafyllopoulou C, Manoli M, et al. Nimesulide Silver Metallodrugs, Containing the Mitochondriotropic, Triaryl Derivatives of Pnictogen; Anticancer Activity against Human Breast Cancer Cells. *Inorg Chem* 2016; 55: 8681–8696.
- [62] Heydari N, Karimi AR, Momeni HR, et al. Chitosan Schiff-Base Hydrogel Sunscreen: A Multifunctional Hybrid Network with Antioxidant, Ultraviolet-Shielding, and Self-Healing Properties. *ACS Omega* 2025; 10: 8250–8261.
- [63] Banti CN, Papatriantafyllopoulou C, Papachristodoulou C, et al. New Apoptosis Inducers Containing Anti-inflammatory Drugs and Pnictogen Derivatives: A New Strategy in the Development of Mitochondrial Targeting Chemotherapeutics. *J Med Chem* 2023; 66: 4131–4149.
- [64] Chaiya P, Senarat S, Phaechemud T, et al. In vitro anti-inflammatory activity using thermally inhibiting protein denaturation of egg albumin and antimicrobial activities of some organic solvents. *Mater Today Proc* 2022; 65: 2290–2295.
- [65] Banti CN, Hadjikakou SK. Evaluation of toxicity with brine shrimp assay. *Bio-protocol* 2021; 11: 6–12.
- [66] Binev IG, Stamboliyska BA, Velcheva EA. The infrared spectra and structure of acetylsalicylic acid (aspirin) and its oxyanion: an ab initio force field treatment. *J Mol Struct* 378 189-197. Epub ahead of print 1996. DOI: 10.1016/0584-8539(95)01648-1.
- [67] Dhiman S, Singh S, Varma A, et al. Phytofabricated zinc oxide nanoparticles as a nanofungicide for management of Alternaria blight of Brassica. *BioMetals* 2021; 34: 1275–1293.
- [68] Endres F. Physical chemistry of ionic liquids. *Phys Chem Chem Phys* 2010; 12: 1648–1648.
- [69] Huang H, Zhou M, Ning S, et al. School of Life Science, Wuhan University, Wuhan, P. R. China, 430072. 1999; 47: 665–671.

- [70] Kolassa N, Punzengruber C, Suko J, et al. *Mechanism of calcium-independent phosphorylation of sarcoplasmic reticulum ATPase by orthophosphate. Evidence of magnesium-phosphoprotein formation*. 1979. Epub ahead of print 1979. DOI: 10.1016/0014-5793(79)80596-7.
- [71] Dünkel L. Fundamentals of Crystallography. *Zeitschrift für Phys Chemie* 1997; 198: 273–274.
- [72] Kato M. *Experimental Techniques*. 2022. Epub ahead of print 2022. DOI: 10.1201/9781003298205-2.
- [73] Bryce-Smith D, Cox A. Photochemistry of the main group elements. *Photochemistry* 2007; 195–204.
- [74] Cavassin ED, de Figueiredo LFP, Otoch JP, et al. Comparison of methods to detect the in vitro activity of silver nanoparticles (AgNP) against multidrug resistant bacteria. *J Nanobiotechnology* 2015; 13: 1–16.
- [75] Söderberg T, Hallmans G, Ågren M, et al. The effects of an occlusive zinc medicated dressing on the bacterial flora in excised wounds in the rat. *Infection* 1989; 17: 81–85.
- [76] Motyl M, Dorso K, Barrett J, et al. Basic Microbiological Techniques Used in Antibacterial Drug Discovery QUADRANT PLATING ON AGAR FOR ISOLATING AND/OR COUNTING BACTERIA. *Curr Protoc Pharmacol* 2005; 1–22.
- [77] Meretoudi A, Banti CN, Siafarika P, et al. Tetracycline water soluble formulations with enhanced antimicrobial activity. *Antibiotics* 2020; 9: 1–24.
- [78] Li CR, Yang XY, Lou RH, et al. In vitro antibacterial activity of vertilmicin and its susceptibility to modifications by the recombinant AAC(6')-APH(2'') enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 3875–3882.
- [79] Chrysouli MP, Banti CN, Kourkoumelis N, et al. Ciprofloxacin conjugated to diphenyltin(IV): A novel formulation with enhanced antimicrobial activity. *Dalt Trans* 2020; 49: 11522–11535.
- [80] Meindl C, Öhlinger K, Zrim V, et al. Skin Sensitization Potential of Sensitizers in the Presence of Metal Oxide Nanoparticles In Vitro. *Nanomaterials* 2024; 14: 1–20.

Z. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- Fotakis Lezos, Christina N. Banti, Antonios Hatzidimitriou, Sotiris K. Hadjikakou, A novel cellulose hydrogel of zinc aspirinate; possible implementation in wound healing. Athens Conference on Advances in Chemistry (Athens, Greece, June 2022)
- Fotakis Lezos, Christina N. Banti, Antonios Hatzidimitriou, Sotiris K. Hadjikakou, A novel substitute to the commercial zinc antibacterial drugs; zinc aspirinate and a possible implementation in wound healing. 19th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry (Patras, Greece, March 2023)
- Christina N. Banti, Fotakis Lezos, Antonios Hatzidimitriou, Sotiris K. Hadjikakou, Carboxymethyl cellulose hydrogel dopes with zinc-aspirinate as a multifunctional material: photoprotection, epithelial regeneration and biocompatibility.