



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**



**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΕΝΑΝΤΙ  
ΠΟΛΥΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΤΟΥ  
ΓΕΩΡΓΙΟΥ ΜΗΛΙΩΤΗ  
ΒΙΟΛΟΓΟΥ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ  
ΕΥΘΥΜΙΑ ΠΕΤΕΙΝΑΚΗ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2019**

### **Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή**

1. Ε. Πετεινάκη, Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας- Επιβλέπουσα
2. Λ. Τζουβελέκης, Αναπλ. Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, ΕΚΠΑ
3. Σ. Χατζηπαναγιωτού, Αναπλ. Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, ΕΚΠΑ

### **Επταμελής επιτροπή**

1. Ε. Πετεινάκη, Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας- Επιβλέπουσα
2. Λ. Τζουβελέκης, Αναπλ. Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, ΕΚΠΑ
3. Σ. Χατζηπαναγιωτού, Αναπλ. Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, ΕΚΠΑ
4. Ε. Ζακυνθινός, Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
5. Β. Μυριαγκού, Ερευνήτρια Α, Εργαστήριο Βακτηριολογίας, ΕΙΠ
6. Α. Γερμενής, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
7. Γ. Σίμος, Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η αντιμικροβιακή αντοχή έναντι των β-λακταμικών αντιβιοτικών αποτελεί έναν από τους σοβαρότερους κινδύνους της δημόσιας υγείας. Τα τελευταία χρόνια, η εντεινόμενη αντοχή κλινικών βακτηριακών στελεχών σε αντιβιοτικά τελευταίας γραμμής όπως οι καρβαπενέμες, είναι ιδιαίτερα ανησυχητική λόγω των περιορισμένων εναλλακτικών θεραπευτικών επιλογών. Μέρος του προβλήματος αποτελεί επίσης η έλλειψη ανακάλυψης αντιβιοτικών νέων τάξεων και η ελλιπής χρηματοδότηση προς την έρευνα αυτή. Τα παραπάνω, κάνουν επιτακτική ανάγκη την βέλτιστη διατήρηση και διαχείριση των υπάρχοντων αντιβιοτικών επιλογών. Προς αυτή την κατεύθυνση, η χρησιμοποίησή κυκλοδεξτρινών ή άλλων νανοσωματιδίων ως μέρος της λύσης έναντι των μηχανισμών αντιμικροβιακής αντοχής χρήζει ερευνητικής διερεύνησης. Τα νανοσωματίδια αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν δυνητικά είτε ως νανοφορείς αντιβιοτικών, προστατεύοντάς τα από τους μηχανισμούς υδρόλυσης των βακτηρίων, είτε ως ανασταλτικοί παράγοντες των μηχανισμών αυτών, είτε ως αυτούσιες αντιμικροβιακές ουσίες. Στην συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν μια σειρά φυσικών και τεχνητών κυκλοδεξτρινών και νανοσωματιδίων ως προς την δραστικότητα τους ως αντιμικροβιακοί παράγοντες κατά κλινικών Gram θετικών και αρνητικών κλινικών στελεχών. Παράλληλα, μετά από τον χημικό καθορισμό των ιδιοτήτων τους για την δημιουργία συμπλοκών με β-λακταμικά αντιβιοτικά όπως η οξακιλλίνη και η μεροπενέμη εξετάστηκαν οι ιδιότητες τους ως νανοφορείς που παρέχουν προστασία του β-λακταμικού δακτυλίου από τις υδρολυτικές ιδιότητες των β-λακταμασών. Πέραν των άλλων ιδιοτήτων τους, τεχνητά πολυκαρβοξυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες, εξετάστηκαν εκτενώς σε πειράματα in-vitro, ex-vivo και in-vivo για τις ανασταλτικές ιδιότητες κατά των μέταλλο-β-λακταμασών (MBL), μιας σειράς υδρολυτικών ενζύμων για τα οποία δεν υπάρχει κανένας κλινικά διαθέσιμος αναστολέας. Παράλληλα, τεχνητά τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες με επταπλές θετικά φορτισμένες πλευρικές ομάδες δοκιμάστηκαν για τις ανασταλτικές τους ιδιότητες κατά αντλιών εκροής, ενός εκ των κυριότερων μηχανισμών αντοχής των βακτηρίων.

Στην Ελλάδα, η ομάδα ερευνητών που ασχολείται εκτενώς με την μελέτη, κατανόηση και αντιμετώπιση των μηχανισμών αντοχής αποτελείται από τα μέλη του Εργαστηρίου Βακτηριολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ: Δρ. Βιβή Μυριαγκού, Δρ. Εύα Τζελέπη, και Δρ. Στάθη Κωτσάκη, από τον Αν. Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών Λεωνίδα Τζουβελέκη και από την Καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Ευθυμία Πετεινάκη. Στους παραπάνω οφείλω ευγνωμοσύνη για την δυνατότητα που μου παρείχαν να ασχοληθώ με ένα τόσο επείγον και ενδιαφέρον ερευνητικό ζήτημα καθώς και για την άρρητη επιστημονική και προσωπική καθοδήγησή τους. Στις ανωτέρω ευχαριστίες συμπεριλαμβάνονται και τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Βακτηριολογίας του Ε.Ι.Π., όπου και έλαβε χώρα το κύριο πειραματικό σκέλος της διατριβής, κα Ειρήνη Σιατραβάνη και Δρ. Ευαγγέλια Βούλγαρη, για την βοήθεια που μου παρείχαν. Σημαντική υποστήριξη και καθοδήγηση παρείχαν τα μέλη της τριμελούς επιτροπής Καθ. Ε. Πετεινάκη, Αν. Καθ. Λ. Τζουβελέκης και ο Αν. καθηγητής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών Στυλιανός Χατζηπαναγιωτού. Τέλος, ευχαριστίες εκφράζονται σε όλους τους συνεργάτες του Ευρωπαϊκού ερευνητικού προγράμματος CycloN-Hit ως αρωγοί της ερευνητικής αυτής προσπάθειας, ιδιαιτέρως δε στους ερευνητές του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος, Δρ. Κωνσταντίνα Γιαννακοπούλου και Δρ. Πηνελοπή Μπουζιώτη καθώς και στην εταιρία Medicon Hellas S.A..

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b> .....	- 1 -
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b> .....	- 3 -
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	- 4 -
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	- 5 -
i) Βακτήρια .....	- 5 -
ii) Μικροβιολογία .....	- 8 -
iii) Αντιβιοτικά .....	- 9 -
iv) Αντιμικροβιακή αντοχή .....	- 15 -
v) Μηχανισμοί αντοχής .....	- 15 -
vi) β-λακταμάσες .....	- 22 -
vii) Μόρια ενισχυτές .....	- 34 -
viii) Κυκλοδεξτρίνες .....	- 35 -
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	- 40 -
I. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	- 41 -
II. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ .....	- 43 -
i) Παραγωγή και περιγραφή κυκλοδεξτρινών. ....	- 43 -
ii) Σύνθεση φθορισμένων μορίων β-IDACYD με BODIPY® .....	- 55 -
iii) Σήμανση μορίων β-IDACYD με το γ-ραδιενεργό ισότοπο γάλλιο-67 ( <sup>67</sup> Ga) .....	- 56 -
iv) Πειράματα <i>in-vitro</i> δραστηριότητας αντιβιοτικών, κυκλοδεξτρινών και συμπλόκων .....	- 57 -
v) Πειράματα <i>ex-vivo</i> .....	- 73 -
vi) Πειράματα <i>in-vivo</i> .....	- 75 -
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	- 83 -
i) Αντιμικροβιακή δράση κυκλοδεξτρινών και νανοσωματιδίων .....	- 83 -
ii) Αντιμικροβιακή δράση συμπλόκων κυκλοδεξτρινών με β-λακταμικά .....	- 91 -
iii) Μόρια αναστολείς .....	- 95 -
IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	- 117 -
i) Αντιμικροβιακές δράσεις κυκλοδεξτρινών και νανοσωματιδίων .....	- 117 -
ii) Αντιμικροβιακή δράση συμπλόκων κυκλοδεξτρινών με β-λακταμικά .....	- 119 -
iii) Μόρια αναστολείς .....	- 120 -
V. ΣΥΝΟΨΗ .....	- 123 -
VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	- 124 -
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	- 134 -
<b>SUMMARY</b> .....	- 137 -

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### i) Βακτήρια

Τα βακτήρια είναι από τις πιο πετυχημένες και προσαρμόσιμες μορφές ζωής έχοντας επιβιώσει στον πλανήτη για τουλάχιστον 3 δισεκατομμύρια χρόνια. Για εκατομμύρια χρόνια από την εμφάνιση τους τα βακτήρια μαζί με τα αρχαία ήταν οι κυρίαρχες μορφές ζωής καταφέροντας να προσαρμοστούν στις ακραίες συνθήκες ενός τότε νέου και μεταβαλλόμενου πλανήτη. Γενετικές και φυλογενετικές αναλύσεις υπέδειξαν ότι ο πιο κοντινός κοινός πρόγονος βακτηρίων και αρχαίων ήταν κάποια υπερθερμόφιλη μορφή ζωής που ευδοκίμωσε στον πλανήτη πριν περίπου από 3 δισεκατομμύρια χρόνια (Di Giulio, 2003). Τα βακτήρια επίσης συμμετείχαν στον σχηματισμό των πρώτων ευκαρυωτικών κυττάρων αναπτύσσοντας συμβιωτική σχέση με πρωτοευκαρυωτικούς οργανισμούς συγγενικούς των αρχαίων (Poole και Penny, 2006). Η θεωρία της ενδοσυμβίωσης που περιγράφει την ανωτέρω σχέση αρχικά διατυπώθηκε το 1910 από τον Ρώσο βοτανολόγο Konstantin Mereschkowski και επανακαλύφθηκε από την Lynn Sagan Margulis το 1967 (Sagan Margulis, 1967). Τα μιτοχόνδρια των ευκαρυωτικών υποστηρίζεται ότι προήλθαν από πρωτοβακτήρια και οι χλωροπλάστες από κυανοβακτήρια. Ο κυτταρικός ξενιστής από τη συμβίωση αυτή κατόρθωσε στην περίπτωση των μιτοχονδρίων να μπορεί να χρησιμοποιεί το οξυγόνο για τις ανάγκες του και στην περίπτωση των χλωροπλάστων να μπορεί να φωτοσυνθέτει. Κατά τη διάρκεια τις εξέλιξης αυτής της συμβιωτικής σχέσης ο ξενιστής πήρε αρκετές από τις λειτουργίες του προκαρυωτικού (Bodyl και Mackiewicz, 2013). Τα οργανίδια αυτά βρίσκονται υπό καθεστώς 'ημιαυτονομίας' καθώς παράγουν μόνα τους κάποια συστατικά απαραίτητα για τη λειτουργία τους, ενώ κάποια άλλα παράγονται από το κύτταρο-ξενιστή.

### **Μορφολογία**

Έχοντας στην διάθεση τους δισεκατομμύρια χρόνια εξελικτικής πορείας τα βακτήρια απαντώνται σε πλειάδα μορφολογιών και μεγεθών. Το μήκος τους κυμαίνεται συνηθώς από 0.5 έως 5 μm εάν και έχουν ανακαλυφθεί είδη όπως το πρωτεοβακτήριο *Thiomargarita namibiensis* που έχει μήκος πάνω από 500 μm (0.5mm) καθιστώντας

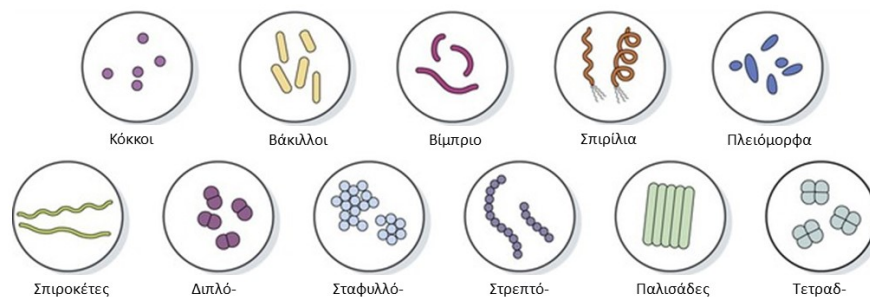
το ορατό με γυμνό μάτι (Young, 2007). Στο κατώτατο εύρος της κλίμακας είναι τα μέλη του γένους *Mycoplasma* που δεν ξεπερνούν σε μέγεθος τα 0.3 μm μέγεθος παρόμοιο με εκείνο των μεγαλύτερων ιών. Τα βακτήρια, μορφολογικά εμφανίζονται κυρίως ως σφαιρίδια (κόκκοι) ή επιμήκη (βάκιλοι). Λιγότερο κοινές μορφολογίες είναι αυτές των καμπυλωμένων ράβδων (*vibrio*), σπειροειδών (*spirilla*) και ελικοειδών μορφών (*spirochaetes*). Μεμονωμένες περιπτώσεις βακτηριακών ειδών με αστεροειδή μορφολογία έχουν επίσης περιγραφεί (Yang, Blair και Salama, 2016). Η ποικιλομορφία σχημάτων καθορίζεται από το βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα και τον κυτταροσκελετό και είναι σημαντική επειδή επηρεάζει την ικανότητα των βακτηρίων να αποκτούν θρεπτικά συστατικά, να προσκολληθούν σε επιφάνειες, να κολυμπήσουν μέσα στα υγρά και να διαφύγουν από θηρευτές.

Παρότι αρκετά βακτήρια εμφανίζονται ως μεμονωμένα κύτταρα, υπάρχουν τύποι που έχουν διπλοειδή μορφολογία (*Neisseria*), αλυσιδωτή μορφολογία (*Streptococcus*) ή εμφανίζονται ως πυκνώματα σταφυλοειδούς μορφής (*Staphylococcus*). Σε συγκεκριμένες συνθήκες απουσίας θρεπτικών ουσιών κάποια βακτήρια όπως αυτά του γένους *Mycobacteria* δημιουργούν κοινοτικές, πολυκυτταρικές δομές, επικοινωνώντας μεταξύ τους μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται quorum sensing (Diggle και Williams, 2013). Τα συσσωματώματα αυτά αποτελούνται από περισσότερα από 100.000 κύτταρα και σε αυτές τις κοινοτικές δομές τα βακτήρια εκτελούν διακριτά καθήκοντα. Στο παράδειγμα των μυξοβακτηριδίων, ένα στα δέκα κύτταρα μεταναστεύει στην κορυφή της πολυκυτταρικής δομής και διαφοροποιείται σε μια αδρανοποιημένη κατάσταση που ονομάζεται μυξόσπορος, δημιουργώντας μια εξωτερική στιβάδα η οποία είναι πιο ανθεκτική στην ξήρανση και άλλες δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα βακτήρια είναι επίσης γνωστό ότι προσδένονται σε επιφάνειες και σχηματίζουν πυκνές συσσωματώσεις βιομεμβρανών (βιοφίλμ) ή μεγαλύτερους σχηματισμούς (μικροβιακοί τάπητες) (Fux *et al.*, 2005). Οι σχηματισμοί αυτοί μπορεί να κυμαίνονται από λίγα μικρόμετρα σε πάχος έως και μισό μέτρο και μπορεί να περιέχουν πολλαπλά είδη βακτηρίων και αρχαίων. Τα βακτήρια που ζουν σε βιοφίλμ παρουσιάζουν μια πολύπλοκη διάταξη κυττάρων και εξωκυτταρικών συστατικών, σχηματίζοντας δευτερογενείς δομές, όπως μικροαποικίες, μέσω των οποίων δημιουργούνται δίκτυα καναλιών για την καλύτερη διάχυση των θρεπτικών ουσιών. Στο φυσικό περιβάλλον όπως σε επιφάνειες φυτών ή στο έδαφος τα



περισσότερα βακτήρια συνδέονται με βιοφίλμ. Τα βιοφίλμ είναι εξαιρετικής κλινικής σημασίας καθώς παρατηρούνται σε χρόνιες λοιμώξεις καθώς και σε ενδοσκοπικές ιατρικές συσκευές (Carpentier, 2014). Οι πολυκυτταρικές αυτές δομές είναι καλύτερα προστατευμένες από τα μεμονωμένα κύτταρα και συνεπώς δύσκολο να καταπολεμηθούν με θεραπευτική αγωγή.

#### Μορφολογία Βακτηρίων



**Εικόνα 1:** Σύμφωνα με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους, τα περισσότερα βακτήρια ταξινομούνται σε διαφορετικά βασικά σχήματα: κόκκους, βακίλλους, σπειροχαίτες (σπειροειδείς ή ελικοειδείς) και πλειόμορφα μεταξύ άλλων.

#### Σχέσεις

Παρά την φαινομενική τους απλότητα, τα βακτήρια μπορούν να σχηματίσουν περίπλοκες σχέσεις με άλλους οργανισμούς. Τα περισσότερα βακτηριακά είδη συμβιώνουν σε αμοιβαιότητα με τον ξενιστή τους. Στους ανθρώπους είναι χαρακτηριστική η περίπτωση της εντερικής χλωρίδας η οποία αποτελείται από άνω των 1.000 επωφελών για την υγεία τύπων βακτηρίων εκτελώντας σημαντικές για την διατήρηση της ομοιόστασης λειτουργίες όπως η σύνθεση του φολικού οξέος, της βιταμίνης-K και της βιοτίνης μεταξύ άλλων (Arumugam *et al.*, 2011). Επίσης, τα βακτήρια αυτά μετατρέπουν τα σάκχαρα σε γαλακτικό οξύ (*Lactobacillus*) και ζυμώνουν πολύπλοκους υδατάνθρακες. Τα βακτηριακά κύτταρα που συμβιώνουν σε ένα ανθρώπινο σώμα ξεπερνάνε τα ανθρώπινα κύτταρα κατά τρεις φορές. Υπάρχουν άλλες κατηγορίες βακτηρίων που εμφανίζουν παρασιτική σχέση με τον ξενιστή τους και κατατάσσονται ως παθογόνα. Τα παθογόνα βακτήρια μαζί με τα πρωτόζωα, τα παράσιτα, τους μύκητες και τους ιούς αποτελούν την πεντάδα μικροβίων που

προκαλούν μολυσματικές νόσους. Βακτηριακές μολυσματικές νόσοι όπως η βουβονική πανώλη προκαλούμενη από το βακτήριο *Yersinia pestis* έχουν προκαλέσει τις πιο καταστροφικές πανδημίες που έχει γνωρίσει ο κόσμος (Santamaría και Toranzos, 2003). Τέλος, λίγα βακτηριακά είδη είναι θηρευτές καθώς σκοτώνουν και καταναλώνουν άλλους μικροοργανισμούς (Chen *et al.*, 2011). Χαρακτηριστικές περιπτώσεις είναι αυτές των *Mycococcus xanthus* και *Vampirovibrio chlorellavorus*.

## ii) Μικροβιολογία

Η ιστορία της ανακάλυψης και παρατήρησης των βακτηρίων ως μολυσματικών παραγόντων είναι μακρόχρονη και πολύπλοκη. Το 1546 ο Ιταλός γιατρός και πολυμαθής Girolamo Fracastoro διατυπώνει πρώτος την θεωρία περί ύπαρξης 'αόρατων' μικροοργανισμών που προκαλούν ασθένειες. 119 χρόνια αργότερα ο Άγγλος Robert Hooke στο βιβλίο του 'Micrographia' θα περιγράψει μικροσκοπικές δομές που ονομάζει κύτταρα ενώ το 1676 ο Ολλανδός Antony Leewenhoek, πειραματιζόμενος με μικροσκόπιο δικής του κατασκευής παρατήρησε τα πρώτα βακτήρια τα οποία ονόμασε 'animalcules' (απειροελάχιστα ζωομόρια) και θα ξεκινήσει ουσιαστικά τον κλάδο της μικροβιολογίας (Clardy, Fischbach και Currie, 2009). Μετά το θάνατο του van Leeuwenhoek, η μελέτη της μικροβιολογίας δεν αναπτύχθηκε ταχέως επειδή τα μικροσκόπια ήταν σπάνια και το ενδιαφέρον για τους μικροοργανισμούς δεν ήταν υψηλό. Τα χρόνια αυτά, οι επιστήμονες συζητούσαν τη θεωρία της αυθόρμητης γένεσης (spontaneous generation) η οποία ανέφερε ότι οι μικροοργανισμοί προκύπτουν από 'άψυχη ύλη', όπως τον βόειο ζωμό. Αυτή η θεωρία αμφισβητήθηκε από τον Francesco Redi, ο οποίος έδειξε ότι οι μύγες δεν δημιουργούνται από την αποσύνθεση του κρέατος (όπως πίστευαν άλλοι) αν το κρέας καλύπτεται και αποτρέπεται η είσοδός τους. Αργότερα, ο Άγγλος κληρικός John Needham ισχυρίστηκε ότι παρατήρησε αυθόρμητη γένεση μικροοργανισμών, αλλά ο Lazzaro Spallanzani αμφισβήτησε τη θεωρία του αποδεικνύοντας ότι ο βρασμένος και συνεπώς στείρος ζωμός δεν δημιουργούσε καμία μορφή ζωής. Η διαμάχη συνεχίστηκε μέχρι τα μέσα του 19<sup>ου</sup> αιώνα όταν ο Γάλλος Louis Pasteur πειραματιζόμενος στο γιατί το κρασί και τα γαλακτομικά προϊόντα ξινίζουν ανακάλυψε ότι για αυτό ευθύνονται τα βακτήρια που αναπτύσσονται. Οδήγησε την έρευνα προς την κατεύθυνση της μικροβιολογίας ισχυριζόμενος ότι αφού τα βακτήρια

μπορεί να επηρεάζουν την κατάσταση των προϊόντων σίγουρα θα επηρεάζουν και την ανθρώπινη υγεία. Διατύπωσε επίσης ότι μικροοργανισμοί μπορεί να μεταφέρονται με τον αέρα και να προκαλούν ασθένειες. Για να αποδείξει την θεωρία του ο Παστέρ έπρεπε να διαψεύσει την θεωρία της αυθόρμητης γένεσης και γι' αυτό επινόησε μια σειρά πειραμάτων όπου το αποστειρωμένο οργανικό εκχύλισμα που χρησιμοποιούσε μολύνονταν μόνο αν ο αέρας περιείχε βακτήρια, ενώ όταν διοχέτευε φιλτραρισμένο ή θερμό αέρα στο εκχύλισμα δεν επερχόταν μόλυνση. Έτσι, ο Παστέρ απέδειξε την βιογένεση, δηλαδή ότι «η ζωή προέρχεται μόνο από ζωή» (Gillen και Sherwin III, 2008). Οι προσπάθειες του όμως να αποδείξει την μολυσματική φύση των μικροβίων δεν ήταν επιτυχείς και ήταν τελικά ο Γερμανός επιστήμονας Robert Koch που απέδειξε την θεωρία χρησιμοποιώντας καλλιέργιες βακίλου τις οποίες εμβολίασε σε ποντίκια υποδεικνύοντας έτσι τον βάκιλο ως τον αιτιολογικό παράγοντα της ασθένειας του άνθρακα. Ο Koch μέσα από την εργασία του έθεσε τρία κριτήρια, σύμφωνα με τα οποία μία ασθένεια οφείλεται σε παθογόνο μικροοργανισμό, είναι δηλαδή λοιμωξη: το αίτιο (I) να ανιχνεύεται στους ιστούς ή στα υγρά ασθενών ή στον οργανισμό ατόμων που απεβίωσαν από την ασθένεια αυτή, (II) να μπορεί να απομονωθεί και να καλλιεργηθεί στο εργαστήριο και (III) να μπορεί να προκαλέσει την ίδια ασθένεια σε πειραματόζωα και να απομονωθεί ξανά από αυτά (Raszka, 2004).

Στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα και στις αρχές του 20<sup>ου</sup> πολλοί επιστήμονες ασχολήθηκαν με τις παρατηρήσεις του Pasteur και του Koch δημιουργώντας την χρυσή εποχή της μικροβιολογίας όπου εκατοντάδες είδη παθογόνων μικροοργανισμών ανακαλύφθηκαν και χαρακτηρίστηκαν. Οι ανακαλύψεις αυτές παρείχαν ως αποτέλεσμα την δυνατότητα αποφυγής κοινών τότε πανδημιών μέσω της αναχαίτησης της εξάπλωσης των μικροοργανισμών. Παρά την έρευνα σε παθογόνους μικροοργανισμούς όμως καμία μορφή θεραπείας δεν υπήρχε διαθέσιμη για τους μολυσμένους ασθενείς.

### iii) Αντιβιοτικά

Η λύση δόθηκε αρκετά χρόνια αργότερα όταν το 1928 ο Σκοτσέζος Alexander Fleming, αντιλήφθηκε ότι ένας μύκητας *Penicillium notatum* είχε μολύνει μια βακτηριακή καλλιέργεια *Staphylococcus aureus* που χρησιμοποιούσε για τα πειράματά του. Παρατήρησε ότι η παρουσία του μύκητα είχε αφήσει καθαρές από βακτήρια ζώνες. Ο

Fleming κατάφερε να απομονώσει και να καλλιεργήσει τον μύκητα ο οποίος ήταν εξαιρετικά δραστικός ακόμα και σε μεγάλες αραιώσεις (Fleming, 1922). Μετά από αρχικές κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους με μολυσμένες πληγές, Βρετανικές φαρμακευτικές εταιρίες της εποχής πείστηκαν ως προς την δραστικότητα της ουσίας που είχε απομονωθεί από τον μύκητα και προχώρησαν στην μαζική παραγωγή της. Η ουσία αυτή ονομάστηκε πενικιλίνη και αποτέλεσε μία από τις σημαντικότερες ανακαλύψεις στην ιστορία και τον ουσιαστικό λόγο της δραματικής αύξησης του προσδόκιμου ζωής κατά τον 20<sup>ο</sup> αιώνα. Μέχρι τον δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο η πενικιλίνη ήταν ευρέως διαδομένη και σε χρήση σώζοντας εκατομμύρια στρατιώτες από μολύνσεις σε πληγές και τραύματα και από το 1945 διαθέσιμη στην αγορά για μη στρατιωτική χρήση. Την ίδια χρονιά η Dorothy Hodgkin χρησιμοποιώντας κρυσταλλογραφία ακτινών-Χ αποσαφηνίζει την δομή του μορίου της πενικιλίνης ταξινομώντας την ως το πρώτο μέλος της οικογένειας των β-λακταμών. Η πρώτη πετυχημένη σύνθεση ενός μορίου πενικιλίνης, της φαινοξυμεθυλοπενικιλίνης, περιεγράφηκε σε μια σειρά 5 βημάτων το 1957 από τον John Shehan. Από τότε μέχρι σήμερα πάνω από 100 αντιβιοτικές ουσίες έχουν ανακαλυφθεί και ανήκουν σε 7 δομικά διαφορετικές κατηγορίες (Clardy, et al., 2009):

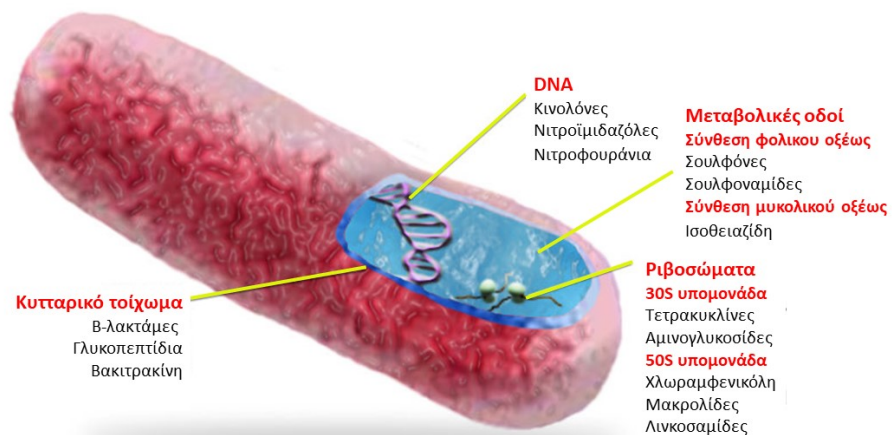
- (I) Β-λακτάμες: Είναι η μεγαλύτερη και πιο διαδεδομένη κατηγορία αντιβιοτικών. Όλα τα μόρια της κατηγορίας αυτής έχουν έναν χαρακτηριστικό β-λακταμικό δακτύλιο τεσσάρων ατόμων 2-αζετιδινόνης και έχουν βακτηριοκτόνο δράση. Η δράση τους βασίζεται στην αναστολή της σύνθεσης της απαραίτητης για την δομή του κυτταρικού τοιχώματος πεπτιδογλυκάνης. Η στιβάδα πεπτιδογλυκάνης είναι θεμελιώδης για την ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος, ειδικά στα Gram-θετικά βακτήρια καθώς αποτελεί το εξωτερικό και κύριο συστατικό του. Κατά την σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, το τελικό στάδιο διεκπεραιώνεται από τις DD-τρανσπεπτιδάσες οι οποίες είναι πρωτεΐνες δέσμησης πενικιλίνης (PBPs). Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά είναι ανάλογα D-αλανίνης-D-αλανίνης όπως και τα τελικά αμινοξέα των πρόδρομων υπομονάδων του πεπτιδίου NAM/NAG της παραγόμενης πεπτιδογλυκάνης. Η δομική συγγένεια των δύο επιτρέπει την μη-αναστρέψιμη δέσμηση των β-λακταμών από τα PBPs ακετυλώνοντας την σερίνη-403 του ενεργού τους κέντρου. Αυτή η

μη-αναστρέψιμη δέσμευση εμποδίζει την τελική τρानσπεπτιδίωση της πεπτιδογλυκάνης εμποδίζοντας έτσι τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Στα β-λακταμικά αντιβιοτικά ανήκουν οι δομικά συγγενείς πενικιλίνες (αμοξικιλίνη), κεφαλοσπορίνες (κεφιξίμη), καρβαπενέμες (μεροπενέμη) και μονοβακτάμες (αζτρεονάμη) (Larrull, et. al., 2010).

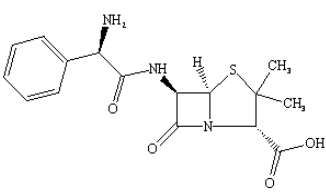
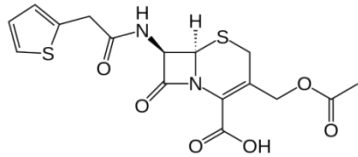
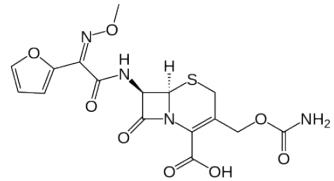
- (II) Μακρολίδες: Τα μόρια της τάξης αυτής έχουν έναν δακτύλιο μακροκυκλικής λακτόνης αποτελούμενο από 14-, 15- ή 16- μέλη στον οποίο προσδέονται ένας ή περισσότεροι δεοξυ-σακχαρίτες. Έχουν βακτηριοστατική δράση προσδέοντας αναστρέψιμα στην θέση P της 50S υπομονάδας του βακτηριακού ριβοσώματος εμποδίζοντας έτσι την πρωτεϊνοσύνθεση. Η κλαριθρομυκίνη και η αζιθρομυκίνη ανήκουν σε αυτή την κατηγορία (Scholar, 2011).
- (III) Αμινογλυκοσίδες: Ανήκουν στην κατηγορία των ολιγοσακχαρίδων με συνδυασμό ομάδων αμινοσακχάρων και κυκλοεξανίων. Έχουν βακτηριοστατική και βακτηριοκτόνο δράση αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση καθώς συνδέονται με την 30S υπομονάδα του βακτηριακού ριβοσώματος. Η στρεπτομυκίνη και η αμικασίνη ανήκουν σε αυτή την κατηγορία (Towne, 2014) .
- (IV) Κινολόνες: Οι κινολόνες έχουν ένα δίκυκλο ενεργό κέντρο δομικά συγγενικό του μορίου 4-κινολόνης. Οι περισσότερες σε χρήση σήμερα είναι φθοριοκινολόνες, περιέχοντας ένα χαρακτηριστικό μόριο φθορίου. Έχουν βακτηριοκτόνο δράση αναστέλλοντας την υποομάδα A της γυράσης του DNA. Στην κατηγορία αυτή ανήκει η κiproφλοξακίνη (Aldred, et. al., 2014).
- (V) Τετρακυκλίνες: Αποτελούνται από 4 δακτυλίους υδρογονανθράκων και δρούν βακτηριοστατικά προσδέοντας στην 30S ριβοσωμική υπομονάδα του συμπλόκου μετάφρασης του mRNA. Σε αυτή την κατηγορία ανήκει η μινοκυκλίνη (Nelson και Levy, 2011) .
- (VI) Γλυκοπεπτίδια: Είναι μία κατηγορία φαρμάκων μικροβιακής προέλευσης αποτελούμενη από γλυκοζυλιωμένα κυκλικά ή πολυκυκλικά μη-ριβοσωμικά πεπτίδια. Είναι βακτηριοκτόνα έχοντας ανάλογο μηχανισμό

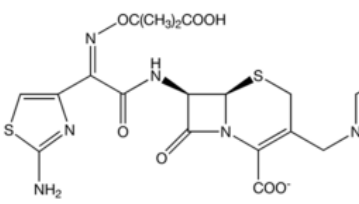
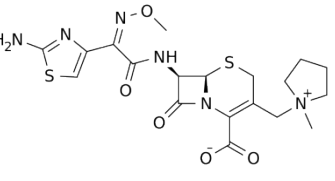
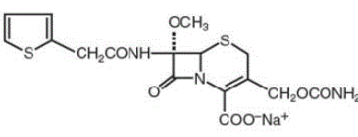
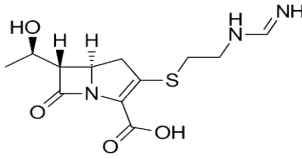
παρεμπόδισης της παραγωγής πεπτιδογλυκάνης με τις β-λακτάμες. Στην κατηγορία αυτή ανήκει η βανκομυκίνη (Gyssens, 2014).

- (VII) Σουλφοναμίδες: Είναι συνθετικές βακτηριοστατικές ουσίες που περιέχουν την μονάδα της σουλφοναμίδης ( $-S(=O)_2-NH_2$ ). Οι σουλφοναμίδες δρουν ως αναστολείς της διυδροφυλικής συνθετάσης και παρεμποδίζουν την σύνθεση του φυλλικού οξέος. Είναι ανταγωνιστές του παρα-αμινο-βενζοϊκού οξέος, το οποίο αποτελεί βασικό μεταβολίτη των μικροβίων, καθώς είναι απαραίτητο για τη σύνθεση φυλικού οξέος. Συμμετέχουν στην αναστολή της σύνθεσης των νουκλεϊκών οξέων. Στην κατηγορία αυτή ανήκει η σουλφομεθοξαζόλη (Holmes και Lindsay Grayson, 2017).



**Εικόνα 2:** Οι κύριοι στόχοι κοινών αντιβιοτικών ουσιών που εξαρτώνται από τη δομή του αντιβιοτικού και τον βαθμό συγγένειας σε ορισμένες ενδοκυττάριας θέσεις- στόχους. Στους στόχους αυτούς περιλαμβάνονται: το κυτταρικό τοίχωμα, τα ριβοσώματα, το DNA καθώς και κάποιες μεταβολικές οδοί.

<p><b>Πενικιλίνες</b></p>  <p><b>Αμπικιλίνη</b></p>	<p>Αμοξικιλίνη, Αμπικιλίνη, Αζλοκιλλίνη, Μπακαμπικιλίνη, Καρμπενικιλίνη, Καριντακιλλίνη, Κλοξακιλλίνη, Δικλοξακιλλίνη, Επικιλίνη, Φλουκλοξακιλλίνη, Μεταμπικιλίνη, Μεζλοκιλλίνη, Ναφκιλλίνη, Πιπερακιλλίνη, Πιβαμπικιλίνη, Σουλπενικιλίνη, Τικαρκιλίνη</p>	
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);"><b>Κεφέςμες</b></p>	<p><b>Κεφαλοσπορίνες</b></p>	<p><b>Κεφαλοσπορίνες I</b></p>  <p><u>Κεφαλοθίνη</u></p> <p>Κεφακετρίλη, Κεφαδροξίλη, Κεφαλεξίνη, Κεφαογλυκίνη, Κεφαλόνη, Κεφαλορίδη, Κεφαλοτίνη, Κεφαπρίνη, Κεφατριζίνη, Κεφαζεδόνη, Κεφαζαφλόρη, Κεφαολίνη, Κεφραδίνη, Κεφροξαδίνη, Κεφτεζόλη</p>
		<p><b>Κεφαλοσπορίνες II</b></p>  <p><u>Κεφουροξίμη</u></p> <p>Κεφακλόρη, Κεφμανδόλη, Κεφμεταζόλη, Κεφμινόξη, Κεφονισίδη, Κεφορανίδη, Κεφοτιάμη, Κεφπροζίλη, Κεφμπουπεραζόνη, Κεφουροξίμη, Κεφουζονάμη</p>

	<p><b>Κεφαλοσπορίνες III</b></p>  <p><u>Κεφταζιδίμη</u></p>	<p>Κεφκαπίνη, Κεφδαλοξίμη, Κεφδινίρη, Κεφδιτορίνη, Κεφεταμέτη, Κεφφιζίμη, Κεφμενοξίμη, Κεφφοδιζίμη, Κεφφοπεραζόνη, Κεφοταξίμη, Κεφπιμιζόλη, Κεφπιραμίδη, Κεφποδοξίμη, Κεφσουλοδίμη, Κεφταζιδίμη, Κεφτεράμη, Κεφτιβουτίνη, Κεφτιολίνη, Κεφτιζοξίμη, Κεφτριαξόνη, Φλομοξεφίμη, Λαταμοξεφίμη</p>
	<p><b>Κεφαλοσπορίνες IV</b></p>  <p><u>Κεφεπίμη</u></p>	<p>Κεφεπίμη, Κεφοζοπράνη, Κεφπιρόμη, Κεφκουινόμη</p>
<p><b>Κεφαμυκίνες</b></p>  <p><u>Κεφοξιτίνη</u></p>	<p>Κεφοξιτίνη, Κεφοτετάνη, Κεφμεταζόλη, Λαταμοξέφη</p>	
<p><b>Καρβαπενέμες</b></p>  <p><u>Ιμιπενέμη</u></p>	<p>Βιαπενέμη, Ντοριπενέμη, Ερταπενέμη, Ιμιπενέμη, Μεροπενέμη, Πανιπενέμη, Φαροπενέμη</p>	

**Πίνακας 1:** Οι κλινικά διαθέσιμες κατηγορίες αντιβιοτικών.

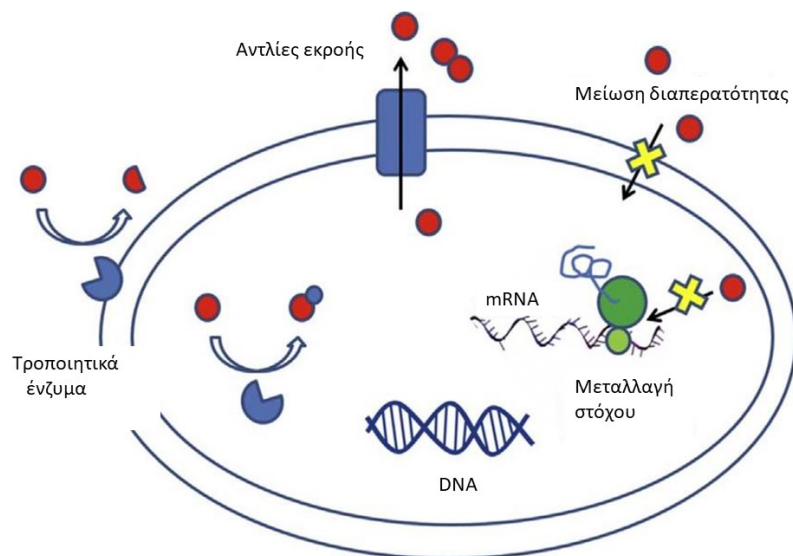


#### **iv) Αντιμικροβιακή αντοχή**

Το 2016 πάνω από 154 εκατομμύρια αντιβιοτικά συντογογραφήθηκαν μόνο στις Η.Π.Α. ενώ στην Ευρώπη ο αριθμός αναλογεί σε 25 ημερήσιες δόσεις ανά χίλιους κατοίκους. Η Ελλάδα κατέχει την μεγαλύτερη κατανάλωση στην Ευρώπη με 36 ημερήσιες δόσεις ανά χίλιους κατοίκους (ECDC, 2018). Η τεράστια και εν μέρη αχρείασθη (έως το 40% των περιπτώσεων) υπερκατανάλωση αντιβιοτικών ουσιών έχει ως συνέπεια την ευρεία εξάπλωση ανθεκτικών στα αντιβιοτικά μικροοργανισμών. Τα ανθεκτικά βακτήρια κυριαρχούν σε περιβάλλοντα υγειονομικής περίθαλψης όπου η επιλεκτική πίεση των αντιβιοτικών είναι έντονη. Παρ' όλα αυτά, διασπορά και μεταφορά στελεχών που φέρουν μεγάλη ποικιλία γονιδίων αντοχής έχει επίσης εμφανιστεί και στο περιβάλλον της κοινότητας καθώς και σε ζώα και σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης (Berendonk *et al.*, 2015). Οι σοβαρές θεραπευτικές συνέπειες αυτού του προβλήματος δημόσιας υγείας έχουν αναγνωριστεί από την επιστημονική κοινότητα και τις διεθνείς οργανώσεις δημόσιας υγείας. Εκτενείς προειδοποιητικές αναφορές και αναλύσεις έχουν γίνει από όλους του κρατικούς και διακρατικούς φορείς υγείας καθώς ήδη πολυανθεκτικά στελέχη ευθύνονται για πάνω από 700.000 θανάτους ετησίως καθώς και για έξοδα δισεκατομμυρίων στα δημόσια συστήματα υγείας λόγω του αυξημένου αριθμού ασθενών και των επιπλοκών που παρουσιάζουν αυτοί (Naylor *et al.*, 2018). Η ελλιπής κατανόηση των μηχανισμών εμφάνισης και διασποράς των πολυανθεκτικών βακτηρίων σε συνδυασμό με την έλλειψη νέων αντιμικροβιακών παραγόντων προοιωνίζει την επανάληψη εποχών πανδημιών που η ανθρωπότητα πίστευε ότι είχε αφήσει πίσω της για πάντα.

#### **v) Μηχανισμοί αντοχής**

Η ακραία προσαρμοστικότητα του γονιδιώματος των βακτηρίων τους προσφέρει ένα σύνολο πλεονεκτημάτων στη μάχη με τους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Η αντιμικροβιακή αντοχή μπορεί να είναι φυσική ή επίκτητη ενώ συνολικά, τα βακτήρια χρησιμοποιούν τέσσερεις κύριους μηχανισμούς για να απαλλαγούν από τα αντιβιοτικά: τροποποίηση του στόχου δράσης, ενζυμική αλληλεπίδραση, μείωση της διαπερατότητας και αντλίες εκροής (Yelin και Kishony, 2018).



**Εικόνα 3:** Οι κύριοι μηχανισμοί αντιμικροβιακής αντοχής στα βακτήρια

(I) Τροποποίηση του στόχου δράσης.

Ένας κοινός τρόπος των βακτηριών για να αποφύγουν την δράση των αντιβιοτικών είναι παρεμβαίνοντας και τροποποιώντας το στόχο δράσης τους. Αυτό μπορεί να συμβεί με την προστασία του στόχου όπως στην περίπτωση της επίκτητης πρωτεΐνης αντοχής Qnr που επιφέρει αντοχή στις φθοριοκινολόνες. Η Qnr δρά ως ομόλογο του DNA που ανταγωνίζεται τη θέση δέσμευσης της DNA γυράσης και τοποϊσομεράσης. Άλλοι μηχανισμοί σε αυτή την κατηγορία είναι η γονιδιακή μετάλλαξη του στόχου, η ενζυμική επίδραση στον στόχο μέσω μεθυλίωσης και η πλήρης αντικατάσταση του στόχου (Tran και Jacoby, 2002).

(II) Μείωση διαπερατότητας

Πολλά από τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στην κλινική πρακτική έχουν ενδοκυτταρικούς στόχους ή στην περίπτωση των Gram-αρνητικών στελεχών στόχους στην εσωτερική, κυταροπλασματική μεμβράνη. Συνεπώς, το αντιβιοτικό μόριο πρέπει να διείσδυση στην εξωτερική και / ή στην κυταροπλασματική μεμβράνη για να εμφανίσει την αντιμικροβιακή του δράση. Κυρίως Gram-αρνητικά βακτήρια έχουν αναπτύξει μηχανισμούς μείωσης της διαπερατότητας της εξωτερικής τους

μεμβράνης, αποτρέποντας την είσοδο του αντιβιοτικού στο εσωτερικό του βακτηριακού κυττάρου. Υδροφιλά μόρια όπως οι β-λακτάμες είναι ιδιαίτερα επιρρεπή σε αλλαγές στην διαπερατότητα καθώς βασίζονται σε γεμάτα με νερό κανάλια διάχυσης που λέγονται πορίνες για την μεταφορά τους στο εσωτερικό του κυττάρου (Delcour, 2009).

### (III) Αντλίες εκροής

Η πρώτη παρατήρηση ενός συστήματος μηχανισμού εκροής περιεγράφηκε στις αρχές του 1980 στην *Escherichia coli* και περιελάμβανε την ενεργή εκροή τετρακυκλίνης από το κυτταρόπλασμα. Έκτοτε, πολλές κατηγορίες αντλιών εκροής έχουν χαρακτηριστεί τόσο σε Gram-αρνητικά όσο και σε Gram-θετικά είδη. Αυτά τα συστήματα μπορεί να είναι εξειδικευμένα για ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό όπως τα γονίδια *tet* για την τετρακυκλίνη και τα γονίδια *mef* για τις μακρολίδες στους πνευμονόκοκκους ή να είναι ευρέος φάσματος (Roberts, 2005). Ο μηχανισμός αυτός επηρεάζει ένα μεγάλο εύρος αντιβιοτικών συμπεριλαμβανομένων των β-λακταμικών, φθοριοκινολονών και πολυμυξινών. Τα γονίδια που κωδικοποιούν αυτές τις αντλίες βρίσκονται είτε σε κινητά γενετικά στοιχεία (MGEs) ή στο χρωμόσωμα. Υπάρχουν 5 κύριες κατηγορίες τέτοιων αντλιών: (i) η major facilitator superfamily (MFS), (ii) η small multidrug resistance family (SMR), (iii) η resistance-nodulation-cell-division family (RND), (iv) η ATP-binding cassette family (ABC), και η (v) multidrug and toxic compound extrusion family (MATE). Οι οικογένειες αυτές διαφέρουν δομικά, ως προς την τους ενεργειακή πηγή, το εύρος υποστρωμάτων που είναι σε θέση να αντλήσουν και στον τύπο των βακτηρίων στους οποίους διανέμονται (Piddock, 2006).

(i) Αντλίες τύπου MFS: Η κατηγορία μεταφορέων MFS συναντάται σε όλα τα ζώντα είδη και αποτελεί την μεγαλύτερη και πιο ποικιλόμορφη κατηγορία. Οι MFS είναι είτε μονομεταφορείς (Uniporters) (μεταφέρουν το υποστρώμα διαμέσου της λιπιδικής διπλοστοιβάδας χωρίς την χρήση ιόντων σύζευξης), είτε συμεταφορείς (symporters) (η μεταφορά του υποστρώματος διενεργείται ταυτόχρονα με την μεταφορά ιόντων προς την ίδια

κατεύθυνση) είτε αντιμεταφορείς (antiporters) (η μεταφορά του υποστρώματος εκτελείτε προς την αντίθετη κατεύθυνση από την μεταφορά ιόντων). Τα περισσότερα μέλη αυτής της υπερικογένειας λειτουργούν ως μονομερείς μονάδες. Αποτελούνται από 400 έως 600 αμινοξέα και διαθέτουν 12 ή 14 διαμεμβρανικές έλικες (TMHs) οργανωμένες σε δύο τμήματα, καθένα από τα οποία αποτελείται από δέσμες έξι ελίκων. Ηεκροή αντιβιοτικών οφείλεται σε μέλη της οικογένειας αντιμεταφορέων (αντιβιοτικό:H<sup>+</sup>) DHA1 και DHA2. Ο κύκλος μεταφοράς των πρωτεϊνών MFS αποτελείται από την πρόσδεση και απελευθέρωση του υποστρώματος και πρωτονίων. Η στοιχειομετρία ανταλλαγής αντιβιοτικού:πρωτονίων εξαρτάται από την οικογένεια. Για παράδειγμα, η οικογένεια μεταφορέων DHA2 ανταλλάσσει δύο πρωτόνια με ένα μόριο υποστρώματος. Στα περισσότερα Gram αρνητικά βακτήρια απαντάται η οικογένεια DHA2 (Costa *et al.*, 2014).

- (ii) Αντλίες τύπου SMR: Οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής προσδίδουν αντοχή έναντι ενώσεων τεταρτοταγούς αμμωνίου καθώς και άλλων λιπόφιλων κατιόντων σε αρχαία και βακτήρια. Είναι σχετικά μικρές καθώς αποτελούνται από τέσσερις διαμεμβρανικές έλικες και ενεργούν ως ομοδιμερή ή ετεροδιμερή. Δομικά, οι τρεις πρώτες TMHs δημιουργούν μια κοιλότητα πρόσδεσης του υποστρώματος, ενώ η τέταρτη έλικα εμπλέκεται κυρίως στις αλληλεπιδράσεις διμερισμού. Κατά τη διάρκεια της μεταφοράς, η αντλία εναλλάσσεται μεταξύ εσωτερικού και εξωτερικού προσανατολισμού μέσα από δομικές αλλαγές των δύο πρωτομερών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα σε κλινικά στελέχη είναι η πρωτεΐνη εκροής της χλωρεξιδίνης (Acel) σε στελέχη *Acinetobacter baumannii* (Paulsen *et al.*, 1996).
- (iii) Αντλίες τύπου RND: Αντλίες τέτοιου τύπου έχουν χαρακτηριστεί σε αρκετά κλινικά βακτήρια όπως είναι οι αντλίες AcrB στην *Escherichia coli*, οι MexB στην *Pseudomonas aureginosa*, οι MtrD

στην *Neisseria gonorrhoeae*, οι CmeB στο *Campylobacter jejuni*, και AdeABC στο *Acinetobacter baumannii*. Οι πρωτεΐνες του τύπου RND είναι μεγάλες σε σχέση με άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες και τα μέλη αυτής της υπερκογένειας σχηματίζουν συνήθως ομοτριμερή. Όλοι οι μεταφορείς RND έχουν μία ποικίλη δομή και μία χαρακτηριστική, διατηρημένη, διαμεμβρανική περιοχή καθώς και μία περιπλαστική και κυττροπλαστική περιοχή που συνολικά αποτελούν πάνω από το 60% της μάζας της πρωτεΐνης. Τα υποστρώματα των αντλιών αυτού του τύπου συμπεριλαμβάνουν ενώσεις λιποφιλικού χαρακτήρα καθώς επίσης και κατιονικού, ουδέτερου (χλωραμφαινικόλη) και όξινου (β-λακτάμες) τύπου (Nikaido και Takatsuka, 2009).

- (iv) Αντλίες τύπου ABC: Οι μεταφορείς τύπου ABC εμφανίζουν λειτουργική ποικιλομορφία και σχετίζονται με την ATP-εξαρτώμενη εισαγωγή και εκροή διαλυτών ουσιών. Δομικά, αποτελούνται από διαμεμβρανικά τμήματα που περιέχουν κοιλότητες δέσμησης του υποστρώματος και περιοχές πρόσδεσης νουκλεοτιδίων (nucleotide-binding domains (NBDs)) που προσδέουν και υδρολύουν το ATP οδηγώντας έτσι των κύκλο μεταφοράς. Οι αντλίες ATP χωρίζονται σε ομοδιμερές και ετεροτετραμερές οικογένειες, με τα μέλη της τελευταίας να προσδίδουν αντιμικροβιακή αντοχή σε Gram θετικά βακτήρια. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι μεταφορείς της οικογένειας MacB που σχετίζεται με αντιμικροβιακή αντοχή στην *Escherichia coli* και σε άλλα Gram αρνητικά βακτήρια. Σε αυτά τα στελέχη η MacB δημιουργεί ένα τριμερές σύμπλοκο με την πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης TolC και την περιπλαστική πρωτεΐνη MacA. Οι αντλίες αυτές μεταφέρουν εκτός του κυττάρου μακρολίδες καθώς επίσης και λιποπεπτίδια και λιποπολυσακχαρίτες χρησιμοποιώντας για την μεταφορά ενέργεια από την υδρόλυση του ATP από την MacB (Eckford και Sharom, 2009).

(v) Αντλίες τύπου MATE: Οι μεταφορείς τύπου MATE σε βακτηριακά στελέχη χρησιμοποιούν τις διαμεμβρανικές συγκεντρώσεις  $H^+$  και  $Na^+$  για να μεταφέρουνε πολυαρωματικά και κατιονικά αντιβιοτικά. Δομικά, αποτελούνται από δύο δέσμες έξι TMHs οι οποίες διαφέρουν τοπολογικά από αυτές των μεταφορέων τύπου MFSs. Τα τμήματα του αμινικού και καρβοξυλικού τους άκρου σχηματίζουν μια κοιλότητα σχήματος V, ανοιχτή προς τον εξωκυττάριο χώρο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η NorM του είδους *Neisseria gonorrhoeae*, όπου μία περιοχή πρόσδεσης αντιβιοτικών έχει προσδιοριστεί στην κεντρική κοιλότητα, κοντά στην περιοχή αλληλεπίδρασης μεμβράνης-περιπλάσματος. Καθώς η περιοχή πρόσδεσης του αντιβιοτικού είναι κοντά στον περιπλασμικό χώρο και είναι μη προσβάσιμη, η πρωτεΐνη θα πρέπει να αλλάζει την δομή της για να αναγνωρίζει το υπόστρωμα στον κυτταροπλασμικό χώρο (Kuroda και Tsuchiya, 2009).

Ένα από τα πιο σημαντικά κλινικά είδη που προκαλούν σοβαρές ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις και έχουν ως κύριο μηχανισμό αντοχής αντλίες εκροής είναι το *Acinetobacter baumannii*. Κλινικά στελέχη *Acinetobacter baumannii* προκαλούν πνευμονία, μηνιγγίτιδα, σηψαιμία και επεισόδια ουρολοιμώξεων κυρίως μέσω της χρήσης καθετήρων συχνά εμφανίζοντας πολυανθεκτικούς φαινοτύπους (Peleg, Seifert και Paterson, 2008). Μέχρι σήμερα, τρία συστήματα αντλιών της υπεροικογένειας RND, δυο MFS και από ένα MATE και SMR έχουν χαρακτηριστεί ως αντλίες εκροής αντιβιοτικών στο βακτηριακό αυτό είδος.

Τα Gram αρνητικά βακτήρια όπως το *Acinetobacter* περιβάλλονται από εξωτερική μεμβράνη συνεπώς αντλίες της οικογένειας RND παρουσιάζονται ως ένα σύστημα τριών παραγόντων δομικά συντηρημένα σε όλα τα βακτηριακά είδη. Στα πολυανθεκτικά στελέχη *Acinetobacter* έχει παρατηρηθεί η υπερέκφραση τριών συστημάτων RND, των: AdeABC, AdeFGH και AdeIJK (Yoon, Courvalin και Grillot-Courvalin, 2013). Τα συστήματα AdeABC και AdeFGH εμφανίζονται ως επίκτητη αντοχή ενώ το σύστημα AdeIJK αποτελεί στοιχείο του χρωμοσώματος. Το σύστημα

AdeABC, το πρώτο του είδους που χαρακτηρίστηκε ρυθμίζεται από ένα διπλό σύστημα γονιδίων το *adeRS* που βρίσκεται ανοδικά του οπερονίου *adeABC* (Roca *et al.*, 2011). Τυπικά, το πρώτο γονίδιο του οπερονίου κωδικοποιεί μία μεμβρανική πρωτεΐνη σύντηξης [membrane fusion protein (MFP)] όπως οι AdeA, AdeF, και AdeI. Το δεύτερο γονίδιο κωδικοποιεί τους RND μεταφορείς AdeB, AdeG, και AdeJ αντιστοίχως. Τέλος, το τρίτο και τελευταίο γονίδιο του οπερονίου κωδικοποιεί τον παράγοντα εξωτερικής μεμβράνης [outer membrane factor (OMF)], συγκεκριμένα τους AdeC, AdeH, και AdeK στα *A. baumannii* (Coyne, Courvalin και Périchon, 2011).

Τα συστήματα AdeABC και AdeFGH εμφανίζονται ως επίκτητη αντοχή ενώ το σύστημα AdeIJK αποτελεί στοιχείο του χρωμοσώματος. Στα συστήματα αυτά η AdeB,F,J είναι οι πρωτεΐνες μεταφορείς, οι AdeA,F,I είναι οι πρωτεΐνες μεμβρανικής σύντηξης και οι AdeC,H,K είναι τα κανάλια πρωτεΐνων εξωτερικής μεμβράνης. Μηχανιστικά η AdeB,F,J συλλαμβάνουν το υπόστρωμα είτε από τα φωσφολιπιδία της διπλής στιβάδας είτε από την εσωτερική μεμβράνη είτε από το κυτταρόπλασμα και τα μεταφέρει στον εξωκυτταρικό χώρο μέσω ενός εκ των AdeC,H,K. Οι περιπλαστικές πρωτεΐνες AdeA,F,I συντονίζουν την συνεργασία μεταξύ των AdeB,F,J και AdeC,H,K. Όπως όλα τα μέλη της οικογένειας RND έτσι και το σύστημα AdeABC χρησιμοποιεί την διαβάθμιση πρωτονίων για να ενεργοποιήσει την εκροή ανταλλάσσοντας ένα ιόν H<sup>+</sup> για ένα μόριο φαρμάκου (Esterly *et al.*, 2011). Το σύστημα AdeABC εμφανίζει δραστικότητα σε μία σειρά αντιβιοτικών υποστρωμάτων συμπεριλαμβανομένων των αμινογλυκοσίδων, τετρακυκλίων, φθοροκυνολόγων και της ερυθρομυκίνης καθώς και κάποιων β-λακταμικών (Eswaran *et al.*, 2004), (Paulsen, 2003). Το σύστημα AdeIJK εμφανίζει αντοχή στις β-λακτάμες, χλωραμφαινικόλη, τετρακυκλίνη, ερυθρομυκίνη, λινκοσαμίδα, φθοροκινολόνες, φουσιδικό οξύ, ριφαμπικίνη, τριμεθοπρίμη, νεονοβιοκίνη και κλινδαμυκίνη (Damier-Piolle *et al.*, 2007) ενώ το σύστημα AdeFGH επιφέρει αντοχή στις

τετρακυκλίνη, χλωραμφαινικόλη, σιπροφλοξασίνη και τριμεθοπρίμη (Coyne et al., 2010).

(IV) Ενζυμική αλληλεπίδραση: Μία από τις πιο επιτυχημένες στρατηγικές των βακτηρίων για την αντιμετώπιση της δράσης των αντιβιοτικών είναι η παραγωγή ενζύμων που αδρανοποιούν το μόριο προσθέτοντας συγκεκριμένες χημικές αλλαγές στην ένωση ή που αδρανοποιούν/καταστρέφουν το μόριο, καθιστώντας το αντιβιοτικό αδύνατο να αλληλεπιδράσει με τον στόχο του (Lowe, 1982).

Η παραγωγή τροποποιητικών ενζύμων ικανών να εισαγάγουν χημικές μεταβολές στο αντιβιοτικό μόριο είναι ένας πολύ γνωστός μηχανισμός επίκτητης μικροβιακής αντοχής και εμφανίζεται τόσο στα Gram αρνητικά όσο και στα Gram θετικά βακτήρια. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα αντιβιοτικά που επηρεάζονται από αυτές τις τροποποιήσεις λειτουργούν αποτρέποντας την σύνθεση πρωτεϊνών στο επίπεδο των ριβοσωμάτων. Έχουν περιγραφεί πολλοί τύποι τροποποιητικών ενζύμων και οι πιο συχνές βιοχημικές αντιδράσεις που καταλύουν περιλαμβάνουν i) ακετυλίωση (αμινογλυκοσίδες, χλωραμφαινικόλη, στρεπτογραμίνες), ii) φωσφορυλίωση (αμινογλυκοσίδες, χλωραμφαινικόλη) και iii) αδενυλίωση (αμινογλυκοσίδες, λινκοσαμίδες) (Wright, 2005). Ο κυριότερος μηχανισμός αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά είναι η υδρόλυση του β-λακταμικού δακτυλίου από τις β-λακταμάσες, όπου η διάνοιξη του β-λακταμικού δακτυλίου καθιστά το αντιβιοτικό ανενεργό.

#### **vi) β-λακταμάσες**

Η παραγωγή ενζύμων που αποδομούν την αντιμικροβιακή ουσία είναι ίσως ο πιο διαδεδομένος και κλινικά σημαντικός μηχανισμός μικροβιακής αντοχής στις β-λακτάμες (βλ. Πίνακα 2).



Ταξινομικά σχήματα		Αναστολή από κλαβουλανικό οξύ/ EDTA	Αντιπροσωπευτικά ένζυμα/ Κύρια χαρακτηριστικά
Κατά Ambler	Κατά Bush, Jacoby και Medeiros		
A	2a	Κλαβουλανικό οξύ	Πενικιλινάσες Gram θετικών βακτηρίων
	2b	Κλαβουλανικό οξύ	<b>Ευρέος φάσματος (Broad Spectrum)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• TEM-1- TEM-2</li> <li>• SHV-1</li> <li>• Ορισμένες τύπου OXA</li> <li>• Πλασμιδιακές και χρωμοσωματικές</li> <li>• Ευθύνονται για την επίκτητη αντοχή στις πενικιλίνες ευρέος φάσματος</li> </ul>
	2be	Κλαβουλανικό οξύ	<b>Εκτεταμένου φάσματος (Extended Spectrum –ESBL's)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• TEM- και SHV-</li> <li>• Προέρχονται από τις αρχικές TEM 1 και 2 και SHV-1</li> <li>• Εμφανίστηκαν το 1983 και έκτοτε υπάρχει παγκόσμια διασπορά</li> <li>• Παρουσιάζονται συχνότερα σε <i>K. pneumoniae</i> και <i>E. coli</i></li> <li>• Κωδικοποιούνται από γονίδια που φέρονται σε πλασμίδια (συχνά μαζί με άλλα γονίδια αντοχής)</li> <li>• Υδρολύουν πενικιλίνες μονοβακτάμες και τις κεφαλοσπορίνες εκτός από την κεφοξιτίνη</li> <li>• Νεότερες ESBL's (τύπου CTX-M, 1-69)</li> <li>• Άλλες ESBL's (GES- 1, -3, -7, -8, -9, PER-1, -2, -3, VEB 1-6, BES-1, BEL-1, SFO-1)</li> </ul> <p>Ανιχνεύονται με μέτρηση ζωνών αναστολής, δοκιμή συνέργειας των δύο δίσκων.</p>
	2br	Μικρή αναστολή από κλαβουλανικό οξύ	Inhibitor resistant TEM (IRT) TEM-30-TEM-50
	2c	Κλαβουλανικό οξύ	Καρβεκιλλινάσες PSE-1, PSE-3, PSE-4

	2e	Κλαβουλανικό οξύ	Κεφουροξιμάσες
	2f	Κλαβουλανικό οξύ	<b>Καρβαπενεμάσες τάξης A</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Στο σύνολο τους επίκτητες</li> <li>• Εμφανίστηκαν για πρώτη φορά πριν την κλινική χρήση της ιμιπενέμης, την δεκαετία του '80</li> <li>• Χρωμοσωματικές (SME-1, -2, -3, IMI-1, -2, NMC-A) – αναστέλλονται εν μέρει από τους αναστολείς</li> <li>• Πλασμιδιακές (KPC-1, -2, -3, -4, GES/IBC)</li> <li>• Οι KPC καρβαπενεμάσες φαίνεται διαθέτουν τη μεγαλύτερη ικανότητα διασποράς και τα στελέχη που τις παράγουν είναι συχνά πολυανθεκτικά</li> </ul>
B	3	EDTA	<b>Μεταλλο-καρβαπενεμάσες</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ταξινομούνται σε τέσσερις τύπους: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. VIM-1, -2, -3, -4, 5, -7, -11</li> <li>2. IMP-1, -2, -4, -7, -10, -11, -13, -16, -18</li> <li>3. GIM-1</li> <li>4. SPM-1</li> </ol> </li> <li>• Παρουσιάζουν ευρεία διασπορά, με κυριότερες στον ελλαδικό χώρο τις ενζυμικές ποικιλίες VIM-1, -2, και -4.</li> <li>• Υδρολύουν όλα τα β-λακταμικά εκτός από την αζτρεονάμη και αναστέλλονται από το EDTA, ενώ δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ.</li> <li>• Κωδικοποιούνται από γονίδια που φερονται συνήθως σε ενσωματόνια τάξης 1.</li> <li>• Η παραγωγή μεταλλοενζύμου δεν αυξάνει πάντα την αντοχή στις καρβαπενέμες τόσο ώστε να θεωρηθεί ανθεκτικό το στέλεχος. Για την ανίχνευση τους, χρησιμοποιείται ένας αναστολέας του ενζύμου (EDTA) σε συνδυασμό με καρβαπενέμη ή/και κεφταζιδίμη. Το EDTA αναστέλλει την καρβαπενεμάση και ελαττώνει το επίπεδο αντοχής.</li> </ul>
C	1	-	<b>AmpC β-λακταμάσες "Κεφαλοσπορινάσες"</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• CIT-, ENT-, FOX-, MOX-, DHA-, CMY, LAT και ACC-</li> <li>• Η έκφραση τους είναι ιδιοσυστασιακή, είτε επαγωγήμη, είτε αποκατεσταλμένη</li> <li>• Παράδειγμα χρωμοσωματικών και επαγωγήμων: <i>Enterobacter spp</i>, <i>Acinetobacter spp</i>, <i>Serratia spp.</i>, <i>Pseudomonas spp.</i></li> <li>• Παράδειγμα χρωμοσωματικών και μη</li> </ul>

			<p>επαγωγίμων: <i>E. coli</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Παράδειγμα πλασμιδιακών: <i>E. coli</i>, <i>Klebsiella spp</i>, <i>P. mirabillis</i></li> <li>• Υδρολύουν όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, εκτός από την κεφεπίμη και τις καρβαπενέμες</li> <li>• Έχει παρατηρηθεί αντοχή στις καρβαπενέμες σε συνδυασμό με απώλεια πορινών</li> <li>• Δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ</li> </ul>
D	2d	Ποικίλη αναστολή από κλαβουλανικό οξύ	<p><b>Καρβαπενεμάσες τάξης D</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ετερογενής ομάδα ως προς τη δομή και τις βιοχημικές ιδιοτητες</li> <li>• OXA-1- OXA-11, PSE-2</li> <li>• Οι OXA καρβαπενεμάσες αποτελούν τον βασικότερο μηχανισμό αντοχής στις καρβαπενέμες στο γένος <i>A. baumannii</i></li> <li>• Το φάσμα υδρόλυσης ποικίλλει. Υδρολύουν τις πενικιλίνες, αλλά ελάχιστα έως καθόλου τις εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορίνες και την αζτρεονάμη</li> </ul> <p>Έχουν χαμηλότερη υδρολυτική δράση έναντι των καρβαπενεμών σε σχέση με τα μεταλλοένζυμα. Ωστόσο σε κλινικά στελέχη παρουσιάζεται υψηλή αντοχή λόγω της συνύπαρξης άλλων μηχανισμών αντοχής</p>
-	4	Κλαβουλανικό οξύ	Πενικιλινάσες από <i>Pseudomonas ceracia</i>

**Πίνακας 2:** Τα δύο κυριότερα σχήματα ταξινόμησης των β-λακταμασών

Τα ένζυμα αυτά που ονομάζονται β-λακταμάσες υδρολύουν τον αμιδικό δεσμό του β-λακταμικού δακτυλίου καθιστώντας το αντιβιοτικό ανενεργό. Παρά το ότι οι β-λακταμάσες αρχικά περιγράφηκαν το 1940, ένα χρόνο πριν την εισαγωγή της πενικιλίνης στην αγορά, είναι δεκτό ότι προϋπήρχαν εδώ και εκατομμύρια χρόνια (Gniadkowski, 2001).

Αμέσως μετά την γενικευμένη χρήση της πενικιλίνης, λοιμώξεις από ανθεκτικά στελέχη *S.aureus* έγιναν αμέσως αντιληπτά και αντικείμενο έρευνας. Τα γονίδια των β-λακταμασών ονομάζονται με το πρόθεμα *bla* ακολουθούμενο από το όνομα της β-λακταμάσης που το γονίδιο κωδικοποιεί. Τα γονίδια αυτά έχουν βρεθεί ως μέρος του χρωμοσώματος, σε MGEs καθώς και ως τμήματα ιντεγκρονίων γεγονός που διευκολύνει ιδιαίτερα την εξάπλωσή τους (Pal *et al.*, 2016). Σήμερα έχουν περιγράψει

περισσότερες από 1.000 β-λακταμάσες ως αποτέλεσμα δισεκατομμυρίων ετών βακτηριακής εξέλιξης και ταξινομούνται με δύο διαφορετικές κατηγοριοποιήσεις.

Οι β-λακταμάσες αποτελούν μια οικογένεια ενζύμων που αποικοδομούν ή τροποποιούν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά δεσμεύοντας με ομοιοπολικούς δεσμούς τα καρβοξύλια του δακτυλίου της β-λακτάμης και υδρολύοντας τον αμιδικό τους δεσμό. Οι β-λακταμάσες αποτελούν το πιο σημαντικό μηχανισμό ανθεκτικότητας έναντι των β-λακταμικών αντιβιοτικών (Jacoby και Munoz-rgice, 2005). Επιπλέον, αποτελούν ένα εξαιρετικό παράδειγμα των διαφορετικών δυνατοτήτων εξέλιξης για έναν μηχανισμό αντοχής: (i) μετάλλαξη σε ένα γονίδιο β-λακταμάσης, (αλλαγές της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που οδηγούν σε αλλαγές αμινοξέων) με αποτέλεσμα την τροποποίηση της υδρολυτικής ικανότητας του ενζύμου, (ii) αύξηση στην αποτελεσματικότητα της έκφρασης της β-λακταμάσης με την χρήση διαφορετικών προαγωγών των γονιδίων ή με την συσχέτιση τους με «αλληλουχίες εισδοχής» IS (Insertion Sequences), (iii) χρήση σύνθετης γονιδιακής ρύθμισης για την αύξηση της συνολικής ποσότητας του ενζύμου, και (iv) συσχέτιση του αντίστοιχου bla γονιδίου με μεταθετά γενετικά στοιχεία (mobile genetic elements, MGEs) όπως πλασμίδια ή τρανσποζόνια γεγονός που διευκολύνει την μεταφορά του γονιδίου μεταξύ βακτηριακών στελεχών (Hegstad *et al.*, 2010). Οι παραπάνω εξελικτικές διαδικασίες έχουν αυξήσει την παρουσία βακτηρίων ικανών να υδρολύουν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, ενώ έχουν πολλαπλασιάσει την ποικιλομορφία και τον ρυθμό εξέλιξης των β-λακταμασών (Hendrik, *et al.*, 2015).

Εάν και η αρχική προέλευση των περισσότερων γονιδίων bla παραμένει άγνωστη, θεωρείται ότι σχετίζεται με βακτήρια που παράγουν β-λακταμικές ενώσεις. Επικρατεί η άποψη ότι βακτήρια που παράγουν αντιβιοτικές ενώσεις απαιτείται να παράγουν και το αντίστοιχο 'αντίδοτο' ώστε να μην επηρεάζονται από την παρουσία της αντιβιοτικής ουσίας. Στα στελέχη αυτά η παραγωγή β-λακταμικών και β-λακταμασών πιθανώς να συν-ρυθμίζεται. Περιβαλλοντικά βακτηριακά είδη όπως τα *Streptomyces* και

*Nocardia* παράγουν ταυτοχρόνως β-λαταμικές ενώσεις και β-λακταμικά ένζυμα, ενώ μύκητες του περιβάλλοντος όπως του είδους *Penicillium* είναι γνωστό ότι παράγουν β-λακταμικές ενώσεις (Gniadkowski, 2008).

Μερικά από τα γονίδια που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των β-λακταμών, όπως τα *cef* ή *pcb*, εμφανίζουν παρόμοιες αλληλουχίες σε διαφορετικά είδη βακτηρίων έχοντας πιθανώς εξελιχθεί από ένα κοινό προγονικό γονιδιακό σύμπλεγμα. Το σύμπλεγμα αυτό αργότερα κινητοποιήθηκε από αρχαία βακτήρια σε παθογόνους οργανισμούς. Οριζόντια μεταφορά γονιδίων αντοχής (Horizontal Gene Transfer, HGT) θα μπορούσε να πραγματοποιήθηκε στο έδαφος έως και 370 εκατομμύρια χρόνια πριν, με μεταφορά γονιδίων από βακτήρια σε βακτήρια και από βακτήρια σε μύκητες (Barlow, 2009).

Επίσης, τα γονίδια που συμμετέχουν στην σύνθεση και τον μεταβολισμό του κυτταρικού τοιχώματος ενδέχεται να έχουν κοινούς προγόνους με ευρέως διαδομένα γονίδια που κωδικοποιούν για β-λακταμάσες (γονίδια *bla*) παθογόνων βακτηρίων. Οι β-λακταμάσες και οι πρωτεΐνες δέσμησης πενικιλίνης (PBPs) έχει εξακριβωθεί ότι μοιράζονται κοινές προγονικές αλληλουχίες και σχετίζονται με τον έλεγχο της βιοσύνθεσης αντιβιοτικών. Εκτός των άλλων, μοιράζονται λειτουργίες σε σχέση με την σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και την πεπτιδογλυκάνης. Οι PBPs είναι υπεύθυνες για την κατασκευή, συντήρηση και ρύθμιση της δομής της πεπτιδογλυκάνης. Βρίσκονται συνήθως στην βακτηριακή εσωτερική μεμβράνη με το ενεργό τους κέντρο εκτεθειμένο στον περιπλασμικό χώρο στα Gram αρνητικά βακτήρια και στον αντίστοιχο χώρο στα Gram θετικά (Scheffers και Pinho, 2005). Αντίστοιχα, οι περισσότερες β-λακταμάσες εκκρίνονται στον περιπλασμικό χώρο σε Gram αρνητικά στελέχη ή πέραν του στρώματος πεπτιδογλυκάνης σε Gram θετικά (Meini, Llarrull και Vila, 2014). Όλες οι τάξεις PBPs έχουν ένα ενεργό κέντρο σερίνης, όπως και οι περισσότερες β-λακταμάσες. Με εξαίρεση μία κατηγορία PBPs που έχει αποδειχθεί ότι χρειάζεται ιόντα ψευδαργύρου (Zn) για την δράση της όπως ακριβώς και οι μέταλλο-β-λακταμάσες.

Επιπλέον, μερικές από τις πιο επιτυχημένες β-λακταμάσες εξελίχθηκαν με την κινητοποίηση τους μέσω MGEs σε περιβαλλοντολογικά βακτήρια. Η μεταφορά και η περαιτέρω εξέλιξη τους σε παθογόνα βακτήρια πιθανώς να επιταχύνθηκε από την εκτενή χρήση των β-λακταμικών αντιβιοτικών τα τελευταία 70 χρόνια. Η επιτυχής εξάπλωση των γονιδίων bla έχει να κάνει και με την κινητοποίηση τους μέσω γενετικών πλατφόρμων (genetic platforms), εξυπηρετώντας έτσι την μεταφορά τους μεταξύ διαφορετικών βακτηριακών πληθυσμών (Diene και Rolain, 2014). Οι περισσότερες από αυτές τις πλατφόρμες φέρουν επίσης και άλλα γονίδια αντοχής που διευκολύνουν την επιλογή βακτηρίων που παράγουν β-λακταμάσες μέσω διαδικασιών συν-επιλογής. Σήμερα περισσότερο από το 90% των απομονωμένων στελεχών *Staphylococcus aureus* παράγουν πενικιλινάσες, ενώ το 60% των στελεχών *Escherichia coli* εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη καθώς παράγουν πλασμιδιακές β-λακταμάσες. Οι ποικιλότητα και η διάδοση των ευρέως φάσματος β-λακταμασών (ESBLs) καθώς και η μάστιγα των πιο πρόσφατα ανεπτυγμένων καρβαπενεμασών έχει καταπλήξει την επιστημονική κοινότητα (Bush, 2010).

Η κατά Ambler κατηγοριοποίηση χωρίζει τις β-λακταμάσες με βάση την ομολογία τους σε 4 κατηγορίες (A, B, C, D) (Hall και Barlow, 2005) ενώ η κατηγοριοποίηση τους κατά Bush-Jacoby γίνεται επίσης σε 4 κατηγορίες με βάση το φάσμα υποστρωμάτων (τη βιοχημική τους δομή) (Bush και Jacoby, 2010)

Η κατά Ambler τάξη A αποτελείται από πέντε διακριτούς τύπους καρβαπενεμάσων που έχουν ένα χαρακτηριστικό μόριο σερίνης στο ενεργό τους κέντρο. Οι τρεις τύποι περιλαμβάνουν συνήθως χρωμοσωματικές (IMI, SME, NMC) β-λακταμάσες και οι δύο τύποι πλασμιδιακές (KPC, GES). Όλες οι καρβαπενεμάσες τάξης A αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ και την ταζομπακτάμη.

Η τάξης C β-λακταμάσες σερίνης είναι δραστικές έναντι των πενικιλινών και των κεφαλοσπορινών αλλά δεν υδρολύουν την αζτρεονάμη και δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ. Το πιο χαρακτηριστικό και

κλινικά σημαντικό παράδειγμα τάξης C β-λακταμάσης είναι η κυρίως χρωμοσωμική κεφαλοσπορινάση AmpC των ειδών *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *Providencia spp.*, *Morganella morganii*, και *P. aeruginosa*.

Η τάξης D β-λακταμάσες είναι επίσης λακταμάσες σερίνης και διαφοροποιούνται από τις τάξης A γιατί υδρολύουν την οξακιλίνη και δεν αναστέλλονται επαρκώς από το κλαβουλανικό οξύ. Πολλές OXA λακταμάσες έχουν ανακαλυφθεί μέχρι σήμερα με διαφορετικά υδρολυτικά προφίλ όπως η OXA-11 που υδρολύει τρίτης γενιάς κεφαλοσπορίνες και η OXA-23 και OXA-48 που υδρολύουν καρβαπενέμες. Τέλος, η τάξης B β-λακταμάσες διαφέρουν δομικά από τις υπόλοιπες λόγω της απουσίας σερίνης και παρουσίας δύο δισθενών ιόντων ψευδαργύρου ( $Zn^{+2}$ ) απαραίτητων για την ενζυμική τους δράση. Οι λακταμάσες αυτές ονομάζονται μέταλλο-β-λακταμάσες (MBL). Υπάρχουν δέκα οικογένειες MBL εκ των οποίων οι τρεις είναι οι πιο διαδομένες και κλινικά σημαντικές: IMP, VIM, και NDM. Το φάσμα δράσης των MBL συμπεριλαμβάνει όλα τα β-λακταμικά εκτός της αζτρεονάμης καθιστώντας ιδιαίτερα δυσχερή –αν όχι αδύνατη– τη θεραπεία των λοιμώξεων που προκαλούνται από τα στελέχη που τις παράγουν.

Αυτοί οι μηχανισμοί αντοχής είναι αποτέλεσμα είτε της εξέλιξης / επιλογής ή / και της μεταφοράς γονιδίων αντοχής στα αντιβιοτικά μεταξύ διαφορετικών τάξεων και γενών βακτηρίων. Επομένως, η λεπτομερής μελέτη της βιολογίας της αντίστασης είναι επιτακτική για το σχεδιασμό νέων τρόπων θεραπείας των λοιμώξεων. Ο σχεδιασμός νέων αντιμικροβιακών ουσιών, η εναλλακτική χρήση κλινικά διαθέσιμων αντιβιοτικών και ο σχεδιασμός καινοτόμων συστημάτων στοχοποίησης για την αποτελεσματικότερη χορήγηση των αντιβιοτικών στη θέση της λοίμωξης είναι σημαντικοί στόχοι προκειμένου να ξεπεραστεί το πρόβλημα της βακτηριακής αντοχής (Fernebro, 2011). Η συντριπτική πλειοψηφία των μόνο 17 νέων αντιβιοτικών που βρίσκονται σήμερα σε κλινικές δοκιμές είναι παραλλαγές των ήδη υπάρχοντων κατηγοριών και δεν αποτελούν ουσιαστικές λύσεις (Jean *et al.*, 2019). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει δημοσιοποιήσει

μία λίστα βακτηριακών ειδών που αποτελούν πρώτη και επείγουσα προτεραιότητα λόγω της πολυανθεκτικότητας που εμφανίζουν και της κλινικής τους σημασίας . Στα βακτήρια αυτά συμπεριλαμβάνονται τόσο τα στελέχη του είδους *Acinetobacter* καθώς και τα στελέχη των εντεροβακτηριακών ειδών *Klebsiella pneumoniae* και *E.coli*. Λόγω απουσίας νέων θεραπευτικών μέσων η διατήρησή των ήδη υπαρχόντων αποτελεί πρώτιστη προτεραιότητα.

### **Αναστολείς β-λακταμασών σερίνης**

Οι πιο πετυχημένοι και μοναδικοί μέχρι στιγμής ενισχυτές τάξης IA λειτουργούν κατά των β-λακταμασών σερίνης (τάξεις A, C, D) . Ο πρώτος φυσικός ενισχυτής που είναι το κλαβουλανικό οξύ απομονώθηκε το 1970 από ένα στέλεχος *Streptomyces clavuligerus*. Το κλαβουλανικό οξύ περιέχει τον β-λακταμικό δακτύλιο και παρόλο που δεν έχει παρά ελάχιστη αντιμικροβιακή δράση αναστέλλει την δράση των β-λακταμάσων σερίνης τάξης A προσδένοντας τον β-λακταμικό δακτύλιο του στο ενεργό τους κέντρο. Από το συνδυασμό του με την αμοξικιλίνη προέκυψε το Augmentin που παραμένει σε χρήση εδώ και 30 χρόνια (Chen *et al.*, 2013). Αργότερα οι σουλφόνες β-λακτάμης ταζομπακτάμη και σουλμπακτάμη συνδυάστηκαν επιτυχημένα με τις πενικιλίνες πιπερακιλίνη και αμπικιλίνη αντιστοίχως. Το 2015, μία νέα κατηγορία ενισχυτών κατά των β-λακταμασών εγκρίθηκε για κλινική χρήση, αυτή των διαζαδικυκλοοκτανίων (DABCOs) (Aremu *et al.*, 2016). Το DABCO αβιμπακτάμη σε συνδυασμό με την κεφαλοσπορίνη κεφταζιδίμη (Avycaz) είναι ήδη σε κλινική χρήση. Το κλαβουλανικό οξύ μετά από 30 χρόνια κλινικής με έτσι κι αλλιώς μικρό εύρος δράσης (μόνο β-λακταμάσες σερίνης ταξης A) εμφανίζει όλο και λιγότερη δραστικότητα λόγω της αυξανόμενης εξάπλωσης των ευρέως φάσματος β-λακταμασών (ESBLs). Η ταζομπακτάμη έχει χαμηλή δραστικότητα έναντι των τάξης-A καρβαπενεμασών καθώς και των διαδεδομένων AmpC τύπων και των οξικιλινασών (τάξης D). Η αβιμπακτάμη διατηρεί προς το παρόν την δραστικότητα της εναντίων των ESBLs, OXA, AmpC και KPC (Drawz και Bonomo, 2010).



### **Αναστολείς μεταλλο- β-λακταμασών (MBL)**

Οι αναστολείς β-λακταμασών σερινής που περιεγράφηκαν παραπάνω δεν έχουν δράση έναντι των μέταλλο-β-λακταμάσων (MBL) (μοριακή τάξη Β) λόγω απουσίας της σερινής και της αντ' αυτής παρουσίας δύο δισθενών ιόντων ψευδαργύρου (Zn<sup>+2</sup>) στο ενεργό κέντρο (Walsh *et al.*, 2005). Η παντελής απουσία διαθέσιμου αναστολέα για τις MBL καθώς και η κλινική εξάρτηση στις καρβαπενέμες για την θεραπεία λοιμώξεων που δοκιμάζεται όσο ποτέ άλλοτε λόγω της αυξανόμενης διασποράς Gram-αρνητικών βακτηρίων που παράγουν μέταλλο-β-λακταμάσες (MBL) τύπου NDM, VIM και IMP καθιστούν την εισαγωγή αναστολέων MBL στην κλινική πράξη επιτακτική ανάγκη (Bush και Bradford, 2016). Έντονες ερευνητικές προσπάθειες έχουν σημειωθεί για την ανακάλυψη αναστολέων MBL χωρίς προς το παρόν κάποιο κλινικά διαθέσιμο αποτέλεσμα. Πιθανοί αναστολείς όπως οι στρεπτομυκυτικές φεναζίνες (Yang και Crowder, 1999), θειώδεις ενώσεις όπως οι θιοεστέρες και θιόλες (Mollard *et al.*, 2001) και θειολικοί εστέρες μερκαπτοοξικού οξέος (Kurosaki *et al.*, 2005), αλκοόλες τριφθορομεθυλίου και κετόνες (Walter *et al.*, 1996), διφαινυλικές τετραζόλες (Toney *et al.*, 1998), παράγωγα φθαλικού οξέος (Toney *et al.*, 2001), πυριδινικά δικαρβοξυλίου (Johnson *et al.*, 2010) είναι λίγοι μόνοι από τους χημικούς παράγοντες που έχουν βρεθεί να έχουν δραστηριότητα έναντι των MBL σε πειράματα in-vitro αλλά είτε τα αποτελέσματα δεν μεταφράζονται in-vivo, είτε οι παράγοντες αυτοί είναι εξαιρετικά τοξικοί και συνεπώς απαγορευτικοί για κλινική χρήση. Προσφάτως ανακαλύφθηκε ένα μυκητιακό φυσικό προϊόν που ονομάζεται ασπεργιλλομαραζίνη Α (AMA) το οποίο εμφανίζει δραστηριότητα ως αναστολέας των MBL NDM και VIM τόσο in-vitro όσο και in-vivo σε συνδυασμό με την μεροπενέμη και έχει αποδεκτό τοξικολογικό προφίλ αλλά η αξιολόγησή του δεν έχει ακόμα ολοκληρωθεί (Faridoon και Ul Islam, 2013).

### **Αναστολείς αντλιών εκροής**

Εκτός από την εκτεταμένη έρευνα για την δημιουργία και ανακάλυψη νέων μορίων αναστολέων των β-λακταμασών ή μορίων ενισχυτών σημαντική προσπάθεια έχει γίνει για την ανακάλυψη φυσικών ή τεχνητών μορίων

αναστολέων των αντλιών εκροής που περιεγράφηκαν παραπάνω (Hemaiswarya, Kruthiventi και Doble, 2008)

### **Φυσιικοί αναστολείς**

Φυτικά αλκαλοειδή: Φυτικά αλκαλοειδή ινδόλης όπως η ρεσερπίνη που απομονώθηκε από τις ρίζες του φυτού *Rauwolfia serpentina* είναι ένας επιτυχημένος αναστολέας των BMR αντλιών εκροής στα Gram-θετικά στελέχη του *Bacillus subtilis* καθώς των αντλιών εκροής NorA (44% ομολογία με την BMR) σε στελέχη *S.aureus* επαναφέροντας την δραστικότητα της τετρακυκλίνης. Μηχανιστικά είναι γνωστό ότι η ρεσερπίνη προσδέεται σε μια περιοχή στόχου BMR που περιλαμβάνει δύο αμινοξέα φαινυλαανίνης και μία βαλίνη στις θέσεις 143, 306 και 286 αντιστοίχως (Neyfakh, Bidnenko και Chen, 2006).

Φλαβονολιγνάνες: Είναι φαινολικοί μεταβολιτές φυτικής προέλευσης προερχόμενοι από το φυτό *Berberis* και αποτελεσματικοί αναστολείς της αντλίας εκροής NorA επαναφέροντας την δραστικότητα της αντιβιοτικής ουσίας βερβερίνης η οποία επίσης παράγεται από φυτά του ίδιου γένους.

Μεθοξυλιωμένες φλαβόνες και ισοφλαβόνες: Τέτοιες ενώσεις όπως οι φλαβόνες 9-11 προερχόμενες από το φυτό *Lupinus argenteus* και η φλαβόνη 12 από το φυτό *Daleaspinosa* λειτουργούν ως αναστολείς του συστήματος αντλιών NorA σε Gram θετικά στελέχη ενισχύοντας την δραστικότητα της βερβερίνης έως και 16 φορές σε πειράματα προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) (Morel *et al.*, 2003).

Κατεχίνες γαλάτες: Οι πολυφαινολικοί αυτοί αναστολείς που βρίσκονται σε φύλλα του πράσινου τσαγιού έχουν αποδειχθεί ότι μειώνουν το MIC της νορφλοξακίνης 4 φορές σε ανθεκτικά στελέχη *S. aureus* και *S. epidermis*. Συγγενικές κατεχίνες εμφανίζουν δραστικότητα έναντι του συστήματος αντλιών εκροής NorA (Markham *et al.*, 1999).

Φαινολικά διτερπένια: Τα διτερπένια καρνοσικό οξύ και καρνοζόλη του βοτάνου δενδρολίβανου λειτουργούν ως ενισχυτές των αντιβιοτικών τετρακυκλίνη και ερυθρομυκίνη εναντίων κλινικών στελεχών *S. Aureus* που υπερεκφράζουν τα αντλίες εκροής Msr(A) και Tet(K) (Smith *et al.*, 2007).

Πολυακυλιωμένες νεοεσπεριδοσίδες: Οι νεοεσπεριδοσίδες του φυτού *Geraniumc aespitosum* είναι επίσης αναστολείς του συστήματος εκροής NorA. Η δραστικότητα τους είναι περιορισμένη εάν και πειραματικά έχουν σε μεμονωμένες περιπτώσεις επαναφέρει την δραστικότητα των αντιβιοτικών νορφλοξακίνη και σιπροφλοξακίνη (E.C.J. *et al.*, 2007).

Ετεροκυκλικοί μακροκύκλοι: Το φυτικής προέλευσης πορφυριμίδιοπορφυρίνης-A αποτελείται από τέσσερις τροποποιημένες υπομονάδες πυρολίου και αποτελεί προϊόν του μεταβολισμού της χοληστερόλης. Τα παράγωγα αυτά έχουν επιτυχημένα επανευαισθητοποιήσει ανθεκτικά στελέχη *S. aureus* σε β-λακταμικά αντιβιοτικά (Y. Mahmood, *et al.*, 2016).

### **Συνθετικοί αναστολείς**

Πεπτιδομιμητές: Ο παράγοντας Phe-Arg-β-naphthylamide (ΡΑβΝ) είναι ο πιο επιτυχημένος αναστολέας για στελέχη *P. aereginosa* που υπερεκφράζουν το σύστημα πρωτεϊνών MexAB-OprM. Μηχανιστικά δρούν ανταγωνιστικά ως προς τις κινολόνες, καθώς ο μεταφορέας του συστήματος εκροής ενεργοποιείται από το ΡΑβΝ αντί από το αντιβιοτικό. Σε ανθεκτικά στελέχη *P.aereginosa* το ΡΑβΝ έχει αυξήσει την δραστικότητα της λεβοφλοξακίνης έως και 8 φορές ενώ έχει επαναφέρει την δραστικότητα πολλών αντιβιοτικών προσδένοντας στους μεταφορείς MexCDOprJ και MexEF-OprN (Kriengkauykiat *et al.*, 2005).

Πολυ-κυκλικοί παράγοντες: Συνθετικά μόρια όπως το Biricodar και το Timcodar είναι μη τοξικοί αναστολείς των πρωτεϊνών εκροής MRP-1 και P-gr. Οι παράγοντες αυτοί δουλεύουν συνεργιστικά με τις φθοροκυνολώνες κατά ανθεκτικών κλινικών στελεχών *S.aureus*, *S. pneumoniae* και *E. Faecalis* (Grossman *et al.*, 2015).

Φαινοθειαζίνες και παράγωγα θειοξανθενίου: Σε στελέχη *S. aureus* που υπερεκφράζουν την αντλία εκροής NorA οι φαινοθειαζίνες είχαν έντονη ενισχυτική δράση εντείνοντας την επίδραση των αντιβιοτικών ερυθρομυκίνη, λεβοφλοξασίνη και αζιθρομυκίνη επηρεάζοντας τη διαβάθμιση των πρωτονίων της εσωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου *Burkholderia pseudomallei* (Ying, Yong και Kim, 2007).

Παράγωγα κινολόνης: Πυριδοκινολόνες έχουν εμφανίσει ανασταλτική δραστικότητα σε πολυανθεκτικά στελέχη *E. aerogenes* επαναφέροντας την

δραστικότητα της νορφλοξακίνης δρώντας ως ανταγωνιστές υποστρώματος σε συστήματα εκροής όπως ο μεταφορέας AcrAB-ToIC (Sabatini *et al.*, 2011).

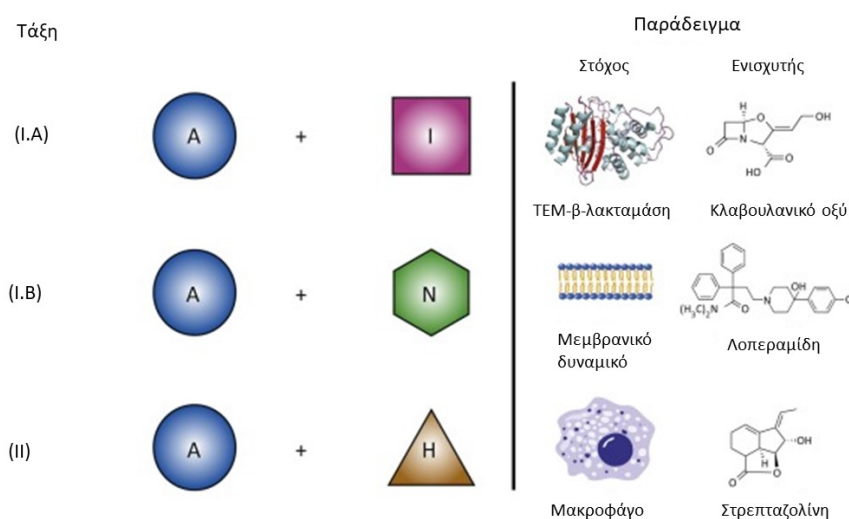
Παράγωγα αρυλπιπεραζίνης: Παράγωγα φαινυλ-πιπεραζίνης έχουν ανασταλτική δράση εναντίων των συστημάτων εκροής AcrAB και AcrEF του *E. coli* επαναφέροντας την δρατικότητα των φθοροκινολόνων σε πολυανθεκτικά κλινικά στελέχη (Zechini και Versace, 2009).

Παράγωγα πυριδοπυριμιδίνης και πυρανοπυριδίνης: Πυριδοπυριμιδινικοί αναστολείς έχουν δρατικότητα έναντι της αντλίας εκροής MexABOprM της *P. aeruginosa*. Αναστολείς της ομάδας αυτής βρίσκονται σε προ-κλινική διαδικασία έγκρισης (Nakayama *et al.*, 2003) (Amoah Barnie, 2014).

Συνολικά και παρά τις εκτεταμένες ερευνητικές προσπάθειες προς αυτή την κατεύθυνση, κανένας αναστολέας αντλιών εκροής είναι κλινικά διαθέσιμος. Πολλοί από τους προαναφερόμενους αναστολείς εμφανίζουν αυξημένη τοξικότητα ενώ αρκετοί είναι μη σταθεροί σε φυσιολογικό pH.

### **vii) Μόρια ενισχυτές**

Στα πλαίσια αυτά μεγάλη προσοχή έχει δοθεί στην δημιουργία ενισχυτών (adjuvants) των αντιβιοτικών, μορίων που η παρουσία τους μειώνει ή εξουδετερώνει την μικροβιακή αντοχή (Brown και Hancock, 2006). Οι ενισχυτές αυτοί χορηγούνται συνήθως συνδυαστικά μαζί με το αντιβιοτικό και εμφανίζουν συνεργία στην δράση τους, δηλαδή η συνδυαστική τους θεραπευτική ισχύ είναι μεγαλύτερη από το καθαρό άθροισμα των ατομικών. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι ενισχυτές αυτοί δεν εμφανίζουν καμία αντιμικροβιακή δράση από μόνοι τους. Οι ενισχυτές χωρίζονται σε δύο κατηγορίες με βάση τον τρόπο δράσης τους. Οι ενισχυτές τάξης I αναστέλλουν την ανθεκτικότητα των βακτηρίων, ενώ οι ενισχυτές τάξης II ενισχύουν την ικανότητα του ξενιστή να αντιμετωπίσει την λοίμωξη. Η ενισχυτές τάξης I χωρίζονται περαιτέρω σε IA οι οποίοι αναστέλλουν απευθείας την αντοχή δρώντας πάνω στα υδρολυτικά ένζυμα ή στις αντλίες εκροής ενώ οι ενισχυτές τάξης IB επηρεάζουν εμμέσως τους μηχανισμούς αντοχής δρώντας σε μεταβολικές οδούς ή στην φυσιολογία του κυττάρου (Wright, 2016).



**Εικόνα 4:** Οι ενισχυτές αντιβιοτικών χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Όταν συν-χρησιμοποιούνται με ένα αντιβιοτικό (A), οι ενισχυτές τάξης I. Αναστέλλουν την ενεργητική ή παθητική αντιμικροβιακή αντοχή ενώ οι ενισχυτές τάξης II ενισχύουν την ικανότητα του ξενιστή (H) να καταπολεμήσει την βακτηριακή λοίμωξη. Οι αναστολείς τάξης I διαφοροποιούνται περαιτέρω σε τάξης I.A που αναστέλλουν (I) έναν ενεργητικό μηχανισμό αντοχής όπως υδρολυτικά ένζυμα και αντλίες εκροής που συνήθως μεταφέρονται με οριζόντια μεταφορά και σε τάξης I.B που είναι μη αντιβιοτικής φύσης (N) και αναστέλλουν παθητικούς μηχανισμούς αντοχής όπως τις ημιδιαπερατές μεμβράνες και τα βιοφίλμ.

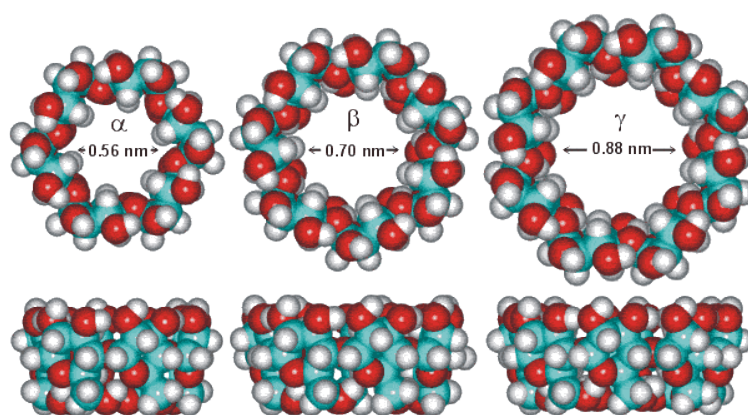
### viii) Κυκλοδεξτρίνες

Τελευταία, έχει προταθεί και εξετάζεται η χρήση νανοφορέων βασισμένων σε κυκλοδεξτρίνες για τη στοχευμένη μεταφορά των αντιβιοτικών στις εστίες λοίμωξης (βελτίωση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων) καθώς και την προστασία τους από τους μηχανισμούς αντοχής. Οι κυκλοδεξτρίνες είναι μια οικογένεια κυκλικών ολιγοσακχαριτών [αποτελούνται από μονομερή μόρια σακχάρων (α-D-γλυκοπυρανόζη)] που παράγονται από άμυλο με την διαδικασία της ενζυμικής μετατροπής. Στη φύση, οι κυκλοδεξτρίνες συναντώνται σε τρεις μορφές, η καθεμία με διαφορετικό αριθμό μονομερών γλυκόζης. Η κυκλοδεξτρίνη-α έχει έξι μονομερή γλυκόζης στον δακτύλιο της ενώ η -β επτά και η -γ οχτώ. Δομικά, αποτελούνται από λιπόφιλες εσωτερικές κοιλότητες και υδρόφιλες εξωτερικές επιφάνειες και διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μέγεθος του δακτυλίου και την υδατοδιαλυτοτητά τους. Οι κυκλοδεξτρίνες παραμένουν αδιάλυτες στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες και είναι διαλυτές σε μερικούς πολικούς διαλύτες. Συνήθως τα

ενσωματωμένα μόρια απελευθερώνονται από το σύμπλοκο με απλή διάλυση (Martina και Cravotto, 2012).

Λόγω του φυσικού τους σχήματος μπορούν εύκολα να σχηματίσουν σύμπλοκα εγκλεισμού με άλλα μόρια. Το σύμπλοκο κυκλοδεξτρίνης-ενσωματωμένου μορίου συγκρατείται με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, δυνάμεις van der Waals και δεσμούς υδρογόνου σε αναλογία ένα προς ένα. Ο εγκλεισμός του ενσωματωμένου μορίου το προστατεύει από ενζυμικές αντιδράσεις όπως υδρόλυση και οξείδωση καθώς και από φωτολυτικές αντιδράσεις των φωτοευαίσθητων μορίων (Challa *et al.*, 2006).

Τοξικολογικά, οι φυσικές κυκλοδεξτρίνες καθώς και αρκετά από τα παράγωγα τους θεωρούνται απολύτως ασφαλή για ανθρώπινη κατανάλωση και έχουν την έγκριση του Αμερικανικού, του Ευρωπαϊκού και του Ιαπωνικού Οργανισμού Φάρμακων (Lanigan και Yamarik, 2002). Οι ιδιότητες τους έχουν μελετηθεί εκτενώς και μέχρι σήμερα απαντώνται σαν κύριο συστατικό σε πάνω από 60 προϊόντα φαρμακευτικών σκευασμάτων με το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτό της τροποποιημένης γ-κυκλοδεξτρίνης suggamadex η οποία χρησιμοποιείται σαν αντίδοτο στον παράγοντα βρωμιούχο ροκουρόνιο κατά την γενική αναισθησία (Queenan και Bush, 2007). Άλλες κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται στην προετοιμασία των εμβολίων Daptacel (Sanofi Group, Pasteur) για προστασία κατά της διφθερίτιδας και του τετάνου (σύμπλοκο με διμεθυλο-β-CD). Εκτός από τις φαρμακευτικές τους εφαρμογές χρησιμοποιούνται εκτενώς στις βιομηχανίες τροφίμων και καλλυντικών.



**Εικόνα 5:** Η δομή και η διάμετρος του πόρου σε nm των τριών φυσικών α-, β- και γ- κυκλοδεξτρινών.

### **Σύνθεση κυκλοδεξτρινών**

Η σύνθεση των φυσικών κυκλοδεξτρινών είναι μία χημικά εύκολη διαδικασία. Για την παραγωγή τους χρησιμοποιείται απλό άμυλο το οποίο αρχικά υγροποιείται είτε με θερμική επεξεργασία είτε χρησιμοποιώντας α-αμυλάση και εν συνεχεία προστίθεται το ένζυμο κυκλοδεξτρινική γλυκοζυλοτρανσφεράση (CGTase) για την ενζυμική μετατροπή. Οι CGTases παράγουν και τις τρεις φυσικές κυκλοδεξτρίνες (-α, -β, -γ), έτσι το αρχικό προϊόν είναι μείγμα των τριών τύπων σε αναλογίες που εξαρτώνται από το είδος CGTase που χρησιμοποιήθηκε. Για τον διαχωρισμό τους χρησιμοποιείται η διαφορετική υδατοδιαλυτότητα των τριών τύπων. Η β-κυκλοδεξτρίνη έχει χαμηλή υδατοδιαλυτότητα με αποτέλεσμα την κρυσταλοποίηση της και τον εύκολο διαχωρισμό της. Για την απομόνωση των πιο υδατοδιαλυτών α- και γ- κυκλοδεξτρινών απαιτείται η χρήση χρωματογραφίας. Εναλλακτικά και για την αποφυγή της χρωματογραφίας μπορούν να προστεθούν κατά την διάρκεια της ενζυμικής μετατροπής οργανικοί διαλύτες όπως το τολουόλιο, η ακετόνη ή η αιθανόλη οι οποίοι σχηματίζουν ένα σύμπλοκο με την επιθυμητή κυκλοδεξτρίνη καθιζάνοντάς την (Khan et al., 1998). Η συμπλοκοποίηση των κυκλοδεξτρινών με το μεταφερόμενο μόριο γίνεται με διαφορετικές χημικές τεχνικές όπως:

- (I) Μέθοδος φυσικής ανάμιξης: Η συμπλοκοποίηση δύναται να γίνει με απλή ανάμειξη της κυκλοδεξτρίνης με το μόριο ξενιστή.
- (II) Μέθοδος ζύμωσης: Παρασκευάζεται μάζα κυκλοδεξτρίνης διαλυμένης σε μικρή ποσότητα νερού και το μόριο ξενιστής προστίθεται απουσία διαλύτη ή παρουσία μικρής ποσότητας αιθανόλης. Η μάζα αλέθεται, η αιθανόλη εξατμίζεται και το σύμπλοκο σχηματίζεται σε μορφή σκόνης.
- (III) Συμπύκνωση: Η κυκλοδεξτρίνη διαλύεται και το μόριο ξενιστής προστίθεται με ταυτόχρονη ανάδευση. Το διάλυμα στην συνέχεια ψύχεται αναδευόμενο και το σύμπλοκο ιζηματοποιείται. Το ίζημα συλλέγεται είτε με την απλή απόρριψη του υπερκειμένου, είτε με φυγοκέντρηση, είτε με διήθηση σε μικροφίλτρα.
- (IV) Συλλογή με εξάτμιση: Η κυκλοδεξτρίνη και το μόριο ξενιστής διαλύονται σε νερό και αιθανόλη αντιστοίχως. Τα δύο διαλείμματα αναμιγνύονται και το υγρό από το παραγόμενο διάλυμα εξατμίζεται σε συνθήκες κενού.

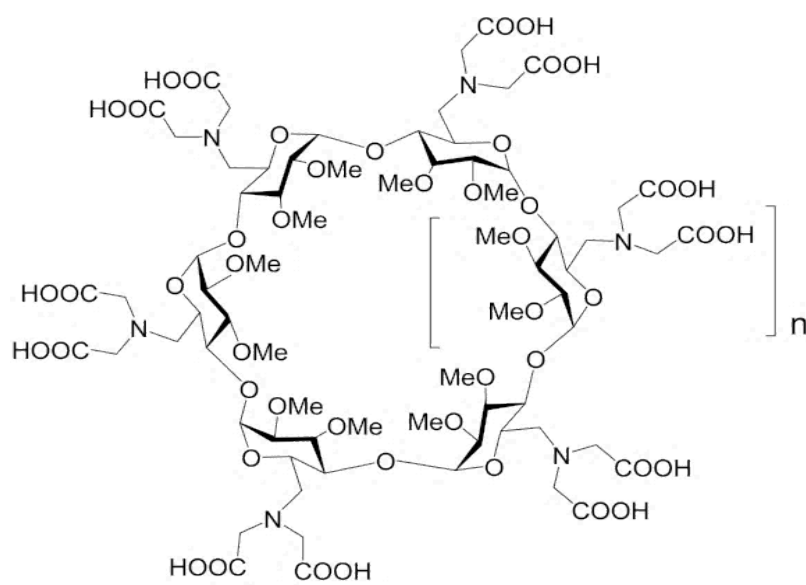
- (V) Μέθοδος εξουδετέρωσης: Η κυκλοδεξτρίνη και το μόριο ξενιστής διαλύονται ξεχωριστά σε 0.1 N υδροξειδίου του νατρίου, αναμειγνύονται με ανάδευση για μισή ώρα και το pH του διαλύματος προσαρμόζεται στο 7.5 όπου το σύμπλοκο ιζηματοποιείται. Το διάλυμα φιλτράρετε και πλένεται μέχρι να είναι καθαρό από χλωρίνη και στην συνέχεια το ίζημα στεγνώνεται στους 250°C για 24 ώρες.
- (VI) Ξήρανση με ψεκασμό: Σε αυτή την μέθοδο, μονοφασικά διαλύματα ξενιστή και κυκλοδεξτρίνης παράγονται σε κατάλληλους διαλύτες. Στην συνέχεια τα διαλύματα αναμειγνύονται και αναδεύονται μέχρι την επίτευξη ισορροπίας και ο διαλύτης αφαιρείται με ταχεία ξήρανση με θερμό αέρα.
- (VII) Λυοφιλοποίηση/ξήρανση με ψύξη: Ο διαλύτης του μείγματος κυκλοδεξτρίνης/μεταφερόμενο μόριο εξαερώνεται μέσω ταχείας ψύξης του διαλύματος και επακόλουθη ξήρανση σε συνθήκες χαμηλής πίεσης. Θερμοευαίσθητοι ξενιστές μπορούν να συμπλοκοποιηθούν με αυτό τον τρόπο.
- (VIII) Τήξη: Το σύμπλοκο μπορεί να παρασκευαστεί με τήξη του μεταφερόμενου μόριο και αναμειγνύοντάς τον με κονιοποιημένη κυκλοδεκτρίνη. Σε αυτή την τεχνική ο ξενιστής θα πρέπει να βρίσκεται σε περίσσια και μετά την ψύξη του διαλύματος αφαιρείται προσθέτοντας διαλύτη ή με άντληση σε κενό.

Παρά το γεγονός ότι οι κυκλοδεξτρίνες και τα σύμπλοκά τους είναι υδρόφιλα μόρια, η υδατοδιαλυτότητα της β-κυκλοδεξτρίνης είναι περιορισμένη όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Οι κυκλοδεξτρίνες αποτελούνται από μονάδες γλυκοκυρανόζης οι οποίες περιέχουν τρεις ελεύθερες υδροξυλίομαδες που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τις λειτουργίες τους και την δραστηκότητά τους. Διαφορετικές συνθήκες pH και θερμοκρασίας επηρεάζουν την δραστηκότητα των δευτεροταγών C-2 και C-3 και των πρωτοταγών C-6 υδροξυλίων του μορίου κυκλοδεξτρίνης (Loftsson και Brewster, 1996). Αντικαθιστώντας κάποιο ή κάποια από τα 21 υδροξύλια της β-κυκλοδεξτρίνης με αλκύλια, καρβοξύλια, εθέρους, εστέρες, θιόλες ή οποιαδήποτε άλλη επιθυμητή ομάδα μέσω χημικών ή ενζυμικών μετατροπής διάφορες ποικιλίες της β-κυκλοδεξτρίνης μπορούν να παραχθούν δίνοντάς τους νέες επιθυμητές ιδιότητες όπως χηλικότητα, αυξημένη διαλυτότητα ή δημιουργία καλύτερων και πιο σταθερών συμπλοκών. Τα κυκλοδεξτρινικά παράγωγα κατηγοριοποιούνται με βάση τον τρόπο



παραγωγής τους σε χημικά τροποποιημένα ή φυσικά ενζυμικά τροποποιημένα (Loftsson και Brewster, 2012). Οι ενζυμικά τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες δημιουργούνται με την βοήθεια του ενζύμου πουλουλανάση. Τέτοια τροποποιημένα παράγωγα είναι οι υδροξυπροπυλικές HP-β-CD και HP-γ-CD καθώς και οι καρβοξυλιωμένες IDACYDs.

Συνθετικές κυκλοδεξτρίνες οι οποίες έχουν τα υδροξύλιά τους στα άτομα άνθρακα C6 και/ή C2 και C3 υποκαταστημένα με ένα ή περισσότερα καρβοξύλια αναφέρονται με τον όρο IDACYDs. Συγκεκριμένα αντιστοίχως έχουν την ιδιότητα να δημιουργούν σύμπλοκα με κατιόντα μεταλλικών λανθανιδών λειτουργώντας έτσι ως χηλικοί παράγοντες (Maffeo *et al.*, 2010).



**a-IDACYD: n=1**

**b-IDACYD: n=2**

**g-IDACYD: n=3**

**Εικόνα 6:** Χημική δομή των κυκλοδεξτρινών α-, b- και g- IDACYD.

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## I. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διεύρυνση φυσικών και τεχνητών νανοσωματιδίων και κυκλοδεξτρινών είτε ως φορείς των κλινικά διαθέσιμων αντιμικροβιακών ουσιών ( $\gamma$ -Cys, CMC/HTMAβCD), είτε ως άμεσοι αντιμικροβιακοί παράγοντες (π.χ. έχοντας τοξική δράση στο βακτηριακό τοίχωμα) (AgNPs, MSPs/AgNPs, κυκλοδεξτρίνες Cyclolab), είτε ως έμμεσοι καταστέλλοντες σημαντικούς μηχανισμούς αντοχής [π.χ. παρεμπόδιση της δράσης βακτηριακών αντλιών εκροής αντιβιοτικών (AMBnTβCDs) ή αναστολή β-λακταμασών (IDACYDs)], παρουσιάζοντας νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις κατά των πολύ-ανθεκτικών βακτηρίων. Συνολικά, μελετήθηκαν περισσότερα από 60 νανοσωματίδια και κυκλοδεξτρίνες σε πειράματα in-vitro, ex-vivo και in-vivo χρησιμοποιώντας τις παρακάτω μεθοδολογίες.

Αρχικά, οργανώθηκε η συλλογή πολυανθεκτικών (MDR) GRAM-θετικών (*S. aureus*) και GRAM-αρνητικών στελεχών [εντεροβακτηριοειδή (*K. pneumoniae*, *E. coli* κλπ.) και μη-ζυμωτικά (*A. baumannii*)]. Η ταυτοποίηση των στελεχών έγινε με συμβατικά συστήματα πολλαπλών βιοχημικών δοκιμασιών. Ο έλεγχος της αντοχής στα αντιβιοτικά έγινε με την μέθοδο διάχυσης δίσκων σε άγαρ (Kirby-bauer). Περεταίρω προσδιορισμός των επιπέδων αντοχής στα αντιβιοτικά έγινε με τη μέθοδο διαβαθμιζόμενης συγκέντρωσης σε άγαρ (E-test) και την μέθοδο των μικροαραιώσεων αντιβιοτικών σε ζυμό (MIC, MBC). Ακολούθησε βιοχημικός, μοριακός και γενετικός χαρακτηρισμός των εμπλεκόμενων μηχανισμών αντοχής και των φορέων των γονιδίων που κωδικοποιούν για αντοχή στα στελέχη της συλλογής.

Η in-vitro αξιολόγηση δραστηριότητας των νανοσωματιδίων/κυκλοδεξτρινών πραγματοποιήθηκε αρχικά εκτιμώντας την δραστηριότητα των ουσιών που προορίζονται για χρήση στην αντιμικροβιακή χημειοθεραπεία με προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης και ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (MIC, MBC) της ουσίας έναντι των προς αντιμετώπιση βακτηριακών παθογόνων με την μέθοδο μικροαραιώσεων σε ζυμό. Στα συμπλέγματα νανοσωματιδίων/κυκλοδεξτρινών/αντιβιοτικών προσδιορίστηκε επίσης η δοσολογική τους συνέργεια με την μέθοδο Checkerboard MIC. Ακολούθησε ο περεταίρω χαρακτηρισμός της δραστηριότητας τους σε πειράματα προσδιορισμού καμπυλών θανάτωσης παθογόνων βακτηρίων σε συνάρτηση με το χρόνο (time-kill

curves). Οι κυκλοδεξτρίνες με προστατευτικές/ανασταλτικές ικανότητες έναντι β-λακταμασών ελέγχθηκαν περεταίρω με τον φασματομετρικό προσδιορισμό υδρόλυσης β-λακταμικών παρουσία και απουσία τους. Τα νανοσωματίδια και οι κυκλοδεξτρίνες ελέγχθηκαν για την κυτταροτοξικότητά τους μετρώντας την απελευθέρωση γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) (Cytotox 96) και το σχηματισμό φορμαζάνης (CellTiter 96). Οι κυκλοδεξτρίνες β-IDACYD που εξετάστηκαν ως αναστολείς MBL αφού σημάνθηκαν με το φθοριόχρωμα BODIPY<sup>®</sup>, ελέγχθηκαν για την πρόσληψη τους από βακτηριακά στελέχη σε πειράματα πολυεστιακής μικροσκοπίας. Οι κυκλοδεξτρίνες γ-Cys που διερεύνηθηκαν ως νανομεταφορείς β-λακταμικών, αφού σημάνθηκαν με το φθοριόχρωμα FITC<sup>®</sup>, ελέγχθηκαν αντιστοίχως για προς την πρόσληψή τους από μακροφάγα ποντικών.

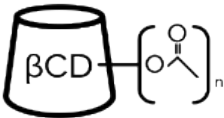
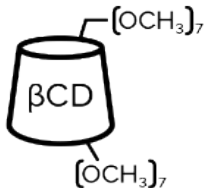
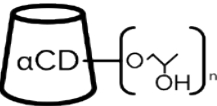
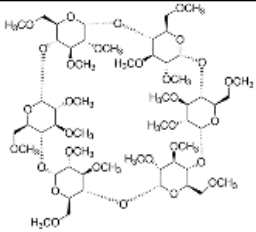
Σε πειράματα ex-vivo, οι κυκλοδεξτρίνες β-IDACYD που επιλέχθηκαν για λεπτομερέστερη μελέτη, αφού σημάνθηκαν με ραδιενεργό γάλλιο (<sup>67</sup>Ga), ελέγχθηκαν για την σταθερότητά και βιοδιαθεσιμότητά τους στο πλάσμα ανθρώπου και ποντικών με την χρήση RP-HPLC. Η ραδιοσημάσμενη <sup>67</sup>Ga-β-IDACYD χρησιμοποιήθηκε επίσης σε μέλετες βιοκατανομής σε ποντικά μετρώντας την ραδιενεργότητα οργάνων και υγρών, ενώ ακολούθησε η ποσοτικοποίηση της σε δείγματα ιστών προσδιορίζοντας την παρουσία ραδιενέργειας και απορρόφησης UV στα 220 nm.

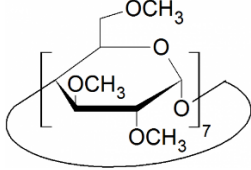
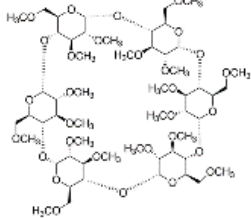
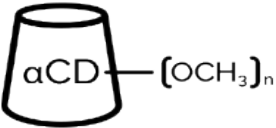
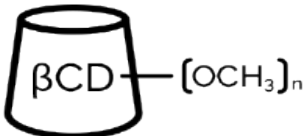
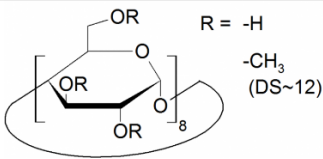
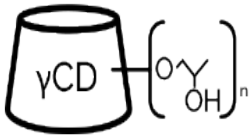
Σε πειράματα in-vivo, οι κυκλοδεξτρίνες β-IDACYDs, γ-Cys-CDs, β-Pen-CDs καθώς και οι τρεις φυσικές κυκλοδεξτρίνες (α, β και γ) ελέγχθηκαν για την παρουσία οξείας τοξικότητας σε θηλυκά ποντίκια CD-1 με βάση τις οδηγίες και τους κανονισμούς της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας. Οι κυκλοδεξτρίνες β-IDACYD εξετάστηκαν για τις ανασταλτικές τους ιδιότητες έναντι MBL σε πειράματα τοπικής (στο μηρό), και γενικευμένης λοίμωξης (σηψαιμία) σε ανοσοκατασταλμένα θηλυκά ποντίκια CD-1 σε τρία διαφορετικά θεραπευτικά σχήματα με την μεροπενέμη. Ακολούθησε ο προσδιορισμός βιοχημικών παραμέτρων στο πλάσμα που απομονώθηκε κατά την διαδικασία των πειραμάτων με τη χρήση του αναλυτή Olympus<sup>®</sup> AU 600. Τέλος, ποσοτικοποιήθηκαν δείκτες λοίμωξης στα δείγματα αυτά με την τεχνική MILLIPLEX<sup>®</sup> MAP που βασίζεται στην τεχνολογία Luminex<sup>®</sup> xMAP<sup>®</sup>.

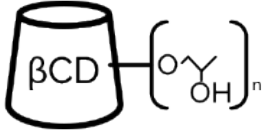
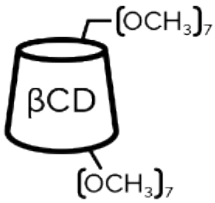
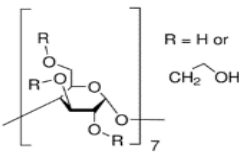
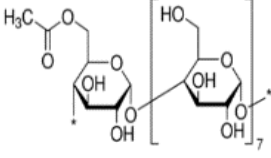
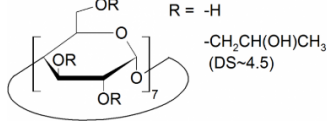
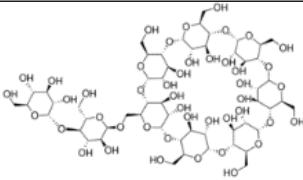
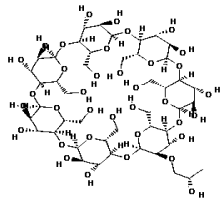
## II. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

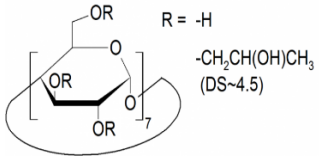


### i) Παραγωγή και περιγραφή κυκλοδεξτρινών.

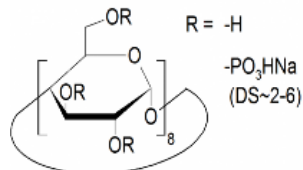
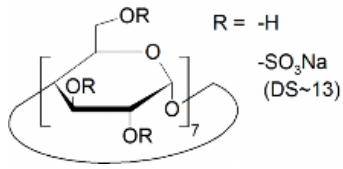
#### Περιγραφή σειράς κυκλοδεξτρινών παραγωγής της CycloLab (Hungary)

Μη-ιονικά παράγωγα	
	<p><b>Ακετυλ-β-κυκλοδεξτρίνη (AcBCD) (DS~7):</b> Είναι μια τροποποιημένη, τυχαία ακετυλιωμένη β-κυκλοδεξτρίνη με μέσο αριθμό υποκαταστάσεων ~7 με χημικό τύπο <math>C_{42}H_{70-n}O_{35} \cdot (C_2H_3O)_n</math> και μοριακό βάρος <math>1135,0 + n \cdot (42,0)</math> g/mol. Είναι χημικά ουδέτερη.</p>
	<p><b>Επτάκις (2,6-δι-Ο-μεθυλ)-β-κυκλοδεξτρίνη περιεχόμενου ~95% (DIMEB-95):</b> Είναι ένα τυχαία τροποποιημένο μονομερές β-κυκλοδεξτρίνης με χημικό τύπο <math>C_{42}H_{70-n}O_{35} \cdot (CH_3)_n</math> και μοριακό βάρος <math>1135,0 + n \cdot (14,0)</math> g/mol.</p>
	<p><b>(2-Υδροξυπροπυλ)-α-κυκλοδεξτρίνη (DS~4.5) (HPACD):</b> Είναι μία τυχαία υδροξυπροπυλιωμένη τροποποίηση της α-κυκλοδεξτρίνης με μέσο αριθμό υποκαταστάσεων ~4.5. Έχει χημικό τύπο <math>C_{36}H_{60-n}O_{30} \cdot (C_3H_7O)_n</math> και μοριακό βάρος <math>972,9 + n \cdot (58,1)</math> g/mol.</p>
	<p><b>Εξάκις (2,3,6-τρι-Ο-μεθυλ)-α-κυκλοδεξτρίνη (TRIMEA):</b> Είναι μία μεθυλιωμένη τροποποιημένη α-κυκλοδεξτρίνη. Έχει χημικό τύπο <math>C_{54}H_{96}O_{30}</math> και μοριακό βάρος 1225,4 g/mol.</p>

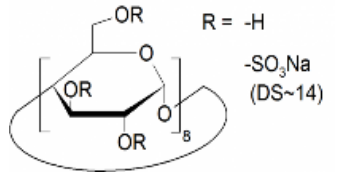
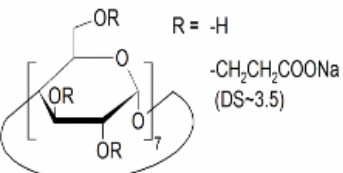
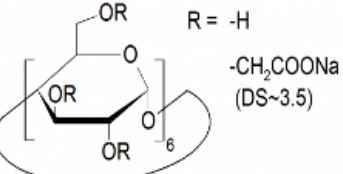
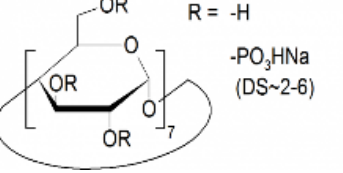
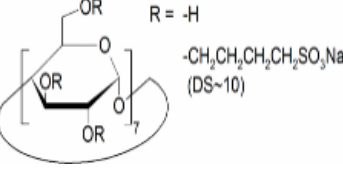
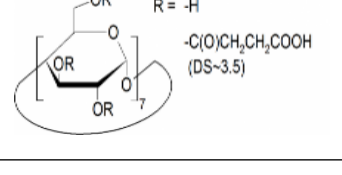
	<p><b>Επτάκις (2,3,6-τρι-Ο-μεθυλ)-β-κυκλοδεξτρίνη (TRIMEB):</b> Είναι μία μεθυλιωμένη τροποποιημένη β-κυκλοδεξτρίνη. Έχει χημικό τύπο <math>C_{63}H_{112}O_{35}</math> και μοριακό βάρος 1429,6g/mol.</p>
	<p><b>Οκτάκις (2,3,6-τρι-Ο-μεθυλ) -γ-κυκλοδεξτρίνη (TRIMEG):</b> Είναι μία μεθυλιωμένη τροποποιημένη γ-κυκλοδεξτρίνη. Έχει χημικό τύπο <math>C_{70}H_{124}O_{42}</math> και μοριακό βάρος 1637,7 g/mol.</p>
	<p><b>Μέθυλ-α-κυκλοδεξτρίνη (DS~11) (RAMEA):</b> Είναι μία τυχαία μεθυλιωμένη α-κυκλοδεξτρίνη με μέσο αριθμό τροποποίησης ~11 . Έχει χημικό τύπο <math>C_{36}H_{60-n}O_{30} \cdot (CH_3)_n</math> και μοριακό βάρος <math>972,9 + n \cdot (14,0)</math> g/mol.</p>
	<p><b>Μέθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη (DS~12) (RAMEB):</b> Είναι μία τυχαία μεθυλιωμένη α-κυκλοδεξτρίνη με μέσο αριθμό τροποποίησης ~12 . Έχει χημικό τύπο <math>C_{42}H_{70-n}O_{35} \cdot (CH_3)_n</math> και μοριακό βάρος <math>1135 + n \cdot (14,0)</math> g/mol.</p>
	<p><b>Μέθυλ-γ-κυκλοδεξτρίνη (DS~12) (RAMEG):</b> Είναι μία τυχαία μεθυλιωμένη γ-κυκλοδεξτρίνη με μέσο αριθμό υποκαταστάσεων ~12 . Έχει χημικό τύπο <math>C_{48}H_{80-n}O_{40} \cdot (CH_3)_n</math> και μοριακό βάρος <math>1297,2 + n \cdot (14,0)</math> g/mol.</p>
	<p><b>(2-Υδροξυπροπυλ)-γ-κυκλοδεξτρίνη (HPGCD) (DS~4.5):</b> Είναι μία τυχαία υδροξυπροπυλιωμένη γ-κυκλοδεξτρίνη με μέσο αριθμό υποκαταστάσεων ~4.5. Έχει χημικό τύπο <math>C_{48}H_{80-n}O_{40} \cdot (C_3H_7O)_n</math> και μοριακό βάρος <math>1297,2 + n \cdot (58,1)</math> g/mol.</p>

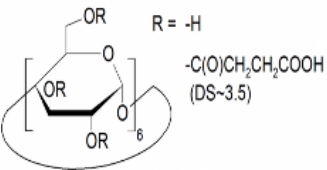
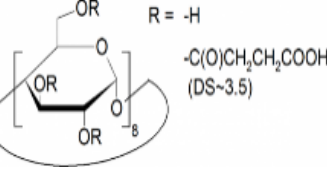
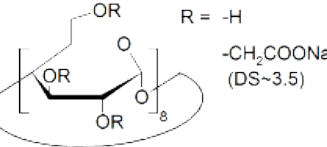
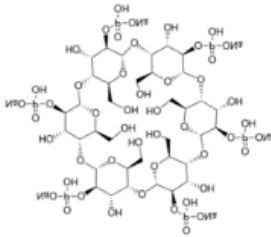
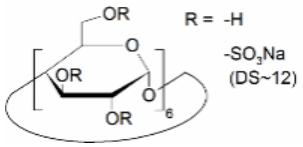
	<p><b>(2-Υδροξυπροπυλ)-β-κυκλοδεξτρίνη (HPBCD)</b> (<math>DS \sim 4.5</math>): Είναι μία τυχαία υδροξυπροπυλομένη β-κυκλοδεξτρίνη με μέσο αριθμό υποκαταστάσεων <math>\sim 4.5</math>. Έχει χημικό τύπο <math>C_{42}H_{70-n}O_{35} \cdot (C_3H_7O)_n</math> και μοριακό βάρος <math>1135 + n \cdot (58,1)</math> g/mol.</p>
	<p><b>Επτάκις (2,6-δι-Ο-μεθυλ)-β-κυκλοδεξτρίνη περιεχόμενου <math>\sim 35\%</math> (DIMEB-50)</b>: Είναι ένα τυχαία τροποποιημένο μονομερές β-κυκλοδεξτρίνης με χημικό τύπο <math>C_{42}H_{70-n}O_{35} \cdot (CH_3)_n</math> και μοριακό βάρος <math>1135,0 + n \cdot (14,0)</math> g/mol.</p>
	<p><b>(2-Υδροξυαιθυλο)-β-κυκλοδεξτρίνη (HPEBCD)</b>: Είναι μία τυχαία τροποποιημένη β-κυκλοδεξτρίνη με μέσο αριθμό υποκαταστάσεων 4. Έχει χημικό τύπο <math>C_{50}H_{90}O_{39}</math> και μοριακό βάρος 1315,2g/mol.</p>
	<p><b>Ακετυλο-γ-κυκλοδεξτρίνη (AcGCD)</b>: Πρόκειται για μία τυχαία ακετυλιωμένη γ-κυκλοδεξτρίνη με μέσο αριθμό υποκαταστάσεων 7, χημικό τύπο <math>C_{62}H_{94}O_{47}</math> και μοριακό βάρος 1591,5 g/mol.</p>
	<p><b>Παλμιτυλιωμένη=β-κυκλοδεξτρίνη (PALM-BCD)</b>: Είναι μια παλμιτοκυλιωμένη β-κυκλοδεξτρίνη με 8 παλμιτυλομάδες άνα δακτύλιο. Έχει χημικό τύπο <math>C_{170}H_{310}O_{43}</math> και μοριακό βάρος 3042,4 g/mol.</p>
	<p><b>6-Ο-α-Μαλτοζυλ-β-κυκλοδεξτρίνη (G2-BCD)</b>: Είναι μία μαλτοζυλιωμένη β-κυκλοδεξτρίνη με χημικό τύπο <math>C_{54}H_{90}O_{45}</math> και μοριακό βάρος 1459,27 g/mol.</p>
	<p><b>(2-Υδροξυπρόπυλ) κυκλο-μαλτοεπτόζη (HP-G7)</b>: Είναι ένα μαλτο-ολιγομερές κυκλοδεξτρίνης με μοριακό τύπο <math>C_{42}H_{75}O_{36}</math> και μοριακό βάρος 1402,83 g/mol.</p>

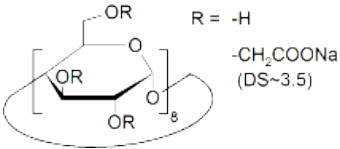
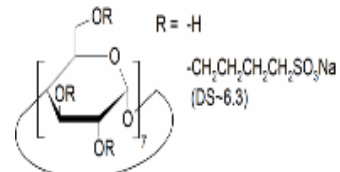
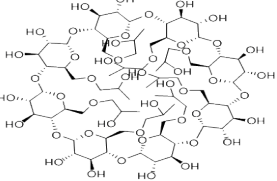
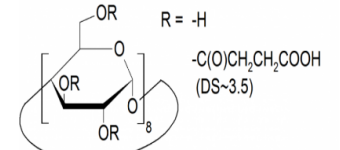
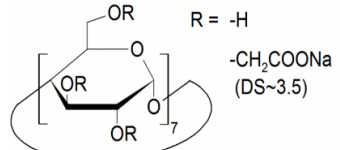
 <p>R = -H -CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>3</sub> (DS~4.5)</p>	<p><b>(2-Υδροξυπρότυλ) κυκλο-μαλτοεπτόζη (HP-G6):</b> Είναι ένα μαλτο-ολιγομερές κυκλοδεξτρίνης με μοριακό τύπο C<sub>42</sub>H<sub>75</sub>O<sub>36</sub> και μοριακό βάρος 1229,11g/mol.</p>
	<p><b>Πολυμερές α-κυκλοδεξτρίνης διασταυρωμένο με επιχλωρυδρίνη (ACDPS):</b> Είναι ένα υδατοδιαλυτό πολύμερες α-κυκλοδεξτρίνης με επιχλωρυδρίνη μοριακού βάρους 3500 g/mol.</p>
	<p><b>Πολυμερές γ-κυκλοδεξτρίνης διασταυρωμένο με επιχλωρυδρίνη (GCDPS):</b> Είναι ένα υδατοδιαλυτό πολύμερες γ-κυκλοδεξτρίνης με επιχλωρυδρίνη μοριακού βάρους 4500 g/mol.</p>


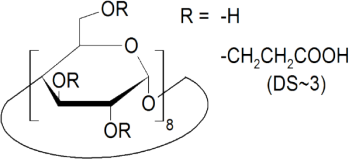
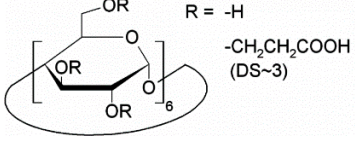
<p align="center"><b>Ανιονικά παράγωγα</b></p>	
 <p>R = -H -PO<sub>3</sub>HNa (DS~2-6)</p>	<p><b>Φωσφορικό νιτρικό άλας γ-κυκλοδεξτρίνης (DS~2-6) (PGCD26):</b> Είναι μία φωσφορυλιωμένη ανιονική κυκλοδεξτρίνη, μοριακού τύπου C<sub>48</sub>H<sub>80-n</sub>O<sub>40</sub> · (NaHPO<sub>3</sub>)<sub>n</sub> και μοριακού βάρους 1297,2 + n·(102,0)g/mol.</p>
 <p>R = -H -SO<sub>3</sub>Na (DS~13)</p>	<p><b>Θειικό νιτρικό άλας β-κυκλοδεξτρίνης (DS~13) (SBCD):</b> Είναι μία ανιονική β-κυκλοδεξτρίνη με μέσο αριθμό υποκαταστάσεων ~13, μοριακού τύπου C<sub>48</sub>H<sub>80-n</sub>O<sub>40</sub> · (SO<sub>3</sub>Na)<sub>n</sub> και μοριακού βάρους 1135,0 + n·(102,1)g/mol.</p>

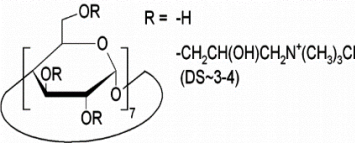
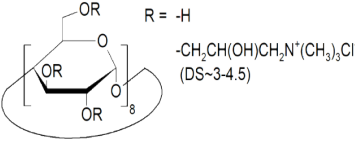


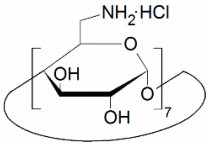
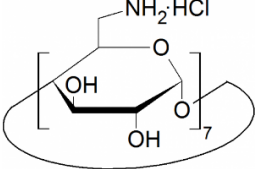
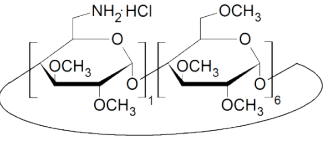
 <p>R = -H -SO<sub>3</sub>Na (DS~14)</p>	<p><b>Θειικό νιτρικό άλας γ-κυκλοδεξτρίνης (DS~14) (SGCD):</b> Είναι μία ανιονική κυκλοδεξτρίνη με μέσο αριθμό υποκαταστάσεων ~14, μοριακού τύπου C<sub>48</sub>H<sub>80-n</sub>O<sub>40</sub> · (SO<sub>3</sub>Na)<sub>n</sub> και μοριακού βάρους 1297,2 + n·(102,1)g/mol.</p>
 <p>R = -H -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COONa (DS~3.5)</p>	<p><b>(2-Καρβοξυαιθυλ) -β-κυκλοδεξτρίνη (DS~3.5) (CEBCD):</b> Είναι ένα τεχνητά καρβοξυλιωμένο παράγωγο της β-κυκλοδεξτρίνης με μέσο αριθμό καρβοξυλίων ~3.5, μοριακό τύπο C<sub>42</sub>H<sub>70-n</sub>O<sub>35</sub> · (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COONa)<sub>n</sub> και μοριακό βάρος 1135,0 + n·(94,1)g/mol.</p>
 <p>R = -H -CH<sub>2</sub>COONa (DS~3.5)</p>	<p><b>Νιτρικό άλας καρβοξυμεθυλο-α-κυκλοδεξτρίνης (DS~3.5) (CMACD):</b> Είναι μία τυχαία καρβοξυμεθυλιωμένη α-κυκλοδεξτρίνη με μέσο αριθμό υποκαταστάσεων ~3.5, μοριακό τύπο C<sub>36</sub>H<sub>60-n</sub>O<sub>30</sub> · (CH<sub>2</sub>COONa)<sub>n</sub> και μοριακό βάρος 972,9 + n·(80,0)g/mol.</p>
 <p>R = -H -PO<sub>3</sub>HNa (DS~2-6)</p>	<p><b>Φωσφορικό νιτρικό άλας β-κυκλοδεξτρίνης (DS~2-6) (PBCD26):</b> Είναι μία φωσφορυλιωμένη ανιονική κυκλοδεξτρίνη, μοριακού τύπου C<sub>42</sub>H<sub>70-n</sub>O<sub>35</sub> · (NaHPO<sub>3</sub>)<sub>n</sub> και μοριακού βάρους 1135,0 + n·(102,0)g/mol.</p>
 <p>R = -H -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na (DS~10)</p>	<p><b>Σουλφοβουτυλιωμένο νιτρικό άλας γ-κυκλοδεξτρίνης (DS~7) (SBEGCD):</b> Είναι μια τυχαία σουλφοβουτυλιωμένη β-κυκλοδεξτρίνη με μέσο αριθμό υποκαταστάσεων ~7, μοριακού τύπου C<sub>48</sub>H<sub>80-n</sub>O<sub>40</sub> · (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>SNa)<sub>n</sub> και μοριακού βάρους 1297,2 + n·(158,2)g/mol.</p>
 <p>R = -H -C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH (DS~3.5)</p>	<p><b>Σουκυνιλ-β-κυκλοδεξτρίνη (DS~3.5) (SuBCD):</b> Είναι ένα τυχαία τροποποιημένο παράγωγο β-κυκλοδεξτρίνης με μέσο αριθμό υποκαταστάσεων</p>

	<p>~3.5, μοριακού τύπου <math>C_{42}H_{70-n}O_{35} \cdot (C_4H_5O_3)_n</math> και μοριακού βάρους <math>1135,0 + n \cdot (100,1)</math> g/mol.</p>
 <p>R = -H -C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH (DS~3.5)</p>	<p><b>Σουκυνιλ-α-κυκλοδεξτρίνη (DS~3) (SuACD):</b> Είναι μία τυχαία σουκυνιλωμένη α-κυκλοδεξτρίνη με μέσο αριθμό υποκατάστης ~3, μοριακού τύπου <math>C_{36}H_{60-n}O_{30} \cdot (C_4H_5O_3)_n</math> και μοριακού βάρους <math>972,9 + n \cdot (100,1)</math>g/mol.</p>
 <p>R = -H -C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH (DS~3.5)</p>	<p><b>Σουκυνιλωμένη (2-υδροξυ) προπυλ γ-κυκλοδεξτρίνη (DS~3.5) (SuACD):</b> Είναι μία τυχαία σουκυνιλωμένη γ-κυκλοδεξτρίνη με μέσο αριθμό υποκατάστης ~3.5, μοριακό τύπο <math>C_{48}H_{80-n}O_{40} \cdot (C_4H_5O_3)_n</math> και μοριακού βάρους <math>1297,2 + n \cdot (100,1)</math> g/mol.</p>
 <p>R = -H -CH<sub>2</sub>COONa (DS~3.5)</p>	<p><b>Νιτρικό άλας καρβοξυμεθυλ-γ-κυκλοδεξτρίνης (DS~3.5) (CMGCD):</b> Είναι ένα τυχαία καρβοξυλιωμένο παράγωγο της γ-κυκλοδεξτρίνης με μέσο αριθμό υποκαταστάσεων ~3.5, μοριακό τύπο <math>C_{48}H_{80-n}O_{40} \cdot (CH_2COONa)_n</math> και μοριακό βάρος <math>1297,2 + n \cdot (80,0)</math>g/mol.</p>
	<p><b>Νιτρικό άλας φωσφορυλιωμένης α-κυκλοδεξτρίνης (DS~4) (Phosphated-α-CD):</b> Είναι ένα τυχαία φωσφορυλιωμένο παράγωγο της α-κυκλοδεξτρίνης με μέσο αριθμό υποκαταστάσεων ~4, μοριακό τύπο <math>C_{36}H_{64}O_{42}P_4</math> και μοριακό βάρος <math>1292,8</math>g/mol.</p>
 <p>R = -H -SO<sub>3</sub>Na (DS~12)</p>	<p><b>Θειικό άλας α-κυκλοδεξτρίνης (DS~12) (SACD):</b> Είναι μία τεχνητά τροποποιημένη α-κυκλοδεξτρίνη με υπομονάδα <math>-SO_2Na</math>, μέσο αριθμό υποκαταστάσεων ~12, μοριακό τύπο <math>C_{36}H_{60-n}O_{30} \cdot (SO_3Na)_n</math> και μοριακό βάρος <math>972,9 + n \cdot (102,1)</math> g/mol.</p>

	<p><b>Νιτρικό άλας καρβοξυμεθυλιωμένης γ-κυκλοδεξτρίνης (DS~3.5) (CMGCD):</b> Είναι ένα καρβοξυμεθυλιώμενο παράγωγο γ-κυκλοδεξτρίνης με μέσο αριθμό υποκαταστάσεων ~3.5, μοριακό τύπο <math>C_{48}H_{80-n}O_{40} \cdot (CH_2COONa)_n</math> και μοριακό βάρος <math>1297,2 + n \cdot (80,0)g/mol</math>.</p>
	<p><b>Σουλφοβουτυλιωμένο νιτρικό άλας β-κυκλοδεξτρίνης (DS~6.5) (SBECD):</b> Είναι ένα σουλφοβουτυλιωμένο παράγωγο β-κυκλοδεξτρίνης με μέσο αριθμό υποκαταστάσεων ~6.5, μοριακό τύπο <math>C_{42}H_{70-n}O_{35} \cdot (C_4H_8O_3SNa)_n</math> και μοριακό βάρος <math>1135,0 + n \cdot (158,2) g/mol</math>.</p>
	<p><b>(2-υδροξυπροπυλ)-γ-κυκλοδεξτρίνη (primary standard) (HPGCD):</b> Είναι ένα υδροξυλιωμένο παράγωγο της γ-κυκλοδεξτρίνης με μοριακό τύπο <math>C_{48}H_{80-n}O_{40} \cdot (C_3H_7O)_n</math> και μοριακό βάρος <math>1297,2 + n \cdot (58,1) g/mol</math>.</p>
	<p><b>Σουκκινυλιωμένη γ-κυκλοδεξτρίνη (DS ~ 3.5) (SuGCD):</b> Είναι μία τυχαία σουκκινυλιωμένη γ-κυκλοδεξτρίνη με μέσο αριθμό υποκατάστασης ~3.5, μοριακό τύπο <math>C_{48}H_{80-n}O_{40} \cdot (C_4H_5O_3)_n</math> και μοριακού βάρους <math>1297,2 + n \cdot (100,1)g/mol</math>.</p>
	<p><b>Νιτρικό άλας καρβοξυμεθυλο-β-κυκλοδεξτρίνης (CMBCD):</b> Είναι ένα καρβοξυμεθυλιώμενο παράγωγο β-κυκλοδεξτρίνης με μέσο αριθμό υποκαταστάσεων ~3.5, μοριακό τύπο <math>C_{42}H_{70-n}O_{35} \cdot (CH_2COONa)_n</math> και μοριακό βάρος <math>1135,0 + n \cdot (80,0)g/mol</math>.</p>

	<p><b>Πολυμερές καρβοξυμεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνης (BCDPSI):</b> Είναι ένα πολυμερές καρβοξυμεθυλιωμένης β-κυκλοδεξτρίνης με μοριακό βάρος 8000 g/mol.</p>
	<p><b>(2-καρβοξυαιθυλ) -γαμμα-κυκλοδεξτρίνη (DS~3.5) (CEGCD):</b> Είναι ένα καρβοξυαιθυλιώμενο παράγωγο γ-κυκλοδεξτρίνης με μέσο αριθμό υποκαταστάσεων ~3.5, μοριακό τύπο <math>C_{48}H_{80-n}O_{40} \cdot (CH_2CH_2COOH)_n</math> και μοριακό βάρος <math>1297,2 + n \cdot (72,1)</math> g/mol.</p>
	<p><b>(2-καρβοξυαιθυλ) -α-κυκλοδεξτρίνη(DS~3) (CEACD):</b> Είναι ένα καρβοξυαιθυλιώμενο παράγωγο α-κυκλοδεξτρίνης με μέσο αριθμό υποκαταστάσεων ~3, μοριακό τύπο <math>C_{36}H_{60-n}O_{30} \cdot (CH_2CH_2COOH)_n</math> και μοριακό βάρος <math>972,9 + n \cdot (72,1)</math> g/mol.</p>

<b>Κατιονικά παράγωγα</b>	
	<p><b>(2-υδροξυ-3-N, N, N-τριμεθυλαμινο) προπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (QABCD):</b> Είναι ένα προπυλιωμένο παράγωγο της β-κυκλοδεξτρίνης με μέσο αριθμό υποκαταστάσεων ~3.5, μοριακό τύπο <math>C_{42}H_{70-n}O_{35} \cdot (C_6H_{15}ONCl)_n</math> και μοριακό βάρος <math>1135,0 + n \cdot (151,6)</math> g/mol.</p>
	<p><b>(2-υδροξυ-3-N, N, N-τριμεθυλαμινο) προπυλο-γ-κυκλοδεξτρίνη (QAGCD):</b> Είναι ένα προπυλιωμένο παράγωγο της γ-κυκλοδεξτρίνης με μέσο αριθμό υποκαταστάσεων ~3-4.5, μοριακό τύπο <math>C_{48}H_{80-n}O_{40} \cdot (C_6H_{15}ONCl)_n</math> και μοριακό βάρος <math>1297,2 + n \cdot (151,6)</math>g/mol.</p>

	<p><b>Επταϋδροχλωρίδιο-επτάκις-(6-δεοξυ-6-αμινο)-β-κυκλοδεξτρίνη (HABCD):</b> Είναι ένα υδροχλωριωμένο ισομερές της β-κυκλοδεξτρίνης με μοριακό τύπο <math>C_{42}H_{84}O_{28}N_7Cl_7</math> και μοριακό βάρος 1383,3g/mol.</p>
	<p><b>Επταϋδροχλωρίδιο-επτάκις-(6-δεοξυ-6-αμινο)-α-κυκλοδεξτρίνη (HAACD):</b> Είναι ένα υδροχλωριωμένο ισομερές της α-κυκλοδεξτρίνης με μοριακό τύπο <math>C_{42}H_{84}O_{28}N_7Cl_7</math> και μοριακό βάρος 1383,3g/mol.</p>
	<p><b>Υδροχλωρική-επτάκις-(2,3-δι-Ο-μεθυλ)-εξάκις-(6-Ο-μεθυλ)-6-μονοδεοξυ-6-μονοαμινο-β-κυκλοδεξτρίνη (MABCD):</b> Είναι ένα υδροχλωριωμένο ισομερές της α-κυκλοδεξτρίνης με μοριακό τύπο <math>C_{62}H_{112}O_{34}NCl</math> και μοριακό βάρος 1451,0g/mol.</p>

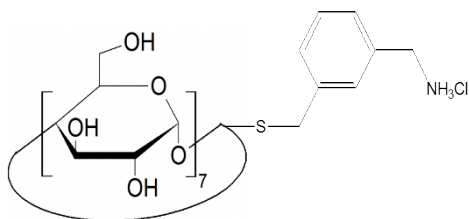
**Πίνακας 3:** Περιγραφή της σειράς κυκλοδεξτρινών παραγωγής Cyclolab.

**Περιγραφή και σύνθεση νανοσωματιδίων καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης (CMC)/ πολυμερών β-κυκλοδεξτρίνης (HTMAPβCD) (Παραγωγής Πανεπιστημίου Ισλανδίας)**

Τα νανοσωματίδια αυτά κατασκευάστηκαν με στόχο την προστασία β-λακταμικών αντιβιοτικών μέσω της εγκόλπωσης του β-λακταμικού δακτυλίου στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης και παρασκευάζονται με ανάμιξη δύο υδατικών διαλυμάτων. Διάλυμα καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης (CMC) που περιλαμβάνει ποσότητα αντιβιοτικού αναμειγνύεται με διάλυμα HTMAPβCD που περιέχει ίση ποσότητα αντιβιοτικού. Συγκεκριμένα, αμφότερα τα αρχικά διαλύματα CMC και HTMAPβCD παρασκευάζονται διαλύοντας επιθυμητή συγκέντρωση (2,5 mg/ml) CMC και πολυμερών σε διπλαπεσταγμένο νερό. Στην συνέχεια, ποσότητα του αντιβιοτικού που αντιστοιχεί σε τελική συγκέντρωση 0,5 mg/ml προστίθεται και στα δύο διαλύματα. Το διάλυμα CMC/αντιβιοτικού προστίθεται στο διάλυμα πολυμερούς HTMAPβCD/αντιβιοτικού υπό συνεχή ανακίνηση (250 rpm, rt). Οι τελικές συγκεντρώσεις στο προκύπτουν διάλυμα είναι 2.5 mg/mL για το CMC και την HTMAPβCD και 0.5 mg/mL για το υπό προστασία αντιβιοτικό.

### **Περιγραφή και σύνθεση Περ-6-S-(3-αμινομεθυλ)-βενζυλ-θειο-β-κυκλοδεξτρινών (AMBnTβCD) (Παρασκευής Innovative Biologics, USA)**

Η AMBnTβCD είναι ένα τεχνητά τροποποιημένο 7/πλά συμμετρικό, χαμηλού μοριακού βάρους (2336,8 g/mol) και θετικά φορτισμένο παράγωγο της β-κυκλοδεξτρίνης που λειτουργεί ως ένας αποτελεσματικός αναστολέας των τοξινών του *B. anthracis* LeTx και EdTx, της τοξίνης C2 του *C. botulinum*, των τοξινών A, B και CDT του *C. difficile* καθώς και της τοξίνης ιότα του *C. perfringens* τόσο *in-vitro* όσο και *in-vivo*. Συνοπτικά, για την παραγωγή της σε ένα διάλυμα 0.21 mmol κυκλοδεξτρίνης AMBnTβCD σε 12 ml 1:1 H<sub>2</sub>O-EtOH προστίθενται 12 ml μονοένυδρης υδραζίνης και το παραγόμενο διάλυμα επωάζεται στους 70°C για 18 ώρες. Αφού το διάλυμα ψυχθεί συμπυκνώνεται κάτω από μειούμενη πίεση και το προκύπτουν ίζημα αναδιαλύεται σε 40 mL 1N HCl. Το διάλυμα αναμιγνύεται για 21 ώρες στους 23°C. Το αδιάλυτο ίζημα απομακρύνεται με φυγοκέντρηση και στο υπερκείμενο προστίθεται ακετόνη μέχρι να καταβυθιστεί το κυκλοδεξτρινικό προϊόν το οποίο στην συνέχεια απομονώνεται, ξεπλένεται με ακετόνη και στεγνώνεται σε συνθήκες κενού.



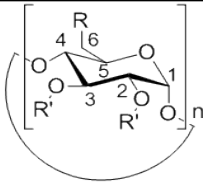
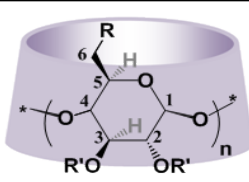
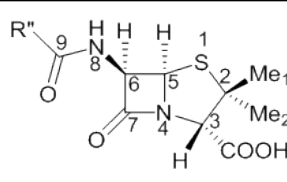
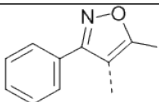
**Εικόνα 7 :** Χημική απεικόνιση της τροποποιημένης β-κυκλοδεξτρίνης AMBnTβCD .

### **Περιγραφή και σύνθεση κυκλοδεξτρινών γ-Cys (Παραγωγής E.K.E.Φ.Ε. Δημόκριτος)**

Οι τροποποιημένες αυτές θετικά φορτισμένες κυκλοδεξτρίνες εξετάστηκαν ως μόρια υποδοχής και εγκόλπωσης επιλεγμένων πενικιλινών με στόχο την εξασφάλιση της προστασίας τους έναντι της υδρόλυσης από β-λακταμάσες *in vitro*. Για την παραγωγή τους σε διάλυμα 0.21 mmol κυκλοδεξτρίνης γ-Cys σε 12 ml 1:1 H<sub>2</sub>O-EtOH προστίθενται 12 ml μονοένυδρης υδραζίνης και το παραγόμενο διάλυμα θερμαίνεται στους 70 °C για 18 ώρες. Αφού το διάλυμα ψυχθεί συμπυκνώνεται κάτω από μειούμενη πίεση και το προκύπτουν ίζημα ανασύσταται σε 40 mL 1N HCl. Το διάλυμα αναμιγνύεται για 21 ώρες στους 23°C. Το αδιάλυτο ίζημα απομακρύνεται με φυγοκέντρηση και στο υπερκείμενο προστίθεται ακετόνη μέχρι να καταβυθιστεί το κυκλοδεξτρινικό προϊόν

το οποίο στην συνέχεια ξεπλένεται με ακετόνη και στεγνώνεται σε συνθήκες κενού. Η σύνθεση τους πραγματοποιήθηκε στο Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος.

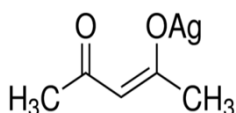
Για την δημιουργία συμπλόκου της κυκλοδεξτρίνης  $\gamma$ -Cys με την πενικιλίνη οξακιλλίνη η  $\gamma$ -Cys διαλύθηκε σε δευτεριωμένο, υπό ανάδευση (250 rpm, 37 ° C) διάλυμα φωσφορικών ιόντων (1xPBS). Η οξακιλλίνη προστέθηκε στο υπό ανάδευση διάλυμα (250 rpm, 37 ° C) για 30 λεπτά. Η στοιχειομετρία των τελικών μιγμάτων [CD]: [οξακιλλίνη] ήταν 1:1 και 2:1 για συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού από 4 έως 9 mM.

a)					
<b>n</b>	<b>R</b>	<b>R'</b>	<b>Label</b>		
8	-SCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	-H	$\gamma$ Cys	Antistaphylococcal penicillins	
					

**Πίνακας 4:** Περιγραφή τροποποιημένων κυκλοδεξτρινών και αντιβιοτικών που δοκιμάστηκαν για την συμπλοκοποίησή τους.

### **Περιγραφή και σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs) και συνδυασμού μεσοπορώδων νανοσωματιδίων πυριτίου (MSPs) με νανοσωματίδια άργυρου (Παραγωγής Πανεπιστημίου της Κατάνια, Ιταλία)**

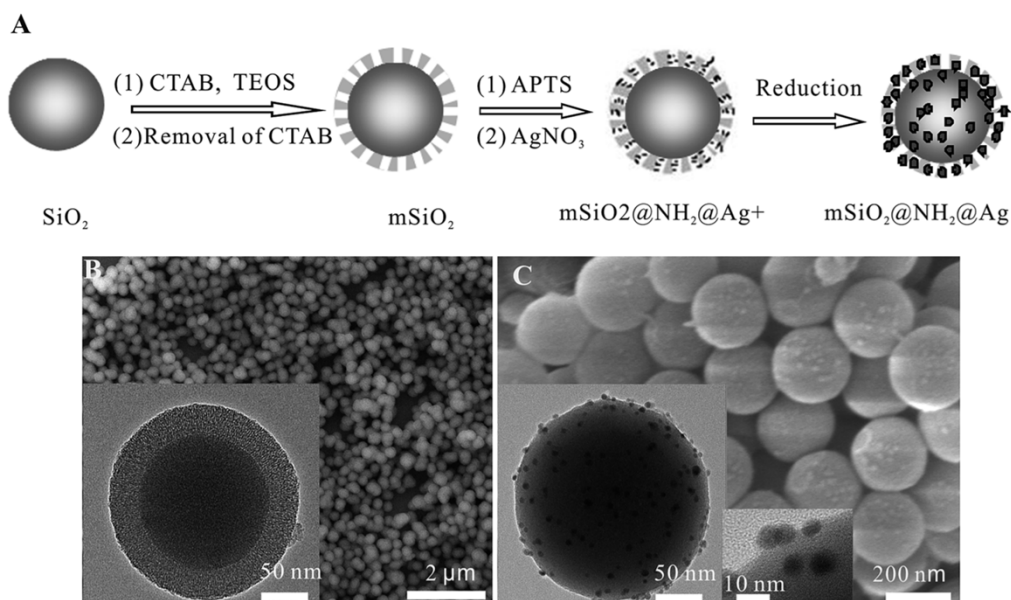
**AgNPs:** Η παραγωγή σταθερών AgNPs πραγματοποιήθηκε σε υδατικό διάλυμα χρησιμοποιώντας 2,4-πενταανιονικό άλας Ag (I) και Ag(acac), ως τα μοναδικά χημικά αντιδραστήρια. Η διαδικασία που ακολουθείτε είναι απλή, καθώς ποσότητα (2 g) Ag(acac) αναδιαλύετε σε υδατικό διάλυμα 2,4-πενταανιονικού άλατος Ag (I) κορεσμένο με Ar σε θερμοκρασία δωματίου.



**Εικόνα 8:** Χημική απεικόνιση νανοσωματιδίων αργύρου

**MSPs/AgNPs:** Μία επιφάνεια μικροσφαιρών μεσοπορώδων νανοσωματιδίων πυριτίου (mSiO<sub>2</sub>) δημιουργήθηκε με την μέθοδο sol-gel. Τα mSiO<sub>2</sub> στην συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 3-αμινοπροπυλτριαιθοξυσιλάνιο (APTS) ώστε να δημιουργηθούν οι απαραίτητες πλευρικές ομάδες για την απορρόφηση του αργύρου.

Τα AgNPs δημιουργήθηκαν απευθείας στην επιφάνεια των mSiO<sub>2</sub> με in-situ χημική αναγωγή των πρόδρομων αντιδραστηρίων χρησιμοποιώντας την μέθοδο της υπερηχητικής αντίδρασης κύματος (ultrasonic wave reaction method).



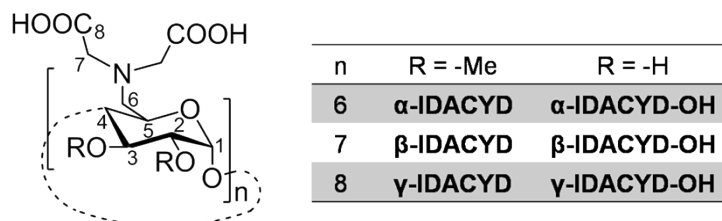
**Εικόνα 9:** (A) Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας παραγωγής των mSiO<sub>2</sub>/AgNPs. (B) Εικόνα SEM των μικροσφαιρών mSiO<sub>2</sub>. (C) Εικόνα SEM των μικροσφαιρών mSiO<sub>2</sub>/AgNPs. Οι εσωτερικές απεικονίσεις είναι εικόνες TEM σε μικρή και μεγάλη μεγέθυνση των mSiO<sub>2</sub>/AgNPs αντίστοιχα.

### **Περιγραφή και σύνθεση IDACYDs (Παραγωγής Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος, Ελλάδα)**

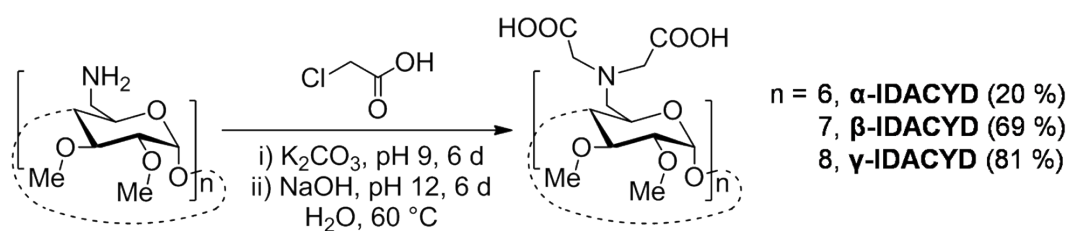
Τα παράγωγα αυτά εξάκις-, επτάκις- και οκτάκις (6-δεόξυ-6-IDA-2,3-0-μέθυλ) (IDA = ιμινοδιοξικό οξύ) γενικά αναφερόμενα ως IDACYDs είναι τεχνητά διακοσμημένες κυκλοδεξτρίνες με ομάδες καρβοξυλίων (Εικόνα 1). Έχουν δημιουργηθεί σε τρεις διαφορετικές μορφές διακοσμημένες με 12 (α), 14 (β) και 16 (γ) καρβοξύλια αντιστοίχως και ενεργούν ως χελικοί παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί κατασκευάζονται στο Ινστιτούτο Νανοτεχνολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος. Το β-IDACYD είναι υδατοδιαλυτό με pKa προσδιορισμένο φασματομετρικά <sup>13</sup>CNMR, 1,8 και 9,4 για τις καρβοξυλομάδες και τις τριτοταγείς αμίνες, αντίστοιχα. Κατά συνέπεια, στο φυσιολογικό pH (~7) το β-IDACYD είναι ανιονικό με -7 συνολικό φορτίο. Λόγω μεθυλίωσης και σε αντίθεση με τις φυσικές κυκλοδεξτρίνες, ο μακροκυκλικός σκελετός άνθρακα στερείται των σταθεροποιητικών δεσμών υδρογόνων στην δευτερεύουσα πλευρά του. Συνεπώς, η δομική αυτή ευκαμψία οδηγεί την αναδίπλωση των υποκατάστατων ιμινοδιοξικού εστέρα προς τα μέσα, επιτρέποντάς



τους να σχηματίσουν δεσμούς με μεταλλικά κατιόντα που καταλήγουν σε σταθερά πολυμερή σύμπλοκα.



**Εικόνα 10:** Χημική δομή του  $\alpha$ - /  $\beta$ - /  $\gamma$ - IDACYD και  $\alpha$ - /  $\beta$ - /  $\gamma$ -IDACYD-OH.



**Εικόνα 11:** Αντίδραση ενός βήματος για την σύνθεση προϊόντων IDACYD από περ(6-αμινο-6-δεόξυ-2,3-O-μέθυλ)-κυκλοδεξτρίνες.

## ii) Σύνθεση φθορισμένων μορίων $\beta$ -IDACYD με BODIPY®

Για την διαδικασία παρασκευής όλα τα σκεύη ξηράθηκαν με την χρήση φλόγας πριν χρησιμοποιηθούν. Για την σύνθεση το BODIPY®-FL (21,5% mol / mol, 0,0007 g,  $2,29 \times 10^{-6}$  mol) διαλύθηκε σε ξηρό DMF (0,5 mL) και διατηρήθηκε στους  $-18^\circ \text{C}$ . Περίπου 0,76g, ( $1,065 \times 10^{-5}$  mol) της  $\beta$ -IDACYD αναδιαλύθηκαν σε ξηρό DMF (8 mL). Η φιάλη τοποθετήθηκε σε λουτρό πάγου στους  $0^\circ \text{C}$  και διατηρήθηκε σε ατμόσφαιρα Ar υπό ισχυρή ανάδευση για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκε HATU (0,219 g,  $5,77 \times 10^{-4}$  mol) ενώ παράλληλα το διάλυμα αραιώθηκε περαιτέρω με προσθήκη ξηρού DMF (4 mL) και αφέθηκε υπό ανάδευση στους  $0^\circ \text{C}$  για 2 ώρες. Έπειτα, προστέθηκε DIPEA (0,075 mL) μαζί με μία πρώτη ποσότητα (0,2 mL) διαλύματος BODIPY®-FL και η φιάλη μεταφέρθηκε σε ελαιόλουτρο στους  $30^\circ \text{C}$  υπό ατμόσφαιρα Ar και υπό ισχυρή ανάδευση, προστατευμένη από το φως. Μετά από 3 ώρες στο προκύπτουν διάλυμα χρώματος σκούρου πορτοκαλί, πραγματοποιήθηκε δεύτερη προσθήκη διαλύματος BODIPY®-FL (0,1 mL) και το μίγμα μεταφέρθηκε σε ελαιόλουτρο όπως περιεγράφηκε παραπάνω. 16 ώρες αργότερα προστέθηκε και άλλη δόση διαλύματος BODIPY®-FL (0,1 mL) και το μίγμα αφέθηκε στις ίδιες με πριν συνθήκες για επιπλέον 68 ώρες. Με το πέρας των 68 ωρών η αντίδραση σταμάτησε και εξουδετερώθηκε. Το νερό

απομακρύνθηκε με αντλία κενού μέχρι ενός mL διαλύματος και στη συνέχεια το διάλυμα υποβλήθηκε σε διαπίδυση για 48 ώρες.

### **iii) Σήμανση μορίων β-IDACYD με το γ-ραδιενεργό ισότοπο γάλλιο-67 (<sup>67</sup>Ga)**

Η μέτρηση της ραδιενεργού ροής πραγματοποιήθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) χρησιμοποιώντας αντλία Waters Controller, ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδίοδων Waters 996 και ανιχνευτή ραδιενέργειας γ-RAM. Το μήκος κύματος ανίχνευσης UV ρυθμίστηκε στα 295 nm για όλα τα πειράματα. Οι αναλύσεις RP-HPLC πραγματοποιήθηκαν σε μια μικροστήλη (cartidge) Waters μ-Bondapack C18 (3.9 mm ID x 30.0 cm L (Waters, Germany)). Οι μετρήσεις ραδιενέργειας διεξήχθησαν με έναν αυτοματοποιημένο γ-μετρητή NaI (TI) (Packard). Τα δείγματα ιστών και αίματος προσδιορίστηκαν με την χρήση μετρητή Packard COBRA II Auto-Gamma (Canberra, USA). Για ένα τυπικό παρασκεύασμα σημασμένου με <sup>67</sup>Ga-β-IDACYD, το β-IDACYD (4 mg σε 200 ml H<sub>2</sub>O) αναμίχθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου (350 μL, pH 4) και κιτρικό ραδιενεργό γάλλιο-67 (100 μL / 25 MBq). Το μίγμα στη συνέχεια επωάστηκε για 30 λεπτά στους 85 °C. Η ραδιοχημική καθαρότητα προσδιορίστηκε με RP-HPLC: Για τον ποιοτικό έλεγχο της ραδιοσήμανσης, δείγματα (10 μL) του διαλύματος αναλύθηκαν με RP-HPLC, με εφαρμογή ενός συστήματος γραμμικής διαβάθμισης σε ρυθμό ροής 1 mL / min από 0% B έως 100% B σε 20 λεπτά, όπου ο διαλύτης A ήταν 0,05% TFA σε H<sub>2</sub>O και ο διαλύτης B ήταν 0,05% TFA σε AcCN. Η ραδιοχημική καθαρότητα αποδείχθηκε ότι ήταν > 95% σε όλες τις περιπτώσεις. Το ραδιοσημασμένο σύμπλοκο χρησιμοποιήθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό σε μελέτες βιοκατανομής, σταθερότητας πλάσματος και μεταβολίτη.

**iv) Πειράματα *in-vitro* δραστηριότητας αντιβιοτικών, κυκλοδεξτρινών και συμπλόκων**

***Μέθοδος διάχυσης δίσκων σε άγαρ (Kirby-Bauer)***

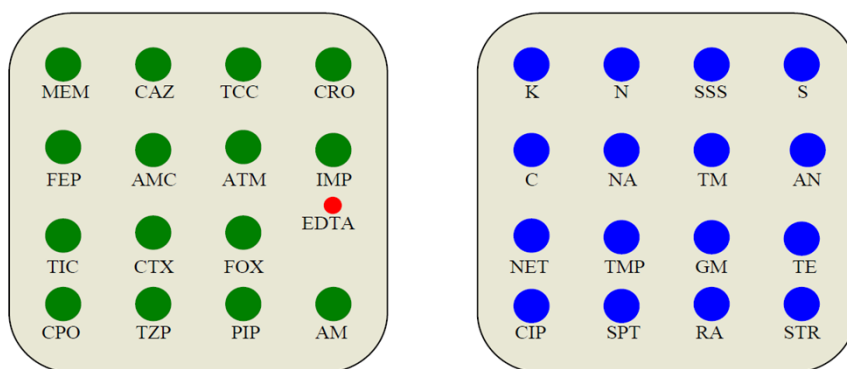
Η μέθοδος προσδιορισμού ευαισθησίας στα αντιβιοτικά με διάχυση δίσκων Kirby-Bauer παρέχει φαινοτυπικές πληροφορίες και είναι χρήσιμη για τον έλεγχο και επιλογή βακτηριακών στελεχών. Οι αντιμικροβιακές ευαισθησίες για όλα τα κλινικά απομονωθέντα Gram θετικά και αρνητικά παθογόνα προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο αυτή για μια σειρά δεκαέξι αντιβιοτικών β-λακτάμης και δεκαέξι άλλα, μη λακταμικά όπως περιεγράφηκε προηγουμένως (Jorgensen, 2007). Η δοκιμή διάχυσης πραγματοποιήθηκε σε άγαρ MH (OXOID) ως μέσο καλλιέργειας.

Αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- i) Εναιώρημα θολρότητας 0,5 McFarland (περίπου  $10^8$  κύτταρα/mL) παρασκευάζεται με αναδιάλυση μεμονωμένων βακτηριακών αποικιών που έχουν καλλιεργηθεί σε τρυβλία με McConkey άγαρ το προηγούμενο βραδύ σε φυσιολογικό ορό (0,9% v/v NaCl). Ο έλεγχος και η επιβεβαίωση θολρότητας γίνεται με χρήση θολοσίμετρου (Biomerieux) διαπιστευμένου για ερευνητική χρήση (IVD).
- ii) Ακολουθεί ομοιόμορφος ενοφθαλμισμός ποσότητας του βακτηριακού εναιωρήματος σε τρυβλίο πετρί διαστάσεων 12cmx 12 cm που περιείχε MuellerHinton με χρήση βαμβακοφόρου στείλεου σε ασηπτικό περιβάλλον.
- iii) Τοποθέτηση δεκαέξι αντιβιοτικών δίσκων σε κάθε τρυβλίο με χρήση αυτόματου διανεμητή. Οι δίσκοι που χρησιμοποιούνται είναι οι εξής:

<b>β-λακταμικά</b>	<b>Λοιπά</b>
μεροπενέμη (10 μg) (mem)	καναμυκίνη (30 μg) (kan)
κεφταζιδίμη (30 μg) (caz)	νεομυκίνη (30 μg) (ne)
τικαρκιλίνη/ κλαβουλανικό οξύ (75μg/25μg) (tcc)	σουλφοναμίδες (0.3 μg) (sss)
κεφαλοτίνη (30 μg)	στρεπτομυκίνη (100 μg) (str)
αμοξικιλίνη/κλαβουλανικό οξύ (20μg/10μg) (amc)	χλωραμφενικόλη (30 μg) (cl)
αζτρεονάμη (30 μg)	ναλιδιξικό οξύ (30 μg) (nal)
ιμπενέμη (10 μg) (imp)	τομπραμυκίνη (10 μg) (tob)
τικαρκιλίνη (75 μg) (tic)	αμικασίνη (30 μg) (amk)
κεφοταξίμη (30 μg) (ctx)	νετλιμικίνη (10 μg) (net)
κεφοξιτίνη (30 μg) (cx)	τριμεθοπρίμη (10 μg) (tmp)
τομπραμυκίνη (10 μg) (tob)	γενταμικίνη (10 μg) (gtn)
πιπερακιλλίνη/ ταζοβακτάμη (100μg/10μg) (tzp)	τετρακυκλίνη (30 μg) (tet)
πιπερακιλλίνη (100 μg) (pip)	σιπροφλοξακίνη (5 μg) (cip)
αμοξικιλίνη (30 μg) (amx)	σπεκτινομυκίνη (100 μg) (spt)
μεροπενέμη/ φενυλβορονικό οξύ (10 μg/400 μg) (mem+prba)	ριφαμυκίνη (5 μg) (ra)
μεροπενέμη/EDTA (10 μg/292 μg) (mem+edta)	βανκομυκίνη (30 μg) (van)

**Πίνακας 5:** Περιγραφή αντιβιοτικών δίσκων με την συγκέντρωση και την ονοματολογία τους που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη ανθεκτικότητας κλινικών στελεχών με την μέθοδο διάχυσης



**Εικόνα 12:** Σχεδιάγραμμα τοποθέτησης δίσκων σε τετράγωνο τριβλίο Mueller-Hinton.

(iv) Επώαση στους 37°C για 16-18 ώρες και καταμέτρηση της διαμέτρου των ζωνών αναστολής σε mm.

Η ταξινόμηση σε κατηγορίες ευαισθησίας προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας τα κλινικά σημεία διακοπής που δόθηκαν από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή για τη δοκιμή ευαισθησίας κατά της μικροβιακής αντοχής (EUCAST) (v.07, 2017).

#### **Προσδιορισμός MIC με την μέθοδο των μικροαραιώσεων**

Οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MICs) των αντιβιοτικών προσδιορίστηκαν με μια μέθοδο μικροαραιώσεων σε ζωμό Mueller-Hinton (MH).

- (i) Αρχικά, παρασκευάζεται εναιώρημα λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης κλινικών στελεχών θολερότητας 0.5 McFarland ( $1-2 \times 10^8$  CFU/mL) σε αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό.
- (ii) Στη συνέχεια το εναιώρημα αραιώνεται έως πυκνότητας  $5 \times 10^5$  CFU / mL σε MH με pH 7.2 εμπλουτισμένο με κατιόντα (Diachel).
- (iii) 100μL από το εκάστοτε αντιβιοτικό στην επιθυμητή συγκέντρωση τοποθετείτε στην πρώτη θέση κάθε σειράς της μικροπλάκας ενώ στις υπόλοιπες θέσεις τοποθετούνται 50 μL ζωμού MH.
- (iv) Το αντιβιοτικό αραιώνεται διαδοχικά καθώς 50 μL από την πρώτη θέση μεταφέρονται στην δεύτερη κ.ο.κ.
- (v) Τελικά 50 μL του εναιωρήματος προστίθεται σε κάθε θέση της μικροπλάκας παρουσία ή απουσία μορίων ενισχυτών.
- (vi) Μια θέση κάθε σειράς παραμένει άδεια αντιβιοτικού (θετικός μάρτυρας), μία θέση παραμένει άδεια εναιωρήματος και αντιβιοτικού ενώ μία άλλη

άδεια εναιωρήματος αλλά παρουσία αντιβιοτικού. Μία τελευταία θέση περιέχει μόνο ποσότητα του ενισχυτή.

- (vii) Η μικροπλάκα επωάζεται στους 36°C για 16-18 ώρες.
- (viii) Ως ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) εκτιμάται η κατώτατη συγκέντρωση αντιβιοτικού που δεν παρατηρείτε βακτηριακή ανάπτυξη (θολερότητα).

Μία σειρά 69 κυκλοδεξτρινών και νανοσωματιδίων δοκιμάστηκαν με την μέθοδο προσδιορισμού MIC είτε ως αντιμικροβιακοί παράγοντες, είτε ως χηλικοί παράγοντες και ενισχυτές των καβραπεναμών, είτε ως μόρια με δυνατότητα προστασίας των αντιβιοτικών από τριυδρολυτικές ιδιότητες των β-λακταμασών, είτε ως αναστολείς των αντλιών εκροής. Στην κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκε σειρά πολυανθεκτικών και ευαίσθητων κλινικών στελεχών Gram θετικών (*S. aureus*) και Gram αρνητικών (*K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. stuartii*, *E. gergoviae*, *A. baumannii*, *E. coli*, *S. marcescens*).

Παραγωγή	Κυκλοδεξτρίνη (Συγκεντρώσεις)	Εξεταζόμενες ιδιότητες κυκλοδεξτρίνης	Αντιβιοτικά (Συγκεντρώσεις)
Ε.Κ.Ε.Φ.Ε Δημόκριτος (Ελλάδα)	α-,β-,γ- IDACYD (50 μM)	Χηλικοί παράγοντες Αναστολέας β- λακταμασών	ιμιπενέμη, μεροπενέμη, κεφταζιδίμη (512 μg/mL έως 0.5 μg/mL)
	γ-κυκλοδεξτρίνη, suggamadex	Μόρια προστασίας αντιβιοτικών	αμοξικιλίνη, αμπικυλλίνη (512 μg/mL έως 0.5 μg/mL)
	bCys, gCys	Μόρια προστασίας αντιβιοτικών	οξακιλλίνη (512 μg/mL έως 0.5 μg/mL)
CycloLab (Ουγγαρία)	Όλα (1,000 μg/ml έως 1.95 μg/ml)	Αντιμικροβιακοί παράγοντες	-
	Όλα τα ανιονικά παράγωγα (100μM)	Χηλικοί παράγοντες Αναστολέας β- λακταμασών	ιμιπενέμη (512 μg/mL έως 0.5 μg/mL)
	Όλα τα κατιονικά παράγωγα (100μM)	Αναστολείς αντλιών εκροής	τετρακυκλίνη (512 μg/mL έως 0.5 μg/mL)
Πανεπιστήμιο της Ισλανδίας (Ισλανδία)	CMC/QaβCD (0.08 ratio) (2.5 mg/mL)	Μόρια προστασίας αντιβιοτικών	ιμιπενέμη, μεροπενέμη (512 μg/mL έως 0.5 μg/mL)
Πανεπιστήμιο	AgNPs	Αντιμικροβιακοί	-

της Κατάνια (Ιτάλια)	(15 έως 0.03 µg/ml)	παράγοντες	
Innovative Biologics (Η.Π.Α.)	PP5115(AMBnTβCD)	Αναστολείς αντλιών εκροής	τετρακυκλίνη, σιπροφλοξακίνη (512 µg/mL έως 0.5 µg/mL)

**Πίνακας 6:** Περιγραφή κυκλοδεξτρινών, ιδιοτήτων τους και αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν πειραματικά

Για τις καρβοξυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες α-, β- και γ- IDACYD παραγωγής του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος χρησιμοποιήθηκαν τα αντιβιοτικά ιμιπενέμη, μεροπενέμη, κεφταζιδίμη σε συγκεντρώσεις 512 µg/mL έως 0.5 µg/mL ενώ το εκάστοτε μόριο αναστολέας χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 50 µM.

Οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MIC) των AgNPs προσδιορίστηκαν επίσης με τη μέθοδο μικροδιάλυσης σε ζωμό Mueller-Hinton (MH) συμπληρωμένο με κατιόντα σε μία σειρά κλινικών στελεχών (2 *Klebsiella pneumoniae*, 2 *Escherichia coli*, 2 *Staphylococcus aureus* και 2 *Acinetobacter baumannii*) χρησιμοποιώντας βακτηριακά εναιωρήματα  $5 \times 10^5$  CFU/mL σε μικροπλάκες 96 φρεατίων (Lambert και Pearson, 2000). Τα νανοσωματίδια αργύρου χρησιμοποιήθηκαν σε σειρά αραιώσεων που κυμαίνονταν από 0,03 έως 15 µg/mL. Οι μικροπλάκες επώαστηκαν για 16 ώρες υπό αερόβιες συνθήκες στους 37 °C. Για τον προσδιορισμό των τιμών MIC ακολουθήθηκαν οι κατευθυντήριες γραμμές της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για τα Κλινικά Εργαστηριακά Πρότυπα (EUCAST). Ως MBC ορίστηκε η χαμηλότερη συγκέντρωση αντιμικροβιακού παράγοντα που μειώνει το βακτηριακό φορτίο κατά τουλάχιστον 99%.

Για της ανιονικές κυκλοδεξτρίνες παραγωγής της Cyclolab (Hungary) χρησιμοποιήθηκε το αντιβιοτικό ιμιπενέμη σε συγκεντρώσεις 512 µg/mL έως 0.5 µg/mL ενώ το εκάστοτε μόριο αναστολέας χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 100 µM.

Για της κατιονικές κυκλοδεξτρίνες παραγωγής της Cyclolab (Hungary) χρησιμοποιήθηκαν απουσία αντιβιοτικού σε συγκεντρώσεις 1,000 µg/ml έως 1.95 µg/ml.

### Προσδιορισμός επιπέδων ευαισθησίας νανοσωματιδίων αργύρου και συνδυασμού μεσοπορώδων νανοσωματιδίων πυριτίου (MSPs) με νανοσωματίδια άργυρου

Για την μελέτη της βακτηριοστατικής και βακτηριοκτόνου δράσης των νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs) και των συνδυασμού τους με MSPs, χρησιμοποιήθηκαν κλινικά στελέχη *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus* με πολυανθεκτικό και ευαίσθητο προφίλ σε κοινά αντιβιοτικά (π.χ. ιμπενέμη, οξακυλλίνη, αμοξικιλίνη/κλαβουλανικό) (βλέπε πίνακα). Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) σε εύρος συγκεντρώσεων από 15μg/mL έως 0.03μg/mL σε ζωμό MH όπως περιεγράφηκε παραπάνω.

Βακτηριακό είδος	Κλινικό στέλεχος	Φαινότυπος (προσδιορισμός ευαισθησίας)
<i>K. pneumoniae</i>	LA 26	Imp <sup>r</sup> , Mrp <sup>r</sup> , Amc <sup>r</sup> , Cip <sup>r</sup> , Net <sup>r</sup>
	TZAN 59	Imp <sup>s</sup> , Mrp <sup>s</sup> , Amc <sup>s</sup> , Cip <sup>s</sup> , Tic <sup>r</sup>
<i>A. baumannii</i>	SLOV 5	Imp <sup>s</sup> , Mrp <sup>s</sup> , Cip <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , Amk <sup>r</sup>
	SLOV 22	Imp <sup>s</sup> , Mrp <sup>s</sup> Cip <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , Amk <sup>r</sup>
<i>E. coli</i>	EY-03	Imp <sup>s</sup> , Mrp <sup>s</sup> , Caz <sup>s</sup> , Amc <sup>s</sup> , Amk <sup>s</sup> , Cip <sup>s</sup>
	541	Imp <sup>r</sup> , Mrp <sup>s</sup> , Caz <sup>r</sup> , Amc <sup>r</sup> , Amk <sup>r</sup> , Cip <sup>s</sup>
<i>S. aureus</i>	111/1370	Amk <sup>s</sup> , Tet <sup>s</sup> , Oxa <sup>s</sup> , Cip <sup>s</sup>
	48/92	Amk <sup>s</sup> , Tet <sup>r</sup> , Oxa <sup>s</sup> , Cip <sup>s</sup>

Πίνακας 6: Περιγραφή κλινικών στελεχών και του φαινοτύπου τους.

### Προσδιορισμός επιπέδων ευαισθησίας συνδυασμών γ-Cys/πενικιλινών

Ο προσδιορισμός των προστατευτικών ιδιοτήτων της κυκλοδεξτρίνης γ-Cys με τις πενικιλίνες αμοξικιλίνη, μεθυκυλλίνη και οξακυλλίνη πραγματοποιήθηκε με την δοκιμασία των μικροαραιώσεων όπως περιεγράφηκε προηγμένος. Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκε μια συλλογή από χαρακτηρισμένα κλινικά στελέχη του είδους *Staphylococcus aureus*. Ο χαρακτηρισμός ενός στελέχους ως MRSA βασίστηκε στην παρουσία του γονιδίου *mecA* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PBP2A (Penicillin binding protein 2A). Οι πενικιλίνες χρησιμοποιήθηκαν σε εύρος συγκεντρώσεων 256-0.5 μg/mL παρουσία ή απουσία της κυκλοδεξτρίνης γ-Cys σε αναλογία πενικιλίνη:γ-Cys 1:4. Η in-vitro φαινοτυπική συμπεριφορά όλων των στελεχών για μία σειρά β-λακταμικών, μακρολίδων και σουλφοναμίδων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο



διάχυσης Kirby-Bauer και με τον προσδιορισμό του MIC όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

Κλινικό στέλεχος	Τύπος στελέχους
4892	MRSA
4888	MRSA
4898	MRSA
94/1236	MRSA
64/934	MRSA
111/1370	MSSA

Πίνακας 7: Περιγραφή κλινικών στελεχών και του φαινοτύπου τους.

### Προσδιορισμός επιπέδων ευαισθησίας κυκλοδεξτρινών παραγωγής CycloLab

Για τον προσδιορισμό των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων και των ανασταλτικών δυνατοτήτων κατά MBL και αντλιών εκροής των κυκλοδεξτρινών παραγωγής της CycloLab χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των μικροαραιώσεων όπως περιγράφετε παραπάνω. Τα κλινικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και ο τύπος αντιμικροβιακής αντοχής παρουσιάζονται στον πίνακα. Για την εξέταση των αντιμικροβιακών τους ιδιοτήτων οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιήθηκαν σε εύρος συγκεντρώσεων 1.000 µg/mL – 1,95 µg/mL. Οι καρβοξυλιώμενες κυκλοδεξτρίνες CMGCD, GDPSI, GEGCD, CEAD, CMGCD, CMACD ελέγχθηκαν ως αναστολείς MBL και δοκιμάστηκαν παρουσία ιμιπενέμης (256-0.5 µg/mL) σε σταθερή συγκέντρωση 100 µM. Οι κυκλοδεξτρίνες MABCD, HAACD, RAMEB, TRIMEA, TRIMEB, HABCD, DIMEB ελέγχθηκαν ως αναστολείς αντλιών εκροής και δοκιμάστηκαν παρουσία τετρακυκλίνης (256-0.5 µg/mL) σε σταθερή συγκέντρωση 100 µM.

Κλινικό στέλεχος	Μηχανισμός αντοχής
<i>A. baumannii</i> SLOV-22	Αντλίες εκροής
<i>A. baumannii</i> SLOV-40	Αντλίες εκροής
<i>A. baumannii</i> LAR-14E	Αντλίες εκροής
<i>K. pneumoniae</i> LA 26/41/58	MBL τάξης B (NDM)
<i>S. aureus</i> LAR 4898	Παραγωγή mecA (MRSA)
<i>K. pneumoniae</i> LA34	MBL τάξης B (VIM) και β-λακταμάση τάξης C (CMY)
<i>K. pneumoniae</i> LA26	MBL τάξης B (NDM)
<i>K. pneumoniae</i> 6/100	MBL τάξης B (VIM)
<i>K. pneumoniae</i> SEC 4	MBL τάξης B (VIM)
<i>K. pneumoniae</i> L078/11	Καρβαπενεμάσες τάξης A (KPC)

Πίνακας 8: Περιγραφή κλινικών στελεχών και των επιβεβαιωμένων μηχανισμών αντοχής τους.

### Προσδιορισμός επιπέδων ευαισθησίας συνδυασμού καρβαπενεμών/ νανοσωματιδίων CMC/ HTMAPβCD

Ο προσδιορισμός των πιθανολογούμενων προστατευτικών ιδιοτήτων των νανοσωματιδίων CMC/ HTMAPβCD στις καρβαπενέμες ιμιπενέμη και μεροπενέμη προσδιορίστηκε σε πειράματα MIC με κλινικά στελέχη *Serratia marcescens* και *Klebsiella pneumoniae* χαρακτηρισμένα προς την παραγωγή καρβαπεναμασών τάξης Β (NDM, VIM, IMP) καθώς και σε στελέχη που δεν παρήγαγαν MBL και εμφάνιζαν ευαίσθητο προφίλ στις καρβαπενέμες. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με τον προσδιορισμό του MIC των καρβαπενεμών, ιμιπενέμης και μεροπενέμης, με την μέθοδο των μικροαραιώσεων παρουσία και απουσία των νανοσωματιδίων CMC/ HTMAPβCD όπως περιεγράφηκε προηγμένος. Οι καρβαπενέμες χρησιμοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις από 256 έως 0.25 µg/mL ενώ τα νανοσωματίδια σε αναλογία CMC/ HTMAPβCD (0,08) και σε εύρος συγκεντρώσεων από 2.5 έως 0.002 mg/mL.

Κλινικό στέλεχος	Τύπος β-λακταμασών
<i>S. marcescens</i> EUG-815	VIM, CMY
<i>K. pneumoniae</i> LA-109/16	VIM
<i>K. pneumoniae</i> LA 37 II/15	NDM, VIM, CTXM
<i>K. pneumoniae</i> 1780	VIM, KPC
<i>K. pneumoniae</i> EY03	Καμία
<i>K. pneumoniae</i> ESDY 1433	KPC
<i>K. pneumoniae</i> 5742	IMP
<i>K. pneumoniae</i> LA 82/16	VIM

**Πίνακας 9:** Περιγραφή κλινικών στελεχών και των τύπων β-λακταμάσων που εκφράζουν.

### **Προσδιορισμός επιπέδων ευαισθησίας συνδυασμών τετρακυκλίνης/ νανοσωματιδίων AMBnTβCD**

Για την μελέτη της ανασταλτικής ικανότητας των νανοσωματιδίων AMBnTβCD έναντι κλινικών στελεχών που εκφράζουν αντλίες εκροής χρησιμοποιήθηκαν κλινικά στελέχη *Acinetobacter baumannii* χαρακτηρισμένα για την έκφραση αντλιών εκροής με υψηλή ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη και στελέχη με ευαίσθητο προφίλ. Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση της τετρακυκλίνης σε συγκεντρώσεις από 256 έως 0.5 μg/mL προσδιορίστηκε παρουσία ή απουσία 20μM της κυκλοδεξτρίνης AMBnTβCD όπως περιεγράφηκε προηγμένος.

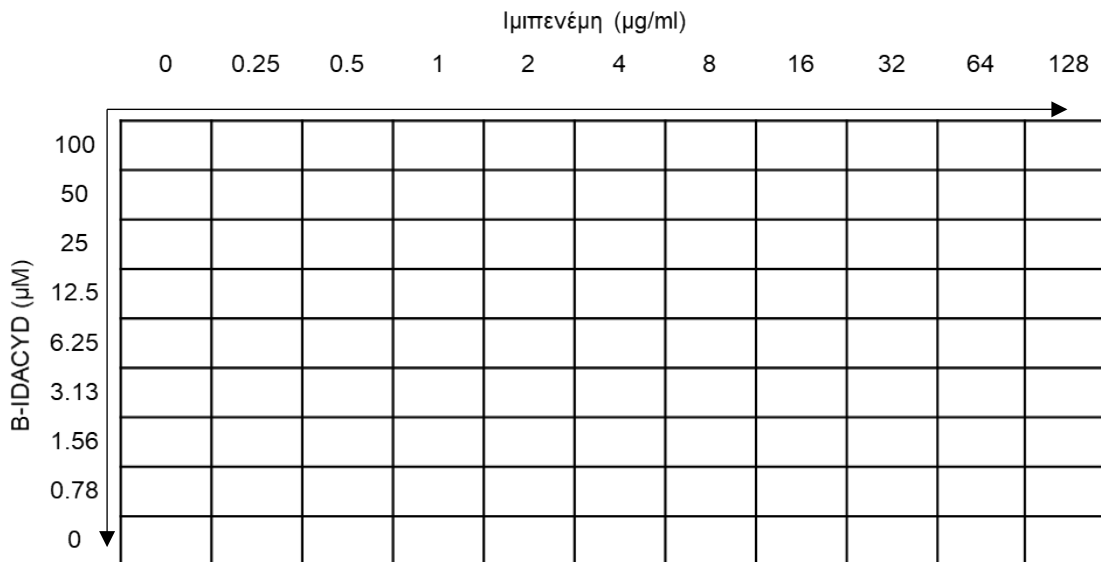
### **Προσδιορισμός επιπέδων ευαισθησίας συνδυασμών καρβαπενεμών/β-IDACYD**

Η μελέτη της ανασταλτικής δράσης των β-IDACYD κατά MBL-θετικών κλινικών στελεχών, όπως αυτά εμφανίζονται στον **Πίνακα 1**, έγινε με τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) των καρβαπενεμών, ιμιπενέμης και μεροπενέμης, με την μέθοδο των μικροαραιώσεων παρουσία και απουσία αναστολέα (β-IDACYD). Ελέγχθηκαν κλινικά βακτηριακά στελέχη που παρήγαγαν καρβαπενεμάσες τάξης B (NDM, VIM, IMP). Στελέχη που παρήγαγαν β-λακταμάσες μοριακών τάξεων A (CTX-M, KPC, SHV), C (CMY) και D (OXA) χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Όλες οι αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν σε ζωμό Mueller-Hinton.

### **Προσδιορισμός δοσολογικής συνέργειας κυκλοδεξτρινών/αντιβιοτικών με την μέθοδο Checkerboard MIC.**

Η συνεργική δράση μεταξύ της ιμιπενέμης και του αναστολέα β-IDACYD ελέγχθηκε με την μέθοδο checkerboard, μια in-vitro δισδιάστατη σειρά σειριακών αραιώσεων όπως έχει περιγράψει προηγουμένως (Pillaietal., 2005). Οι αραιώσεις βασίστηκαν στα MIC των δύο ουσιών. Τα διαλύματα του παρασκευάστηκαν και οι διαδοχικές αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν αμέσως αμέσως πριν την εκτέλεση του πειράματος σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI. Συνολικά 50μl Mueller-Hinton broth μοιράστηκε σε κάθε φρεάτιο της μικροπλάκας. Το αντιβιοτικό αραιώθηκε διαδοχικά οριζοντίως με την μέγιστη συγκέντρωση να είναι τουλάχιστον 2xMIC για το κάθε στέλεχος, ενώ ο αναστολέας αραιώθηκε διαδοχικά καθέτως. Κάθε πηγάδι της μικροπλάκας περιείχε βακτηριακό φορτίο  $5 \times 10^4$  CFU σε τελικό όγκο 100 μL και η μικροπλάκα επώαστηκε για 18 ώρες

στους 37°C. Κάθε πηγάδι της μικροπλάκας περιείχε αντιβιοτικό και αναστολέα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, με τις μέγιστες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού και αναστολέα να βρίσκονται στις αντίθετες γωνίες της μικροπλάκας. Σύμφωνα με τις οδηγίες ως MIC ορίστηκε η χαμηλότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που αναστέλλει την ανάπτυξη του βακτηρίου όπως αυτό προσδιορίζεται δια γυμνού οφθαλμού.



**Εικόνα 13 :** Παράδειγμα μικροπλάκας για τον προσδιορισμό MIC με την μέθοδο Checkerboard, για τον χαρακτηρισμό της συνδυαστικής δράσης αντιβιοτικού (ιμιπενέμη) και αναστολέα (B-IDACYD). Ο αναστολέας αραιώνεται διαδοχικά με κάθετη φορά ενώ το αντιβιοτικό οριζοντίως. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού και αναστολέα βρίσκονται στα αντίθετα άκρα της μικροπλάκας.

Η δοκιμή checkerboard χρησιμοποιήθηκε ως βάση για τον προσδιορισμό της ελάχιστης βέλτιστης δόσης β-IDACYD που εμφανίζει τις μέγιστες ικανότητες ενίσχυσης της δραστηριότητας της ιμιπενέμης. Για την δοκιμή χρησιμοποιήθηκε ζωμός Mueller-Hinton (MH) εμπλουτισμένος με κατιόν. Η δοκιμή έγινε στο κλινικό στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* LA26 που εκφράζει το αλληλόμορφο NDM και στο κλινικό στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* LA34 που εκφράζει το αλληλόμορφο VIM χρησιμοποιώντας εναιώρημα  $5 \times 10^5$  CFU/ml σε μικροπλάκα ELISA. Κάθε δοκιμή διεξήχθη εις τριπλούν.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό της ελάχιστης βέλτιστης δόσης της τροποποιημένης κυκλοδεξτρίνης AMBnTBCD που εμφανίζει τις μέγιστες ικανότητες ενίσχυσης της δραστηριότητας της τετρακυκλίνης. Η δοκιμή έγινε στο κλινικό στέλεχος *Acinetobacter baumannii* SLOV22 χρησιμοποιώντας εναιώρημα  $5 \times 10^5$  CFU/ml.

## **Καμπύλες θανάτωσης παθογόνων βακτηρίων σε συνάρτηση με το χρόνο (time-kill assays)**

### **β-IDACYD:**

Η ανασταλτική δράση των συνδυασμών β-IDACYD κυκλοδεξτρίνης/καρβαπενεμών έναντι MBL-θετικών στελεχών αξιολογήθηκε με καμπύλες θανάτωσης (time-kill curves). Οι συγκέντρωσεις της ιμιπενέμης και της μεροπενέμης που χρησιμοποιήθηκαν αντιστοιχούσαν στις τιμές MIC και 2xMIC. Το αρχικό μικροβιακό εναιώρημα είχε πυκνότητα  $5 \times 10^5$  CFU/mL. Οι καμπύλες θανάτωσης καθορίστηκαν απουσία και παρουσία β-IDACYD (50 μM) έναντι του NDM-θετικού κλινικού στελέχους *Klebsiella pneumoniae* LA26 (MIC ιμιπενέμης=16mg/L, MIC μεροπενέμης=32mg/L) καθώς και των VIM και IMP θετικών κλινικών στελεχών *Klebsiella pneumoniae* LA 109/16 (MIC ιμιπενέμης=16 mg/L, MIC μεροπενέμης=128 mg/L) και 5742/16 (MIC ιμιπενέμης=8mg/L, MIC μεροπενέμης=16mg/L), αντιστοίχως. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται λεπτομερώς από τους Burgess και Hall (2014). Συνοπτικά, προεπωασμένος, εμπλουτισμένος με κατιόντα και συμπληρωμένος με προκαθορισμένες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών ζωμός MH (OXOID) (25mL), εμβολιάστηκε με βακτηριακό εναιώρημα από καλλιέργειες λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης στον ίδιο ζωμό. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 35 °C για 24 ώρες. Έγινε καταμέτρηση των αποικιών στις 0, 3, 6 και 24 ώρες επώασης. Σε κάθε χρονικό σημείο αφαιρούνταν 0.1 mL από τις καλλιέργειες, αραιωνόταν τουλάχιστον 1/10 σε Φ.Ο. ώστε να είναι μετρήσιμο και να ελαχιστοποιηθεί η ποσότητα του αντιβιοτικού και μεταφερόταν σε MH άγαρ. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε  $\log_{10}$ CFU/mL. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Αντίστοιχες καλλιέργειες χωρίς αντιβιοτικό χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικά δείγματα αναφοράς.

### **Ag-NPs:**

Η διαδικασία έγινε όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως. Χρησιμοποιήθηκαν τα κλινικά στελέχη *K. pneumoniae* LA-26, *E. coli* EY-03 και MRSA 4892. Η τελική πυκνότητα των μικροβιακών εναιωρημάτων σε ζωμό MH εμπλουτισμένο με κατιόντα ήταν  $10^6$  CFU/mL. Προκειμένου να προσδιοριστούν οι καμπύλες θανάτωσης χρησιμοποιήθηκε

συγκέντρωση AgNPs ίση με 15 µg/mL. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν για 24 ώρες στους 35° C. Οι μετρήσεις των αποικιών πραγματοποιήθηκαν στις 0, 6 και 24 ώρες. Ένας όγκος 0,1 mL απομακρύνθηκε σε κάθε χρονικό σημείο και καλλιεργήθηκε σε MH άγαρ αφού πρώτα αραιώθηκε τουλάχιστον 1/10 σε φυσιολογικό ορό για να διευκολυνθεί η μέτρηση και να ελαχιστοποιηθεί η μεταφορά νανοσωματιδίων. Το εκτιμώμενο όριο ποσοτικοποίησης ήταν 10<sup>2</sup> CFU/mL. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως log<sub>10</sub> CFU/mL. Τα πειράματα εκτελέστηκαν εις διπλούν. Καλλιέργειες ελέγχου χωρίς νανοσωματίδια συμπεριλήφθηκαν σε κάθε ομάδα πειραμάτων.

#### **AMBnTβCD:**

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του αναστολέα αντλιών εκροής AMBnTβCD με συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη που αντιστοιχούν σε τιμές MIC και 2xMIC έναντι του κλινικού στελέχους *Acinetobacter baumannii* SLOV22 (MIC τετρακυκλίνης=32 mg/L).

#### **Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας.**

Η κυτταροτοξικότητα προσδιορίστηκε μετρώντας την απελευθέρωση γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) (CytoTox 96) και το σχηματισμό φορμαζάνης (CellTiter 96).

Το CytoTox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega) λειτουργεί μετρώντας την απελευθέρωση της LDH. Η LDH είναι μια οξειδοοδουκτάση που βρίσκεται σε πολλούς οργανισμούς. Καταλύει την μετατροπή του πυροσταφλικού και γαλακτικού οξέος με ταυτόχρονη μετατροπή του NADH σε NAD<sup>+</sup>. Όταν οι ιστοί τραυματιστούν λόγω ασθένειας ή παρουσίας τοξικών ενώσεων, τα κύτταρα απελευθερώνουν την LDH στην κυκλοφορία του αίματος. Καθώς η LDH είναι ένα σταθερό ένζυμο χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό τραυματισμού και τοξικότητας σε ιστούς και κύτταρα. Η απελευθερωμένη LDH σε κυτταρικό υπερκείμενο μετρείται σε μια ενζυμική δοκιμασία διάρκειας 30 λεπτών που έχει ως αποτέλεσμα την μετατροπή τετραζολικού άλατος σε φορμαζάνη κόκκινου χρώματος. Η ποσότητα χρώματος που παράγεται είναι ανάλογη του αριθμού των κυττάρων που έχουν υποστεί λύση. Η συγκέντρωση χρώματος στο ορατό φάσμα ποσοτικοποιείται με την χρήση φωτομετρητή-μικροπλακών. Το CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) είναι μια βελτιωμένη παραλλαγή της MTT μεθοδολογίας.

Χρησιμοποιείτε προσθέτοντας ένα διάλυμα χρωστικής σε κυτταροκαλλιέργειες πάνω σε μικροπλάκες 96 φρεατίων. Κατά την διάρκεια μιας τετράωρης επώασης, τα ζώντα κύτταρα μετατρέπουν το MTT τετραζόλιου, συστατικό του χρωστικού διαλύματος, σε προϊόν φορμαζάνης. Το διάλυμα αναστολής της αντίδρασης προστεθείται με την πάροδο της επώασης για να διαλυτοποιήσει το παραγόμενο προϊόν φορμαζάνης και η απορρόφηση προσδιορίζεται με την χρήση φωτομέτρου μικροπλακών στα 570 nm.

### **β-IDACYD:**

Η πιθανή κυτταροτοξικότητα της β-IDACYD κυκλοδεξτρίνης ελέγχθηκε στην κυτταρική σειρά ινοβλαστών L929 με την χρήση των: (i) CytoTox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega) και (ii) CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Οι ινοβλάστες καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM (Biochrom) συμπληρωμένο με 10% (v/v) εμβρυϊκό βόειο ορό (FBS; Biochrom), 100 mM πυροσταφυλικό νάτριο, 2 mM L-γλουταμίνης, 10 mM HEPES, 100 U/ml πενικιλίνης και 100 µg/ml στρεπτομυκίνης. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε μικροπλάκες 96 φρεατίων για 24 ώρες. Στην συνέχεια, προστέθηκε σειρά διαδοχικών αραιώσεων β-IDACYD από 0.5 έως 1000 µg/ml. Η κυτταροτοξικότητα προσδιορίστηκε μετρώντας την απελευθέρωση γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) (CytoTox 96) και το σχηματισμό φορμαζάνης (CellTiter 96).

### **γ-Cys, AgNPs και MSPs/AgNPs :**

Η κυτταροτοξικότητα της τροποποιημένης β-κυκλοδεξτρίνης γ-Cys, των νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs) καθώς και του συνδυασμού MSPs/AgNPs προσδιορίστηκαν επίσης με τις δύο προαναφερόμενες μεθόδους.

### ***Ενεργότητα του β-IDACYD ως αναστολέα των μεταλλο-β-λακταμασών***

Για τον προσδιορισμό της πιθανολογούμενης ανασταλτικής δραστηριότητας της β-IDACYD έναντι των MBL το blaVIM-1 γονίδιο από ένα κλινικό στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* κλωνοποιήθηκε στο πλασμιδιακό όχημα pBC-SK και το ένζυμο VIM-1 απομονώθηκε με την χρήση χρωματογραφίας ανταλλαγής ιόντων. Η ανασταλτική δραστηριότητα της β-IDACYD έναντι της VIM-1 MBL μελετήθηκε φωτομετρικά στα 299 nm.

## **Πειράματα υδρόλυσης**

### **Φασματομετρικός προσδιορισμός υδρόλυσης β-λακταμικών στα σύμπλοκα γ-Cys-CD/οξακιλλίνης**

Η δυνατότητα της τεχνητής κυκλοδεξτρίνης γ-Cys-CD να προστατεύει την πενικιλίνη και την οξακιλλίνη παρουσία του υδρολυτικού ενζύμου οξακιλινάση-1 (OXA-1) απομονωμένου από το κλινικό στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* 152/11 εξετάστηκε σε *in-vitro* πείραμα με φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της υδρόλυσης των β-λακταμών στα 260 nm. Η ακριβής ποσότητα OXA-1 υπολογίστηκε με την χρήση του Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, US). Ο συνδυασμός γ-Cys-CD/οξακιλλίνης χρησιμοποιήθηκε σε αναλογία 4:1. Όλα τα πειράματα αναστολής πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου

### **Υδρολυτικό προφίλ συμπόλου καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης (CMC)/ πολυμερών HTMAPβCD με την μεροπενέμη**

Ο προσδιορισμός της πιθανολογούμενης προστατευτικής ικανότητας των νανοσωματιδίων CMC/HTMAPβCD από την υδρόλυση της μεροπενέμης από την VIM-1 MBL πραγματοποιήθηκε φωτομετρικά στα 299 nm. Τα νανοσωματίδια προετοιμάστηκαν πριν την μέτρηση σε αναλογία CMC/HTMAPβCD 0.8 και συμπλοκοποιούνταν παρουσία 50 μM μεροπενέμης. Η αλλαγή της απορρόφησης καταγραφόταν για 2 min από την προσθήκη 0.6mL ενζύμου VIM-1 MBL. Οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα HEPES (25 mM; pH 7.6) εμπλουτισμένο με 25 μM ZnSO<sub>4</sub> στους 25°C. Ο προσδιορισμός της υδρόλυσης της μεροπενέμης απουσία νανοσωματιδίου πραγματοποιήθηκε επίσης για τις ίδιες συγκεντρώσεις και κάτω από τις ίδιες συνθήκες.

### **Προσδιορισμός IC<sub>50</sub> της β-IDACYD κυκλοδεξτρίνης**

Ως IC<sub>50</sub> ορίζεται η ελάχιστη συγκέντρωση του αναστολέα που μειώνει κατά 50% την ενζυμική δραστηριότητα. Ο προσδιορισμός της τιμής IC<sub>50</sub> έγινε όπως έχει περιγράψει από τους Κωτσάκη και συνεργάτες (Kotsakis et al., 2010). Για τις ανάγκες του πειράματος τα γονίδια *blaVIM-1*, *blaNDM-1* και *blaIMP-1* από κλινικά στελέχη *Klebsiella pneumoniae* κλωνοποιήθηκαν και τα παραγόμενα ένζυμα απομονώθηκαν



χρωματογραφικά (ion exchange chromatography). Η ανασταλτική δράση της β-IDACYD κυκλοδεκτρίνης έναντι των ενζύμων VIM-1, NDM-1 και IMP-1 προσδιορίστηκε φωτομετρικά. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε UV/Vis φωτόμετρο Hitachi U-2001. Το μείγμα της αντίδρασης προεπωαζόταν για 3 λεπτά πριν κάθε μέτρηση παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων β-IDACYD κυκλοδεκτρίνης. Ακολουθούσε η προσθήκη του υποστρώματος (80 μM ιμιπενέμης) και η καταγραφή των αλλαγών στην απορρόφηση για 2 min. Οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα HEPES (25 mM; pH 7.6) εμπλουτισμένο με 25 μM ZnSO<sub>4</sub> στους 25°C. Τα μήκη κύματος και οι συντελεστές μοριακής απόσβεσης που χρησιμοποιήθηκαν για την ιμιπενέμη ήταν :  $\lambda = 300 \text{ nm}$  και  $\Delta\epsilon = 7000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Kotsakis et al., 2010). Η υδρολυτική δραστηριότητα των MBL κατά της ιμιπενέμης εκφρασμένη ως kcat/km ήταν:  $1.3 \text{ s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$  (VIM-1),  $5.7 \text{ s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$  (IMP-1) και  $0.21 \text{ s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$  (NDM-1) (Queenan et al., 2010; Murphy et al., 2002). Για τους υπολογισμούς και τα διαγράμματα χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc.) όπως έχει περιγράψει προηγουμένως (Giakkouri et al., 2000).

### ***Πειράματα πρόσληψης κυκλοδεκτρινών από βακτηριακά και ευκαρυωτικά κύτταρα***

#### **Ελεγχος πρόσληψης σημασμένης με BODIPY-β-IDACYD κυκλοδεκτρίνης σε στέλεχος *K. pneumoniae***

Το απομονωμένο από λογαριθμική καλλιέργεια σε ζωμό Luria-Bertani (LB) κλινικό στέλεχος *K. pneumoniae* LA26 χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση  $10^8 \text{ CFU/mL}$  (προσδιορισμένη σε UV/VIS φωτόμετρο). Αρχικά, το βακτηριακό εναιώρημα κατακρημνίστηκε με φυγοκέντρηση (5 min,  $\sim 2700 \text{ g}$ , 4°C). Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1 mL PBS (170 mM NaCl, 3.4 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2). Το κυτταρικό ίζημα συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση (5 min,  $\sim 3700 \text{ g}$ ). Ακολούθησε διπλή έκπλυση με PBS και επαναιώρηση στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα (τελική πυκνότητα κυττάρων  $\sim 10^8 \text{ CFU/mL}$ ). Ένα mL της βακτηριακής καλλιέργειας επώαστηκε με BODIPY-β-IDACYD (10 μg/mL τελική συγκέντρωση) για 30 min στους 37°C. Ακολούθως της επώασης τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (5 min,  $\sim 2700 \text{ g}$ , 4°C), το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 0.5 mL PBS. Όγκος 50 μL από κάθε δείγμα

τοποθετήθηκε στο κέντρο αντικειμενοφόρου πλάκας VWR (VWR Vistavision HistoBond) και θερμάνθηκε μέχρι να στεγνώσει. Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν και παρατηρήθηκαν με τη χρήση πολυεστιακής μικροσκοπίας (Leica TCS-SP; Leica Microsystems).

### ***Πρόσληψη φθορισμένης γ-Cys από μακροφάγα ποντικού***

Μακροφαγική σειρά από ποντίκια (κυτταρική σειρά J774A.1) καλλιεργήθηκε σε μικροπλάκες 24 φρεατίων παρουσία 50 μM γ-Cys κυκλοδεξτρίνης σημασμένης με FITC (FITC-γCys) σε θρεπτικό μέσο RPMI-1640 (Biochrom) εμπλουτισμένο με 10% (v/v) εμβρυϊκό βόειο ορό (FBS, Biochrom), 2 mM L-γλουταμίνη, 10 mM HEPES, 100 u / mL πενικιλίνη-G και 100 μg / mL στρεπτομυκίνη (πλήρες θρεπτικό μέσο RPMI) σε 5% CO<sub>2</sub> στους 37 °C για μια σειρά χρονικών περιόδων (15, 30, 60, 120, 240 λεπτά και 24 ώρες). Στο τέλος κάθε χρονικού σημείου επώασης, τα μακροφάγα ξεπλένονταν με παγωμένο PBS, pH 7.4 στο οποίο είχε προστεθεί 5 mM EDTA για να σταματήσει η φαγοκυττάρωση και να απομακρυνθεί η μη συνδεδεμένη γ-Cys. Η πρόσληψη της επισημασμένης με FITC γ-Cys κυκλοδεξτρίνης προσδιορίστηκε με κυτταρομετρία ροής (FACS Calibur, Becton-Dickinson) και τα δεδομένα που προέκυψαν επεξεργάστηκαν με το λογισμικό FlowJo V10 (Tree Star Inc.).

### ***Πρόσληψη της φθορισμένης γ-Cys κυκλοδεξτρίνης από μακροφάγα-Ανάλυση με συνεστιακή μικροσκοπία***

Η διαδικασία πρόσληψης και ο εντοπισμός της γ-Cys στην μακροφαγική σειρά J774A.1 ελέγχθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού. Μακροφάγα ( $0,2 \times 10^6$  κύτταρα / φρεάτιο) αναπτύχθηκαν σε στείρες αντικειμενοφόρους πλάκες σε μικροπλάκες 24 φρεατίων. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε 500 μL θρεπτικού μέσου RPMI και επώαστηκαν για 24 ώρες σε 5% CO<sub>2</sub> στους 37 ° C για να επιτραπεί η πρόσδεσή τους στις πλάκες. Ακολούθως, προστέθηκε 50 μM σημασμένης με FITC γ-Cys, διαλυμένης σε μέσο καλλιέργειας και επώαστηκαν για μία σειρά χρονικών σημείων: 0, 30, 60, 120 και 240 λεπτά στους 37 ° C. Χρησιμοποιήθηκε επίσης αρνητικό δείγμα που επώαστηκε στους 4 ° C. Στο τέλος κάθε περιόδου επώασης οι πλάκες πλένονταν τρεις φορές με κρύο PBS και προστίθεται 50 nM LysoTracker Red (Invitrogen), μια κόκκινη φθορίζουσα χρώση για την επισήμανση και παρακολούθηση όξινων οργανιδίων σε

ζωντανά κύτταρα. Μετά την προσθήκη της χρωστικής τα κύτταρα επωάζονταν για περαιτέρω 30 λεπτά και πλάκες πλύθηκαν και μονιμοποιήθηκαν σε 4% (w/v) παραφορμαλδεΐδη (PFA) σε PBS για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στην συνέχεια τα σημασμένα κύτταρα πλύθηκαν σε PBS και σταθεροποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 10% (w/v) mowiol 40-88, 25% (v/v) γλυκερόλη, 100mM HCl σε 20mM Tris. Οι πλάκες επώαστηκαν για 1 ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος προστατευμένες από το φως και εξετάστηκαν με τη χρήση πολυσεταιικού μικροσκοπίου (Leica TCS-SP, Leica Microsystems).

Περαιτέρω ανάλυση και εξέταση συνεντοπισμού των εικόνων πραγματοποιήθηκε με την χρήση του λογισμικού επεξεργασίας Fiji (ImageJ). Ο αλγόριθμος COSTES χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της τιμής υποβάθρου (background threshold value) (Costes et al., 2004). Ο συντελεστής επικάλυψης Manders tM-2 χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του ποσοστού των πράσινα φθορισμένων με FITC  $\gamma$ -Cys-CDs που επικαλύπτονται και συνεπώς βρίσκονται εντός των κόκκινα σημασμένων με LysoTracker ενδοκυτταρικών οργανιδίων (Dunn et al., 2011).

## **v) Πειράματα *ex-vivo***

### ***Σταθερότητα στο πλάσμα και μελέτες δέσμευσης πρωτεϊνών***

Σε πρόσφατα απομονωμένο πλάσμα ανθρώπου και ποντικού (450  $\mu$ L) προστέθηκαν 50 $\mu$ L ραδιοσημασμένης  $^{67}\text{Ga}$ - $\beta$ -IDACYD. Το διάλυμα επώαστηκε σε υδατόλουτρο στους 37 °C. Τρία δείγματα των 100  $\mu$ L (εις τριπλούν) αφαιρέθηκαν μετά από 30, 60 και 120 λεπτά και τους προστέθηκε αιθανόλη (EtOH) (200  $\mu$ L) για να κατακρημνισθούν οι πρωτεΐνες του πλάσματος. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά (1000 rpm). Το υπερκείμενο απομονώθηκε και προσδιορίστηκε η ραδιενεργότητά του σε ένα  $\gamma$ -wellcounter, ενώ το ίζημα πλύθηκε δύο φορές με 1 mL EtOH και ακολούθως μετρήθηκε επίσης. Η δραστηριότητα του ιζήματος συγκρίθηκε με τη συνολική δραστηριότητα (ίζημα και υπερκείμενο) για να υπολογιστεί το ποσοστό της  $^{67}\text{Ga}$ - $\beta$ -IDACYD που δεσμεύτηκε σε πρωτεΐνες πλάσματος. Επίσης, το υπερκείμενο αναλύθηκε με RP-HPLC (με τους ίδιους διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην ραδιοσήμανση) για τον προσδιορισμό της σταθερότητας του  $^{67}\text{Ga}$ - $\beta$ -IDACYD σε πλάσμα ανθρώπου και ποντικού.

### **Προσδιορισμός βιοκατανομής *ex-vivo***

Ο πειραματισμός σε ζώα έγινε σύμφωνα με την Οδηγία της ΕΕ 2010/63 / ΕΕ και τους σχετικούς εθνικούς κανονισμούς. Αυτές οι μελέτες έχουν εγκριθεί περαιτέρω από την Επιτροπή Δεοντολογίας του ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος" και η φροντίδα των ζώων και οι ακολουθούμενες διαδικασίες είναι σύμφωνες με τις θεσμικές οδηγίες και τις άδειες που εκδίδονται από το Τμήμα Γεωργικής και Κτηνιατρικής Πολιτικής της Νομαρχίας Αττικής (Αριθμοί Καταχώρησης: EL 25 BIO 022). Τα ζώα στεγάστηκαν σε κλιματιζόμενα δωμάτια κάτω από κύκλο 12 ωρών φωτός / σκότους και είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό.

Τα πειράματα βιοκατανομής πραγματοποιήθηκαν σε θηλυκά CD-1 ποντίκια ηλικίας 7-8 εβδομάδων και βάρους 28-32 gr, χρησιμοποιώντας ραδιοσημασμένο σύμπλοκο  $^{67}\text{Ga}:\beta\text{-IDACYD}$  το οποίο χορηγήθηκε ενδοφλέβια μέσω της ουραίας φλέβας. Για την έγχυση, η σημασμένη με  $^{67}\text{Ga}$  κυκλοδεξτρίνη αραιώθηκε σε διάλυμα φωσφορικών ιόντων (PBS) 0,1 M, pH 7,4 (δόση ανά ζώο: 100  $\mu\text{L}$  όγκος/0,13  $\mu\text{mol}$  συγκέντρωση κυκλοδεξτρίνης/1,67 MBq ραδιοενεργότητα). Η μελέτη βιοκατανομής πραγματοποιήθηκε 5, 30, 60, 120 και 240 λεπτά μετά τη χορήγηση ( $n = 5$  ανά χρονικό σημείο). Σε κάθε χρονικό σημείο τα ποντίκια θυσιάζονταν και τα βασικά όργανα όπως η καρδιά, το ήπαρ, τα νεφρά, το στομάχι, τα έντερα, ο σπλήνας, οι πνεύμονες, το πάγκρεας και τα οστά απομακρύνθηκαν και μαζί με δείγματα μυών και ούρων ζυγίστηκαν και μετρήθηκαν για την ραδιενεργότητά τους (Packard COBRA II autogamma counter). Τα δεδομένα κατανομής ιστού υπολογίστηκαν ως ποσοστό επί τοις εκατό ενέσιμης δόσης ανά όργανο (% ID/όργανο). Το στομάχι και τα έντερα δεν άδειασαν πριν από τις μετρήσεις. Το % ID σε ολικό αίμα εκτιμήθηκε υποθέτοντας τον συνολικό όγκο αίματος ως το 6,5% του συνολικού σωματικού βάρους.

### **Ποσοτικοποίηση $^{67}\text{Ga}-\beta\text{-IDACYD}$ σε δείγματα ιστών**

Για να προσδιοριστεί το προφίλ του μεταβολίτη του  $^{67}\text{Ga}-\beta\text{-IDACYD}$ , σε μία ομάδα 10 θηλυκών CD-1 ποντικών, ηλικίας 6-7 εβδομάδων και βάρους 30-32 gr, χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά ποσότητα  $^{67}\text{Ga}-\beta\text{-IDACYD}$ . Η παρουσία μεταβολίτη στα ούρα και στο αίμα αξιολογήθηκε 5, 60 και 120 λεπτά μετά την αρχική έγχυση. Τα ούρα συλλέχθηκαν πριν την ευθανασία και φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά (2000 g). Το αίμα που

συλλέχθηκε από τα ποντίκια στα ίδια χρονικά σημεία αφέθηκε να πήξει και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά σε 2000 g και συλλέχθηκε το υπερκείμενο (ορός). Τα δείγματα ούρων και ορού αναλύθηκαν με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους. Δείγματα ορού και ούρων προστέθηκαν σε στήλη αποκλεισμού μεγέθους (TSKgrI G3000SWXL, 7,8 mm ID x 30,0 cm L, TOSOH BIOSCIENCE) και εκπλύθηκαν με κινητή φάση PBS που περιείχε 0,5% NaN<sub>3</sub>, σε παροχή 1 mL/min. Το προϊόν της έκπλυσης εξετάστηκε για την παρουσία ραδιενέργειας και απορρόφησης UV στα 220 nm.

### **Μελέτες σταθερότητας αποτρανσφερίνης**

Ένα δείγμα 50  $\mu$ L <sup>67</sup>Ga-B-IDACYD προστέθηκε σε 450  $\mu$ L διαλύματος αποτρανσφερίνης (3 mg / mL PBS, pH 7.4) και επώαστηκε στους 37 ° C. Δείγματα αφαιρέθηκαν μετά από 30, 60 και 120 λεπτά και αναλύθηκαν με HPLC αποκλεισμού μεγέθους για να προσδιοριστεί η ποσότητα του ραδιομεταδότη που παρέμεινε ενεργή.

### **vi) Πειράματα *in-vivo***

#### **Προσδιορισμός οξείας τοξικότητας**

Πραγματοποιήθηκε σειρά *in-vivo* πειραμάτων για να εξεταστεί η τοξικότητα σε ζωντανούς οργανισμούς και να προσδιοριστεί το δασολογικό τους εύρος, μιας σειράς τεχνητά τροποποιημένων κυκλοδεξτρινών των κατηγοριών  $\beta$ -IDACYDs,  $\gamma$ -Cys-CDs,  $\beta$ -Pen-CDs καθώς και των τριών φυσικών κυκλοδεξτρινών ( $\alpha$ ,  $\beta$  και  $\gamma$ ). Τα *in-vivo* αυτά πειράματα σχεδιάστηκαν και εκτελέστηκαν με βάση τις οδηγίες και τους κανονισμούς της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας. Τα υπό δοκιμή νανοσωματίδια χορηγήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση σε θηλυκά CD-1 ποντίκια. Τα ποντίκια ήταν ηλικίας 7-8 εβδομάδων και βάρους 28-32 γραμμαρίων. Ομάδες από τρία έως τέσσερα ζώα δέχθηκαν χορήγηση μίας εκ των έξι κυκλοδεξτρινών σε συγκεντρώσεις 30mg/kg και 120 mg/kg. Στην περίπτωση του  $\beta$ -IDACYD χορηγήθηκε μία επιπλέον δόση συγκέντρωσης 500 mg/kg. Μετά τη χορήγηση τα πειραματόζωα ήταν υπό συνεχή παρακολούθηση για διάστημα 4-6 ημερών και οι θάνατοι καθώς και οποιαδήποτε

ένδειξη τοξικότητας (πυρετός, τρόμος, αστάθεια, ρίγη, σπασμοί, ασυνήθης συμπεριφορά, επιληπτικές κρίσεις) καταγραφόταν.

### **Θεραπεία σε μοντέλο τοπικής λοίμωξης στον μηρό**

Είκοσι θηλυκά ποντίκια ηλικίας 10 εβδομάδων (CD1) και βάρους 30-35 gr χρίστηκαν ουδετεροπενικά με χορήγηση δύο δόσεων κυκλοφωσφαμιδίου (150 mg/kg και 100 mg/kg ανά ποντικό τις ημέρες 1 και 4 προ λοίμωξης αντίστοιχα). Κατά την ημέρα 5 σε όλα τα ποντίκια προκλήθηκε τοπική λοίμωξη με εναιώρημα 0,1 mL πυκνότητας  $10^7$  CFU / mL του κλινικού στελέχους *K. pneumoniae* SEC-4 (MIC ιμιπενέμης 64 mg/L) τακτοποιημένο ως προς την παραγωγή της MBL VIM-1 με ενδομυϊκή έγχυση στον δεξιό μηρό. Από τα 6 ποντίκια στην ομάδα ελέγχου στα οποία χορηγήθηκε διάλυμα φυσιολογικού ορού (Ομάδα A), 2 ποντίκια θανατώθηκαν 2 ώρες μετά την πρόκληση της λοίμωξης, ενώ τα άλλα ποντίκια χωρίστηκαν σε ομάδες των 7 και τους χορηγήθηκε ενδοφλέβια θεραπεία με ένα από τα ακόλουθα δοσολογικά σχήματα: 30 mg / kg ιμιπενέμης (Ομάδα B) ή 30 mg / kg ιμιπενέμης μαζί με 10 mg/kg β-IDACYD (Ομάδα C) ανά 2 ώρες για διάστημα 24 ωρών (συνολικές ημερήσιες δόσεις: 360 mg / kg ιμιπενέμης (B) και 360 mg / kg ιμιπενέμης με 120 mg / kg β-IDACYD (C)). Έξι ώρες μετά την πρόκληση της λοίμωξης, 2 ποντίκια της ομάδας A καθώς και 3 ποντίκια από κάθε μία από τις ομάδες B και C θανατώθηκαν και οι μηροί τους αφαιρέθηκαν ασηπτικά. Με την πάροδο των 24 ωρών, οι υπόλοιποι ποντικοί από όλες τις ομάδες θυσιάστηκαν και οι μηροί τους αφαιρέθηκαν όπως περιεγράφηκε προηγουμένως. Οι μύες των μηρών μεταφέρθηκαν σε σωλήνες πολυπροπυλενίου των 15 mL και ομογενοποιήθηκαν σε 1 mL αποστειρωμένου PBS. Προετοιμάστηκαν 10 σειριακές αραιώσεις των ομογενοποιημένων μηρών σε αποστειρωμένο PBS και 0,1 mL από κάθε μία εκ των εννέα αραιώσεων για κάθε μηρό τοποθετήθηκε σε τρυβλία Mueller-Hinton άγαρ εις διπλούν. Οι βακτηριακές αποικίες καταμετρήθηκαν για κάθε τρυβλίο μετά από ~16 ώρες επώασης στους 37 ° C.

### Time Points (t.p.)

-2	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
ΛΟΙΜΩΞΗ (20)	ΘΕΡΑΠΕΙΑ σε όλα τα t.p. / σε όλες τις ομάδες πλην της A, με τα αντίστοιχα σχήματα												
	ΘΑΝΑΤΩΣΗ A <sub>0</sub> (2 ποντίκια)	ΘΑΝΑΤΩΣΗ A <sub>6</sub> (2 ποντίκια) B <sub>6</sub> (3 ποντίκια) C <sub>6</sub> (3 ποντίκια)									ΘΑΝΑΤΩΣΗ A <sub>24</sub> (2 ποντίκια) B <sub>24</sub> (4 ποντίκια) C <sub>24</sub> (4 ποντίκια)		

Σχήμα	Θεραπεία	Ποντίκια	Ώρες θανάτωσης (από αρχή θεραπείας)
A	Χωρίς θεραπεία (control)	6	0,6,24
B	Ιμιπενέμη 30mg/kg ανά 2 h	7	6,24
C	Ιμιπενέμη + β-IDACYD 30mg/kg + 9.5 mg/kg ανά 2 h	7	6,24

**Πίνακας 10:** Περιγραφή των θεραπευτικών σχημάτων και τον χρονικών σημείων θεραπείας και θανάτωσης πειραματόζων.

### Θεραπεία σε μοντέλο σήψης

#### Πείραμα 1 (Θεραπεία ανά 2 ώρες)

Ουδετεροπενικά, θηλυκά CD-1 ποντίκια ηλικίας 7-8 εβδομάδων και βάρους 28-32 gr μολύνθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση 0.1 mL βακτηριακού εναιωρήματος ( $10^8$  CFU/mL) του στελέχους *K. pneumoniae* LA26 που παράγει NDM (MIC μεροπενέμης 32 mg/L). Τα ζώα είχαν καταστεί ουδετεροπενικά ( $<100$  ουδετερόφιλα/ $\text{mm}^3$ ) με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 150 και 100 mg/kg κυκλοφωσφαμιδίου τέσσερις (-4) και μία (-1) ημέρες αντιστοίχως πριν την πρόκληση λοίμωξης. Η θεραπεία με μεροπενέμη παρουσία και απουσία β-IDACYD ξεκίνησε 2 ώρες μετά την έγχυση του βακτηριακού εναιωρήματος και διήρκεσε για 24 ώρες. Χρησιμοποιήθηκαν δύο δοσολογικά σχήματα: (A) 30 mg/kg μεροπενέμης (n=10), (B) 30 mg/kg μεροπενέμης με 20 mg/kg β-IDACYD (n=10) και (C) μια ομάδα ελέγχου που λάμβανε ενδοπεριτοναϊκά φυσιολογικό ορό (n=10) [συνολικές ημερήσιες δόσεις: 360 mg/kg μεροπενέμης (A) και 360 mg/kg μεροπενέμης με 240 mg/kg β-IDACYD (B)]. Δείγματα αίματος ελήφθησαν 0, 6, 24 ώρες και 7 ημέρες μετά την χορήγηση της πρώτης δόσης αντιβιοτικού (πέντε μολυσμένα ζώα ανά χρονικό σημείο), αραιώθηκαν διαδοχικά σε φυσιολογικό ορό ( $10^{-1}$  έως  $10^{-9}$ ) και καλλιεργήθηκαν σε MH άγαρ για 16 ώρες στους  $37^\circ\text{C}$  για τον προσδιορισμό των ζώντων αποικιών. Όλα τα ποντίκια υποβλήθηκαν σε ευθανασία 7

ημέρες μετά τη μόλυνση και συλλέχθηκαν ο σπλήνας και το ήπαρ. Τα όργανα τοποθετήθηκαν σε 1 mL φυσιολογικού ορού σε πάγο και κατόπιν ομογενοποιήθηκαν. Τα ομογενοποιημένα όργανα αραιώθηκαν διαδοχικά σε φυσιολογικό ορό ( $10^{-1}$  έως  $10^{-9}$ ) και τα ζώντα κύτταρα καταμετρήθηκαν μετά από καλλιέργεια σε MH άγαρ.

#### Time Points (t.p.)

	-2	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	160	
<b>ΛΟΙΜΩΞΗ (20)</b>						<b>ΘΕΡΑΠΕΙΑ</b> σε όλα τα t.p. / σε όλες τις ομάδες πλην της A, με τα αντίστοιχα σχήματα <b>ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ</b>										
	<b>ΑΙΜΟΛΗΨΙΑ A<sub>0</sub> (5 ποντίκια)</b>				<b>ΑΙΜΟΛΗΨΙΑ A<sub>6</sub> (5 ποντίκια)</b> <b>B<sub>6</sub> (5 ποντίκια)</b> <b>C<sub>6</sub> (5 ποντίκια)</b>										<b>ΑΙΜΟΛΗΨΙΑ A<sub>24</sub> (5 ποντίκια)</b> <b>B<sub>24</sub> (5 ποντίκια)</b> <b>C<sub>24</sub> (5 ποντίκια)</b>	<b>ΑΙΜΟΛΗΨΙΑ ΚΑΙ ΘΑΝΑΤΩΣΗ ΕΝΑΠΟΜΕΙΝΟΝΤΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ</b>

Σχήμα	Θεραπεία	Ποντίκια	Ώρες θανάτωσης (από αρχή θεραπείας)
A	Χωρίς θεραπεία (control)	7	-
B	Ιμιπενέμη 30mg/kg ανά 2 h	10	160
C	Ιμιπενέμη + β-IDACYD 30mg/kg + 20mg/kg ανά 2 h	10	160

**Πίνακας 11:** Περιγραφή των θεραπευτικών σχημάτων και τον χρονικών σημείων θεραπείας και θανάτωσης πειραματόζων.

#### Προσδιορισμός βιοχημικών παραμέτρων

Για τη διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης του β-IDACYD με ιόντα απαραίτητα για τη διατήρηση της ομοιόστασης, το πλάσμα του αίματος απομονώθηκε με φυγοκέντρηση (3.000 rpm, 5 λεπτά) από όλα τα δείγματα που συλλέχθηκαν. Τα επίπεδα τεσσάρων ιόντων (ασβέστιο [Ca<sup>2+</sup>], μαγνήσιο [Mg<sup>2+</sup>], σίδηρος [Fe<sup>2+</sup>] και φωσφορικά ) καθώς και τα επίπεδα κρεατινίνης και ουρίας προσδιορίστηκαν με τη χρήση του αναλυτή Olympus AU 600.

#### Πειράματα 2 και 3 (Θεραπεία μίας δόσης)

Ουδετεροπενικά θηλυκά CD-1 ποντίκια ηλικίας 7-8 εβδομάδων και βάρους 29-32 gr μολύνθηκαν ενδοπεριτοναϊκά με θανατηφόρα δόση ( $10^7$  CFU) του κλινικού στελέχους *K. pneumoniae* LA26 που παράγει NDM όπως περιεγράφηκε προηγουμένως. Η



θεραπεία με μεροπενέμη παρουσία ή απουσία β-IDACYD χορηγήθηκε 2 ώρες μετά τη μόλυνση σε δοσολογικά σχήματα μίας δόσης: (A) 30 mg/kg μεροπενέμης (n=10) ή (B) 30 mg/kg μεροπενέμης με 20 mg/kg β-IDACYD (n=10) ή (C) 30 mg/kg μεροπενέμης με 120 mg/kg β-IDACYD (n=10) ή (D) διάλυμα φυσιολογικού ορού (n=10). Δείγματα αίματος ελήφθησαν 0, 6, 24 ώρες και 3 ημέρες μετά την χορήγηση της πρώτης δόσης του αντιβιοτικού (πέντε ζώα για κάθε χρονικό σημείο) και αραιώθηκαν σειριακά σε φυσιολογικό ορό ( $10^{-1}$  έως  $10^{-9}$  CFU/ml). Οι αραιώσεις καλλιεργήθηκαν σε ΜΗ άγαρ και επωάστηκαν για 16 ώρες στους 37 °C για τον προσδιορισμό του αριθμού των ζώντων βακτηριακών κυττάρων. Όλα τα ποντίκια υποβλήθηκαν σε ευθανασία 3 ημέρες μετά τη μόλυνση και συλλέχθηκαν η σπλήνα και το συκώτι. Τα όργανα τοποθετήθηκαν σε 1 mL φυσιολογικού ορού σε πάγο και ομογενοποιήθηκαν. Τα ομογενοποιημένα όργανων αραιώθηκαν σειριακά σε φυσιολογικό ορό ( $10^{-1}$  έως  $10^{-9}$  CFU/ml) και καλλιεργήθηκαν σε ΜΗ άγαρ για την καταμέτρηση των ζώντων βακτηριακών κυττάρων.

Σε παράλληλο πείραμα, μολυσμένα, ουδετεροπενικά CD-1 ποντίκια έλαβαν μία δόση (A) μεροπενέμης (10 mg/kg) (n=10) ή (B) μεροπενέμης (10 mg/kg) και β-IDACYD (20 mg/kg) (n=10) ή (C) μεροπενέμης (10 mg/kg) και β-IDACYD (120 mg/kg) (n=10) ή (D) φυσιολογικό ορό (n=10). Δείγματα αίματος απομονώθηκαν 0, 6 και 24 ώρες μετά την χορήγηση του αντιβιοτικού (4 μολυσμένα ζώα για κάθε χρονικό σημείο), αραιώθηκαν σειριακά σε φυσιολογικό ορό ( $10^{-1}$  έως  $10^{-9}$  CFU/ml) και καλλιεργήθηκαν σε ΜΗ άγαρ για την καταμέτρηση των ζώντων κυττάρων *K. pneumoniae*.

### **Δείκτες λοίμωξης**

Το πλάσμα που απομονώθηκε (3000 rpm, 5 λεπτά) από τα δείγματα αίματος που συλλέχθηκαν από τα τρία in-vivo πειράματα μοντέλου σήψης χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των επιπέδων κυτοκινών, λεμφοκινών και προ-φλεγμονωδών δεικτών. Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-17A, IL-17E, IL-17F, IL-1B, IL-4, IL-6, MIP-3A, TNF- $\alpha$  και TNF- $\beta$  πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το MILLIPLEX MAP Mouse TH17 Magnetic Bead Panel kit (Billerica MA), ενώ για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων των ACTH, FGF-23, ινσουλίνης, λεπτίνης, OPG και SOST χρησιμοποιήθηκε το MILLIPLEX MAP Mouse Bone Magnetic Bead Panel (Billerica, MA). Τέλος, τα επίπεδα CRP και SAP προσδιορίστηκαν με τη χρήση του kit MILLIPLEX

MAP Mouse Acute Phase Magnetic Bead Panel (Billerica, MA) σε σύστημα Luminex 200 ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Η τεχνική MILLIPLEX® MAP βασίζεται στην τεχνολογία Luminex® xMAP® που επιτρέπει την διεξαγωγή ποικιλίας βιολογικών δοκιμασιών που περιλαμβάνουν ανοσοπροσδιορισμούς επί της επιφάνειας φθορίζοντων μαγνητικών σφαιριδίων γνωστών ως μικροσφαίρες MagPlex™-C. Η Luminex® χρησιμοποιεί τεχνικές για να κωδικοποιήσει χρωματικά τις μικροσφαίρες με δυο φθοριοχρώματα. Μέσω αλλαγής των συγκεντρώσεων των δύο αυτών φθοριοχρωμάτων, 100 διαφορετικά σετ μικροσφαιρών μπορούν να δημιουργηθούν το καθένα επικαλυμμένο με ένα συγκεκριμένο αντίσωμα απομόνωσης. Μετά την πρόσληψη ενός αναλύτη από το δείγμα στο σφαιρίδιο, εισάγεται ένα βιοτινυλιωμένο αντίσωμα ανίχνευσης. Στην συνέχεια, το μείγμα αντίδρασης επωάζεται με ένα σύζευγμα στρεπταβιδίνης-PE, που είναι το μόριο αναφοράς, για να ολοκληρωθεί η αντίδραση στην επιφάνεια κάθε μικροσφαίρας. Οι μικροσφύρες στην συνέχεια, περνάν γρήγορα μέσα από μια δέσμη λέιζερ που διεγείρει τα εσωτερικά φθοριοχρώματα. Ένα δεύτερο λέιζερ διεγείρει το φθοριόχρωμα (PE) στο μόριο αναφοράς. Τελικώς, ειδικοί επεξεργαστές ψηφιακού σήματος υψηλής ταχύτητας αναγνωρίζουν κάθε μεμονωμένη μικροσφαίρα και ποσοτικοποιούν το αποτέλεσμα της βιολογικής δοκιμής βάσει των φθορίζοντων σημάτων αναφοράς. Η ικανότητα προσθήκης πολλαπλών συζευγμένων σφαιριδίων σε κάθε δείγμα έχει ως αποτέλεσμα την ικανότητα πολλαπλής ανάλυσης ανά δείγμα. Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων IFN-g, IL-10, IL-17A, IL-17E, IL-17F, IL-1B, IL-4, IL-6, MIP-3A, TNF-a και TNF-b πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το MILLIPLEX MAP Mouse TH17 Magnetic Bead Panel kit (Billerica, MA). Τα CD4+T-βοηθητικά κύτταρα αποτελούν κύρια συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος και συγκεκριμένα της προσαρμοστικής ανοσίας. Με βάση το προφίλ των εκκρινόμενων μεταγραφικών παραγόντων και κυτοκινών μπορούν να διαχωριστούν σε υποκατηγορίες (Th1, Th2, Th17 και Treg). Τα κύτταρα Th1 επάγονται από την παρουσία της Ιντερλευκίνης (IL)-12 και ενάγονται από την Ιντερφερόνη-γ (IFNγ), ενώ εκκρίνουν περεταίρω IFNγ για την ενεργοποίηση των μακροφάγων. Τα κύτταρα Th2 επάγονται από την IL-4 και παράγουν κυρίως IL-4, IL-5, IL-13, IL-25/IL17E και IL-31 ενώ παίζουν σημαντικό ρόλο στις αλλεργικές αντιδράσεις. Τα κύτταρα Treg επάγονται από τον TGFβ, παράγουν την αντιφλεγμονώδη κυτοκίνη IL-10 καθώς και τον παράγοντα TGFβ ελέγχοντας έτσι την

απόκριση των Τ λεμφοκυττάρων, αποτρέποντας αυτοάνοσες αντιδράσεις. Τα κύτταρα Th17 αποτελούν ένα πρόσφατα ανακαλυφθέν υπότυπο, που χαρακτηρίζεται για την παραγωγή IL-17 ενώ επάγεται από TGFβ, IL-6 και IL-21 σε ποντίκια και TGFβ σε συνδυασμό με τις IL-23 και IL-1β στους ανθρώπους. Ενεργοποιημένα κύτταρα Th17 εκκρίνουν IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-21, IL-22 και TNFα που προάγουν φλεγμονώδη αντίδραση στους ιστούς. Επίσης τα Th17 κύτταρα σχετίζονται με την απομάκρυνση εξωκυττάρων βακτηρίων και μυκήτων. Βρίσκονται σε περίσσια στο εντερικό επιθήλιο και λειτουργούν ως φράγμα στην εισβολή παθογόνων μικροοργανισμών. Αυξημένες ποσότητες Th17 κυττάρων έχουν σχετιστεί με αυτοάνοσα νοσήματα όπως η ψωρίαση, ο παιδικός διαβήτης, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η νόσος του Κρόν. Επιπλέον, τα Th17 κύτταρα εμφανίζουν συσχέτιση με την ανάπτυξη και μετάσταση διαφόρων τύπων καρκίνου, πιθανώς προάγοντας και αναστέλλοντας την ανάπτυξη όγκων.

Για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων των ACTH, FGF-23, ινσουλίνης, λεπτίνης, OPG και SOST χρησιμοποιήθηκε το kit MILLIPLEX MAP Mouse Bone Magnetic Bead Panel (Billerica, MA). Ο οστικός μεταβολισμός είναι μια δυναμική διαδικασία συνεχής εναπόθεσης και επαναρρόφησης οστού που ελέγχεται από οστεοβλάστες, οστεοκύτταρα και οστεοκλάστες. Ενώ οι οστεοβλάστες και τα οστεοκύτταρα είναι υπεύθυνα για την εναπόθεση (δημιουργία) οστού, οι οστεοκλάστες είναι υπεύθυνοι για την επαναρρόφηση του. Και οι δύο διαδικασίες είναι εξίσου σημαντικές για την διατήρηση της οστικής μορφολογίας και πυκνότητας καθώς επίσης και μια συνεχής παροχή ασβεστίου. Για να διατηρήσουν αυτή την μεταβολική ισορροπία τα κύτταρα εξαρτώνται από περίπλοκες σηματοδοτικές πορείες (signaling pathways) που περιλαμβάνουν ορμόνες και κυτοκίνες για τον έλεγχο των σωστών επιπέδων ανάπτυξης και διαφοροποίησης. Στις σηματοδοτικές αυτές πορείες σημαντικό ρόλο παίζουν η οστεοπροτεγερίνη (OPG), η σκληροστίνη (SOST), η ινσουλίνη, η λεπτίνη, η αδρενοκορτικοτροπική ορμόνη (ACTH) και οπαράγοντας ανάπτυξης ινοβλαστών (FGF-23). Η διαταραχή του μεταβολισμού των οστών έχει ως αποτέλεσμα ασθένειες όπως η οστεοπόρωση, η οστεοαρθρίτιδα, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η χρόνια νεφρική νόσος.

Τα επίπεδα CRP και SAP ποσοτικοποιήθηκαν με τη χρήση του kit MILLIPLEX MAP Mouse Acute Phase Magnetic Bead Panel (Billerica, MA). Οι πρωτεΐνες οξείας φάσης είναι εκείνες των οποίων οι συγκεντρώσεις αυξάνονται (θετικές πρωτεΐνες οξείας

φάσης) ή μειώνονται (αρνητικές πρωτεΐνες οξείας φάσης) όταν υπάρχει φλεγμονή. Αυτή η φλεγμονώδης αντίδραση ονομάζεται αντίδραση οξείας φάσης. Τα τελευταία χρόνια έχουν εντοπιστεί αρκετές νέες πρωτεΐνες οξείας φάσης και αρκετές από αυτές εκκρίνονται επίσης από τον λιπώδη ιστό. Η C-Reactive Protein (CRP) και η Serum Amyloid Protein/Pentraxin-2 (SAP) είναι τέτοιες πρωτεΐνες και αποτελούν καλούς δείκτες για την ύπαρξη φλεγμονώδους αντίδρασης.

### III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### i) Αντιμικροβιακή δράση κυκλοδεξτρινών και νανοσωματιδίων

##### *Νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs και MSPs/AgNPs)*

##### **Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός κλινικών στελεχών με την μέθοδο διάχυσης δίσκων σε άγαρ**

Ο φαινότυπος αντοχής και ευαισθησίας για μια συλλογή έξι κλινικών στελεχών προσδιορίστηκε σε μια σειρά 16 β-λακταμικών και 16 μη β-λακταμικών αντιβιοτικών. Τα στελέχη χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητα ή ανθεκτικά με βάση τις τελευταίες διαθέσιμες οδηγίες του EUCAST V.07 (2017). Το κλινικό στέλεχος *K. pneumoniae* LA26 ταυτοποιήθηκε ως ανθεκτικό στα αντιβιοτικά κεφταζιδίμη, μεροπενέμη, ιμιπενέμη, αμοξικιλίνη, κεφεπίμη, κεφοταξίμη, τικαρκιλλίνη, αμικασίνη, τομπραμυκίνη, γκενταμικίνη, νετιλμικίνη, ενώ το κλινικό στέλεχος *K. pneumoniae* TZAN-59 βρέθηκε να είναι ανθεκτικό στην τικαρκιλλίνη. Το στέλεχος LAR4892 *S. aureus* χαρακτηρίστηκε ανθεκτικό στην τετρακυκλίνη. Το στέλεχος *E. coli* 541 παρουσίασε ανθεκτικότητα ενάντια στις κεφταζιδίμη, ιμιπενέμη, αμοξικιλίνη με κλαβουλανικό, κεφεπίμη, κεφοταξίμη, τικαρκιλλίνη, πιπερακιλλίνη με ταζομπακτάμη, αμικασίνη και τομπραμυκίνη. Αμφότερα τα κλινικά στελέχη *A. baumannii* SLOV22 και SLOV5 θεωρήθηκαν ανθεκτικά σε αμικασίνη, τομπραμυκίνη, νετιλμικίνη, γκενταμικίνη και σιπροφλοξασίνη.

##### **Προσδιορισμός MIC και MBC**

Οι τιμές MIC και MBC των νανοσωματιδίων αργύρου παρουσιάζονται στον **Πίνακα 12**. Διαπιστώθηκε πειραματικά ότι 15μg/ml των AgNPs όσο και του συνδυασμού MSPs/AgNPs ανέστειλαν επιτυχώς την ανάπτυξη ευαίσθητων και ανθεκτικών κλινικών στελεχών *K. pneumoniae*, *A. baumannii* και *S. aureus*, ενώ τα 7,5 μg / ml του συνδυασμού MSPs/AgNPs ήταν επαρκή για να αναστείλουν την ανάπτυξη ενός ευαίσθητου και ενός ανθεκτικού στελέχους *E. coli*. Οι τιμές MBC των νανοσωματιδίων ήταν αντίστοιχες με τις τιμές MIC παρατήρηση που υποδηλώνει την απουσία μηχανισμών αντοχής προς αυτά.

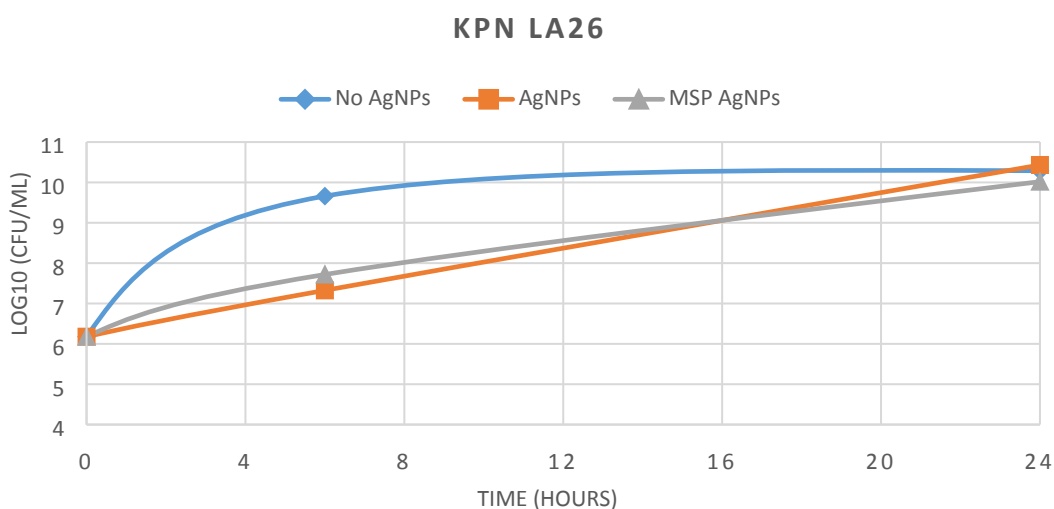
A) MSPs/AgNPs				
Βακτηριακό είδος	Κλινικό στέλεχος	Φαινότυπος (προσδιορισμός ευαισθησίας)	MICs (mg/L) σε 5X10 <sup>5</sup> CFU/mL	MBCs (mg/L) σε 5X10 <sup>5</sup> CFU/mL
<i>K. pneumoniae</i>	LA 26	Imp <sup>r</sup> , Mrp <sup>r</sup> , Amc <sup>r</sup> , Cip <sup>r</sup> , Net <sup>r</sup>	15	15
	TZAN 59	Imp <sup>s</sup> , Mrp <sup>s</sup> , Amc <sup>s</sup> , Cip <sup>s</sup> , Tic <sup>r</sup>	15	15
<i>A. baumannii</i>	SLOV 5	Imp <sup>s</sup> , Mrp <sup>s</sup> , Cip <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , Amk <sup>r</sup>	15	>15
	SLOV 22	Imp <sup>s</sup> , Mrp <sup>s</sup> Cip <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , Amk <sup>r</sup>	15	15
<i>E. coli</i>	EY-03	Imp <sup>s</sup> , Mrp <sup>s</sup> , Caz <sup>s</sup> , Amc <sup>s</sup> , Amk <sup>s</sup> , Cip <sup>s</sup>	7.5	7.5
	541	Imp <sup>r</sup> , Mrp <sup>s</sup> , Caz <sup>r</sup> , Amc <sup>r</sup> , Amk <sup>r</sup> , Cip <sup>s</sup>	7.5	15
<i>S. aureus</i>	111/1370	Amk <sup>s</sup> , Tet <sup>s</sup> , Oxa <sup>s</sup> , Cip <sup>s</sup>	15	15
	48/92	Amk <sup>s</sup> , Tet <sup>r</sup> , Oxa <sup>s</sup> , Cip <sup>s</sup>	15	15
B) AgNPs				
Βακτηριακό είδος	Κλινικό στέλεχος	Φαινότυπος (προσδιορισμός ευαισθησίας)	MICs (mg/L) σε 5X10 <sup>5</sup> CFU/mL	MBCs (mg/L) σε 5X10 <sup>5</sup> CFU/mL
<i>K. pneumoniae</i>	LA 26	Imp <sup>r</sup> , Mrp <sup>r</sup> , Amc <sup>r</sup> , Cip <sup>r</sup> , Net <sup>r</sup>	15	15
	TZAN 59	Imp <sup>s</sup> , Mrp <sup>s</sup> , Amc <sup>s</sup> , Cip <sup>s</sup> , Tic <sup>r</sup>	15	15
<i>A. baumannii</i>	SLOV 5	Imp <sup>s</sup> , Mrp <sup>s</sup> , Cip <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , Amk <sup>r</sup>	15	>15
	SLOV 22	Imp <sup>s</sup> , Mrp <sup>s</sup> Cip <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , Amk <sup>r</sup>	15	15
<i>E. coli</i>	EY-03	Imp <sup>s</sup> , Mrp <sup>s</sup> , Caz <sup>s</sup> , Amc <sup>s</sup> , Amk <sup>s</sup> , Cip <sup>s</sup>	15	>15
	541	Imp <sup>r</sup> , Mrp <sup>s</sup> , Caz <sup>r</sup> , Amc <sup>r</sup> , Amk <sup>r</sup> , Cip <sup>s</sup>	15	>15
<i>S. aureus</i>	111/1370	Amk <sup>s</sup> , Tet <sup>s</sup> , Oxa <sup>s</sup> , Cip <sup>s</sup>	15	15
	48/92	Amk <sup>s</sup> , Tet <sup>r</sup> , Oxa <sup>s</sup> , Cip <sup>s</sup>	15	15

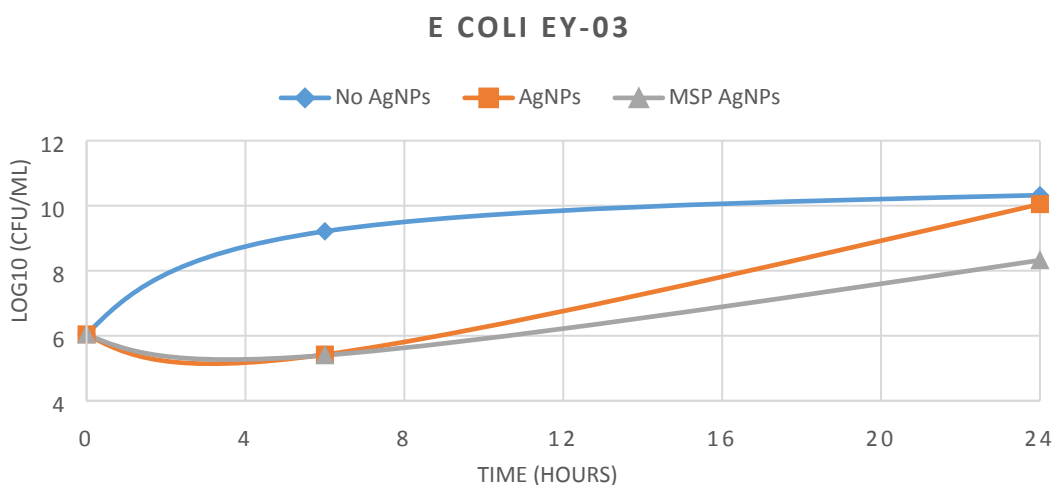
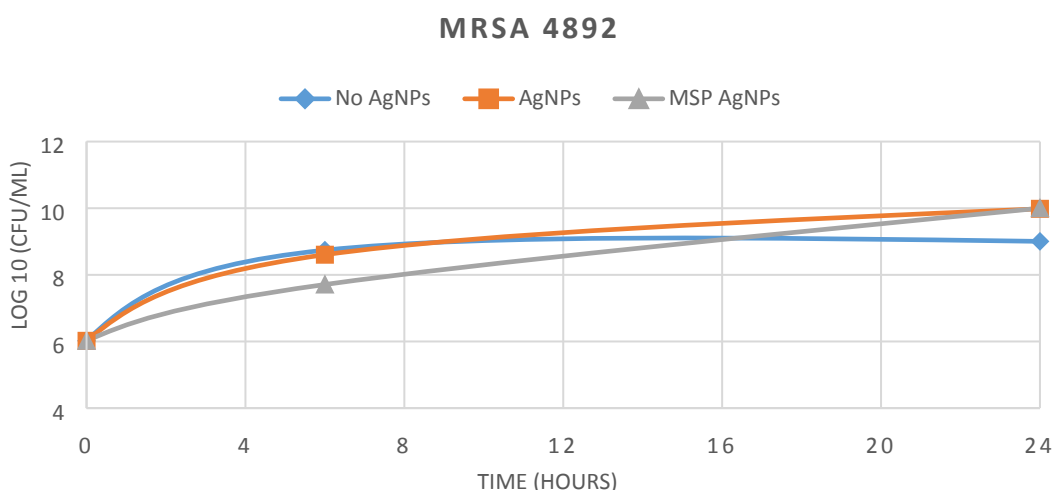
**Πίνακας 12:** Τα MIC και MBC των (A) MSPs/AgNPs και (B) των AgNPs που δοκιμάστηκαν έναντι ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus*. Tic, Τικαρκυλλίνη; Amc, Αμοξικυλλίνη/ κλαβουλανικό οξύ; Oxa, Οξακυλλίνη; Caz, Κεφταζιδίμη; Imp, Ιμιπενέμη; Mrp, Μεροπενέμη; Cip, Σιπροφλοξακίνη; Net, Νετιλιμικίνη; Gm, Γκενταμικίνη; Amk, Αμικασίνη; Tet, Τετρακυκλίνη. Το σύμβολο r συμβολίζει ανθεκτικότητα ενώ το s ευαισθησία. Η ευαισθησία έναντι των αντιβιοτικών προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο διάχυσης δίσκων Kirby-Bauer. Τα στελέχη χαρακτηρίστηκαν με βάση τα κλινικά όρια ευαισθησίας (clinical breakpoints) της EUCAST v.07 (2017).

### Καμπύλες θανάτωσης παθογόνων βακτηρίων σε συνάρτηση με το χρόνο (time-kill assays)

Στο διάγραμμα (Εικόνα 14) παρουσιάζονται οι καμπύλες θανάτωσης βακτηριακού εναιωρήματος πυκνότητας ( $10^5$ - $10^6$  CFU/mL). Τα AgNPs σε συγκέντρωση ίση με την τιμή MIC (15  $\mu$ g/ml) έδειξαν αντιβακτηριακή δράση έναντι δύο εκ των κλινικά απομονωμένων στελεχών (*K. pneumoniae* LA-26, *E. coli* EY-03) προκαλώντας μείωση του βακτηριακού φορτίου κατά 3,8 και 2,3  $\log_{10}$  αντίστοιχα μετά από επώαση 6 ωρών. Αντίστοιχα, τα MSPs/AgNPs σε συγκέντρωση ίση με την τιμή MIC (15  $\mu$ g/ml) έδειξαν αντιβακτηριακή δράση έναντι δύο εκ των κλινικά απομονωμένων στελεχών (*K. pneumoniae* LA-26, *E. coli* EY-03) προκαλώντας μείωση του βακτηριακού φορτίου κατά 3,9 και 1,9  $\log_{10}$  μετά από επώαση 6 ωρών. Σε όλες τις περιπτώσεις, η μέτρηση αποικιών παρουσία του AgNPs και των MSPs/AgNPs στις 24 ώρες δεν διέφερε σημαντικά από τις μετρήσεις των αντίστοιχων απουσία των νανοσωματιδίων. Συμπερασματικά από τις καμπύλες θανάτωσης δεν προκύπτουν ενδείξεις ότι τα AgNPs και τα MSPs/AgNPs μπορούν να αποτρέψουν αποτελεσματικά τον πολλαπλασιασμό των τριών κλινικών στελεχών.

A



**B****C**

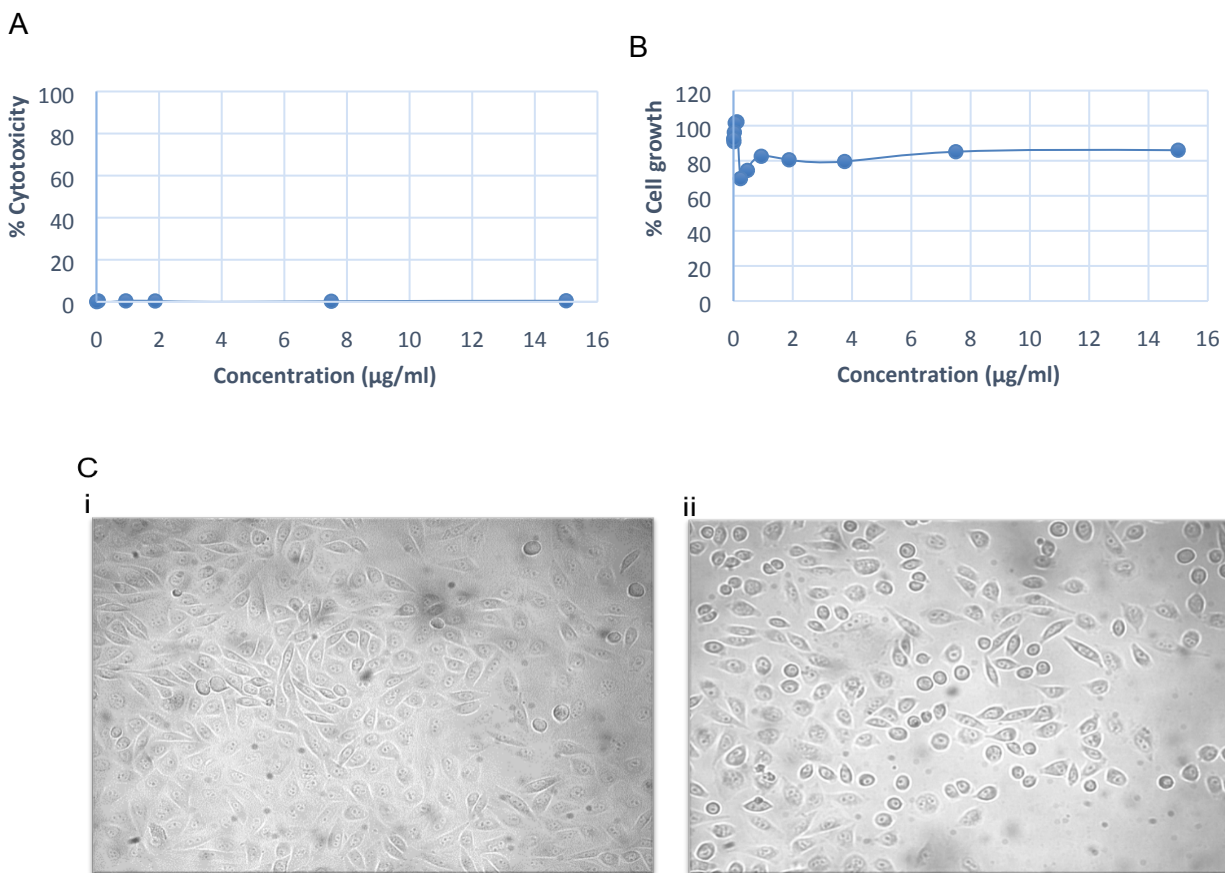
**Εικόνα 14:** Προσδιορισμός καμπύλων θανάτωσης παρουσία ή απουσία των AgNPs ή των MSPs/AgNPs σε συγκέντρωση MIC (15 µg/ml) έναντι του κλινικού στελέχους *K. pneumoniae* LA 26 (A), του κλινικού απομονωμένου στελέχους *Escherichia coli* EY-03 (B) και του κλινικού MRSA 4892 (C). Καλλιέργειες ελεύθερες αντιβιοτικού συμπεριλήφθηκαν σε κάθε ομάδα πειραμάτων ως μάρτυρες.

### Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας

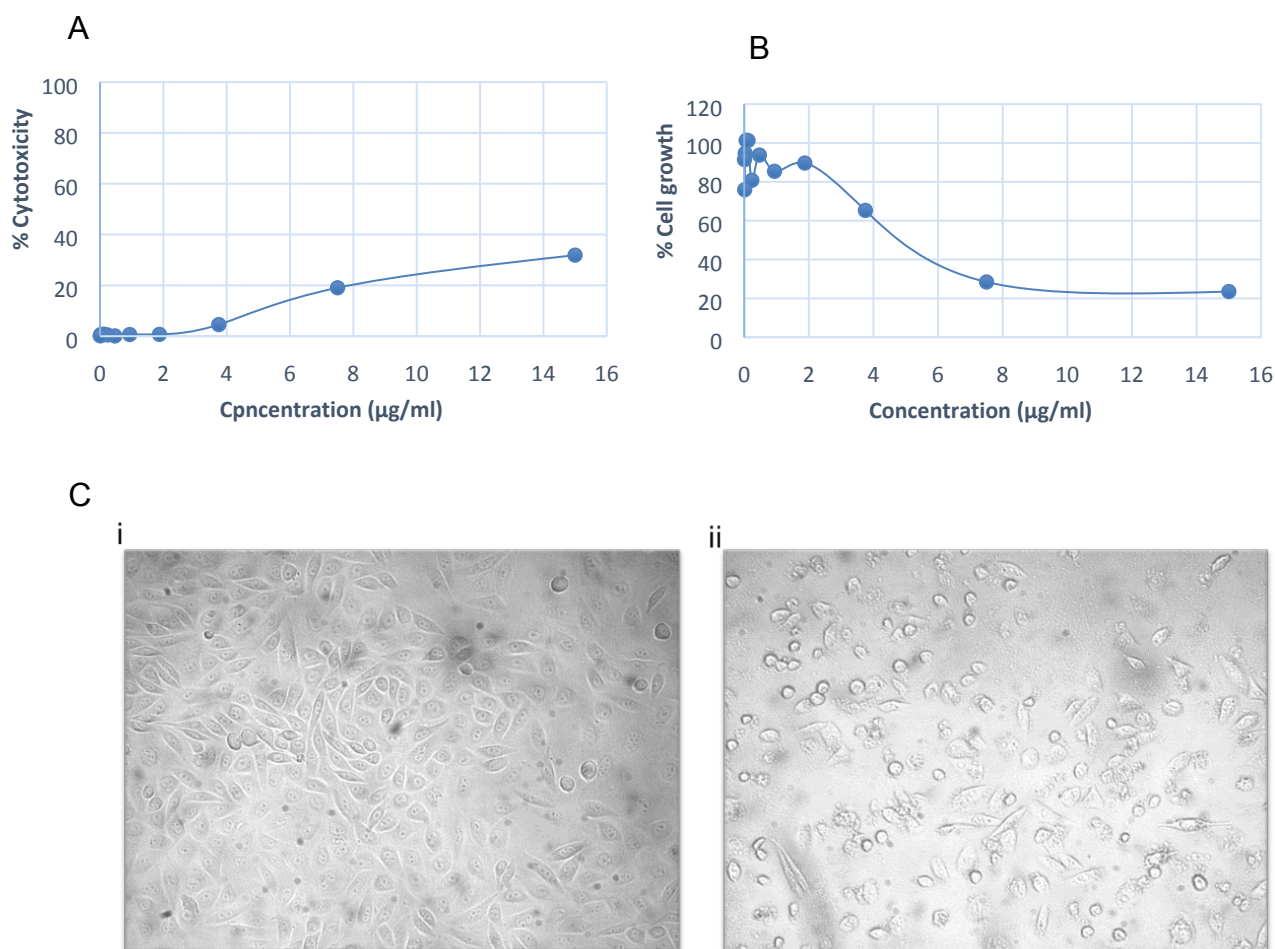
Οι πιθανές κυτταροτοξικές ιδιότητες των νανοσωματίδιων αργύρου και του συνδυασμού MSPs/AgNPs προσδιορίστηκαν *in vitro* με την χρήση του κιτ LDH και τη χρήση της ανιχνεύσεως μη ραδιενεργού κυτοτοξικότητας CytoTox96 σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 0,07 έως 15 µg/ml όπως περιγράφεται παραπάνω. Τα νανοσωματίδια AgNPs εμφάνισαν χαμηλή κυτταροτοξικότητα με μέγιστο στο  $0,5 \pm 0,0045\%$  κυτταρικού θανάτου για τη συγκέντρωση των 15 µg/ml. Αντίθετα, στη δοκιμασία πολλαπλασιασμού κυτταρικού κυτταρικού διαλύματος



CellTiter 96 , τα νανοσωματίδια εμφάνισαν χαμηλή αναστολή κυτταρικής ανάπτυξης για τις ίδιες συγκεντρώσεις όπως παραπάνω (0,07-15 $\mu\text{g/ml}$ ) (**Εικόνα 15**). Ενώ, τα νανοσωματίδια MSPs/AgNPs εμφάνισαν κυτταροτοξικότητα με μέγιστο στο  $37 \pm 0,2\%$  κυτταρικού θανάτου για τη συγκέντρωση των 15  $\mu\text{g/ml}$ . Ενώ, στη δοκιμασία πολλαπλασιασμού κυτταρικού διαλύματος CellTiter 96, τα νανοσωματίδια MSPs/AgNPs εμφάνισαν υψηλή αναστολή κυτταρικής ανάπτυξη έως και 79% για τις ίδιες συγκεντρώσεις όπως παραπάνω (0,07-15  $\mu\text{g/ml}$ ) (**Εικόνα 16**).



**Εικόνα 15:** CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (A) και CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (B) για κυτταρική σειρά ινοβλαστών L929 που υποβλήθηκαν σε αγωγή με διαφορετική συγκέντρωση νανοσωματιδίων AgNPs για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος δύο επαναλήψεων. (C) Οι ινοβλάστες L929 (i) χωρίς θεραπεία και (ii) μετά από 24 ώρες επώασης με 15  $\mu\text{g} / \text{mL}$  τα νανοσωματίδια AgNPs. Οι εικόνες ελήφθησαν με μικροσκόπιο Leica DN IL, εξοπλισμένο με κάμερα Leica DC 100.



**Εικόνα 16:** CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (A) και CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (B) για κυτταρική σειρά ινοβλαστών L929 που υποβλήθηκαν σε αγωγή με διαφορετική συγκέντρωση νανοσωματιδίων MSPs/AgNPs για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος δύο επαναλήψεων. (C) Οι ινοβλάστες L929 (i) χωρίς θεραπεία και (ii) μετά από 24 ώρες επώασης με 15 µg/mL τα νανοσωματίδια MSPs/AgNPs. Οι εικόνες ελήφθησαν με μικροσκόπιο Leica DN IL, εξοπλισμένο με κάμερα Leica DC 100.

### **Κυκλοδεξτρίνες (Cyclolab)**

#### **Προσδιορισμός MIC**

Όλες οι κυκλοδεξτρίνες παραγωγής της CycloLab ελέγχθηκαν για τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες έναντι κλινικών στελεχών *A. baumannii*, *K. pneumoniae* και *S. aureus*. Σε όλες τις περιπτώσεις οι τιμές MIC των κυκλοδεξτρινών ήταν >1.000 µg/mL που ήταν η ανώτατη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε.

Οι καρβοξυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες CMGCD, GDPSI, GEGCD, CEAD, CMGCD, CMACD που δοκιμάστηκαν σε συγκέντρωση 100µM ως αναστολείς MBL, δεν επανευαισθητοποίησαν στην καρβαπενέμη ιμιπενέμη κλινικά στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν MBL.

Κλινικό στέλεχος	Μηχανισμός αντοχής	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	Ιμιπενέμη + CEGCD
		Ιμιπενέμης	Ιμιπενέμης + CMGCD	Ιμιπενέμης	Ιμιπενέμης + GCDPSI	Ιμιπενέμης	
KPN LA34	VIM+CMY	16 µg/ml	16 µg/ml	32 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	16 µg/ml
KPN LA26	NDM	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml
KPN 6/100	VIM	2 µg/ml	2 µg/ml	2 µg/ml	16 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml
KPN SEC 4	VIM	8 µg/ml	8 µg/ml	8 µg/ml	8 µg/ml	8 µg/ml	8 µg/ml

Κλινικό στέλεχος	Μηχανισμός αντοχής	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	Ιμιπενέμη + CMACD
		Ιμιπενέμης	Ιμιπενέμης + CEACD	Ιμιπενέμης	Ιμιπενέμης + CMGCD	Ιμιπενέμης	
KPN LA34	VIM+CMY	16 µg/ml	16 µg/ml	16 µg/ml	16 µg/ml	32 µg/ml	32 µg/ml
KPN LA26	NDM	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml	2 µg/ml
KPN 6/100	VIM	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml	0.5 µg/ml
KPN SEC4	VIM	8 µg/ml	8 µg/ml	8 µg/ml	8 µg/ml	8 µg/ml	8 µg/ml

Κλινικό στέλεχος	Μηχανισμός αντοχής	MIC	MIC	MIC	MIC
		Ιμιπενέμης	Ιμιπενέμης + CMBCD	Ιμιπενέμης	Ιμιπενέμης + CEBCD
KPN LA34	VIM+CMY	16 µg/ml	16 µg/ml	32 µg/ml	32 µg/ml
KPN LA26	NDM	2 µg/ml	2 µg/ml	2 µg/ml	2 µg/ml
KPN 6/100	VIM	2 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml
KPN SEC4	VIM	8 µg/ml	8 µg/ml	8 µg/ml	8 µg/ml

**Πίνακας 13:** Αποτελέσματα MIC του αντιβιοτικού ιμιπενέμη παρουσία και απουσία των κυκλοδεξτρινών CMGCD, GDPSI, GEGCD, CEAD, CMGCD, CMACD.

Οι κυκλοδεξτρίνες επταπλών κατιονικών πλευρικών ομάδων MABCD, HAACD, RAMEB, TRIMEA, TRIMEB, HABCD, DIMEB που δοκιμάστηκαν σε συγκέντρωση 100μM ως αναστολείς αντλιών εκροής, δεν επανευαισθητοποίησαν κλινικά στελέχη *A. baumannii* που εκφράζουν συστήματα αντλιών εκροής στην τετρακυκλίνη.

Κλινικό στέλεχος	MIC Τετρα κυκλίνης	MIC Τετρακυ κλίνης + MABCD	MIC Τετρα κυκλίνης	MIC Τετρα κυκλίνης + HAACD	MIC Τετρα κυκλίνης	MIC Τετρα κυκλίνης + RAMEB	MIC Τετρα κυκλίνης	MIC Τετρα κυκλίνης + TRIMEA
<i>A. baumannii</i> SLOV40	4 μg/ml	4 μg/ml	8 μg/ml	4 μg/ml	4 μg/ml	2 μg/ml	8 μg/ml	2 μg/ml
<i>A. baumannii</i> SLOV22	8 μg/ml	8 μg/ml	8 μg/ml	8 μg/ml	8 μg/ml	8 μg/ml	8 μg/ml	8 μg/ml
<i>A. baumannii</i> LAR 14E	4 μg/ml	4 μg/ml	4 μg/ml	4 μg/ml	4 μg/ml	4 μg/ml	4 μg/ml	4 μg/ml

Κλινικό στέλεχος	MIC Τετρα κυκλίνης	MIC Τετρα κυκλίνης + TRIMEB	MIC Τετρα κυκλίνης	MIC Τετρα κυκλίνης + HABCD	MIC Τετρα κυκλίνης	MIC Τετρα κυκλίνης + DIMEB
<i>A. baumannii</i> SLOV40	4 μg/ml	2 μg/ml	4 μg/ml	4 μg/ml	4 μg/ml	2 μg/ml
<i>A. baumannii</i> SLOV22	4 μg/ml	4 μg/ml	8 μg/ml	8 μg/ml	8 μg/ml	8 μg/ml
<i>A. baumannii</i> LAR 14E	4 μg/ml	4 μg/ml	4 μg/ml	4 μg/ml	4 μg/ml	4 μg/ml

**Πίνακας 14:** Αποτελέσματα MIC του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη παρουσία και απουσία των κυκλοδεξτρινών MABCD, HAACD, RAMEB, TRIMEA, TRIMEB, HABCD, DIMEB.

## ii) Αντιμικροβιακή δράση συμπλόκων κυκλοδεξτρινών με β-λακταμικά

### Κυκλοδεξτρίνη γ-Cys

#### Προσδιορισμός της προστατευτικής δράσης της γ-Cys για πενικιλίνες σε πειράματα προσδιορισμού MIC

Οι τιμές MIC των αντιβιοτικών αμοξυκιλλίνη, μεθυκυλλίνη και οξακυλλίνη παρουσία και απουσία των κυκλοδεξτρινών γ-Cys παρουσιάζονται στον Πίνακα 15. Η κυκλοδεξτρίνη γ-Cys χρησιμοποιήθηκε σε αναλογία πενικιλίνη:γ-Cys, 1:4. Η κυκλοδεξτρίνη γ-Cys δεν μείωσε σημαντικά το MIC των τριών αντιβιοτικών για κανένα από τα κλινικά στελέχη που δοκιμάστηκαν.

Στέλεχος	Χαρακτηρισμός	MIC Αμοξυκιλλίνης (μg/mL)		MIC Μεθυκυλλίνης (μg/mL)		MIC Οξακυλλίνης (μg/mL)	
		-	Amx/γ-Cys	-	Amx/γ-Cys	-	Amx/γ-Cys
4892	MRSA	32	16/64	16	16/64	64	32/128
4888	MRSA	64	32/128	8	8/32	4	4/16
4898	MRSA	64	32/128	8	8/32	4	4/16
94/1236	MRSA	64	64/256	256	128/512	256	256/1024
64/394	MRSA	256	128/512	256	128/512	256	128/512
11/1370	MSSA	2	2/8	2	2/8	1	1/4

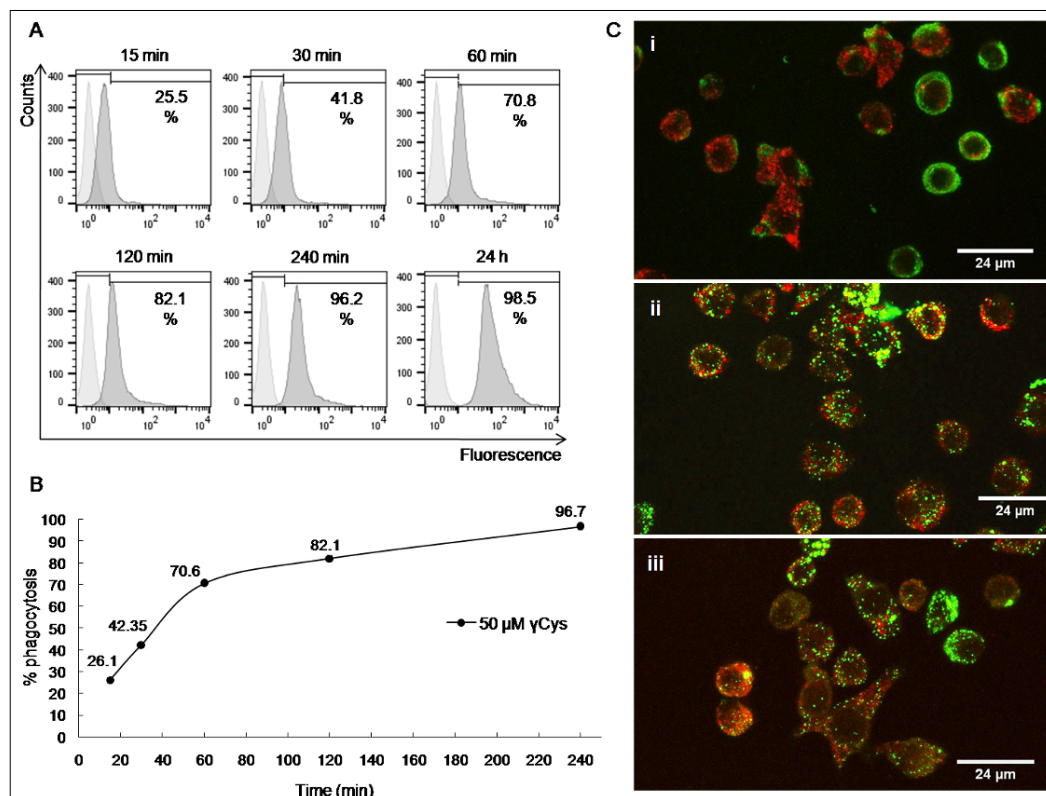
Πίνακας 15: Αποτελέσματα MIC των αντιβιοτικών αμοξυκιλλίνη, μεθυκυλλίνη και οξακυλλίνη παρουσία και απουσία της κυκλοδεξτρίνης γ-Cys.

#### Προσδιορισμός της προστατευτικής δράσης της γ-Cys σε πειράματα υδρόλυσης της οξακιλλίνης

Η χημικά αποδεδειγμένα εγκόλπωση της οξακιλλίνης στην κοιλότητα της γ-Cys-CD εξετάστηκε σε *in-vitro* πείραμα για την πιθανότητα προστασίας της από τον υδρολυτικό μηχανισμό της λακταμάσης OXA-1. Η υπόθεση εξετάστηκε μετρώντας τις αλλαγές στην απορρόφηση (OD) στα 260 nm για διαφορετικές συγκεντρώσεις οξακιλλίνης παρουσία 20 μg απομονωμένης OXA-1. Σε συνδυασμό συγκεντρώσεων οξακιλλίνης:γ-Cys-CD 50μM:200μM η ταχύτητα υδρόλυσης ( $V_{max}$ ) σχετικής με την πενικιλίνη-G μειώθηκε από 300 nmol/min σε 18,64 nmol/min συγκρινόμενη με 5μM οξακιλλίνης. Σε αναλογία 100μM οξακιλλίνης:400 μM γ-Cys-CD η μείωση στο  $V_{max}$  της υδρόλυσης ήταν 6,5 φορές σε σχέση με την υδρόλυση που παρατηρήθηκε χρησιμοποιώντας 100μM οξακιλλίνης.

### Εγκόλπωση της $\gamma$ -Cys από μακροφάγα

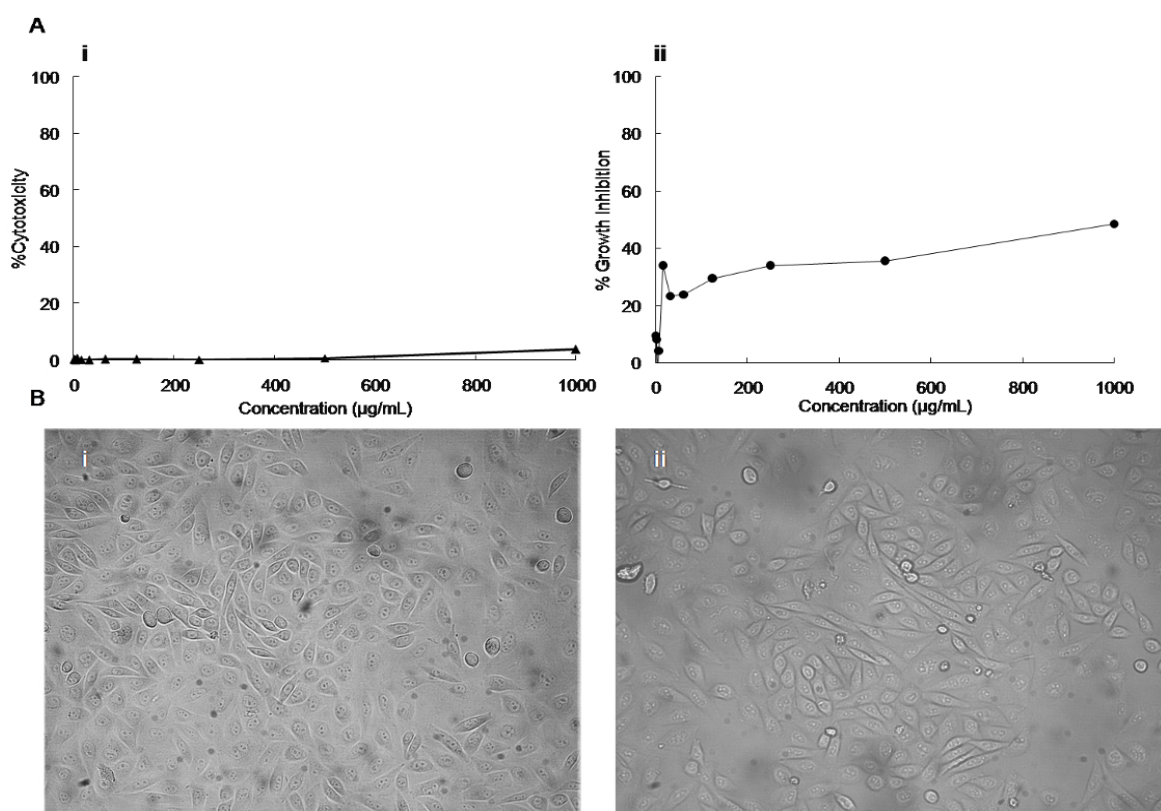
Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής (FACS) έδειξε ότι η φθοροσημασμένη FITC- $\gamma$ -Cys εγκολπώνεται ταχέως από μακροφάγα με τρόπο χρονικά εξαρτημένο. Η ανάλυση του ιστογράμματος έδειξε μια σαφή και χρονικά εξαρτημένη αύξηση του μέσου όρου του πληθυσμού (**Εικόνα 17-A**). Πάνω από το 25% των μακροφάγων είχε εσωτερικεύσει ποσότητα  $\gamma$ -Cys μετά από επώαση 15 λεπτών. Το ποσοστό αυτό αυξήθηκε σταθερά φτάνοντας έναν μέσο όρο 99,8% μετά από 24 ώρες (**Εικόνα 17-B**). Αυτές οι παρατηρήσεις επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω από την χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας (confocal laser microscopy). Η ανάλυση έδειξε μερική περίκλιση των φθορισμένων νανοσωματιδίων FITC- $\gamma$ -Cys σε ενδοκυτταρικά όξινα οργανίδια όπως τα λυσοσώματα που κυμαίνονταν από 11,6%, 37,0% και 19,9% για χρόνους επώασης 1 ώρας, 2ωρών και 4ωρών, αντιστοίχως (**Εικόνα 17-C**).



**Εικόνα 17:** (A) Το ιστογράμμα παρουσιάζει την πρόσληψη 50  $\mu$ M φθορισμένης FITC- $\gamma$ -Cys από την μακροφαγική σειρά ποντικού J774A.1 (σκούρο γκρι) σε σύγκριση με κύτταρα που δεν υποβλήθηκαν σε αγωγή (ανοικτό γκρι) σε διάφορα χρονικά σημεία έκθεσης (15, 30, 60, 240 λεπτά και 24 ώρες). (B) Πρόσληψη 50  $\mu$ M FITC- $\gamma$ -Cys από τα μακροφάγα J774A.1 σε διαφορετικά χρονικά σημεία. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων. (C) Αντιπροσωπευτικές εικόνες μικροσκοπίας φθορισμού που δείχνουν την πρόσληψη 50  $\mu$ M FITC- $\gamma$ -Cys (πράσινο) από την μακροφαγική σειρά J774A.1 σε χρονικά σημεία επώασης: 30 λεπτών (i), 120 λεπτών (ii), και 240 λεπτών (iii). Τα λυσοσώματα επισημάνθηκαν με LysoTracker Red. Οι εικόνες αντιπροσωπεύουν τις μέγιστες προβολές των οπτικών τμημάτων όπως αυτές ελήφθησαν στο συνεστιακό μικροσκόπιο. Μπάρα κλίμακας = 24  $\mu$ m.

### ***In-vitro* κυτταροτοξικότητα της $\gamma$ -Cys**

Για τον προσδιορισμό του τοξικολογικού προφίλ της  $\gamma$ -Cys κυκλοδεξτρίνης διεξήχθησαν δύο δοκιμές κυτταροτοξικότητας. Το  $\gamma$ -Cys παρουσίασε χαμηλή κυτταροτοξικότητα όταν αυτή προσδιορίστηκε με βάση την απελευθέρωση της LDH με την μέγιστη τιμή κυτταρικού θανάτου να προσδιορίζεται στα  $3.73 \pm 0.001\%$  για τη συγκέντρωση των  $1.000 \mu\text{g} / \text{mL}$  (**Εικόνα 18-Ai**). Η βιωσιμότητα των κυττάρων εξετάστηκε επίσης με τη χρωματομετρική δοκιμασία MTS που προσδιορίζει την μεταβολική δραστηριότητα. Το  $\gamma$ -Cys επέδειξε μια μέτρια αναστολή κυτταρικής ανάπτυξης με την μέγιστη τιμή να προσδιορίζεται στα  $48.56 \pm 0.021\%$  για τη υψηλότερη συγκέντρωση ( $1.000 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) (**Εικόνα 18-Aii**). Η μορφολογία των κυττάρων δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την παρουσία της  $\gamma$ -Cys, σε σύγκριση με τα κύτταρα που δεν εκτέθηκαν στην κυκλοδεξτρίνη (**Εικόνα 18-B**). Συνολικά, τα *in vitro* πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη υποδηλώνουν ότι η  $\gamma$ -Cys παρουσιάζει χαμηλή έως μέτρια κυτταρική τοξικότητα.



**Εικόνα 18:** (A) Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας με: CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (i) και CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (ii) σε κύτταρα ινοβλαστών L929 που υποβλήθηκαν σε αγωγή με διαφορετικές συγκεντρώσεις  $\gamma$ -Cys για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος δύο επαναλήψεων. (B) Σειρά ινοβλαστών L929 (i) χωρίς θεραπεία και (ii) μετά από επώαση 24 ωρών με  $1.000 \mu\text{g} / \text{mL}$   $\gamma$ -Cys. Οι εικόνες ελήφθησαν με μικροσκόπιο Leica DN IL, εξοπλισμένο με κάμερα Leica DC 100.

## Νανοσωματίδια καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης (CMC)/ πολυμερών HTMAPβCD

### Προσδιορισμός MIC και MBC

Οι τιμές MIC και MBC των νανοσωματιδίων CMC/ HTMAPβCD με ή χωρίς μεροπενέμη παρουσιάζονται στον Πίνακα. Αρχικά μελετήθηκε η δραστικότητα της μεροπενέμης παρουσία ή απουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των νανοσωματιδίων σε μια σειρά κλινικών στελεχών *S. marcescens* και *K. pneumoniae* ταυτοποιημένα για την παραγωγή MBL τύπων NDM, VIM και IMP καθώς και ενός ευαίσθητου στελέχους *K. pneumoniae*. Η παρουσία των νανοσωματιδίων σε καμία συγκέντρωση δεν εμφάνισε προστατευτικές ικανότητες στην υδρόλυση της μεροπενέμης. Σε ένα δεύτερο πείραμα η δραστικότητα σειράς συγκεντρώσεων της μεροπενέμης μελετήθηκε παρουσία ή απουσία σταθερής συγκέντρωσης νανοσωματιδίων στην ίδια σειρά κλινικών στελεχών με παραπάνω. Η παρουσία των νανοσωματιδίων δεν εμφάνισε προστατευτικές ικανότητες.

Στέλεχος	Αντοχή	Ιμιπενέμη (256 – 0.25 µg/mL)	Ιμιπενέμη (256 – 0.25 µg/mL) + CMC/QAβCD (0.08 ratio) NPs (2.5 – 0.002 mg/mL)	Μεροπενέμη (224 – 0.22 µg/mL)	Μεροπενέμη (224 – 0.22 µg/mL) + CMC/QAβCD (0.08 ratio) NPs (2.5 – 0.002 mg/mL)
<i>S. marcescens</i> EUG-815	VIM, CMY	32	32	256	256
<i>K. pneumoniae</i> LA-109/16	VIM	16	16	128	128
<i>K. pneumoniae</i> LA 37 II/15	NDM, VIM, CTXM	64	64	128	128
<i>K. pneumoniae</i> 1780	VIM, KPC	16	16	32	32
<i>K. pneumoniae</i> EY03	sensitive	1	1	0.5	0.5
<i>K. pneumoniae</i> ESDY 1433	KPC	16	16	64	64



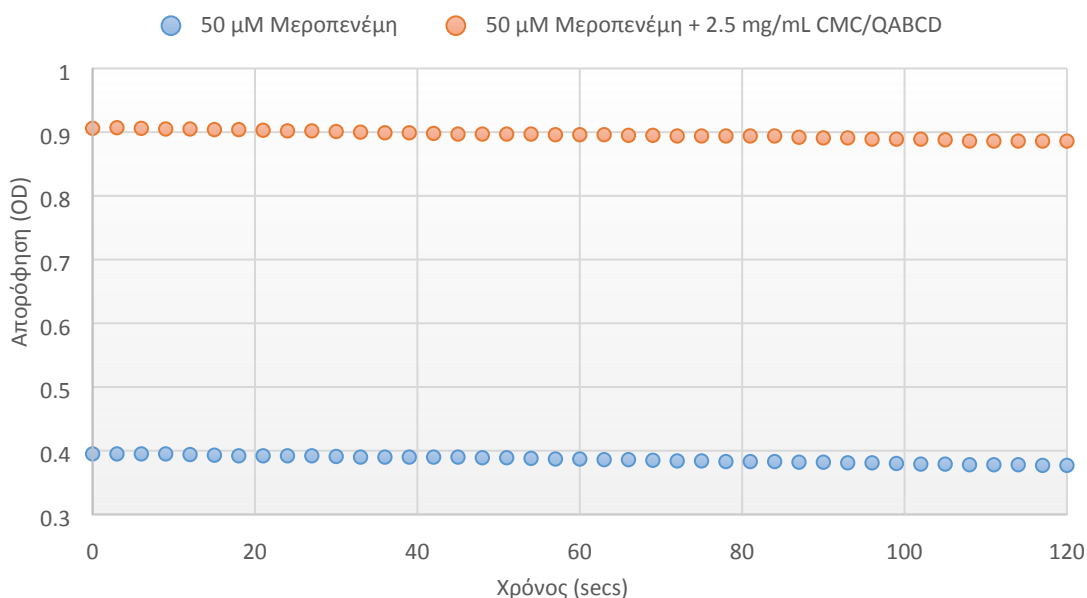
Κ. <i>pneumoniae</i> 5742	IMP	16	8	16	16
Κ. <i>pneumoniae</i> LA 82/16	VIM	32	16	32	32

**Πίνακας 16:** Παρατηρούμενη ανασταλτική δραστηριότητα καθαυμένων παρουσίας και απουσίας συγκεντρώσεων νανοσωματιδίων CMC/QAβCD

### Πειράματα υδρόλυσης

Το σύμπλοκο μεροπενέμης-νανοσωματιδίων CMC/QAβCD εμφάνισε το ίδιο υδρολυτικό προφίλ με την ελεύθερη μεροπενέμη κατά την διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης της από την VIM-1 MBL. Ο λόγος της ταχύτητας υδρόλυσης

$\frac{\text{ταχύτητα υδρόλυσης μεροπενέμης}}{\text{ταχύτητα υδρόλυσης μεροπενέμης/νανοσωματιδίων}}$  υπολογίστηκε στο 1.11.



**Εικόνα 19:** Ταχύτητα υδρόλυσης 50μM μεροπενέμης από την MBL VIM-1 παρουσία και απουσία 2.5 mg/mL νανοσωματιδίων CMC/QAβCD.

### iii) Μόρια αναστολείς

#### Αναστολή αντλιών εκροής-Νανοσωματίδια AMBnTβCD

#### Προσδιορισμός MIC

Οι τιμές MIC της τετρακυκλίνης παρουσία και απουσία 20 μM των νανοσωματιδίων AMBnTβCD παρουσιάζονται στον **Πίνακα 17**. Η δοκιμή δραστηριότητας έγινε σε μια

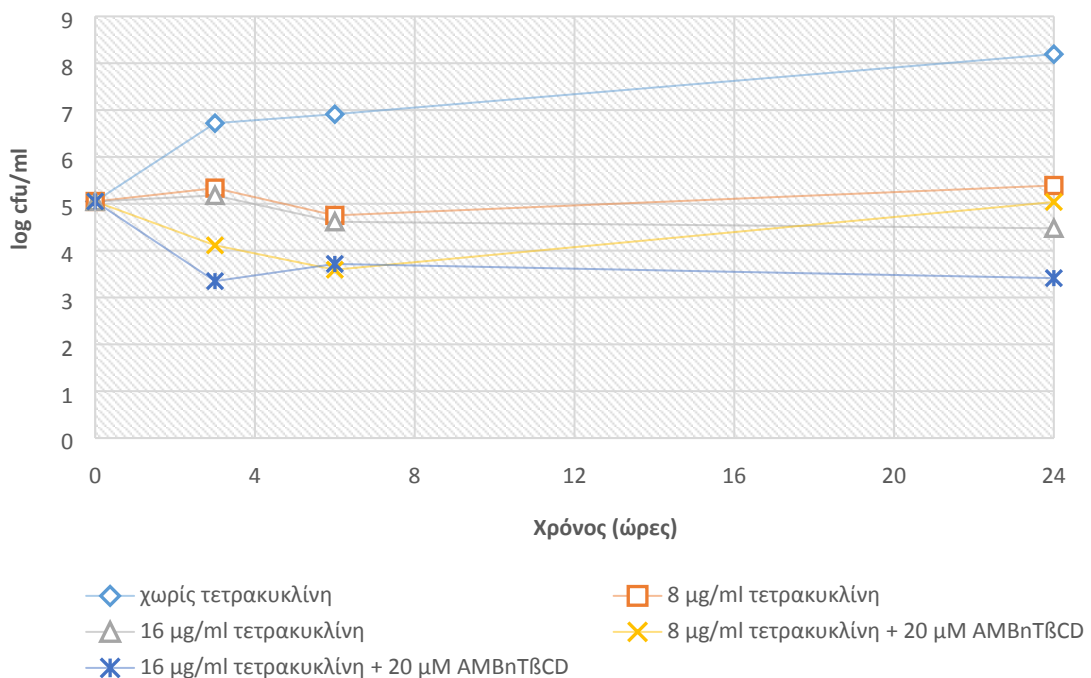
σειρά 19 κλινικών στελεχών *A.baumannii* ταυτοποιημένα για την έκφραση συστημάτων αντλιών εκροής καθώς και στελεχών που δεν εκφράζουν τέτοια συστήματα. Η κυκλοδεξτρίνη AMBnTβCD μείωσε το MIC στα στελέχη που εκφράζουν συστήματα αντλιών, επανευαισθητοποιώντας τα στην παρουσία της τετρακυκλίνης.

Αντιβιοτικό	Κυκλοδεξτρίνη	Συγκέντρωση κυκλοδεξτρίνης (μM)	Κλινικό στέλεχος	MIC (μg/ml)
Τετρακυκλίνη	-	-	GK 2/219	8
	AMBnTβCD	20	GK 2/219	2
	-	-	GK 4/240	4
	AMBnTβCD	20	GK 4/240	<0.5
	-	-	SLOV-53	2
	AMBnTβCD	20	SLOV-53	<0.5
	-	-	IK 539/04/11	32
	AMBnTβCD	20	IK 539/04/11	16
	-	-	IK 75/11	64
	AMBnTβCD	20	IK 75/11	<0.5
	-	-	IK 64/11	64
	AMBnTβCD	20	IK 64/11	<0.5
	-	-	SLOV 109	128
	AMBnTβCD	20	SLOV 109	128
	-	-	IK68	64
	AMBnTβCD	20	IK68	<0.5
	-	-	SLOV50	256
	AMBnTβCD	20	SLOV50	32
	-	-	IK473	64
	AMBnTβCD	20	IK473	16
	-	-	TZAN43	32
	AMBnTβCD	20	TZAN43	4
	-	-	SLOV48	2
	AMBnTβCD	20	SLOV48	<0.5
	-	-	TZAN 40	64
	AMBnTβCD	20	TZAN 40	<0.5
	-	-	SLOV 22	8
	AMBnTβCD	20	SLOV 22	<0.5
	-	-	TZAN 46	64
	AMBnTβCD	20	TZAN 46	1
	-	-	TZAN 56	64
	AMBnTβCD	20	TZAN 56	<0.5
-	-	SLOV107	8	
AMBnTβCD	20	SLOV107	1	
-	-	IK44	128	
AMBnTβCD	20	IK44	<0.5	
-	-	SLOV110	256	
AMBnTβCD	20	SLOV110	64	

**Πίνακας 17:** Αποτελέσματα MIC του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη παρουσία και απουσία της κυκλοδεξτρίνης AMBnTβCD.

### Καμπύλες θανάτωσης παθογόνων βακτηρίων σε συνάρτηση με το χρόνο (time-kill assays)

Στο διάγραμμα παρουσιάζονται οι καμπύλες θανάτωσης βακτηριακού εναιωρήματος πυκνότητας ( $10^5$ - $10^6$  CFU/mL). Το αντιβιοτικό τετρακυκλίνη χρησιμοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις που αντιστοιχούν στις τιμές MIC και 2x MIC του κλινικού στελέχους *A. baumannii* SLOV22. Στο τέλος της επώασης 24 ωρών η παρουσία 20  $\mu$ M AMBnTβCD είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του βακτηριακού φορτίου (CFU/mL) κατά τουλάχιστον 1.5 log<sub>10</sub> σε σύγκριση με εκείνη του ελεύθερου αντιβιοτικού.



Εικόνα 20: : Οι καμπύλες θανάτωσης του κλινικού στελέχους *Acinetobacter baumannii* SLOV22 με το αντιβιοτικό τετρακυκλίνη σε συγκεντρώσεις MIC και 2xMIC παρουσία και απουσία 20  $\mu$ M της κυκλοδεξτρίνης AMBnTβCD.

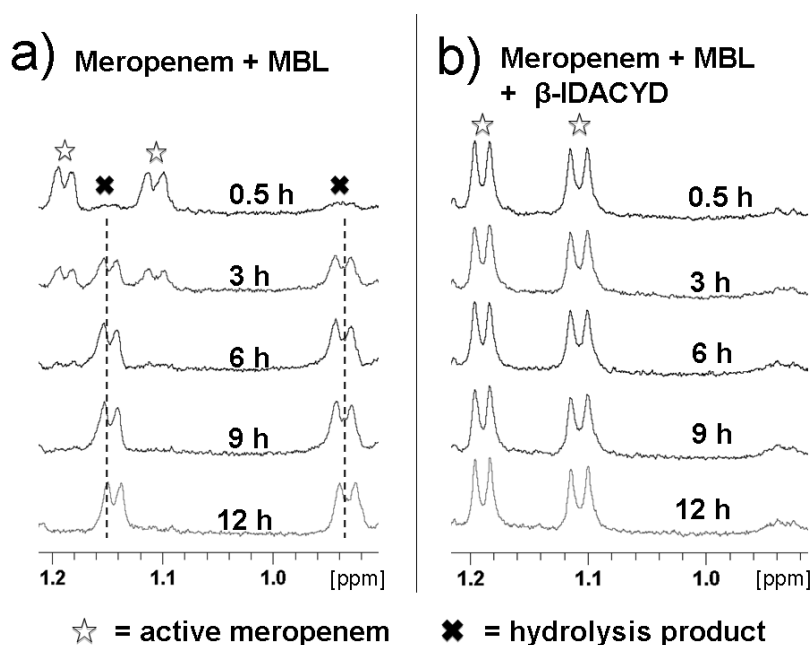
### Αναστολή MBL-Κυκλοδεξτρίνη β-IDACYD

#### Πειράματα in-vitro

#### Δοκιμές και χηλικές ιδιότητες της β-IDACYD

Η κυκλοδεξτρίνη β-IDACYD είναι υδατοδιαλυτή και η λογαριθμική σταθερά διάστασης όξεος της ( $pK_a$ ), όπως καθορίστηκε με την χρήση φασματοσκοπίας

πυρηνικού συντονισμού  $^{13}\text{C}$  NMR έχει μέσες τιμές 1,8 και 9,4 για τις καρβοξυλομάδες και τα τμήματα τριτοταγούς αμίνης, αντιστοίχως. Κατά συνέπεια, σε φυσιολογικό pH (~ 7) η κυκλοδεξτρίνη  $\beta$ -IDACYD είναι ανιόν με σύνολο φορτίου -7. Ο μακροκυκλικός σκελετός άνθρακα, σε αντίθεση με τις φυσικές κυκλοδεξτρίνες, στερείται του σταθεροποιητικού δικτύου δεσμών υδρογόνου στην δευτερεύουσα πλευρά, λόγω μεθυλίωσης. Ως εκ τούτου, το μόριο εμφανίζει μια δομική χαλαρότητα η οποία επιτρέπει την αναδίπλωση των υποκατάστατων ιμινοδιοξεικού οξέος προς τα μέσα και τον σχηματισμό ημιπολικών δεσμών με μεταλλικά κατιόντα με αποτέλεσμα την δημιουργία σταθερών πολυμεταλλικών συμπλοκών. Παρόμοιες χηλικές ιδιότητες αναμένονταν και με δισθενή κατιόντα και επιλέχθηκε έτσι ως υποψήφιο μόριο αναστολέας των MBL. Φασματοσκοπία πυρηνικού συντονισμού  $^1\text{H}$  NMR χρησιμοποιήθηκε αρχικά για να εξεταστεί η ανασταλτική ικανότητα του  $\beta$ -IDACYD εναντίων MBL, παρουσίας της ευρέως φάσματος καρβαπενέμης, μεροπενέμης. Όπως δείχνεται στην Εικόνα 21, παρουσία της MBL NDM-1 η ποσότητα μεροπενέμης υδρολύεται μέσα σε μια περίοδο 8 ωρών. Υπό τις ίδιες συνθήκες, αλλά παρουσία του  $\beta$ -IDACYD Εικόνα 21, το ένζυμο αδρανοποιείται και η μεροπενέμη είναι σταθερή στο διάλυμα για τουλάχιστον 16 ώρες.



**Εικόνα 21:** Η in-vitro ανασταλτική δραστηριότητα της κυκλοδεξτρίνης  $\beta$ -IDACYD εναντίων MBL (NDM) σε πειράματα NMR. Η εικόνα A και B είναι τμήματα του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, 298K), phosphate buffer,  $\text{H}_2\text{O}$ , της μεροπενέμης (0.18 mM παρουσία καθαρής NDM-1 (485  $\mu\text{L}$ ). (A) απουσία  $\beta$ -IDACYD και (B)  $\beta$ -IDACYD (1.9 mM) για μία περίοδο 12 ωρών.

### Ιn vitro δραστηριότητα του β-IDACYD: ένας ισχυρός αναστολέας MBL

Το β-IDACYD δοκιμάστηκε έναντι μιας συλλογής 36 πολύ-ανθεκτικών Gram αρνητικών κλινικών στελεχών που παρήγαγαν της MBL NDM, VIM και IMP καθώς επίσης και 6 κλινικά στελέχη που παρήγαγαν β-λακταμάσες σερίνης (ESBLs, AmpCs). Όλα τα κλινικά απομονωμένα στελέχη θεωρήθηκαν ανθεκτικά αφού είχε προσδιοριστεί ο φαινότυπός τους χρησιμοποιώντας τη μέθοδο διάχυσης δίσκου Kirby-Bauer και η κατάταξή τους βασίστηκε στην ταξινόμηση της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για την εξέταση της μικροβιακής ευαισθησίας (EUCAST) (v.07).

Σε μελέτες ελέγχου MIC με την μέθοδο Chessboard για μια σειρά διαφορετικών συγκεντρώσεων (100-0,78 µM) του β-IDACYD προσδιορίστηκε ότι 50 µM ήταν η συγκέντρωση της κυκλοδεξτρίνης με την βέλτιστη αναστολή έναντι όλων των κλινικών στελεχών που παράγουν MBL, όταν εξετάστηκε σε συνδυασμό με τις καρβαπενέμες ιμιπενέμη και μεροπενέμη. Συγκεκριμένα, σε όλες τις περιπτώσεις, 50 µM του β-IDACYD ήταν αρκετά για να μειώσουν το MIC της μεροπενέμης και της ιμιπενέμης μέχρι και 256 φορές, επανευαισθητοποιώντας στις καρβαπενέμες όλα τα στελέχη που παράγουν MBL (**Πίνακας 18**). Κλινικά στελέχη που συν-εκφράζουν μαζί με τις MBL, ευρέος φάσματος β-λακταμάσες ESBLs ή / και AmpC επανευαισθητοποιήθηκαν τόσο στην ιμιπενέμη όσο και στην μεροπενέμη, όπως αναμενόταν. Οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MIC) των καρβαπενεμών για κλινικά στελέχη που συν-εκφράζουν μαζί με τις MBL καρβαπενεμάσες σερίνης KPC και OXA-48, καθώς και ευαίσθητα κλινικά στελέχη παρέμειναν ανεπηρέαστες από την παρουσία του β-IDACYD.

Βακτηριακό Είδος	Κλινικό στέλεχος	β-λακταμάση	Φαινότυπος
<i>K. pneumoniae</i>	SEC-2	VIM	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>s</sup>
	SEC-4	VIM	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>s</sup>
	LA-109/16	VIM, CTXM	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>i</sup>
	LA-82/16	VIM, SHV	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>r</sup>
	LAR-2873	VIM-12	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>r</sup>
	ESDY-2681	VIM-27	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>s</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>s</sup>
	LA-34	VIM, CMY	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>r</sup>
	ESDY-1780	VIM, KPC	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>r</sup>
	2685	VIM, CMY, CTXM	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>r</sup>
LA-26	NDM	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>r</sup>	

	2489	NDM	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>r</sup>
	LA-28	NDM, CTXM	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>r</sup>
	LA-470/17	NDM	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>r</sup>
	LA-419/16	NDM,CTXM	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>r</sup>
	ESDY-5742	IMP	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>i</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>s</sup>
	TZAN-59	None	tic <sup>r</sup> , caz <sup>s</sup> , amc <sup>s</sup> , fep <sup>s</sup> , tzp <sup>s</sup> , fox <sup>s</sup> , atm <sup>s</sup>
	6/100	VIM	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>s</sup>
	ALX-47	OXA-48,CTX-M	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>s</sup> , atm <sup>r</sup>
	L078/11	KPC	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>r</sup>
	LA-34	VIM, CMY	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>r</sup>
	EY-20S	CMY, SHV	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>i</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>r</sup>
	IT-17829	CTXM, SHV	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>i</sup> , tzp <sup>i</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>r</sup>
	LA-38	NDM	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>i</sup> , tzp <sup>i</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>s</sup>
	LAR-40II/15	KPC	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>r</sup>
	LAR-26I/15	NDM, VIM, CTXM	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>r</sup>
	LAR-37II/15	NDM, VIM, CTXM	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>r</sup>
	LAR-7547	NDM, VIM, CTXM	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>r</sup>
	LAR-38I/15	VIM, NDM, CTXM	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>r</sup>
	LA-27	NDM, CTXM	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>r</sup>
	UoA 12/227	VIM	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>s</sup>
	UoA 1995	VIM	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>s</sup>
<b><i>P. mirabilis</i></b>	ALX-13	VIM, VEB	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>s</sup> , fox <sup>s</sup> , atm <sup>s</sup>
	ESDY-17	VIM, CMY	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>s</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>s</sup>
	ESDY-15315	VIM, CMY	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>s</sup>
	ESDY-15184	VIM, CMY	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>s</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>s</sup>
<b><i>P. stuartii</i></b>	ALX- 21	VIM, VEB	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>s</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>s</sup>
	ALX-27	VIM	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>s</sup> , fox <sup>s</sup> , atm <sup>i</sup>
	ESDY-4559	VIM	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>i</sup> , atm <sup>s</sup>
	ESDY-4563	VIM, VEB	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>s</sup> , fox <sup>s</sup> , atm <sup>i</sup>
<b><i>E. gergoviae</i></b>	AK-5227	VIM, CMY	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>r</sup>
	AK-5240	VIM, CMY	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>s</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>s</sup>
<b><i>A. baumannii</i></b>	TZAN-40	VIM, OXA-58	gm <sup>r</sup> , tm <sup>r</sup> , an <sup>r</sup> , net <sup>r</sup> , cip <sup>r</sup>
	TZAN-42	VIM, OXA-58	gm <sup>r</sup> , tm <sup>r</sup> , an <sup>r</sup> , net <sup>r</sup> , cip <sup>r</sup>
<b><i>E. coli</i></b>	TZAN-116	VIM	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>r</sup>
	TZAN-541	VIM	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>r</sup>
<b><i>S. marcescens</i></b>	EUG-815	VIM, CMY	tic <sup>r</sup> , caz <sup>r</sup> , amc <sup>r</sup> , fep <sup>r</sup> , tzp <sup>r</sup> , fox <sup>r</sup> , atm <sup>s</sup>

**Πίνακας 18:** Η συλλογή κλινικών στελεχών που χρησιμοποιήθηκε για τον *in-vitro* έλεγχο δρατικότητας της κυκλοδεξτρίνης β-IDACYD. Tic; τικαρκυλίνη, caz; κεφταζιδίμη, amc; αμοξυκιλίνη-κλαβουλανικό οξύ, fep; κεφεπίμη, tzp; πιπερακιλίνη-ταζομπακτάμη, fox; κεφοξιτίνη, atm; αζτρεονάμη. Το σύμβολο r υποδεικνύει ανθεκτικότητα ενώ το σύμβολο r ευαισθησία. Η ευαισθησία έναντι των αντιβιοτικών προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο διάχυσης δίσκων σε άγαρ Kirby-Bauer. Τα στελέχη χαρακτηρίστηκαν με βάση τα κλινικά σημεία διακοπής (breakpoints) της EUCAST v.07 (2017).

Βακτηριακό είδος	Κλινικό στέλεχος	MIC ιμιπενέμης (mg/L)	MIC ιμιπενέμης /50μM β-IDACYD (mg/L)	MIC μεροπενέμης (mg/L)	MIC μεροπενέμης /50μM β-IDACYD (mg/L)
<i>K.pneumoniae</i>	SEC-2	32	2	64	2
	SEC-4	64	2	32	1
	LA-109/16	16	<0.125	128	<0.25
	LA-82/16	8	<0.125	64	0.25
	LAR-2873	4	<0.125	8	<0.25
	ESDY-2681	16	<0.125	128	<0.25
	LA-34	32	<0.5	256	0.25
	ESDY-1780	16	8	64	32
	2685	32	0.5	128	<0.25
	LA-26	16	<0.125	32	<0.25
	2489	32	0.5	128	1
	LA-28	8	<0.125	64	<0.25
	LA-470/17	8	8	128	32
	LA-419/16	4	<0.125	16	<0.25
	ESDY-5742	8	<0.125	16	<0.25
	TZAN-59	1	0.5	0.5	0.5
	6/100	32	1	128	1
	ALX-47	4	4	8	4
	L078/11	32	16	64	64
	LA-34	32	0.25	64	0.25
	EY-20S	2	2	8	4
	IT-17829	1	0.5	32	32
	LA-38	8	<0.125	128	0.5
	LAR-40II/15	16	16	64	64
	LAR-26I/15	16	0.125	64	0.5
	LAR-37II/15	64	<0.125	128	<0.25
	LAR-7547	64	4	128	16
	LAR-38I/15	4	<0.125	16	<0.25
	LA-27	8	<0.125	8	<0.25
	UoA 12/227	8	<0.125	64	<0.25
UoA 1995	8	<0.125	64	<0.25	
<i>P. mirabilis</i>	ALX-13	8	1	32	0.5
	ESDY-17	4	<0.125	0.25	<0.25
	ESDY-15315	16	<0.125	4	<0.25
	ESDY-15184	8	0.125	2	<0.25

<i>P. stuartii</i>	ALX- 21	8	0.25	2	<0.25
	ALX-27	16	<0.125	2	<0.25
	ESDY-4559	4	<0.125	4	<0.25
	ESDY-4563	4	<0.125	2	<0.25
<i>E. gergoviae</i>	AK-5227	8	1	2	<0.25
	AK-5240	8	<0.125	1	<0.25
<i>A. baumannii</i>	TZAN-40	4	0.25	4	2
	TZAN-42	8	2	32	8
<i>E. coli</i>	TZAN-116	4	<0.125	1	<0.25
	TZAN-541	4	<0.125	2	<0.25
<i>S. marcescens</i>	EUG-815	16	<0.125	256	<0.25

**Πίνακας 19:** Οι τιμές MIC των καρβαπενεμών παρουσία και απουσία του ενισχυτή β-IDACYD εναντιών σειράς βακτηριακών κλινικών στελεχών.

Βακτηριακό είδος	Κλινικό στέλεχος	MIC κεφταζιδίμης (mg/L)	MIC κεφταζιδίμης / 50μM β-IDACYD (mg/L)
<i>K. pneumoniae</i>	LA-109/16	>256	32
	LA-82/16	>256	32
	LA-28	>256	32
	ESDY-5742	>256	1
	ALX-47	>256	>256
	LAR-40II/15	32	32
	UoA 12/227	>256	<0.25
	UoA 1995	>256	<0.25
<i>P. mirabilis</i>	ESDY-15184	>256	<0.25
<i>P. stuartii</i>	ALX- 21	128	16
	ESDY-4559	8	<0.25
<i>E. coli</i>	TZAN-116	>256	<0.25
<i>S. marcescens</i>	EUG-815	>256	<0.25

**Πίνακας 20:** Οι τιμές MIC της τρίτης γενιάς κεφαλοσπορίνης (κεφταζιδίμης) παρουσία και απουσία του ενισχυτή β-IDACYD εναντιών σειράς βακτηριακών κλινικών στελεχών



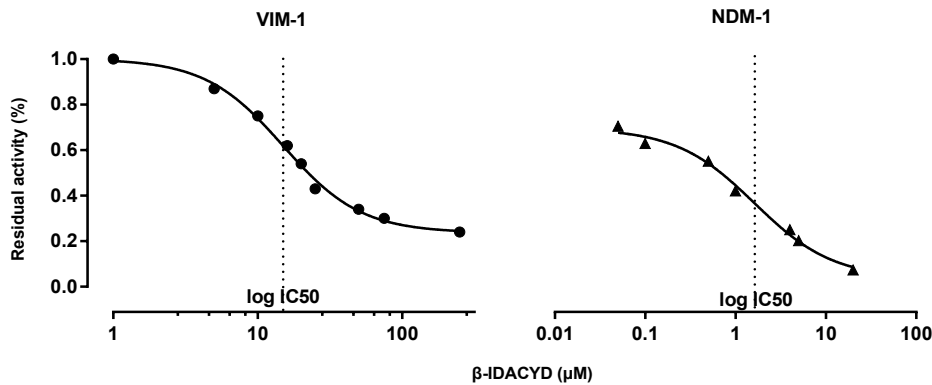
Κλινικό στέλεχος	Β-λακταμάσες	Μεροπενέμη MIC(mg/L)	Μεροπενέμη+ β-IDACYD-OH MIC(mg/L)	Μεροπενέμη + γ-IDACYD MIC(mg/L)	Μεροπενέμη + α-IDACYD MIC(mg/L)	Ιμιπενέμη MIC(mg/L)	Ιμιπενέμη+ β-IDACYD-OH MIC(mg/L)	Ιμιπενέμη+ γ-IDACYD MIC(mg/L)	Ιμιπενέμη + α-IDACYD MIC(mg/L)
Κρn LA 82/16	VIM-1	64	0.25	0.5	<0.25	64	1	2	<0.25
Κρn LA 109/16	VIM-1	256	0.5	8	<0.25	16	0.25	0.5	<0.25
Κρn ESDY 5742	IMP-1	32	0.5	2	<0.25	8	2	4	<0.25
Κρn LA419/1 6	NDM- 1	16	0.25	0.5	<0.25	8	(**)	(**)	<0.25
Κρn LA 26	NDM- 1	32	0.5	1	(**)	16	0.5	0.5	(**)
Κρn LA 34	VIM-1 CMY*	256	0.25	2	<0.5	16	0.25	1	<0.5
Pr m ESDY 15315	VIM- 1, CMY*	16	<0.25	0.5	(**)	16	0.25	0.5	(**)
Κρn LAR 37II/15	NDM- 1, VIM- 1, CTXM *	128	0.25	2	(**)	64	<0.25	1	(**)

**Πίνακας 21:** Οι τιμές MIC των καρβαπενεμών ιμιπενέμη και μεροπενέμη παρουσία και απουσία 50μM των κυκλοδεξτρινών β-IDACYD-OH, α-IDACYD και γ-IDACYD εναντίων σειράς βακτηριακών κλινικών στελεχών που παράγουν MBL. (\*)CMY και CTXM είναι β-λακταμάσες σερίνης (\*\*) Δεν υπάρχουν πειραματικά δεδομένα

### Προσδιορισμός IC50

Για την επαλήθευση της παρατηρούμενης στα πειράματα μικροαραιώσεων ισχυρής ανασταλτικής δράσης του β-IDACYD κατά των MBL, προσδιορίστηκαν φασματοφωτομετρικά οι τιμές IC50 της κυκλοδεξτρίνης έναντι καθαρισμένων MBL τύπου NDM, VIM και IMP. Ο αναστολέας παρουσίασε υψηλή ισχύ έναντι των ενζύμων NDM-1 και VIM-1:  $1,626 \mu\text{M} \pm 0,32$  και  $14,99 \mu\text{M} \pm 1,07$ , αντιστοίχως. Η κυκλοδεξτρίνη, σε συγκεντρώσεις έως 500 μM, απέτυχε να αναστείλει τη δράση της IMP-1. Οι παρατηρήσεις αυτές μοιάζουν με την ανασταλτική ισχύ του χηλικού παράγοντα EDTA

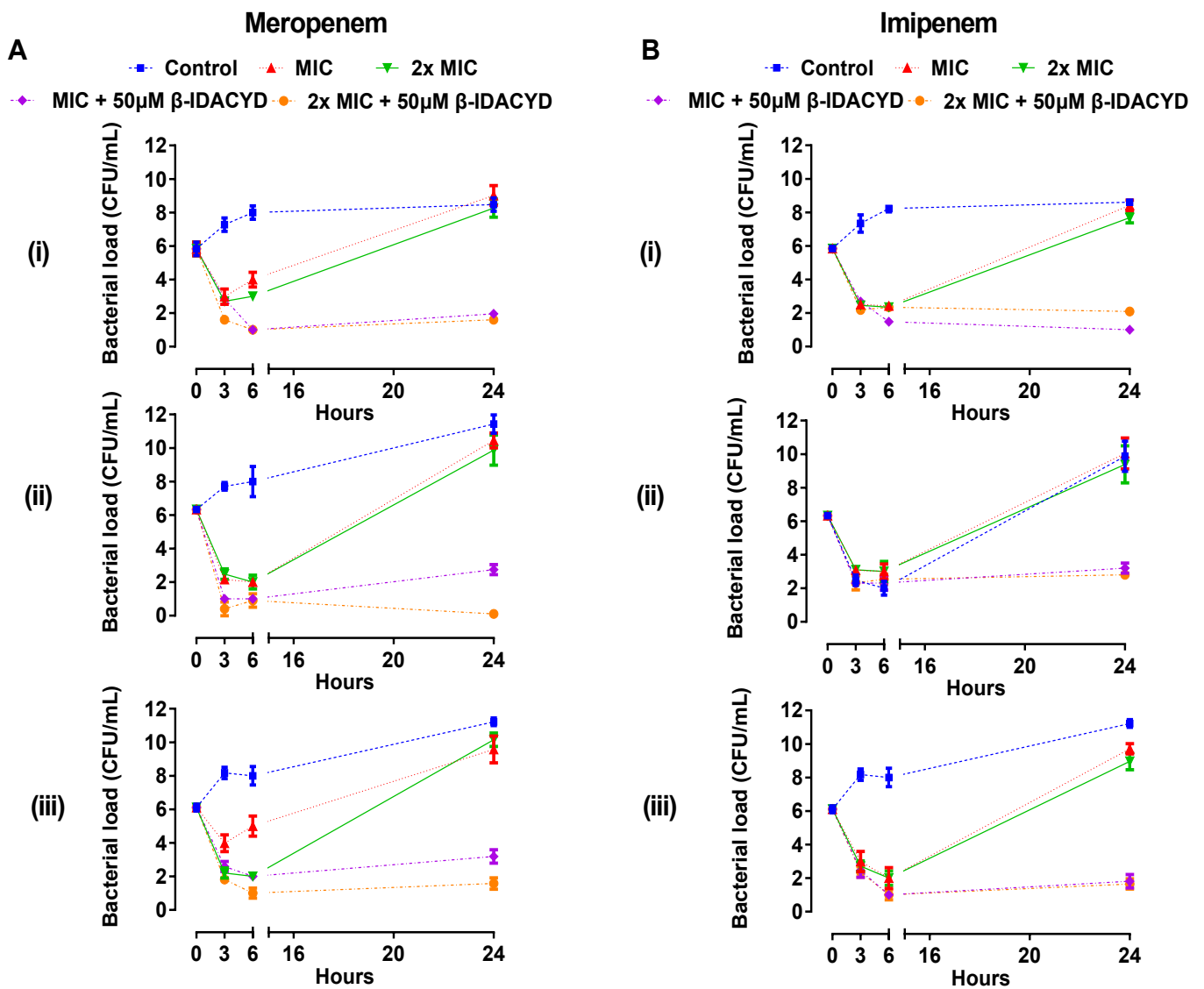
(IC<sub>50</sub> IMP-1=980μM). Η παρατηρούμενη υψηλότερη ευαισθησία της MBL NDM-1 στην παρουσία του β-IDACYD είναι σύμφωνη με άλλες αναφορές σχετικά με την ικανότητα χηλίωσης του EDTA, πιθανόν λόγω ισχυρότερης δέσμευσης των ιόντων Zn<sup>+2</sup> στην NDM-1.



**Εικόνα 22:** Οι καμπύλες προσδιορισμού της τιμής IC<sub>50</sub> της κυκλοδεξτρίνης β-IDACYD σε μM έναντι MBL τύπων NDM και VIM.

#### Καμπύλες θανάτωσης παθογόνων βακτηρίων σε συνάρτηση με το χρόνο (time-kill assays)

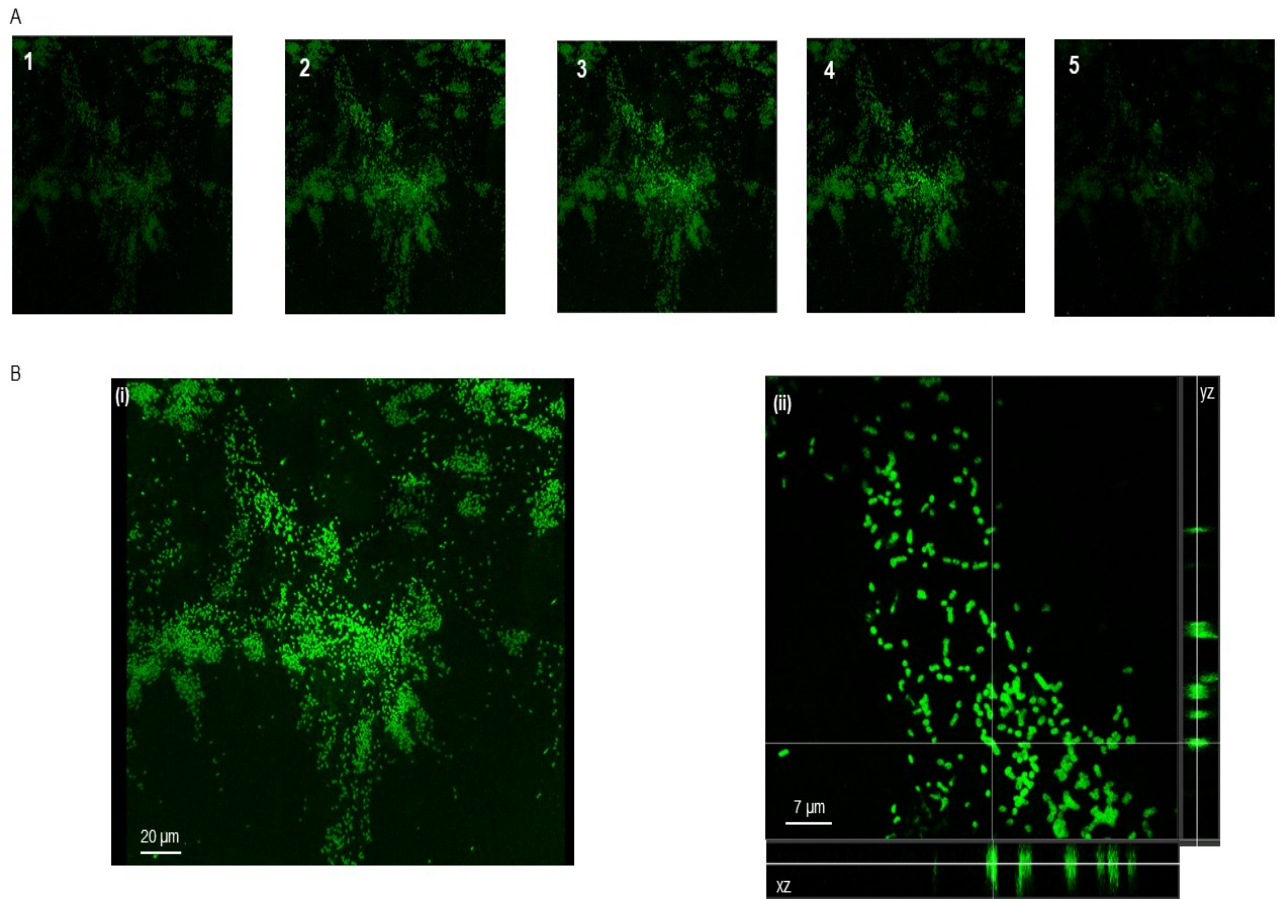
Για την περαιτέρω αξιολόγηση της ισχύος της β-IDACYD in-vitro προσδιορίστηκαν οι καμπύλες θανάτωσης εναιωρήματος πυκνότητας (10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> CFU/mL) κλινικών στελεχών *K. pneumoniae* χαρακτηρισμένων ως προς την παραγωγή NDM, VIM και IMP. Τα αντιβιοτικά ιμιπενέμη και μεροπενέμη χρησιμοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις που αντιστοιχούν στις τιμές MIC και 2xMIC των αντίστοιχων στελεχών. Σε όλες τις περιπτώσεις, στο τέλος της επώασης 24 ωρών η παρουσία 50 μM β-IDACYD είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του βακτηριακού φορτίου (CFU/mL) κατά τουλάχιστον 8 log<sub>10</sub> σε σύγκριση με εκείνη του ελεύθερου αντιβιοτικού (**Εικόνα 23**).



**Εικόνα 23:** Οι καμπύλες θανάτωσης των κλινικών στελεχών: (i) *K. pneumoniae* LA26 (NDM-1) (ii) *K. pneumoniae* LA 109/16 (VIM-1) (iii) *K. pneumoniae* 5742 (IMP-1) με τη χρήση μεροπενέμης (A) και ιμιπενέμης (B) σε ανασταλτικές συγκεντρώσεις που αντιστοιχούν στις τιμές των MIC και 2xMIC παρουσία ή απουσία 50 μM β-IDACYD. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως  $\log_{10}$  CFU/mL. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις δυτλούν. Καλλιέργειες ελεύθερες αντιβιοτικών χρησιμοποιήθηκαν επίσης ως μάρτυρες. Οι γραμμές σφαλμάτων είναι ενδεικτικές του τυπικού μέσου σφάλματος (SEM) ( $n=2$  επαναλήψεις).

Το β-IDACYD εισέρχεται σε βακτηριακά κύτταρα

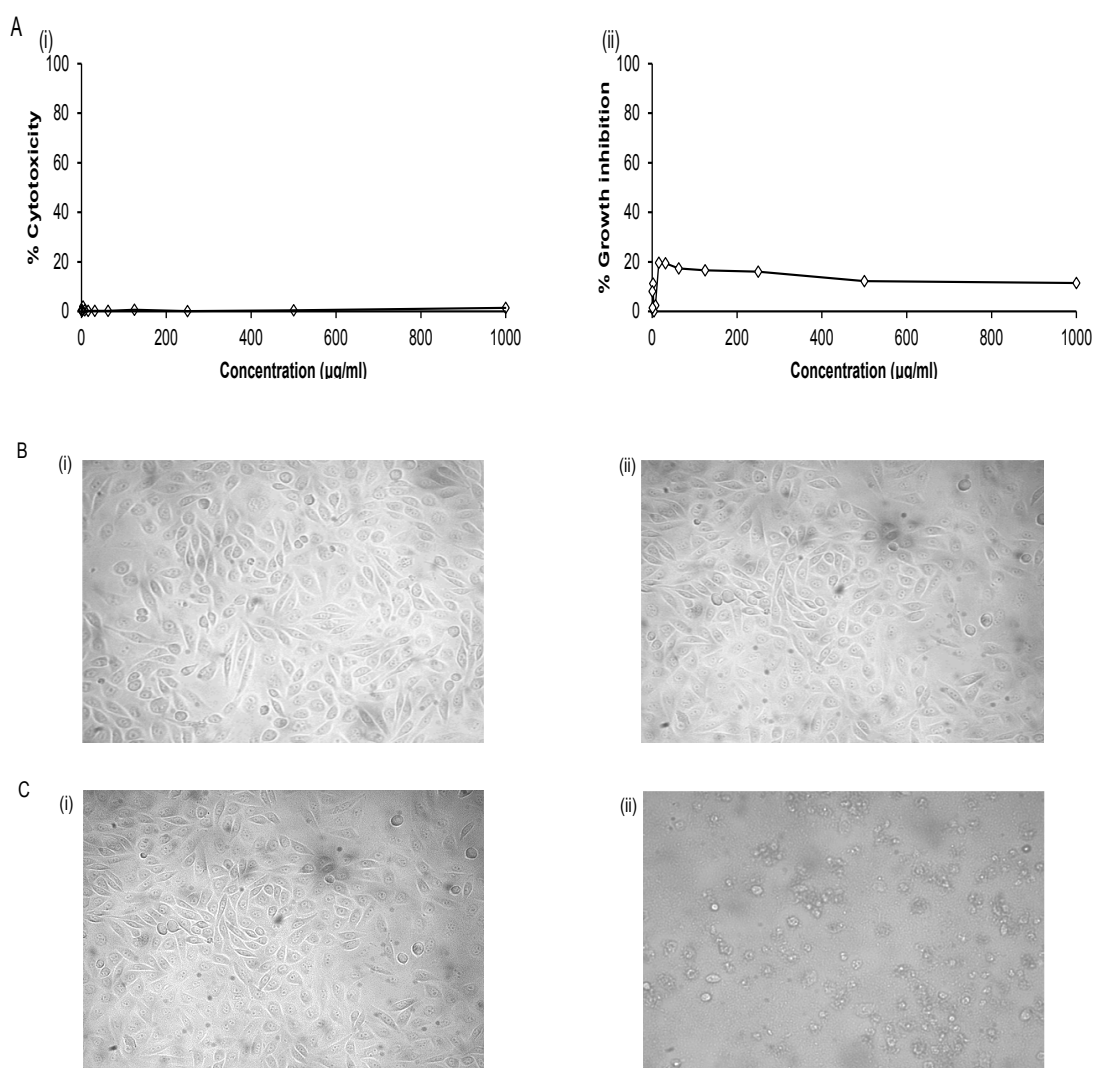
Σε πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας με χρήση φθορισμένης με BODIPY β-IDACYD αποδείξαμε την εισροή της φθορίζουσας β-IDACYD εντός των κυττάρων του NDM-θετικού κλινικού στελέχους *K. pneumoniae* LA26.



**Εικόνα 24:** Αντιπροσωπευτικές εικόνες μικροσκοπίας φθορισμού που δείχνουν την πρόσληψη 5  $\mu\text{g} / \text{ml}$  σημασμένου με BODIPY β-IDACYD (πράσινο), από το κλινικό στέλεχος LA 26 που παράγει NDM-1, μετά από επώαση 30 λεπτών. (A) Αντιπροσωπευτικά οπτικά τμήματα των ληφθέντων Z-στοιβάδων (B) Οι εικόνες αντιπροσωπεύουν τις μέγιστες προβολές των οπτικών τμημάτων όπως αυτά λήφθηκαν στο συνεστιακό μικροσκόπιο σε μεγέθυνση (i)  $\times 64$  και (ii) σε τμήμα της μεγέθυνσης  $\times 64$  περαιτέρω μεγεθυμένο  $\times 8$  παρουσιάζοντας τους άξονες XY, XZ και YZ. Οι ράβδοι κλίμακας αντιπροσωπεύουν 20 $\mu\text{m}$  και 7 $\mu\text{m}$  αντιστοίχως.

### In-vitro κυτταροτοξικότητα

Η υπό διερεύνηση κυκλοδεξτρίνη σε συγκεντρώσεις από 0,5 έως 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  δεν εμφάνισε ενδείξεις κυτταροτοξικότητας στο (i) CytoTox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay ενώ παρουσίασε μια περιορισμένη (19%) αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης για τις ίδιες συγκεντρώσεις (0,5-1000  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) στο (ii) CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay. Και στις δύο περιπτώσεις, τα κύτταρα δεν παρουσίασαν μορφολογικές διαφορές χαρακτηριστικές της κυτταροτοξικότητας όταν εξετάστηκαν με οπτικό μικροσκόπιο (**Εικόνα 25**).



**Εικόνα 25:** Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας με: (A) CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (i) και CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (ii) για κύτταρα ινοβλαστών L929 που υποβλήθηκαν σε αγωγή με διαφορετική συγκέντρωση  $\beta$ -IDACYD για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος δύο επαναλήψεων. (B) Ινοβλάστες L929 (i) μετά από επώαση 9 ωρών με 1,000  $\mu\text{g} / \text{mL}$   $\beta$ -IDACYD και (ii) μετά από επώαση 24 ωρών με 1,000  $\mu\text{g} / \text{mL}$   $\beta$ -IDACYD. (C) Ινοβλάστες L929 (i) χωρίς θεραπεία (αρνητικός μάρτυρας) και (ii) παρουσία τοξικού θετικού μάρτυρα. Οι εικόνες ελήφθησαν με μικροσκόπιο Leica DN IL, εξοπλισμένο με κάμερα Leica DC 100.

### In-vivo τοξικότητα

Η οξεία τοξικότητα της β-IDACYD καθορίστηκε επίσης για να καθοριστεί το δοσολογικό εύρος χρήσης της σε *in vivo* μελέτες και ενδεχομένως για να παρατηρηθεί στοχευμένη τοξικότητα σε συγκεκριμένα όργανα. Για τα δοσολογικά σχήματα που δοκιμάστηκαν, έως και 500 mg/kg δεν υπήρξαν θάνατοι και καμία συμπτωματολογία που να υποδηλώνει οξεία τοξικότητα.

### Βιοδιαθεσιμότητα και Βιοκατανομή

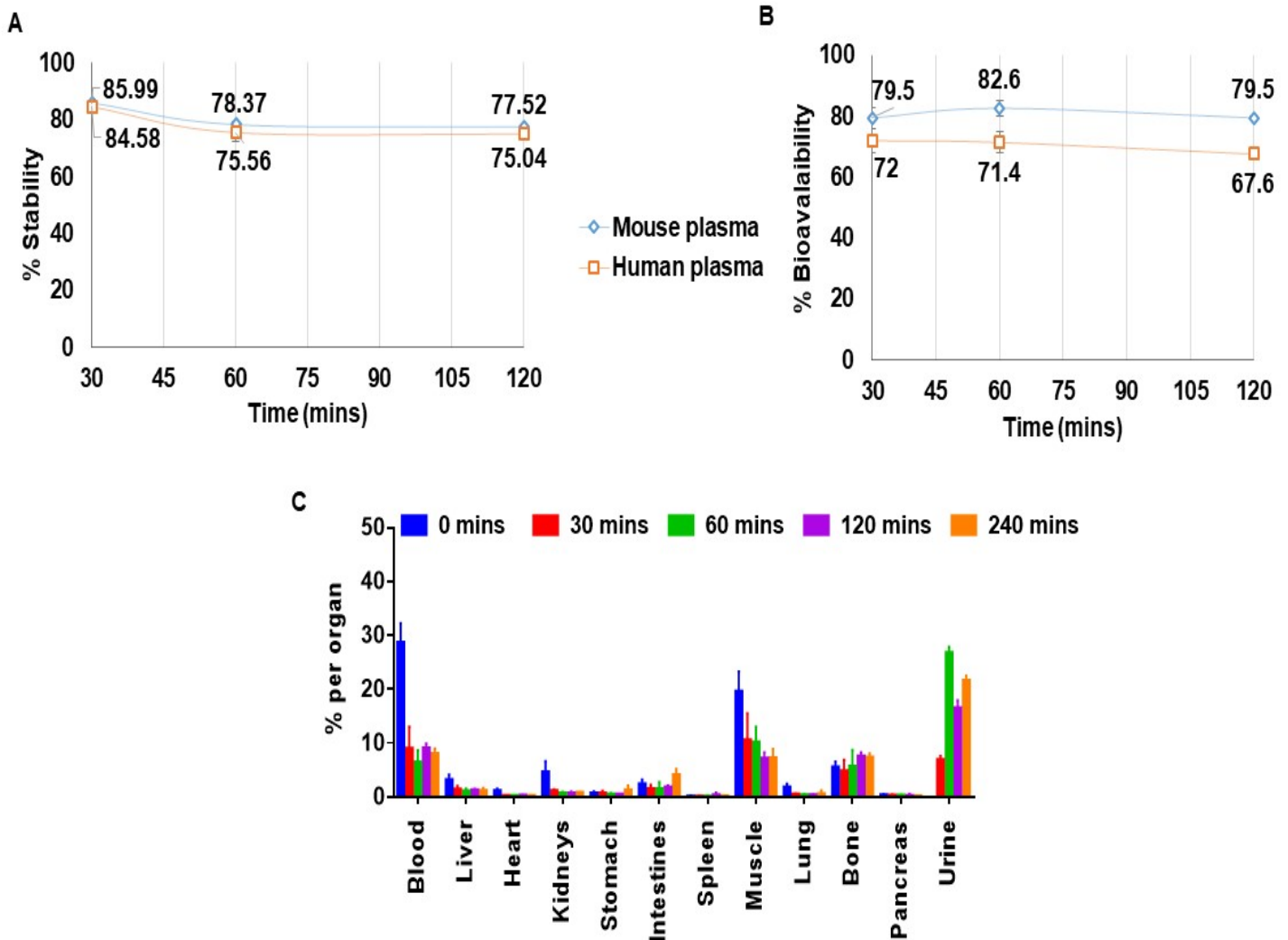
Οι χηλικές ιδιότητες του β-IDACYD έναντι μεταλλικών ιόντων χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της βιοδιαθεσιμότητας και της βιοκατανομής του προκειμένου να αξιολογηθούν οι βασικές φαρμακοκινητικές ιδιότητες του αναστολέα. Τα αποτελέσματα της θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC) έδειξαν ότι η σταθερά πρόσδεσης μεταξύ των κατιόντων β-IDACYD και Gallium (III) είναι υψηλή (ρυθμιστικό διάλυμα MOPS, pH 7,4:  $K \approx 12000 \text{ M}^{-1}$ ) και επομένως θα ήταν δυνατή η ραδιοσήμανση με το ισότοπο Gallium-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ) ή Gallium-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ), χρησιμοποιώντας την κυκλοδεξτρίνη σε περίσσεια ( $4 \times 10^4$  -φορές), και το σχηματιζόμενο σύμπλοκο πιθανώς σταθερό. Αρχικά, το β-IDACYD ραδιοσημάνθηκε με το ισότοπο  $^{67}\text{Ga}$ , με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός καθαρού ραδιενεργού συμπλόκου με υψηλή ραδιοχημική καθαρότητα (> 95%). Η επώαση του  $^{67}\text{Ga}$ -β-IDACYD με φρέσκο πλάσμα ανθρώπου και ποντικού στους 37 ° C είχε υψηλή σταθερότητα σε όλα τα χρονικά σημεία που αξιολογήθηκαν, με το  $^{67}\text{Ga}$ -β-IDACYD να επιδεικνύει ελαφρώς μεγαλύτερη σταθερότητα στο πλάσμα του ποντικού από ότι στο ανθρώπινο (~ 78% ανέπαφη  $^{67}\text{Ga}$ - β-IDACYD μετά από επώαση 120 λεπτών, σε σύγκριση με ~ 72% ανέπαφης  $^{67}\text{Ga}$ -β-IDACYD στο ανθρώπινο πλάσμα). Ένα κλάσμα περίπου 30% του  $^{67}\text{Ga}$ -β-IDACYD βρέθηκε να δεσμεύεται σε πρωτεΐνες ανθρώπινου πλάσματος 30 λεπτά μετά την χορήγηση (pi), παραμένοντας σταθερό έως και 120 λεπτά αργότερα. Η δέσμευση του  $^{67}\text{Ga}$ -β-IDACYD σε πρωτεΐνες πλάσματος ποντικού ήταν σχεδόν 20% στα 120 λεπτά.

Τα πειράματα βιοκατανομής πραγματοποιήθηκαν σε θηλυκά CD-1 ποντίκια χρησιμοποιώντας το ραδιοσημασμένο σύμπλοκο  $^{67}\text{Ga}$ :β-IDACYD και τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν 5, 30, 60, 120 και 240 λεπτά μετά την αρχική χορήγηση του

ραδιενεργού διαλύματος. Το σύμπλοκο παρουσίασε μια γρήγορη, χρονικά εξαρτώμενη απόκριση από το αίμα χωρίς να παρατηρηθεί σημαντική συσσώρευση στους άλλους ιστούς που αναλύθηκαν. Η κύρια οδός απέκκρισης ήταν διαμέσου του ουροποιητικού συστήματος και δεν παρατηρήθηκε σημαντική πρόσληψη ή συσσώρευση του συμπλόκου στο ήπαρ, την σπλήνα ή το έντερο.

Πραγματοποιήθηκαν επίσης μεταβολικές μελέτες σε δείγματα αίματος και ούρων που ελήφθησαν από θηλυκά CD-1 ποντίκια 5, 60 και 120 λεπτά ακολούθως της χορήγησης ποσότητας του συμπλόκου  $^{67}\text{Ga}$ -β-IDACYD. Όπως αποδείχθηκε με ανάλυση HPLC, παρατηρήθηκε μια μοναδική κορυφή που αντιστοιχεί σε ακέραιο το σύμπλοκο  $^{67}\text{Ga}$ -β-IDACYD σε όλα τα δείγματα, χωρίς να παρουσιάζονται άλλα ραδιενεργά συστατικά, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ραδιενέργεια που ανιχνεύεται σε όλα τα όργανα οφείλεται εξ ολοκλήρου στο  $^{67}\text{Ga}$ -β-IDACYD.

Τα ιόντα Γαλλίου (Ga) είναι γνωστό ότι δεσμεύονται από την τρανσφερίνη, μια πρωτεΐνη μεταφοράς σιδήρου που βρίσκεται στο αίμα, λόγω της παρόμοιας ιοντικής τους ακτίνας. Η σταθερότητα της  $^{67}\text{Ga}$ -ραδιοσημασμένης β-IDACYD εκτιμήθηκε παρουσία περίσσειας τρανσφερίνης. Σε μελέτη με χρήση υγρής χρωματογραφίας (HPLC) το ισότοπο παρέμεινε πλήρως λειτουργικό μετά από 120 λεπτά, χωρίς ενδείξεις για δέσμευση του από την τρανσφερίνη ή απώλειας του υποδηλώνοντας υψηλή σταθερότητα. Τα αποτελέσματα της βιοκατανομής υποστηρίζουν την *in-vivo* σταθερότητα του ισοτόπου, καθώς παρατηρήθηκε γρήγορη απόκριση από το αίμα και τους άλλους ιστούς κατά τη διάρκεια του χρόνου αξιολόγησης των 240 λεπτών.



**Εικόνα 26:** Παρουσιάζονται τα γραφήματα (A) σταθερότητας και (B) βιο-διαθεσιμότητας της ραδιοθετημένης  $^{67}\text{Ga}$ - $\beta$ -IDACYD σε απομονωμένο πλάσμα ανθρώπου και ποντικού (C) το προφίλ βιο-κατανομής της ραδιοθετημένης  $^{67}\text{Ga}$ - $\beta$ -IDACYD σε CD-1 ποντίκια σε χρονικά σημεία μετά την χορήγηση: 0 λεπτών, 30 λεπτών, 60 λεπτών, 120 λεπτών και 240 λεπτών ( $n = 10$  / χρονικό σημείο). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως # μέσος όρος δύο τεχνικών επαναλήψεων. Οι γραμμές σφάλματος υποδηλώνουν το SEM.



## **Πειράματα in-vivo**

### In-vivo θεραπευτικά σχήματα

#### **Μοντέλο τοπικής λοίμωξης**

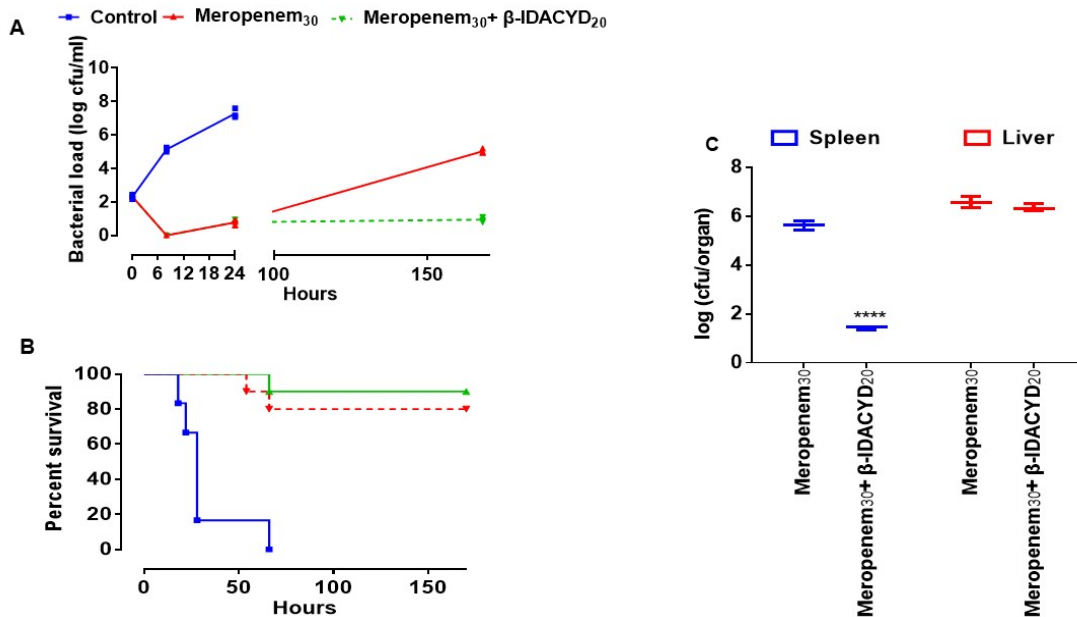
Δεδομένης της αποδεδειγμένης in-vitro δραστικότητας της β-IDACYD και του μη τοξικού προφίλ της πραγματοποιήθηκε ένα αρχικό πείραμα θεραπείας σε μοντέλο τοπικής λοίμωξης για να διερευνηθούν οι in-vivo θεραπευτικές δυνατότητές της. Σε ένα μοντέλο τοπικής λοίμωξης του μηρού ουδετεροπενικών θηλυκών CD-1 ποντικών χορηγήθηκε ενδοφλεβίως ένα θεραπευτικό σχήμα 30 mg / kg μιπενέμης ή 30 mg / kg μιπενέμης με 10 mg / kg β-IDACYD ανά 2 ώρες για διάστημα 24 ωρών. Στο τέλος της θεραπείας, το βακτηριακό φορτίο του μηρού ελαφρύνθηκε 0,5 log<sub>10</sub> παρουσία 10 mg / kg β-IDACYD σε σύγκριση με αυτό της μονοθεραπείας μεροπενέμης.

#### **Μοντέλο σηψαιμίας**

##### *Θεραπεία 1*

Δεδομένου της παρατηρούμενης στα πειράματα βιοκατανομής υψηλής συγκέντρωσης της κυκλοδεξτρίνης στο αίμα για περίοδο 2 ωρών, ο προσδιορισμός της δραστικότητάς της ως αναστολέας σε ένα μοντέλο σηψαιμίας κρίθηκε πιο αντιπροσωπευτικός για τον προσδιορισμό της δράσης της in-vivo. Έχοντας αυτά υπόψη, πραγματοποιήθηκε μια σειρά τριών in-vivo πειραμάτων. Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν ουδετεροπενικά CD-1 ποντίκια τα οποία μολύνθηκαν με μια θανατηφόρα δόση κλινικού στελέχους *K. pneumoniae* που παράγει NDM-1. Στην πρώτη σειρά πειραμάτων, οι ποντικοί έλαβαν ένα σχήμα θεραπείας χορηγούμενο ανά δύο ώρες για διάστημα 24 ωρών είτε με 30 mg / kg μεροπενέμης ή με συνδυασμό 30 mg / kg μεροπενέμης και 20 mg / kg β-IDACYD. Χωρίς θεραπεία το 90% των ποντικών υπέκυψε στη μόλυνση μέσα σε 24 ώρες. Η μονοθεραπεία με μεροπενέμη προστάτευσε το 80% των ποντικών κατά τη διάρκεια του πειράματος (140 ώρες), ενώ η συν-χορηγούμενη θεραπεία μεροπενέμης / β-IDACYD προστάτευσε το 90% των ποντικών για την ίδια διάρκεια. Επίσης, στις 140 ώρες μετά την έναρξη της θεραπείας το συνδυαστικό σχήμα μεροπενέμης / β-IDACYD είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της τιμής του βακτηριακού φορτίου στο αίμα κατά 4 log<sub>10</sub> σε σύγκριση με

εκείνη της μονοθεραπείας με μεροπενέμη. Επιπλέον, το βακτηριακό φορτίο στην σπλήνα ανακουφίστηκε κατά  $4,2 \log_{10}$  σε σύγκριση με αυτό του σκέτου αντιβιοτικού.

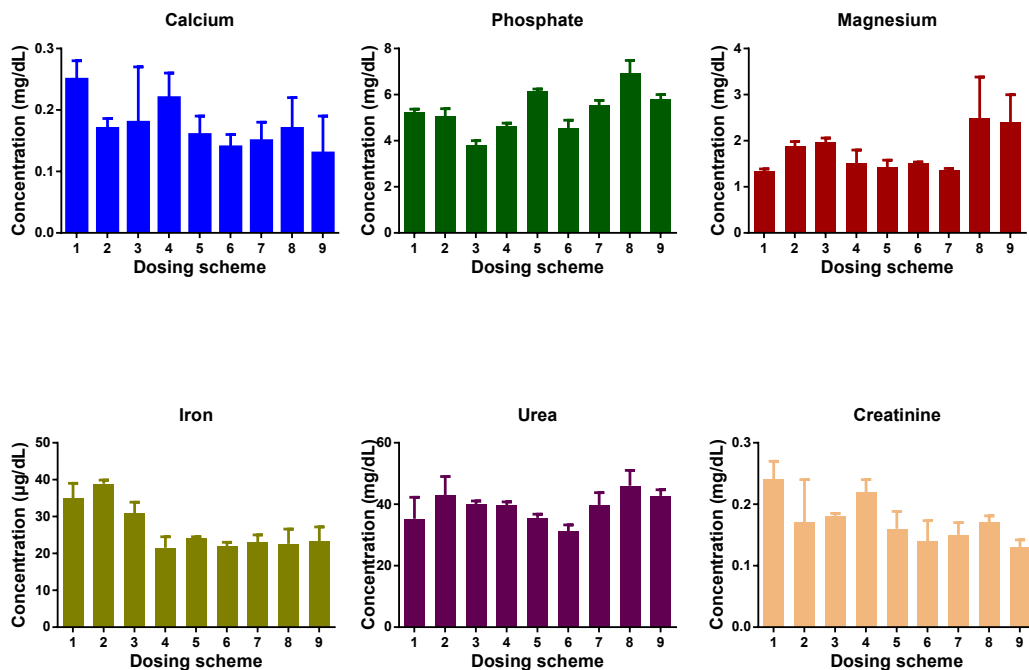


**Εικόνα 27:** Παρουσιάζετε το βακτηριακό φορτίο (CFU / mL) (A) και το ποσοστό επιβίωσης (B) ποντικών CD-1 μολυσμένων με θανατηφόρο δόση ( $10^7$  CFU) του κλινικού *K. pneumoniae* LA-26 που παράγει NDM-1. Τα ποντίκια έλαβαν ενδοπεριτοναϊκά το ακόλουθο σχήμα θεραπείας: φυσιολογικό ορό, 30 mg / kg μεροπενέμη, 30 mg / kg μεροπενέμη + 20 mg / kg β-IDACYD. Η θεραπεία (έναρξη 2 ώρες μετά τη μόλυνση) χορηγείτο κάθε 2 ώρες για μια περίοδο 24 ωρών ενώ έγινε λήψη αίματος 0 ώρες, 6 ώρες, 24 ώρες και 140 ώρες μετά την έναρξη της θεραπείας. Όλες οι ομάδες ήταν n = 10. Η σπλήνα και το ήπαρ (C) από n = 5 ποντικούς απομονώθηκαν επίσης στις 140 ώρες μετά την έναρξη της θεραπείας και προσδιορίστηκε το βακτηριακό τους φορτίο [log (CFU / όργανο)]. Οι γραμμές σφαλμάτων είναι ενδεικτικές του SEM (n = 2 επαναλήψεις)

#### Προσδιορισμός έμμεσης τοξικότητας-Ομοιόσταση δισθενών κατιόντων στον οργανισμό παρουσία β-IDACYD

Όπως και με όλους τους χηλικούς παράγοντες η ικανότητα του β-IDACYD να προσδένει κατιόντα δημιούργησε ανησυχίες σχετικά με την δραστικότητα που ίσως είχε με απαραίτητα για την διατήρηση της ομοιόστασης μεταλλικά ιόντα. Για να εκτιμηθεί η πιθανότητα τοξικότητας του β-IDACYD, προσδιορίσαμε σε πλάσμα που απομονώθηκε από το αίμα των πειραματόζωων τα επίπεδα τεσσάρων διαφορετικών ιόντων (φώσφορου, σίδηρου, μαγνησίου και ασβεστίου) απαραίτητων για τη διατήρηση της ομοιόστασης καθώς και δύο οργανικών ενώσεων (ουρία και κρεατινίνη) για έλεγχο νεφρικής τοξικότητας. Όλα τα επίπεδα ιόντων και οργανικών ενώσεων ήταν εντός φυσιολογικού εύρους και συγκρινόμενα με αυτά της ομάδας

μαρτύρων. Σε κάθε περίπτωση δεν εμφανίστηκαν σημάδια επίδρασης στην ιοντική ισορροπία ή επηρεασμού της νεφρικής λειτουργίας.



**Εικόνα 28:** Παρουσιάζετε η συγκέντρωση πλάσματος σε mg / dL των ιόντων ασβεστίου, σιδήρου, φωσφόρου, μαγνησίου καθώς και της ουρίας και της κρεατινίνης απομονωμένο από CD-1 ποντικούς μολυσμένους με θανατηφόρο δόση ( $10^7$  CFU) του στελέχους LA26 της *K. pneumoniae* που παράγει NDM-1. Τα ποντίκια έλαβαν ενδοπεριτοναϊκά, φυσιολογικό ορό, 30 mg / kg μεροπενέμης, 30 mg/kg μεροπενέμης + 20 mg/kg β-IDACYD. Η θεραπεία χορηγείτο κάθε 2 ώρες για μια περίοδο 24 ωρών και απομονώθηκε αίμα και ακολούθως το πλάσμα σε χρονικά σημεία 0h, 6h, 24h και 140h (7d) μετά την έναρξη της θεραπείας. Οι αριθμοί των δοσολογιών αντιστοιχούν στις ακόλουθες συνθήκες: (1) control σε 0h, (2) control σε 6h, (3) μεροπενέμη 30mg / kg σε 6h, (4) μεροπενέμη 30mg/kg + 20mg/kg β-IDACYD σε 6h, (5) control στις 24 ώρες, (6) μεροπενέμη 30 mg / kg στις 24 ώρες, (7) μεροπενέμη 30 mg/kg + 20 mg/kg β-IDACYD, (8) μεροπενέμη 30 mg / kg + 20mg kg β-IDACYD στις 140 ώρες.

### Θεραπεία 2

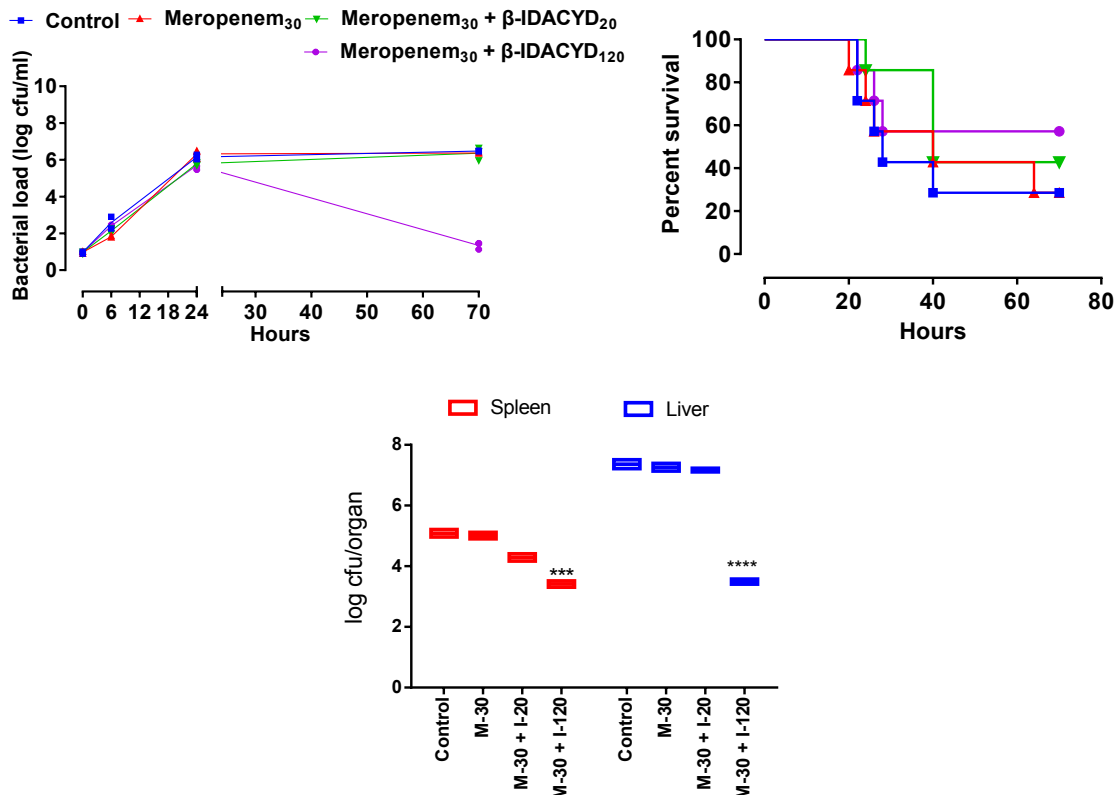
Στη δεύτερη σειρά πειραμάτων, τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν σε αγωγή με μονή δόση είτε μεροπενέμης (30 mg/kg), είτε μεροπενέμης (30 mg/kg) και β-IDACYD (20mg / kg) είτε μεροπενέμης (30 mg/kg) και β-IDACYD (120 mg/kg). Απουσία θεραπείας, το 30% των ποντικών παρέμεινε ζωντανό 70 ώρες μετά την αρχική μόλυνση. Το ίδιο ποσοστό επιβίωσης παρατηρήθηκε για τη μονοθεραπεία με μεροπενέμη ενώ μια εφάπαξ δόση 120 mg/kg β-IDACYD προστάτευσε το 60% των ποντικών στο ίδιο χρονικό πλαίσιο. Το βακτηριακό φορτίο στο αίμα 70 ώρες μετά την μόνη δόση θεραπείας μειώθηκε 4,8  $\log_{10}$  παρουσία 120 mg/kg β-IDACYD σε σύγκριση με αυτό

της μονοθεραπείας με αντιβιοτικό. Το βακτηριακό φορτίο ήταν επίσης σημαντικά μικρότερο τόσο στην σπλήνα ( $3,8 \log_{10}$  μείωση) όσο και στο ήπαρ ( $1,4 \log_{10}$  μείωση).

### Θεραπεία 3

Σε ένα τρίτο πείραμα θεραπείας βακτηριαιμίας, χορηγήσαμε με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση μονή δόση 10 mg/kg μεροπενέμης ή 10 mg/kg μεροπενέμης με 20 mg/kg β-IDACYD ή 10 mg/kg μεροπενέμης με 120 mg/kg β-IDACYD. Η μονοθεραπεία με μεροπενέμη δεν μπόρεσε να προστατεύσει τα ποντίκια από το θάνατο μέσα σε 48 ώρες ενώ η ίδια δόση μεροπενέμης συγχωρηγούμενη με 120 mg/kg β-IDACYD έσωσε το 50% των ποντικών εντός του ίδιου χρόνου. Η παρατηρούμενη μείωση κατά  $3 \log_{10}$  στο βακτηριακό φορτίο του αίματος παρουσία 120 mg/kg του αναστολέα σε σύγκριση με το ίδιο το αντιβιοτικό επιβεβαίωσε τις υψηλές ενισχυτικές ικανότητες που παρουσιάζει ο αναστολέας ακόμη και για τις μη βέλτιστες δόσεις μεροπενέμης. Σε όλες τις περιπτώσεις, η β-IDACYD παρουσίασε μακροχρόνιες ικανότητες καταστολής της βακτηριαιμίας προκαλούμενης σε CD-1 ποντικούς καθώς και του βακτηριακού φορτίου που στην σπλήνα και στο ήπαρ.

A

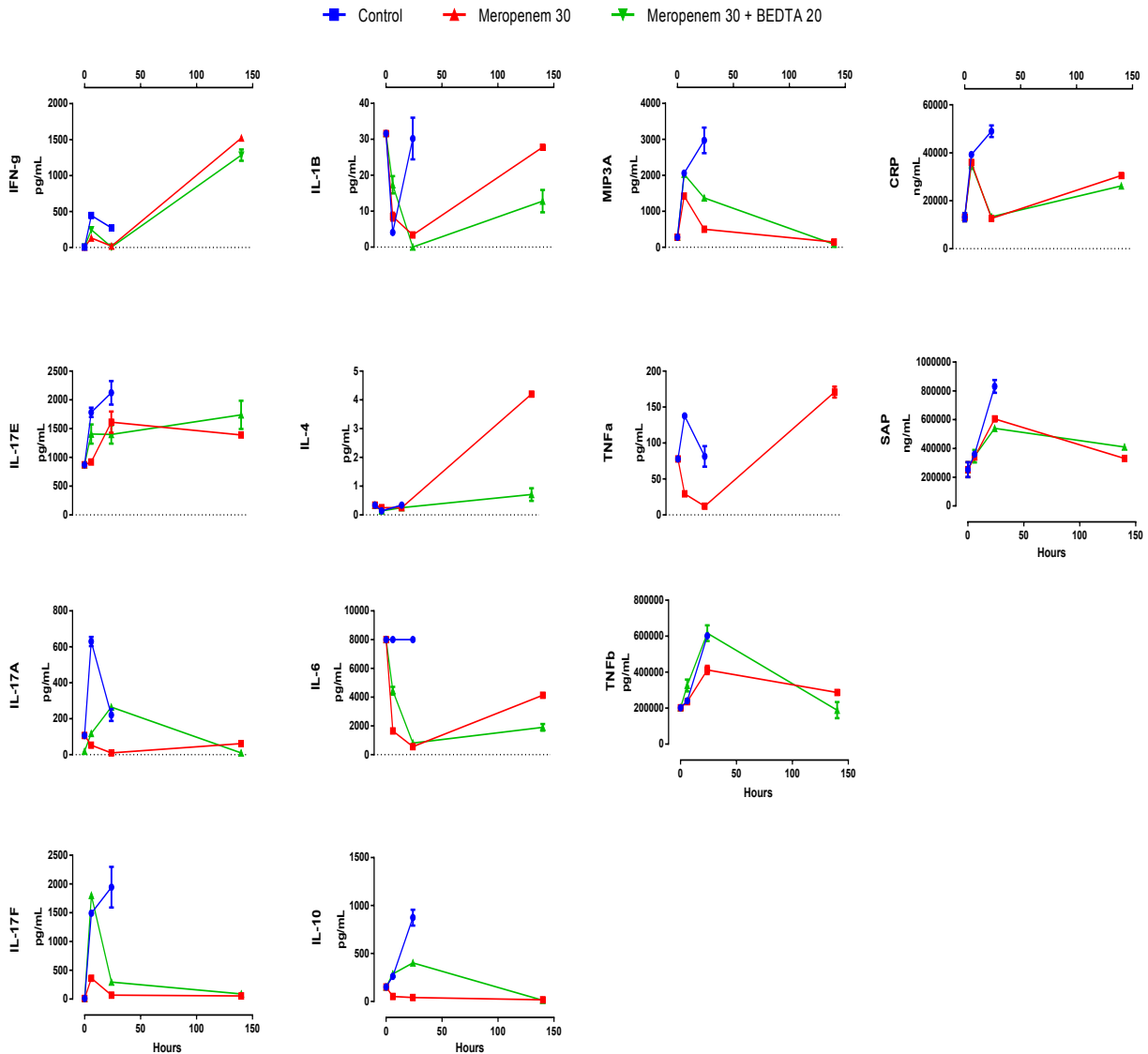


**B**

**Εικόνα 29:** Παρουσιάζετε το βακτηριακό φορτίο (CFU / mL) και το ποσοστό επιβίωσης CD-1 ποντικών μολυσμένων με θανατηφόρο δόση ( $10^7$  CFU) του κλινικού στελέχους *K. Pneumoniae* LA26 που παράγει NDM-1. Οι ποντικοί έλαβαν ενδοπεριτοναϊκά ένα από τα ακόλουθα σχήματα θεραπείας: (Α) φυσιολογικός ορός, μεροπενέμη 30 mg/kg, μεροπενέμη, 30 mg/kg μεροπενέμη + 20 mg/kg β-IDACYD ή 30 mg/kg μεροπενέμη + 120 mg/kg IDACYD. Η θεραπεία χορηγήθηκε με τη μορφή μιας δόσης 2 ώρες μετά τη μόλυνση και λήφθηκε αίμα 0 ώρες, 6 ώρες, 24 ώρες και 70 ώρες μετά την έναρξη της θεραπείας (B) φυσιολογικός ορός, μεροπενέμη 10 mg/kg, μεροπενέμη, 10 mg/kg μεροπενέμη + 20 mg/kg β-IDACYD ή 10 mg/kg μεροπενέμη + 120 mg/kg β-IDACYD. Η θεραπεία δόθηκε με τη μορφή μιας δόσης 2 ώρες μετά τη μόλυνση και τραβήχτηκε αίμα 0h, 6h και 24h μετά την έναρξη της αγωγής. Όλες οι ομάδες ήταν  $n = 10$ . Οι γραμμές σφάλματος είναι ενδεικτικές του SEM ( $n = 2$  επαναλήψεις).

#### Προσδιορισμός δεικτών λοίμωξης και τοξικότητας

Μια επιπλέον μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της *in-vivo* ισχύος και ασφάλειας της β-IDACYD ήταν ο προσδιορισμός των επιπέδων μιας σειράς λεμφοκινών, κυτοκινών και προ-φλεγμονωδών πρωτεϊνικών δεικτών. Τα επίπεδα των IL17S, 6, 1β, 4, 21, 10, 17A, 17F, IPN-γ, MIP-3α, TNP-α και TNP-β που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση Th17 προσδιορίστηκαν όλα με μια μέθοδο Luminex χρησιμοποιώντας πλάσμα απομονωμένο από τα ποντίκια από όλα τα θεραπευτικά σχήματα σηψαιμίας. Σε καμία περίπτωση δεν εμφανίζεται η παρουσία του β-IDACYD να προκαλεί ανοσοαπόκριση, καθώς οι δείκτες βρίσκονται στα ίδια επίπεδα ανοσοαπόκρισης με αυτά της μονοθεραπείας με αντιβιοτικό. Η παρατήρηση αυτή ενισχύθηκε από τα επίπεδα των πρωτεϊνών CRP και SAP της φλεγμονώδους αντίδρασης.



**Εικόνα 30:** Η συγκέντρωση στο πλάσμα σε pg / mL των TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , των εκκρινόμενων κυτοκινών (MIP3 $\alpha$ , IFN-g, ILs-1B, 4, 6, 10, 17A, E, F) 23, OPG, SOST) και ορμονών (ινσουλίνη, λεπτίνη, ACTH) και σε ng / mL των πρωτεϊνών φλεγμονώδους απόκρισης οξείας φάσης (CRP, SAP) που απομονώθηκε από CD-1 ποντικούς μολυσμένους με θανατηφόρο δόση ( $10^7$  CFU) του κλινικού στελέχους *K. pneumoniae* LA26. Τα ποντικά έλαβαν ενδοπεριτοναϊκά το ακόλουθο σχήμα θεραπείας: φυσιολογικό ορό, 30 mg / kg μεροπενέμης, 30 mg / kg μεροπενέμης + 20 mg / kg β-IDACYD. Η θεραπεία χορηγείτο κάθε 2 ώρες για 24ωρη περίοδο και λήφθηκε αίμα 0h, 6h, 24h και 140h μετά την έναρξη της θεραπείας. (Η ανάλυση διεξήχθη σε Lumiplex 200 χρησιμοποιώντας τα KIT MILLIPLEX MAP. Οι ράβδοι σφάλματος είναι ενδεικτικές του SEM (n = 3 επαναλήψεις).

## IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### i) Αντιμικροβιακές δράσεις κυκλοδεξτρινών και νανοσωματιδίων

#### ***Νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs και MSPs/AgNPs)***

**AgNPs:** Δεδομένης της ισχυρής βακτηριοκτόνου δράσης των ελεύθερων ιόντων αργύρου, η *in-vitro* αποτελεσματικότητα των νανοσωματιδίων AgNPs δεν ήταν ικανοποιητική (MIC 15 µg/mL, σύντομη ανάκαμψη της βακτηριακής ανάπτυξης στις καμπύλες θανάτωσης). Η πλέον πιθανή εξήγηση είναι ο υπερβολικά αργός ρυθμός απελευθέρωσης ιόντων αργύρου στον οποίο θα πρέπει να αποδοθεί και η χαμηλή κυτταροτοξικότητα των AgNPs. Τα νανοσωματίδια αυτά εμφάνισαν επίσης κυτταροτοξικότητα και αναστολή ανάπτυξης σε *in-vitro* πειράματα με ινοβλάστες ποντικών.

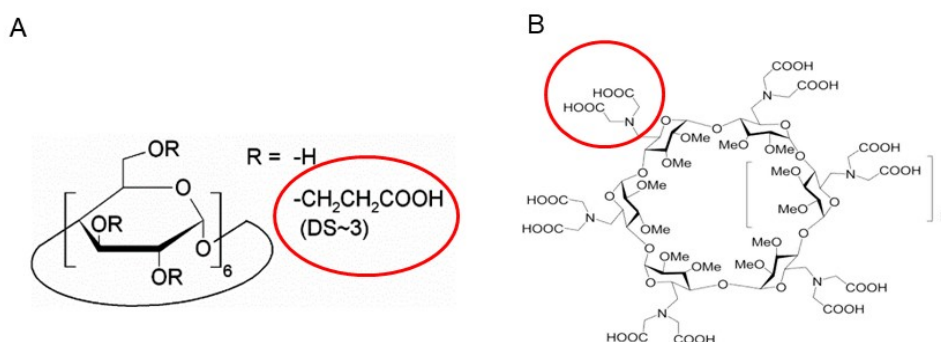
**MSPs/AgNPs:** Η λογική ανάμιξης νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs) με μεσοπορώδη νανοσωματίδια πυριτίου (MSPs) βασίζεται στην ιδέα δημιουργίας μια επιφάνειας MSPs με πόρους κάθετους προς την επιφάνεια του πυρήνα όπου θα βρίσκεται μια μεγάλη πυκνότητα AgNPs. Οι ενεργές ομάδες των AgNPs θα βρίσκονται εκτεθειμένες στην επιφάνεια των μεσοπόρων καναλιών εκφράζοντας τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες. Στα πειράματα προσδιορισμού του MIC τα MSPs/AgNPs εμφάνισαν αντιμικροβιακές ιδιότητες σε συγκεντρώσεις ως και 7,5 µg/mL. Σε πειράματα προσδιορισμού καμπυλών θανάτωσης δεν εμφάνισαν αποτελεσματικότητα, μη αναστέλλοντας την ανάπτυξη των κλινικών στελεχών *K. pneumoniae*, *S. aureus* και *E. coli* σε σύγκριση με το ελεύθερο αντιβιοτικό στο τελικό χρονικό σημείο των 24 ωρών. Τέλος, παρόλο που η παρουσία των MSPs θα μείωνε θεωρητικά την αποδεδειγμένη τοξικότητα του ελεύθερου αργύρου, ο συνδυασμός MSPs/AgNPs εμφανίστηκε ιδιαίτερα τοξικός *in-vitro*, τοξικότερος των AgNPs.

Ως εκ τούτου, δεν κρίθηκε σκόπιμη η περαιτέρω διερεύνηση των αντιβακτηριακών ιδιοτήτων του συγκεκριμένου τύπου νανοσωματιδίων.

### Κυκλοδεξτρίνες (Cyclolab)

Δοκιμάστηκαν 52 κυκλοδεξτρίνες παραγωγής της εταιρίας βιοτεχνολογίας Cyclolab (Ουγγαρία) με σκοπό τον προσδιορισμό των αντιμικροβιακών τους ιδιοτήτων. Οι κυκλοδεξτρίνες αυτές σε συγκεντρώσεις έως και 1.000 μg/mL δεν εμφάνισαν ιδιότητες αναστολής της ανάπτυξης κλινικών στελεχών *A. baumannii*, *K. pneumoniae* και *S. aureus*.

Με βάση τις χηλικές ιδιότητες των ενώσεων με ελεύθερες ομάδες καρβοξυλίων (π.χ. EDTA) οι 8 τεχνητά καρβοξυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες υποτέθηκε ότι θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως αναστολείς των MBL, επανευαισθητοποιώντας κλινικά στελέχη που τις εκφράζουν στις καρβαπενέμες ιμιπενέμη και μεροπενέμη. Σε *in-vitro* δοκιμασίες δεν εμφάνισαν ικανότητες αναστολής των MBL για συγκεντρώσεις έως 100 μM. Επιτυχημένοι χηλικοί παράγοντες που αναστέλλουν MBL όπως είναι οι κυκλοδεξτρίνες α-, β- και γ-IDACYD έχουν σε κάθε πλευρική τους ομάδα διπλά άκρα καρβοξυλίων τα οποία σχηματίζουν φουρκέτες. Γενικά, οι χηλικοί παράγοντες είναι χημικές ενώσεις των οποίων οι δομές επιτρέπουν την ταυτόχρονη προσκόλληση των δύο ή περισσότερων θέσεων δότη στο ίδιο μεταλλικό ιόν ταυτόχρονα και παράγουν έναν ή περισσότερους δακτυλίους. Αντίθετα, οι καρβοξυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες της Cyclolab έχουν μονήρεις ομάδες καρβοξυλίων στις πλευρικές τους ομάδες μην επιτρέποντας την ταυτόχρονη πρόσδεση δύο ιόντων, προϋπόθεση απαραίτητη για την λειτουργία τους ως αναστολείς MBL.



**Εικόνα 31:** Απεικόνιση της καρβοξυλιωμένης κυκλοδεξτρίνης με μονά άκρα καρβοξυλίων CEACD (A) και της καρβοξυλιωμένης κυκλοδεξτρίνης με διπλά άκρα καρβοξυλίων IDACYD (B).



Τέλος, 7 κυκλοδεξτρίνες που είχαν επταπλές θετικά φορτισμένες πλευρικές ομάδες και κρίθηκε ότι θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ανασταλτικά προς αντλίες εκροής αντίστοιχης επταγωνικής συμμετρίας όπως οι Ade της οικογένειας RND δοκιμάστηκαν εναντίων κλινικών στελεχών *Acinetobacter baumannii* ταυτοποιημένων προς την έκφραση τέτοιων αντλιών. Οι κυκλοδεξτρίνες αυτές δεν εμφάνισαν ανασταλτικές ιδιότητες, μην επανευαισθητοποιώντας τα κλινικά στελέχη στην τετρακυκλίνη, αντιβιοτικό που κατά κύριο λόγο αποβάλετε από στελέχη *A. baumannii* μέσω αντλιών του συστήματος Ade.

Συνολικά οι 52 κυκλοδεξτρίνες της CycloLab δεν εμφάνισαν ιδιότητες που να χρίζουν περεταίρω μελέτης.

## ii) Αντιμικροβιακή δράση συμπλόκων κυκλοδεξτρινών με β-λακταμικά

### ***H κυκλοδεξτρίνη γ-Cys***

Η θετικά φορτισμένη οκτάκις(6-(2-αμινομθυλίο)-6-δεόξυ)-γ-κυκλοδεξτρίνη (γ-Cys) εμφανίστηκε να σχηματίζει ισχυρά σύμπλοκα με την πενικιλίνη οξακιλλίνη ( $K_b \sim 1700 \text{ M}^{-1}$ ) σε μια αντίδραση ενθαλπικά και εντροπικά ευνοϊκή ( $\Delta H_b = -10.5 \text{ kJ/mol}$ ,  $\Delta S_b = 8.0 \text{ kJ/mol}$ ). Σε πειράματα φωτομετρίας αποδείχθηκε η ικανότητα της κυκλοδεξτρίνης γ-Cys να προστατεύσει μερικώς την οξακιλλίνη από την β-λακταμάση Oxa-1, μειώνοντας την ταχύτητα υδρόλυσης κατά 2,3 φορές. Επίσης, η γ-Cys εμφάνισε ένα αρκετά ασφαλές προφίλ κυτταροτοξικότητας και την ικανότητα να εισέρχεται σε μακροφάγα κύτταρα, μεταφέροντας και αυξάνοντας την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του αντιβιοτικού της φορτίου. Η αποτελεσματική ενδοκυττάρωση της γ-Cys στα μακροφάγα μπορεί να έχει σημαντικές προεκτάσεις. Η φαγοκυττάρωση των παθογόνων βακτηρίων διαδραματίζει βασικό ρόλο στην ανοσολογική άμυνα του ξενιστή οργανισμού. Είναι εύλογο λοιπόν να υποθέσουμε ότι οι αυξημένες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών εντός των μακροφάγων μέσω της εισαγωγής συμπλόκων γ-Cys / αντιβιοτικών μπορεί να ενισχύσουν τη βακτηριακή θανάτωση (Agnes *et al.*, 2017).

### **Νανοσωματίδια καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης (CMC)/ πολυμερών HTMAPβCD**

Σε αρχικά πειράματα, τα νανοσωματίδια CMC/QAβCD εμφάνισαν πιθανές ιδιότητες προστασίας της καρβαπενέμης μεροπενέμης. Συγκεκριμένα, πειράματα κινητικής έδειξαν ότι αναλογία 0,08 νανοσωματιδίων καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης (CMC):πολυμερών HTMAPβCD προστατεύουν την μεροπενέμη καθώς η παρουσία τους καθυστερεί την αυτουδρόλυσή της. Τα αρχικά αυτά αποτελέσματα δεν επιβεβαιώθηκαν σε *in-vitro* πειράματα καθώς ο συνδυασμός των νανοσωματιδίων δεν προστάτευσε την μεροπενέμη σε πειράματα προσδιορισμού MIC από κλινικά στελέχη που παράγουν MBL. Επίσης, σε πειράματα υδρόλυσης με την MBL VIM-1 η παρουσία νανοσωματιδίων καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης (CMC)/ πολυμερών HTMAPβCD δεν μείωσε την ταχύτητα υδρόλυσης της μεροπενέμης σε σχέση με το ελεύθερο αντιβιοτικό. Συμπερασματικά δεν εμφανίστηκαν ενδείξεις που να χρίζουν περαιτέρω διερεύνησης.

### **iii) Μόρια αναστολείς**

#### **Κυκλοδεξτρίνες AMBnTβCD**

Τεχνητές κυκλοδεξτρίνες που περιέχουν 7 θετικά φορτισμένες ομάδες (7+β-CD) έχειδειχθεί ότι μπλοκάρουν τον πόρο μετατόπισης που σχηματίζεται από την β υπομονάδα των τοξινών άνθρακα. Συγκεκριμένα η κυκλοδεξτρίνη AMBnTβCD σε υπονανομολαρικές συγκεντρώσεις έχει αποδειχθεί ότι μπλοκάρει τον επταμερή πόρο που δημιουργείτε από το προστατευτικό τμήμα αντιγόνου (PA) 62 (PA-63) της τοξίνης του *Bacillus anthrax in-vitro* ενώ σε πειράματα *in-vivo* μόλυνσης με άνθρακα προστάτευσε τους αρουραίους από την θανατηφόρο τοξίνη, ενώ σε συνδυασμό με την σιπροφλοξακίνη αύξησαν σημαντικά τα επίπεδα επιβίωσης των πειραματόζων. Καθώς οι πορίνες του συστήματος αντλιών εκροής RND του στελέχους *A. baumannii* εμφανίζουν ίδια επταμερή συμμετρία όπως η PA-63 υποτέθηκε ότι η κυκλοδεξτρίνη AMBnTβCD θα μπορούσε να δράσει ανασταλτικά επανευαισθητοποιώντας κλινικά στελέχη που τις εκφράζουν σε αντιβιοτικά που επηρεάζονται από την λειτουργία τέτοιων αντλιών, όπως η τετρακυκλίνη. Αποδείχθηκε πειραματικά ότι η κυκλοδεξτρίνη AMBnTβCD όντως επανευαισθητοποιεί κλινικά στελέχη που εκφράζουν αντλίες RND στην τετρακυκλίνη μείωντας το MIC της τετρακυκλίνης σημαντικά έως

και 128 φορές. Η παρατήρηση επιβεβαιώθηκε σε πειράματα προσδιορισμού καμπυλών θανάτωσης όπου το βακτηριακό φορτίο παρουσία της AMBnTβCD μειώθηκε τουλάχιστον  $1,5 \log_{10}$  σε σύγκριση με εκείνο του ελεύθερου αντιβιοτικού μετά από 24 ώρες επώαση. Οι κυκλοδεξτρίνες AMBnTβCD εμφανίζουν δυνατότητες αναστολής αντλιών RND κλινικών στελεχών *A. baumannii*, και χρειάζεται περεταίρω χαρακτηρισμός των ανασταλτικών και τοξικολογικών τους ιδιοτήτων τόσο *in-vitro* όσο και *in-vivo*.

### **Οι κυκλοδεξτρίνες IDACYD**

Οι εξάκις-, επτάκις- και οκτάκις- (6-δύοξυ-6-ιμινοδιόξυ-2,3-Ο-μέθυλ) κυκλοδεξτρίνες α-, β- και γ- IDACYD εμφάνισαν ισχυρές ικανότητες επανευαισθητοποίησης κλινικών Gram αρνητικών στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες στις καρβαπενέμες σε *in-vitro* πειράματα προσδιορισμού του MIC. Συγκεκριμένα, η μονοισομερής, τετραδεκάκις καρβοξυλιωμένη, υποκαταστημένη με ιμινοδιασετικό οξύ β-κυκλοδεξτρίνη (β-IDACYD), μεθυλιωμένη στην δευτερεύουσα πλευρά της αποδείχθηκε ότι επαναφέρει πλήρως την δραστικότητα των καρβαπενεμών (ιμιπενέμης και μεροπενέμης) έναντι Gram-αρνητικών κλινικών στελεχών που παράγουν MBL (NDM, VIM, IMP) τόσο *in-vivo* όσο και *in-vitro*. Η δραστικότητας της σε πειράματα *in-vitro* ήταν ισχυρή μειώνοντας το MIC καρβαπενεμών εναντίων κλινικών στελεχών που παράγουν MBL έως και 256 φορές, ενώ σε πειράματα time-kill μείωσε το βακτηριακό φορτίο (CFU/mL) κατά  $>8 \log_{10}$  με το πέρας 24 ωρών. Η δραστικότητα αυτή ποσοτικοποιήθηκε σε πειράματα προσδιορισμού του IC50 έναντι των τριών κλινικά σημαντικότερων MBL (VIM, NDM, IMP). Η κατώτατη συγκέντρωση κυκλοδεξτρίνης που εμφανίζει την μέγιστη δραστικότητα ενάντιων MBL, όπως προσδιορίστηκε σε πειράματα checkerboard είναι 50 μΜ.

Έχει πρόσφατα αποδειχθεί ότι οι MBL διασχίζουν την εσωτερική μεμβράνη του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος ως ξεδιπλωμένα πεπτιδία μέσω του συστήματος Sec και ότι αργότερα διπλώνονται και αποκτούν τα απαραίτητα για την ενζυμική τους δράση δισθενή ιόντα  $Zn^{+2}$  στον περιπλασμικό χώρο (Morán-Barrío, Limansky και Viale, 2009). Είναι συνεπώς απαραίτητο για κάθε επιτυχή αναστολέα MBL να διασχίσει την εξωτερική μεμβράνη και να εισέλθει στον περιπλασμικό χώρο, προκειμένου να έχει πρόσβαση στις β-λακταμάσες. Η αποτελεσματική εσωτερίκευση

του β-IDACYD μαζί με την ανασταλτική επίδραση που παρατηρείται στις δοκιμασίες MIC και χρόνου-θανάτωσης υποδηλώνει μια άμεση ενδοπεριπλασματική αλληλεπίδραση μεταξύ των εκφραζόμενων MBLs και του αναστολέα.

Σε πειράματα κυτταροτοξικότητας *in-vitro* και τοξικότητας *in-vivo* είχε ένα μη τοξικό προφίλ. Εμφάνισε επίσης υψηλή βιοδιαθεσιμότητα ενώ δεν ενεργοποίησε καμία ανοσοποιητική απόκριση όπως αυτή προσδιορίστηκε σε πειράματα τεχνολογίας lumipex. Όσον αφορά της χηλικές της ιδιότητες, αποδείχθηκε ότι δεν επηρεάζει την ομοιόσταση άλλων ιόντων όπως το ασβέστιο, ο σίδηρος, το μαγνήσιο και ο φώσφορος. Η *in-vivo* φαρμακοκινητική της είναι συμβατή με αυτή της μεροπενέμης, επιτυγχάνοντας έναν ισχυρά θεραπευτικό συνδυασμό μεροπενέμης/ β-IDACYD σε μοντέλα τοπικής λοίμωξης στον μηρό και γενικευμένης βακτηριαμίας. Συγκεκριμένα η παρουσία κλινικών βακτηρίων που παράγουν MBL (NDM) στο αίμα ποντικών μειώθηκε κατά  $4 \log_{10}$ , στην σπλήνα κατά  $4,8 \log_{10}$  και στο ήπαρ κατά  $3 \log_{10}$  CFU συγκρινόμενα με τα επίπεδα βακτηριακού φορτίου της μονοθεραπείας με μεροπενέμη.

Η κυκλοδεξτρίνη β-IDACYD-OH με υδροξυλιώμενη την δευτορεγενή πλευρά της εμφάνισε επίσης ικανότητες επανευαισθητοποίησης κλινικών στελεχών που παράγουν MBL σε καρβαπενέμες. Σε όλες τις περιπτώσεις όπως και με το μεθυλιωμένο παράγωγο της που εξετάστηκε εκτενώς μείωσε το MIC της μεροπενέμης και της ιμιπενέμης έως και >256 φορές ακόμα και εάν υπήρχε συν-έκφραση β-λακταμασών σερίνης (κεφαλοσπορινάσες) ή β-λακταμάσες ευρέος φάσματος όπως οι CMY και οι CTX-M. Συνολικά οι κυκλοδεξτρίνες β-IDACYD και α-IDACYD εμφάνισαν υψηλότερη δραστηριότητα από τις αντίστοιχες β-IDACYD-OH και γ-IDACYD.

Συνολικά τα πειράματα έδειξαν ότι η συγχορήγηση του β-IDACYD με καρβαπενέμες, όπως η ιμιπενέμη και μεροπενέμη, αποτελεί αποτελεσματική και ικανή θεραπευτική προσέγγιση.

## V. ΣΥΝΟΨΗ

Από τις κυκλοδεξτρίνες που μελετήθηκαν προέκυψαν ευρήματα που υποστηρίζουν την χρήση τεχνητών τέτοιων μορίων ως οχήματα μεταφοράς και προστασίας αντιβιοτικών από τους μηχανισμούς υδρόλυσης των β-λακταμασών ή και μόρια ενίσχυσης της δράσης αντιβιοτικών σε περιπτώσεις συν-χορήγησης των δύο. Η λεπτομερής ανάλυση των κυκλοδεξτρίνων IDACYD και ειδικά της β-IDACYD έναντι κλινικών στελεχών που παράγουν MBL ανέδειξε τις ανασταλτικές τους ιδιότητες επανευαισθητοποιώντας τα στελέχη αυτά στις καρβαπενέμες ιμιπενέμη και μεροπενέμη. Οι τεχνητές αυτές κυκλοδεξτρίνες αποτελούν μια νέα τάξη ισχυρών αναστολέων MBL, ικανές για την θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων Gram αρνητικών παθογόνων που παράγουν κλινικά σημαντικές MBL. Οι IDACYDs λειτουργούν ενισχύοντας ή επανενεργοποιώντας τις καρβαπενέμες επιτρέποντας την θεραπεία λοιμώξεων που δεν μπορούν να θεραπευτούν με τα επί του παρόντος κλινικά διαθέσιμα αντιβιοτικά μεμονωμένα ή και με συνδυασμούς τους. Τα ερευνητικά ευρήματα υποστηρίζουν ότι οι IDACYDs δεν παρουσιάζουν κυτταροτοξικότητα ή οξεία τοξικότητα ενώ δεν προκαλούν ανοσολογική ή φλεγμονώδη αντίδραση.

Παράλληλα, η κυκλοδεξτρίνη γ-Cys εμφανίστηκε ικανή να προστατεύσει μερικώς την οξακίλλινη από τους μηχανισμούς υδρόλυσης των οξακαλλινιασών (oxa-1) ενώ εμφάνισε την ιδιότητα να εισέρχεται σε μακροφάγα χωρίς να παρουσιάζει σημάδια τοξικότητας. Η γ-Cys αποτελεί ένα ενδιαφέρον σύστημα προστασίας των β-λακταμικών αντιβιοτικών. Τέλος, οι τεχνητές κυκλοδεξτρίνες AMBnTβCD με τις χαρακτηριστικές επτά κατιονικές ομάδες τους εμφάνισαν ιδιότητες παρεμπόδισης των αντλιών εκροής RND που εμφανίζουν επταμερή συμμετρία, επανευαισθητοποιώντας κλινικά στελέχη που τις εκφράζουν στην τετρακυκλίνη.

Συνολικά, η έρευνα στον τομέα των κυκλοδεξτρίνων ως μόρια προστασίας ή ενίσχυσης αντιβιοτικών μπορεί να αποτελέσει μια λύση στο αυξανόμενο πρόβλημα της αντιμικροβιακής αντοχής και της απουσίας δημιουργίας νέων τάξεων αντιβιοτικών τα τελευταία 25 χρόνια.

## VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Yang, D. C., Blair, K. M., & Salama, N. R. (2016). Staying in Shape: the Impact of Cell Shape on Bacterial Survival in Diverse Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/membr.00031-15>
2. Yelin, I., & Kishony, R. (2018). Antibiotic Resistance. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.018>
3. Toney, J. H., Fitzgerald, P. M. D., Grover-Sharma, N., Olson, S. H., May, W. J., Sundelof, J. G., ... Hammond, G. G. (1998). Antibiotic sensitization using biphenyl tetrazoles as potent inhibitors of *Bacteroides fragilis* metallo- $\beta$ -lactamase. *Chemistry and Biology*. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(98\)90632-9](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(98)90632-9)
4. Walsh, C. (2004). Where will new antibiotics come from? *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro727>
5. Kurosaki, H., Yamaguchi, Y., Higashi, T., Soga, K., Matsueda, S., Yumoto, H., Goto, M. (2005). Irreversible inhibition of metallo- $\beta$ -lactamase (IMP-1) by 3-(3-mercaptopropionylsulfanyl)-propionic acid pentafluorophenyl ester. *Angewandte Chemie - International Edition*. <https://doi.org/10.1002/anie.200500835>
6. Poole, A. M., & Penny, D. (2007). Evaluating hypotheses for the origin of eukaryotes. *BioEssays*. <https://doi.org/10.1002/bies.20516>
7. Hendrik, T. C., Voorintholt, A. F., & Vos, M. C. (2015). Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase- Producing klebsiella spp: A systematic review and meta-Analyses. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140754>
8. Damier-Piolle, L., Magnet, S., Brémont, S., Lambert, T., & Courvalin, P. (2008). AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.00732-07>
9. Scholar, E. (2011). Macrolides. In *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61016-5>
10. Khan, A. R., Forgo, P., Stine, K. J., & D'Souza, V. T. (1998). Methods for selective modifications of cyclodextrins. *Chemical Reviews*. <https://doi.org/10.1021/cr970012b>

11. Toney, J. H., Hammond, G. G., Fitzgerald, P. M. D., Sharma, N., Balkovec, J. M., Rouen, G. P., ... Gao, Y. D. (2001). Succinic Acids as Potent Inhibitors of Plasmid-borne IMP-1 Metallo- $\beta$ -lactamase. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104742200>
12. Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>
13. Loftsson, T., & Brewster, M. E. (2012). Cyclodextrins as functional excipients: Methods to enhance complexation efficiency. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. <https://doi.org/10.1002/jps.23077>
14. Nikaido, H., & Takatsuka, Y. (2009). Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.10.004>
15. Nelson, M. L., & Levy, S. B. (2011). The history of the tetracyclines. *Annals of the New York Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06354.x>
16. Piddock, L. J. V. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nature Reviews. Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1464>
17. Walter, M. W., Felici, A., Galleni, M., Soto, R. P., Adlington, R. M., Baldwin, J. E. Schofield, C. J. (1996). Trifluoromethyl alcohol and ketone inhibitors of metallo- $\beta$ -lactamases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. [https://doi.org/10.1016/0960-894X\(96\)00453](https://doi.org/10.1016/0960-894X(96)00453)
18. Tran, J. H., & Jacoby, G. A. (2002). Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.082092899>
19. Yang, K. W., & Crowder, M. W. (1999). Inhibition studies on the metallo- $\beta$ -lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1293>
20. Hegstad, K., Mikalsen, T., Coque, T. M., Werner, G., & Sundsfjord, A. (2010). Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Clinical Microbiology and Infection*. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03226.x>

21. Barlow, M. (2009). What antimicrobial resistance has taught us about horizontal gene transfer. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-853-9\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-853-9_23)
22. Eckford, P. D. W., & Sharom, F. J. (2009). ABC Efflux Pump-Based Resistance to Chemotherapy Drugs. *Chemical Reviews*. <https://doi.org/10.1021/cr9000226>
23. Delcour, A. H. (2009). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005>
24. Aldred, K. J., Kerns, R. J., & Osheroff, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi5000564>
25. Paulsen, I. T. (2003). Multidrug efflux pumps and resistance: Regulation and evolution. *Current Opinion in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.08.005>
26. Mollard, C., Moali, C., Papamicael, C., Damblon, C., Vessilier, S., Amicosante, G., Roberts, G. C. K. (2001). Thiomandelic acid, a broad spectrum inhibitor of zinc  $\beta$ -lactamases. Kinetic and spectroscopic studies. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107054200>
27. Naylor, N. R., Atun, R., Zhu, N., Kulasabanathan, K., Silva, S., Chatterjee, A., Robotham, J. V. (2018). Estimating the burden of antimicrobial resistance: a systematic literature review. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0336-y>
28. Jacoby, G. A., & Munoz-price, L. S. (2005). The New Beta-Lactamases. *NEJM*.
29. Y. Mahmood, H., Jamshidi, S., Mark Sutton, J., & M. Rahman, K. (2016). Current Advances in Developing Inhibitors of Bacterial Multidrug Efflux Pumps. *Current Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160304150522>
30. Martina, K., & Cravotto, G. (2012). Cyclodextrins. In *Handbook of Analysis of Active Compounds in Functional Foods*. <https://doi.org/10.1201/b11653>
31. Diene, S. M., & Rolain, J. M. (2014). Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter species. *Clinical Microbiology and Infection*. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12655>
32. Clardy, J., Fischbach, M. A., & Currie, C. R. (2009). The natural history of antibiotics. *Current Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.04.001>



33. Kuroda, T., & Tsuchiya, T. (2009). Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.012>
34. Gyssens, I. C. (2014). Glycopeptides. In *Fundamentals of Antimicrobial Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-75613-4\\_12](https://doi.org/10.1007/978-0-387-75613-4_12)
35. Costa, C., Dias, P. J., Sá-Correia, I., & Teixeira, M. C. (2014). MFS multidrug transporters in pathogenic fungi: Do they have real clinical impact? *Frontiers in Physiology*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00197>
36. Coyne, S., Rosenfeld, N., Lambert, T., Courvalin, P., & Péricchon, B. (2010). Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.00155-10>
37. Johnson, J. W., Gretes, M., Goodfellow, V. J., Marrone, L., Heynen, M. L., Strynadka, N. C. J., & Dmitrienko, G. I. (2010). Cyclobutanone analogues of  $\beta$ -lactams revisited: Insights into conformational requirements for inhibition of serine- and metallo- $\beta$ -lactamases. *Journal of the American Chemical Society*. <https://doi.org/10.1021/ja9086374>
38. Eswaran, J., Koronakis, E., Higgins, M. K., Hughes, C., & Koronakis, V. (2004). Three's company: Component structures bring a closer view of tripartite drug efflux pumps. *Current Opinion in Structural Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.10.003>
39. Diggle, S. P., & Williams, P. (2013). Quorum Sensing. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01252-3>
40. Kong, K. F., Schneper, L., & Mathee, K. (2010). Beta-lactam antibiotics: From antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x>
41. Gniadkowski, M. (2008). Evolution of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases by mutation. *Clinical Microbiology and Infection*. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01854.x>
42. Meini, M.-R., Llarrull, L., & Vila, A. (2014). Evolution of Metallo- $\beta$ -lactamases: Trends Revealed by Natural Diversity and in vitro Evolution. *Antibiotics*. <https://doi.org/10.3390/antibiotics3030285>

43. Holmes, N. E., & Lindsay Grayson, M. (2017). Sulfonamides. In *Kucers the Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, Antiparasitic, and Antiviral Drugs, Seventh Edition*. <https://doi.org/10.1201/9781315152110>
44. Raszka, W. V. (2004). Principles of Microbiology. In *Pediatrics*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-01199-0.50017-7>
45. Drawz, S. M., & Bonomo, R. A. (2010). Three decades of  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00037-09>
46. Maffeo, D., Lampropoulou, M., Fardis, M., Lazarou, Y. G., Mavridis, I. M., Mavridou, D. A. I., Yannakopoulou, K. (2010). Novel polycarboxylated EDTA-type cyclodextrins as ligands for lanthanide binding: Study of their luminescence, relaxivity properties of Gd(III) complexes, and PM3 theoretical calculations. *Organic and Biomolecular Chemistry*. <https://doi.org/10.1039/b924980j>
47. Wright, G. D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.002>
48. Loftsson, T., & Brewster, M. E. (1996). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. <https://doi.org/10.1021/js950534b>
49. Carpentier, B. (2014). Biofilms. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00039-2>
50. Kumar, S., Mukherjee, M. M., & Varela, M. F. (2013). Modulation of Bacterial Multidrug Resistance Efflux Pumps of the Major Facilitator Superfamily. *International Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1155/2013/204141>
51. Santamaría, J., & Toranzos, G. A. (2003). Enteric pathogens and soil: A short review. *International Microbiology*.
52. Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
53. Llarrull, L. I., Testero, S. A., Fisher, J. F., & Mobashery, S. (2010). The future of the  $\beta$ -lactams. *Current Opinion in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.09.008>
54. Towne, T. G. (2014). Aminoglycosides. In *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00234-7>

55. Hall, B. G., & Barlow, M. (2005). Revised Ambler classification of  $\beta$ -lactamases [1]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1093/jac/dki130>
56. Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R. Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
57. Di Giulio, M. (2003). The Universal Ancestor and the Ancestor of Bacteria Were Hyperthermophiles. *Journal of Molecular Evolution*. <https://doi.org/10.1007/s00239-003-2522-6>
58. Fux, C. A., Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Stoodley, P. (2005). Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.010>
59. Challa, R., Ahuja, A., Ali, J., & Khar, R. K. (2006). Cyclodextrins in drug delivery: An updated review. *AAPS PharmSciTech*. <https://doi.org/10.1208/pt060243>
60. Stavri, M., Piddock, L. J. V., & Gibbons, S. (2007). Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl460>
61. Berendonk, T. U., Manaia, C. M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Martinez, J. L. (2015). Tackling antibiotic resistance: The environmental framework. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>
62. Paulsen, I. T., Skurray, R. A., Tam, R., Saier, M. H., Turner, R. J., Weiner, J. H., Grinius, L. L. (1996). The SMR family: A novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02462.x>
63. Bush, K. (2010). Bench-to-bedside review: The role of  $\beta$ -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Critical Care*. <https://doi.org/10.1186/cc8892>
64. Faridoon, & Ul Islam, N. (2013). An update on the status of potent inhibitors of Metallo- $\beta$ -lactamases. *Scientia Pharmaceutica*. <https://doi.org/10.3797/scipharm.1302-08>
65. Coyne, S., Courvalin, P., & P erichon, B. (2011). Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.01388-10>

66. Chen, H., Athar, R., Zheng, G., & Williams, H. N. (2011). Prey bacteria shape the community structure of their predators. *ISME Journal*. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.4>
67. Peleg, A. Y., Seifert, H., & Paterson, D. L. (2008). Acinetobacter baumannii: Emergence of a successful pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-07>
68. Roca, I., Espinal, P., Martí, S., & Vila, J. (2011). First Identification and Characterization of an AdeABC-Like Efflux Pump in Acinetobacter Genomespecies 13TU . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/aac.01142-10>
69. Scheffers, D.-J., & Pinho, M. G. (2005). Bacterial Cell Wall Synthesis: New Insights from Localization Studies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/mmbr.69.4.585-607.2005>
70. Fernebro, J. (2011). Fighting bacterial infections - Future treatment options. *Drug Resistance Updates*. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2011.02.001>
71. Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A. K., & Doble, M. (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.06.008>
72. Morel, C., Stermitz, F. R., Tegos, G., & Lewis, K. (2003). Isoflavones as potentiators of antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf0302714>
73. Markham, P. N., Westhaus, E., Klyachko, K., Johnson, M. E., & Neyfakh, A. A. (1999). Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of Staphylococcus aureus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
74. Neyfakh, A. A., Bidnenko, V. E., & Chen, L. B. (2006). Efflux-mediated multidrug resistance in Bacillus subtilis: similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.11.4781>
75. Smith, E. C. J., Kaatz, G. W., Seo, S. M., Wareham, N., Williamson, E. M., & Gibbons, S. (2007). The phenolic diterpene totarol inhibits multidrug efflux pump activity in Staphylococcus aureus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.00216-07>
76. Kriengkauykiat, J., Porter, E., Lomovskaya, O., & Wong-Beringer, A. (2005). Use of an efflux pump inhibitor to determine the prevalence of efflux pump-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in

*Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.565-570.2005>

77. Grossman, T. H., Shoen, C. M., Jones, S. M., Jones, P. L., Cynamon, M. H., & Locher, C. P. (2015). The efflux pump inhibitor timcodar improves the potency of antimycobacterial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.04271-14>
78. Ying, Y. C., Yong, M. O., & Kim, L. C. (2007). Synergistic interaction between phenothiazines and antimicrobial agents against *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.01033-06>
79. Sabatini, S., Gosetto, F., Manfroni, G., Tabarrini, O., Kaatz, G. W., Patel, D., & Cecchetti, V. (2011). Evolution from a natural flavones nucleus to obtain 2-(4-propoxyphenyl) quinoline derivatives as potent inhibitors of the *S. aureus* NorA efflux pump. *Journal of Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jm200370y>
80. Zechini, B., & Versace, I. (2009). Inhibitors of Multidrug Resistant Efflux Systems in Bacteria. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*. <https://doi.org/10.2174/157489109787236256>
81. Nakayama, K., Ishida, Y., Ohtsuka, M., Kawato, H., Yoshida, K. I., Yokomizo, Y., Watkins, W. J. (2003). MexAB-OprM-specific efflux pump inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. Part 1: Discovery and early strategies for lead optimization. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2003.07.024>
82. Brown, K. L., & Hancock, R. E. W. (2006). Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current Opinion in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.11.004>
83. Morán-Barrio, J., Limansky, A. S., & Viale, A. M. (2009). Secretion of GOB metallo- $\beta$ -lactamase in *Escherichia coli* depends strictly on the cooperation between the cytoplasmic DnaK chaperone system and the Sec machinery: Completion of folding and Zn(II) ion acquisition occur in the bacterial periplasm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.01637-08>
84. Agnes, M., Thanassoulas, A., Stavropoulos, P., Nounesis, G., Miliotis, G., Miriagou, V., Yannakopoulou, K. (2017). Designed positively charged cyclodextrin hosts with enhanced binding of penicillins as carriers for the delivery of antibiotics: The case of oxacillin. *International Journal of Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.04.080>

85. Fleming, A. (1922). On a Remarkable Bacteriolytic Element found. *The Royal Society*. <https://doi.org/10.1098/rspb.1922.0023>
86. Gniadkowski, M. (2001). Evolution and epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clinical Microbiology and Infection*. <https://doi.org/10.1046/j.1198-743X.2001.00330.x>
87. Bush, K., & Bradford, P. A. (2016).  $\beta$ -lactams and  $\beta$ -lactamase inhibitors: An overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>
88. Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L., & Nordmann, P. (2005). Metallo- $\beta$ -lactamases: The quiet before the storm? *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.306-325.2005>
89. E.C.J., S., G.W., K., S.M., S., N., W., E.M., W., S., G., Gibbons, S. (2007). The phenolic diterpene totarol inhibits multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. <https://doi.org/10.1128/AAC.00216-07>
90. Bodył, A., & Mackiewicz, P. (2013). Endosymbiotic Theory. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01678-8>
91. Young, K. D. (2007). Bacterial morphology: why have different shapes? *Current Opinion in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.009>
92. Esterly, J. S., Richardson, C. L., Eltoukhy, N. S., Qi, C., & Scheetz, M. H. (2011). Genetic mechanisms of antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii*. *Annals of Pharmacotherapy*. <https://doi.org/10.1345/aph.1P084>
93. Yoon, E.-J., Courvalin, P., & Grillot-Courvalin, C. (2013). RND-Type Efflux Pumps in Multidrug-Resistant Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*: Major Role for AdeABC Overexpression and AdeRS Mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/aac.02556-12>
94. Lowe, J. (1982). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. [https://doi.org/10.1016/S0065-7743\(08\)60495-9](https://doi.org/10.1016/S0065-7743(08)60495-9)
95. Aremu, O. S., Gopaul, K., Kadam, P., Singh, M., Mocktar, C., Singh, P., & Koorbanally, N. A. (2016). Synthesis, Characterization, Anticancer and Antibacterial Activity of Some Novel Pyrano[2,3-d]pyrimidinone Carbonitrile Derivatives. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.2174/1871520616666160813213245>

96. Pal, C., Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., & Larsson, D. G. J. (2016). The structure and diversity of human, animal and environmental resistomes. *Microbiome*. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0199-5>
97. Roberts, M. C. (2005). Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.02.034>
98. Gillen, A. L., & Sherwin III, F. J. (2008). Louis Pasteur's Views on Creation, Evolution, and the Genesis of Germs. *Answers Research Journal*.
99. Jean, S. S., Gould, I. M., Lee, W. Sen, & Hsueh, P. R. (2019). New Drugs for Multidrug-Resistant Gram-Negative Organisms: Time for Stewardship. *Drugs*. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01112-1>
100. Sagan Margulis, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*.
101. Chen, J., Shang, X., Hu, F., Lao, X., Gao, X., Zheng, H., & Yao, W. (2013). β-Lactamase Inhibitors: An Update. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.2174/13895575113139990074>
102. ECDC. (2018). Surveillance of antimicrobial resistance in Europe (2017). In *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe*. <https://doi.org/10.2900/296939>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η υψηλή συχνότητα λοιμώξεων από πολυανθεκτικά στελέχη διαφόρων παθογόνων μικρο-οργανισμών, κυρίως σε νοσοκομειακούς ασθενείς, έχει διεθνώς αναγνωριστεί ως ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα δημόσιας υγείας. Οι κύριες κατευθύνσεις για την αντιμετώπιση του προβλήματος είναι α) ο πολυεπίπεδος περιορισμός της διασποράς των ανθεκτικών στελεχών και β) η ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Μεταξύ των τελευταίων έχει προταθεί και η χρήση νανοφορέων βασισμένων σε κυκλοδεξτρίνες για τη στοχευμένη μεταφορά των αντιβιοτικών στις εστίες λοίμωξης (βελτίωση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων) καθώς και την προστασία τους από τους μηχανισμούς αντοχής. Επιπλέον, ειδικά διαμορφωμένα και ελεύθερα αντιβιοτικών νανοσωματίδια θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν είτε ως άμεσοι αντιμικροβιακοί παράγοντες (π.χ. τοξική δράση στο βακτηριακό τοίχωμα) είτε έμμεσα ως καταστολείς σημαντικών μηχανισμών αντοχής (π.χ. παρεμπόδιση της δράσης βακτηριακών αντλιών εκροής αντιβιοτικών ή αναστολή της ενζυμικής δράσης των MBL). Τέτοιοι νανοφορείς είναι οι κυκλοδεξτρίνες, μια οικογένεια κυκλικών μορίων ζάχαρης που παράγονται από το άμυλο με την διαδικασία της ενζυμικής μετατροπής. Οι ιδιότητες τους έχουν μελετηθεί εκτενώς για πάνω από έναν αιώνα και μέχρι σήμερα απαντώνται σαν κύριο συστατικό σε πάνω από 60 προϊόντα φαρμακευτικών σκευασμάτων και έχουν την έγκριση του Αμερικανικού, του Ευρωπαϊκού και του Ιαπωνικού Οργανισμού Φαρμάκων. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν φυσικά και τεχνητά νανοσωματίδια και κυκλοδεξτρίνες είτε ως φορείς των κλινικά διαθέσιμων αντιμικροβιακών ουσιών είτε ως άμεσοι αντιμικροβιακοί παράγοντες, είτε ως έμμεσοι καταστέλλοντες σημαντικούς και κύριους μηχανισμούς αντοχής.

Αρχικά, στο πρώτο σκέλος της μελέτης εξετάστηκαν οι αντιμικροβιακές ιδιότητες κυκλοδεξτρινών και νανοσωματιδίων. Τα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs) που δοκιμάστηκαν είτε μόνα τους είτε σε συνδυασμό με μεσοπορώδοι νανοσωματίδια πυριτίου (MSPs), παραγωγής του Πανεπιστημίου της Κατάνια (Ιταλία), εμφάνισαν βακτηριοκτόνες ιδιότητες έναντι σειράς κλινικών Gram θετικών και αρνητικών στελεχών σε in-vivo πειράματα προσδιορισμού του MIC και του MBC σε συγκεντρώσεις έως 7.5 µg/mL. Παράλληλα, εμφάνισαν κυτταροτοξικότητα



προκαλώντας ταυτόχρονη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης. Ως αντιμικροβιακοί παράγοντες εξετάστηκαν ακολούθως μία σειρά τροποποιημένων φυσικών κυκλοδεξτρινών α-,β- και γ- που παράχθηκαν από την CyloLab (Ουγγαρία), χωρίς κάποιος παράγοντας να εμφανίσει δυνατότητες αναστολής της ανάπτυξης κλινικών στελεχών in-vitro.

Στο δεύτερο σκέλος τη μελέτης ελέγχθηκαν οι ιδιότητες νανοσωματιδίων/κυκλοδεξτρινών να φέρουν β-λακταμικά αντιβιοτικά, προστατεύοντας τα από τους μηχανισμούς υδρόλυσης των β-λακταμασών. Νανοσωματιδία καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης (CMC)/ πολυμερών HTMAPβCD που παράχθηκαν στο Πανεπιστήμιο της Ισλανδίας (Ισλανδία), εμφάνισαν σε αρχικά βιοχημικά πειράματα ιδιότητες προστασίας της καρβαπενέμης μεροπενέμης μέσω εγκόλπωσης του β-λακταμικού δακτυλίου στο εσωτερικού του συμπλέγματος CMC/HTMAPβCD. Όμως, σε πειράματα υδρολύσεων από MBL καθώς και σε πειράματα μικροαραιώσεων in-vitro, οι προστατευτικές αυτές ιδιότητες δεν επιβεβαιώθηκαν. Η θετικά φορτισμένη οκτάκις (6-(2-αμινομθυλίο)-6-δεόξυ)-γ-κυκλοδεξτρίνη (γ-Cys), παραγωγής του του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος (Ελλάδα), εμφανίστηκε να σχηματίζει ισχυρά σύμπλοκα με την πενικιλίνη οξακυλλίνη, προστατεύοντας την μερικώς από την από την καρβαπενεμάση Oxa-1, μειώνοντας την ταχύτητα υδρόλυσής της σε πειράματα φωτομετρίας. In-vitro, εμφάνισε ένα επιθυμητό τοξικολογικό προφίλ, καθώς δεν παρουσιάστηκαν σημάδια κυτταροτοξικότητας ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις. Τέλος, εξακριβώθηκε η ιδιότητά της να εισέρχεται σε μακροφάγα κύτταρα, μεταφέροντας και αυξάνοντας την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του αντιβιοτικού της φορτίου.

Στο τρίτο σκέλος της μελέτης εξετάστηκαν τεχνητές κυκλοδεξτρίνες για την δράση τους ως μόρια αναστολές κατά διαδεδομένων μηχανισμών αντιμικροβιακής αντοχής όπως οι αντλίες εκροής και οι MBL. Οι κυκλοδεξτρίνες AMBηTβCD, παραγωγής του της Innovative Biologics (Η.Π.Α.), που περιέχουν 7 θετικά φορτισμένες ομάδες (7+β-CD) μελετήθηκαν ως ανασταλτικοί παράγοντες συστημάτων αντλιών εκροής RND επταπλής συμμετρίας, κλινικών στελεχών *A. baumannii*. Σε νανομοριακές συγκεντρώσεις, επανευαισθητοποίησαν, in-vitro, κλινικά στελέχη που εκφράζουν αντλίες RND στην τετρακυκλίνη και σιπροφλοξίνη. Η δραστηριότητα τους

αποδείχθηκε τόσο σε πειράματα προσδιορισμού MIC όσο και σε πειράματα προσδιορισμού καμπυλών θανάτωσης όπου το βακτηριακό φορτίο παρουσία της AMBnTβCD μειώθηκε τουλάχιστον  $1,5 \log_{10}$  σε σύγκριση με εκείνο του ελεύθερου αντιβιοτικού μετά από 24 ώρες επώαση. Οι τεχνητά καρβοξυλιώμενες κυκλοδεξτρίνες IDACYDs, παραγωγής του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος (Ελλάδα), μελετήθηκαν ως προς την ιδιότητα τους να αναστέλλουν την δράση των ΜΒΛ, εμφανίζοντας χηλικές ιδιότητες προς τα δισθενή ιόντα ψευδαργύρου που χρειάζονται οι λακταμάσες αυτές για την ενζυμική τους δράση, επαναευσθετοποιώντας κλινικά στελέχη στις καρβαπενέμες. Οι κυκλοδεξτρίνες αυτές επανάφεραν πλήρως την δραστικότητα της ιμιπενέμης και μεροπενέμης σε in-vitro πειράματα με Gram αρνητικά κλινικά στελέχη χαρακτηρισμένα για την παραγωγή των τριών κύριων ΜΒΛ (VIM-1, NDM-1 και IMP-1). Η κυκλοδεξτρίνη εμφάνισε ένα μη τοξικό προφίλ τόσο in-vitro όσο και in-vivo, εμφανίζοντας υψηλή βιοδιαθεσιμότητα στο πλάσμα τόσο ανθρώπινης όσο και ποντικίσιας προέλευσης. Η παρουσία της ήταν καλά ανεκτή στα ποντίκια, μην προκαλώντας ανεπιθύμητη ανοσοαπόκριση. Σε in-vivo πειράματα θεραπευτικής, συνεργιστικής της δράσης με την μεροπενέμη σε ποντίκια στα οποία είχε προκληθεί σηψαιμία με θανατηφόρο δόση ενός NDM-1 κλινικού στελέχους *K. pneumoniae*, η παρουσία της β-IDACYD μείωσε το βακτηριακό φορτίο περισσότερο από  $4 \log_{10}$  τόσο στο αίμα όσο και στην σπλήνα επαναφέροντας την δραστικότητα της μεροπενέμης. Το τοξικολογικό και ισχυρά ανασταλτικό προφίλ της β-IDACYD την καθιστά έναν ικανό παράγοντα συν-θεραπείας με καρβαπενέμες έναντι Gram αρνητικών βακτηρίων που παράγουν ΜΒΛ.

## SUMMARY

The increasing frequency of multidrug resistant bacterial infections in nosocomial settings is widely recognized as one of the most urgent public health problems. The main directions to compact the dire consequences of the multidrug resistance threat are: a) the multifaceted containment of the spreading of multidrug resistant strains and b) the development of new therapeutical approaches. Among the latter, the use of cyclodextrin based nanocarriers has been proposed for the targeted carrying of antibiotic substances at the site of infection (improving their pharmacokinetic properties) as well as for their protection from antimicrobial resistance mechanisms. Furthermore, modified and antibiotic free nanoparticles could be used either as direct antimicrobial agents (e.g. by exerting toxic activity on the bacterial cell wall) or as indirect inhibitors of important resistance mechanisms (e.g. by blocking the activity of bacterial efflux pumps or by inhibiting the enzymatic properties of MBLs). Such nanocarriers are cyclodextrins, a family of cyclic sugars, produced by the enzymatic conversion of starch molecules. Their properties have been extensively studied for over a century and nowadays they are used as an active ingredient, in more than 60 pharmaceuticals, having gained the approval of the American, European and Japanese regulatory authorities. In the current study, we examined natural and modified nanoparticles and cyclodextrins for their properties either as carriers of clinically available antimicrobial agents, as direct antimicrobial compounds or as indirect ones, exerting inhibitory properties against the main antimicrobial resistance mechanisms.

In the first stage of this study we examined the antimicrobial properties of cyclodextrins and nanoparticles. The silver nanoparticles (AgNPs) that were tested either solely or embedded in Mesoporous Silica Particles (MSPs), produced by the University of Catania (Italy), presented bactericidal properties against a series of Gram positive and negative clinical isolates in *in-vitro* studies determining their MIC and MBC values, for concentrations as low as 7.5 µg/mL. In parallel, in cytotoxicity studies they were found to possess cytotoxic properties as well as causing the arrest of cell growth. We also tested a series of modified  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ - cyclodextrins produced by Cyclolab

(Hungary), as putative antimicrobial agents, without any of the compounds showing signs of effective growth inhibition of clinical strains in *in-vitro* studies.

In the second stage of this study, we examined the properties of nanoparticles/cyclodextrins to act as nanocarriers, carrying  $\beta$ -lactam antibiotics, protecting the active  $\beta$ -lactam ring from the hydrolytic properties of  $\beta$ -lactamase enzymes. Nanoparticles composed of carboxymethylcellulose (CMC)/ HTMAP $\beta$ CD polymer dimers, produced by the University of Iceland (Iceland) presented protective properties of the carbapenem antibiotic meropenem, in *in-vitro* chemical characterisation studies, through a strong association of the  $\beta$ -lactam ring in the inner cavity of the CMC/ HTMAP $\beta$ CD complex. In *in-vitro* hydrolysis by MBLs and microdilution studies, the protective properties of the complex were not confirmed. The positively charged octakis (6-(2-aminomethyl)-6-deoxy)- $\gamma$ -cyclodextrin ( $\gamma$ -Cys), produced by N.C.S.R. Demokritos, in preliminary studies was shown to produce strong complexes with the penicillin oxacillin, protecting it from the carbapenamase Oxa-1, reducing the hydrolysis rate in photometric studies. *In-vitro*, the  $\gamma$ -Cys cyclodextrin presented a desirable toxicological profile, as it did not exhibit signs of cytotoxicity even in high concentrations. Lastly, we determined its ability to enter in macrophages, carrying its antimicrobial load and significantly increasing its intracellular concentration.

In the third stage of this study we examined modified cyclodextrins for their applications as inhibitors against resistant mechanisms such as efflux pumps and MBLs. The AMBnT $\beta$ CD cyclodextrins, produced by Innovative Biologics (U.S.A.), are modified with 7 positive charged subunits (7+ $\beta$ -CD) and were studied as inhibitors for the RND efflux systems, produced by clinical strains of *A. baumannii*. In *in-vitro* studies, they successfully re-sensitized clinical strains producing such efflux systems in the antibiotics tetracycline and ciprofloxacin. Their re-sensitizing properties were proven both in MIC determination studies and in time-kill assays. In these assays the bacterial load was reduced by at least 1,5  $\log_{10}$  in the presence of nanomolar concentrations of the AMBnT $\beta$ CD compared to the free antibiotic, at the end of a 24 hour incubation. The modified, polycarboxylated cyclodextrins (IDACYDs), produced by N.C.S.R. Demokritos, were examined for their properties to act as chelating agents against zinc

cations, inhibiting the enzymatic activity of MBLs and re-sensitizing the clinical strains producing them in carbapenems. These IDACYDs fully restored the antimicrobial activity of imipenem and meropenem against clinical strains characterised for the production of the 3 main MBLs (VIM-1, NDM-1 and IMP-1). Furthermore, the cyclodextrin had a non-toxic profile in both *in-vitro* and in *in-vivo* studies, while presenting high bioavailability in plasma of human and murine origin. Its presence was well tolerated by mice, not producing an adverse immune-response. In *in-vivo* therapeutic studies we examined its synergistic action with meropenem. In septicaemic mice infected with a deadly dose of an NDM-1 *K. pneumonia* clinical isolate, the cyclodextrin's presence reduced the bacterial load more than 4 log<sub>10</sub> in blood and spleen, fully restoring meropenem's activity. The well-tolerated and potent pharmaceutical profile of β-IDACYD makes it an attractive candidate as part of a carbapenem co-therapy against MBL producing Gram negative pathogens.