



ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ  
ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»  
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ

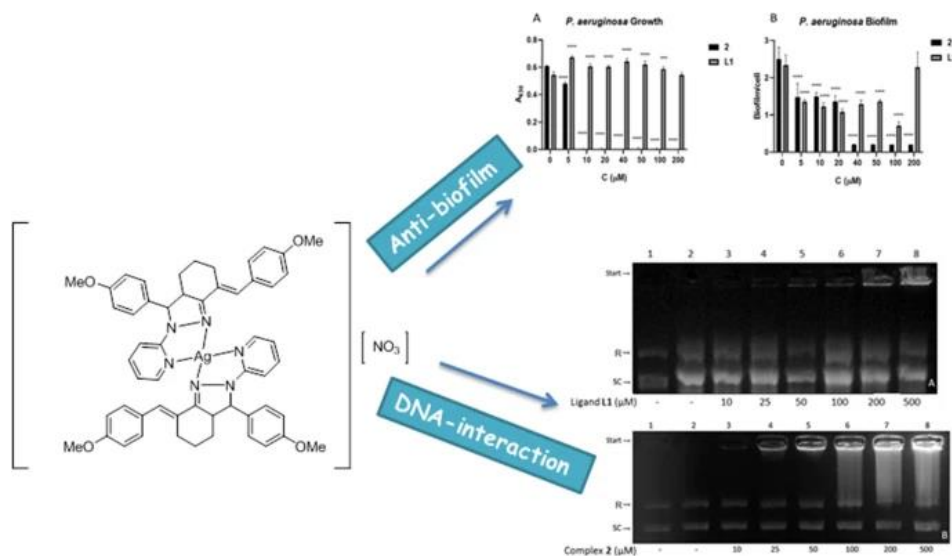
**Καταπολεμώντας τα πολυανθεκτικά παθογόνα μικρόβια: Ανάπτυξη αποτελεσματικών, μη τοξικών αντιβακτηριδιακών ενώσεων συναρμογής του αργύρου μέσω σχεδιασμού κατάλληλων διδοντικών υποκαταστατών με βάση τα πυραζολινικά ανάλογα κουρκουμοειδών**

Μεταδιδακτορική έρευνα – Τελική έκθεση πεπραγμένων

Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών ΙΚΥ στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση μεταδιδακτόρων ερευνητών/ερευνητριών Β κύκλος» (MIS 5033021) του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του ΕΣΠΑ (2014-2020)

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΜΑΤΙΑΔΗΣ

Δρ Χημικός



ΑΘΗΝΑ

2021

Η εικόνα στο εξώφυλλο δείχνει παραστατικά τη δομή και τη δράση ενός από τα δραστικά μόρια άργυρου που προέκυψαν από την έρευνα. Το συγκεκριμένο μόριο παρουσιάζει μεταξύ άλλων δράσεων, ικανότητες: α) να αναστέλλει βιομεμβράνες σχηματισμένες από το μικρόβιο *Pseudomonas aeruginosa* και β) να αλληλεπιδρά με το DNA.

## **Περιεχόμενα**

<b>Περίληψη</b>	<b>4</b>
<b>Εργασίες που προέκυψαν από την έρευνα</b>	<b>5</b>
<b>Εισαγωγή</b>	<b>6</b>
<b>Συζήτηση – Αποτελέσματα</b>	<b>9</b>
1. Μελέτη σύνθεσης, αντιμικροβιακής και βιολογικής δραστηρότητας του συμπλόκου άργυρου(I) με παράγωγο πυραζολίνης-πυριδίνης	9
2. Μελέτη σύνθεσης, δομής, αντιβακτηριδιακής και αντιμυκητιασικής δραστηρότητας συμπλόκων του άργυρου(I) με πυραζολίνες που φέρουν ομάδα βενζοϊκού οξέος	23
<b>Πειραματικό μέρος</b>	<b>36</b>
<b>Συμπεράσματα-Μελλοντικές προοπτικές</b>	<b>39</b>
<b>Βιβλιογραφία</b>	<b>40</b>
<b>Παραρτήματα</b>	<b>42</b>

## Περίληψη

Με την ευρεία εξάπλωση της μικροβιακής αντοχής, οι περισσότερες πηγές για νέες δραστικές ενώσεις, έχουν διερευνηθεί εξαντλητικά για νέες κατηγορίες αντιβιοτικών. Εν τω μεταξύ, τα σύμπλοκα μετάλλων, έχουν χρησιμοποιηθεί ελάχιστα για την ανάπτυξη νέων παραγόντων κατά των μικροβίων και των μυκητών. Ωστόσο, στο περιβάλλον που έχει διαμορφωθεί, είναι πολύ σημαντικό να μελετηθούν, ειδικά λαμβάνοντας υπόψη τις ιδιαίτερες ιδιότητές τους, όπως οι διαφορετικοί τρόποι δράσης, οι τρισδιάστατες γεωμετρίες που καταλαμβάνουν και η δυνατότητα για δράση σε περισσότερους του ενός στόχους, προλαμβάνοντας τη μικροβιακή αντοχή. Ειδικότερα, τα σύμπλοκα αργύρου έχουν αποδειχθεί εδώ και δεκαετίες ότι είναι εξαιρετικά αποτελεσματικά σε μικροβιακές μολύνσεις.

Αντικείμενο της παρούσας έρευνας αποτελεί ο στρατηγικός σχεδιασμός ενώσεων με εν δυνάμει αντιβιοτική δράση, η σύνθεσή τους, η εμπειριστατωμένη μελέτη της δομής τους και η μελέτη της αντιβιοτικής δράσης και άλλως ιδιοτήτων που σχετίζονται με την ικανότητά τους να αποτελέσουν ενώσεις οδηγούς για την ανάπτυξη νέων αντιβακτηριδιακών και αντιμυκητιασικών φαρμάκων.

Οι ενώσεις που μελετήθηκαν ήταν τα σύμπλοκα αργύρου με διδοντικούς υποκαταστάτες πυραζολίνης τύπου αζώτου-αζώτου και οξυγόνου-οξυγόνου.

Οι πυραζολίνες επιλέχθηκαν όχι τόσο για τη δραστικότητά τους ως αντιμικροβιακοί παράγοντες, όσο για τη δυνατότητά τους να ρυθμίζονται τα μόριά τους ως προς αρκετές ιδιότητες και κυρίως ως προς τη δυνατότητα να προσδένονται περισσότερο ή λιγότερο ισχυρά με τα μέταλλα και με τον άργυρο εν προκειμένω.

Σύμπλοκα αυτού του τύπου παρασκευάστηκαν και αξιολογήθηκαν αρχικά ως προς την αναστολή ανάπτυξης 5 κύριων «ESKAPE» παθογόνων μικροοργανισμών (*E. Coli*, *S. aureus* (MRSA), *K. Pneumoniae*, *A. Baumannii* and *P. Aeruginosa*) και δύο μυκητών (*C. Neoformans* και *C. Albicans*). Όλα έδειξαν υψηλή έως πολύ υψηλή δραστικότητα έναντι αρκετών στελεχών, συνοδευόμενα από χαμηλή τοξικότητα έναντι υγιών κυττάρων και χαμηλή αιμολυτική δράση.

Σε κάθε περίπτωση, οι ενώσεις μελετήθηκαν ως προς τη δομή τους, τη σύνθεσή τους και τις επιπλέον βιολογικές τους δράσεις.

Εκτενής μελέτη με περισσότερες δομές ανάλογες, ή με σημαντικές τροποποιήσεις ή άλλα μέταλλα, όπως ο χαλκός, πρόκειται να πραγματοποιηθεί στο άμεσο μέλλον.

## Εργασίες που προέκυψαν από τη Μεταδιδακτορική Έρευνα

### Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά με κριτές

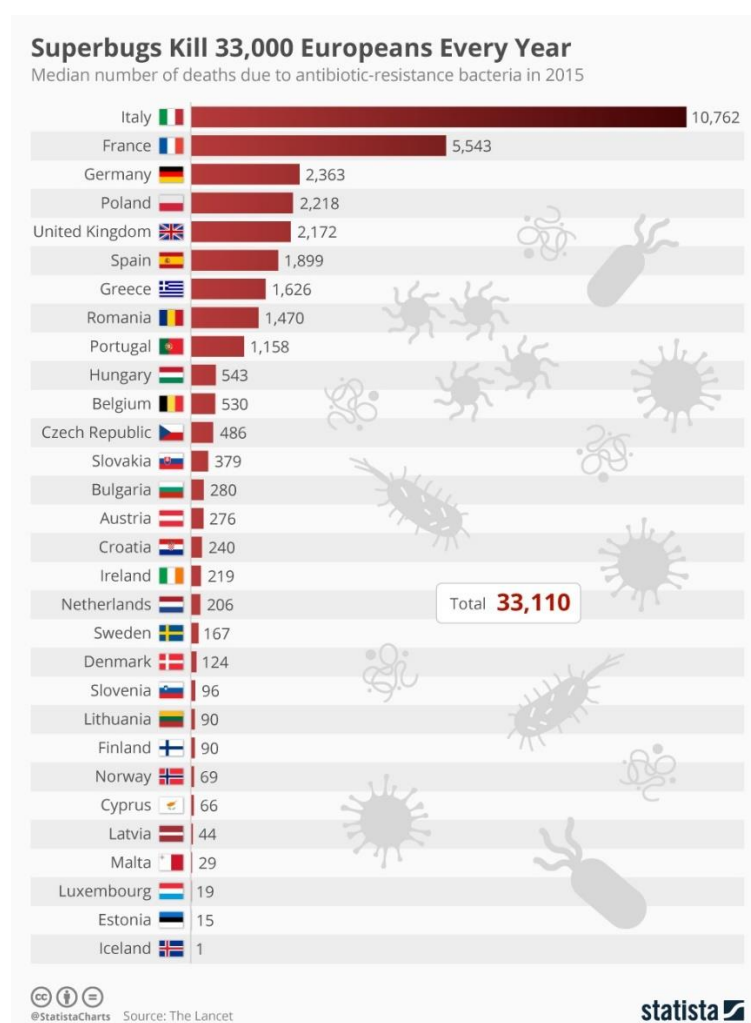
1. **Matiadis D.**, Karagiaouri M., Mavroidi B., Nowak K., Katsipis G., Pelecanou M., Pantazaki A., Sagnou M. *Synthesis and antimicrobial evaluation of a pyrazoline-pyridine silver(I) complex: DNA-interaction and anti-biofilm effects*. *BioMetals*, **2021**, 34, 67-85. (Impact Factor: **2.95**)
2. Frei A., Zuegg J., Elliott A. G., **Matiadis D.**, Sagnou M., et al. *Metal Complexes as Antifungals? - From a Crowd-Sourced Compound Library to First In Vivo Experiments*. *Chem. Sci.* 2021. Προς υποβολή (Impact Factor: **9.82**)

### Δημοσιεύσεις σε διεθνή συνέδρια

1. **D. Matiadis**, B. Mavroidi, M. Pelecanou, M. Sagnou. *Novel curcuminoid analogues bearing pyrazolines: synthesis and biological evaluation*. EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry, 1-5 September 2019, Athens, Greece.

## Εισαγωγή

Η μικροβιακή αντοχή στα αντιβιοτικά (antimicrobial resistance – AMR) αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες απειλές για την ανθρωπότητα [1]. Παρόλο που τα αντιμικροβιακά φάρμακα εξακολουθούν να θεραπεύουν θανάσιμες ασθένειες, η εξάπλωση των πολυανθεκτικών παθογόνων μικροβίων έχει γίνει ένας σοβαρός κίνδυνος για την ανθρωπότητα, καθώς σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα νέα φάρμακα του είδους διαρκώς μειώνονται μπορεί να οδηγήσει στο καταστροφικό ενδεχόμενο μίας μετα-αντιβιοτικής εποχής [2]. Αυτά τα πολυανθεκτικά μικρόβια είναι υπεύθυνα για τουλάχιστον 33.000 θανάτους ανά έτος στην Ευρώπη, σύμφωνα με πρόσφατη έρευνα (Εικόνα 1) [3]. Επιπλέον, έχουν ως συνέπεια τη διαρκώς αυξανόμενη οικονομική επιβάρυνση των συστημάτων υγείας. Ανησυχητικό είναι το γεγονός ότι το 39% αυτών των λοιμώξεων, προκαλούνται από βακτήρια, τα οποία είναι ανθεκτικά ακόμη και στα αντιβιοτικά τελευταίας γραμμής, καθιστώντας πολύ δύσκολη ή αδύνατη την αντιμετώπισή τους.



**Εικόνα 1.** Θάνατοι που οφείλονται στα πολυανθεκτικά βακτήρια ανά χώρα της Ευρώπης. Οι τιμές δείχνουν πολύ μεγάλες διαφορές μεταξύ των χωρών και η Ελλάδα βρίσκεται στις πρώτες θέσεις. Τα στοιχεία του σχήματος προέρχονται από πρόσφατη δημοσίευση στο έγκριτο περιοδικό The Lancet: Infectious Diseases [3]

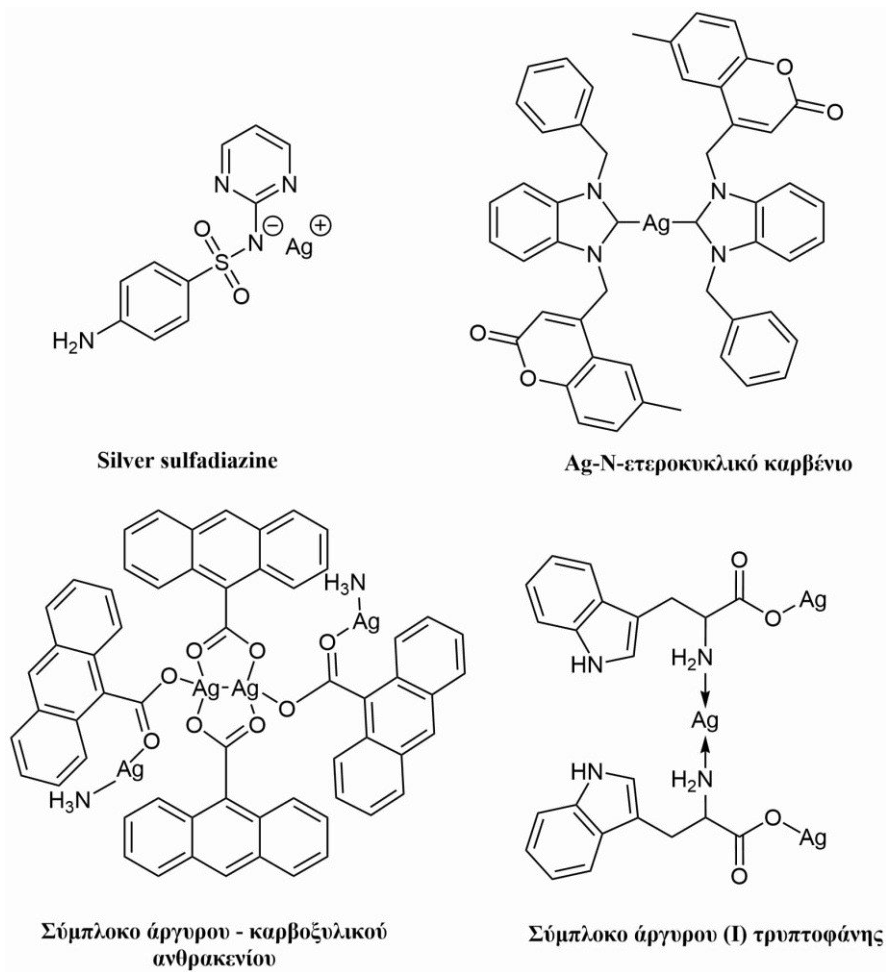
Επίσης, οι παθογόνοι μύκητες αποτελούν πιθανή αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Μολύνσεις από μύκητες, όπως ο *Candida albicans* και ο *Cryptococcus neoformans* είναι συχνά απειλητικές για τη ζωή ασθενών με HIV-AIDS ή καρκίνο [4]. Δυστυχώς, μόνο ένας μικρός αριθμός αντιμυκητιασικών φαρμάκων είναι διαθέσιμος, εξαιτίας του γεγονότος ότι οι μύκητες είναι ευκαριωτικοί οργανισμοί, ακριβώς όπως τα ανθρώπινα κύτταρα-ξενιστές [5]. Επιπλέον, η ανοχή έναντι των περισσότερων φαρμάκων έχει ήδη ξεκινήσει να αναπτύσσεται [6,7].

Ως εκ τούτου, καθώς η ανοχή έναντι των αντιβακτηριδιακών και αντιμυκητιασικών δραστικών ουσιών έχει αναγνωρισθεί ως αναπόφευκτη, νέες κατηγορίες αυτών των παραγόντων πρέπει να αναπτυχθούν.

Αν και τα σύμπλοκα μετάλλων αποτελούν μία υποσχόμενη κατηγορία ενώσεων με αξιολογες δράσεις, μόνο λίγες εφαρμογές αυτών υπάρχουν σε κλινικό επίπεδο. Το βισμούθιο, το οποίο χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλα αντιβιοτικά για την καταπολέμηση του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού [8-10] ή ως σύμπλοκο tribromophenatebismuth(III) με ονομασία «Xenofom» σε εφαρμογές επικάλυψης πληγών [11], και, κυρίως, ο άργυρος.

Οι αντιβακτηριδιακές, αντιμυκητιασικές και αντικές ιδιότητες των ιόντων αργύρου, των συμπλόκων αργύρου και των νανοσωματιδίων χαλκού έχουν μελετηθεί και μελετώνται εκτενώς [12]. Η χρήση των ιόντων αργύρου σε ιατρικά σκευάσματα ή ακόμη και ως πρόσθετων στο πόσιμο νερό, είναι γνωστή από τα αρχαία χρόνια [13]. Διαλύματα αλάτων αυτού του μετάλλου, στη μορφή του νιτρικού άργυρου κυρίως ( $\text{AgNO}_3$ ), έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία βακτηριακών μολύνσεων σχετιζόμενων με εγκαύματα και μολύνσεις στους οφθαλμούς [14].

Ωστόσο, παρόλο που θεωρούνται σχετικά ασφαλή, ανάγονται συχνά ταχύτατα προς μεταλλικό άργυρο, κυρίως από θειόλες που βρίσκονται στο δέρμα [15]. Για αυτόν το λόγο, έχουν αναπτυχθεί ερευνητικά ή κυκλοφορήσει στο εμπόριο ενώσεις οι οποίες περιέχουν άργυρο με οργανικούς υποκαταστάτες. Το πιο γνωστό είναι το σύμπλοκο της σουλφαδιαζίνης ( $\text{AgSD}$ ) που χρησιμοποιείται σε μορφή κρέμας ως ευρέως φάσματος αντιβακτηριδιακό ακόμη και σήμερα (Εικόνα 2). Στην Ελλάδα κυκλοφορεί με την επωνυμία Sylfio Cream, η οποία περιέχει μόνο αυτή τη δραστική ένωση, καθώς και με την επωνυμία HY-SIL, η οποία περιέχει και υαλουρονικό νάτριο. Αυτή η ένωση είναι ιδιαίτερα δραστική έναντι του *Pseudomonas aeruginosa* και του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* [16]. Σε ερευνητικό επίπεδο, αποτελέσματα καλύτερα σε σχέση με τις θεραπείες πρώτης γραμμής έχουν δείξει τα παράγωγα που παρουσιάζονται στην εικόνα 2 και περιλαμβάνουν ένα Ag-N-ετεροκυκλικό καρβένιο με minimum inhibitory activity (MIC) 2-4  $\mu\text{g/mL}$  έναντι των *S. aureus*, *Escherichia coli* και *P. Aeruginosa* [17], ένα σύμπλοκο με καρβοξυλικό ανθρακένιο πιο δραστικό από την κετοκοναζόλη και το  $\text{AgSD}$  [18], καθώς κι ένα σύμπλοκο αργύρου με υποκαταστάτη το αμινοξύ τρυπτοφάνη με χαμηλή τοξικότητα και υψηλή δράση έναντι του *E. coli* (0.1  $\mu\text{g/mL}$ ) [19].



**Εικόνα 2.** Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα αντιμικροβιακών συμπλόκων του αργύρου με οργανικούς υποκαταστάτες.



## Συζήτηση – Αποτελέσματα

### 1. Μελέτη σύνθεσης, αντιμικροβιακής και βιολογικής δραστηριότητας του συμπλόκου αργύρου(I) με παράγωγο πυραζολίνης-πυριδίνης.

(Δημοσίευση 1)

#### 1.1. Γενικά

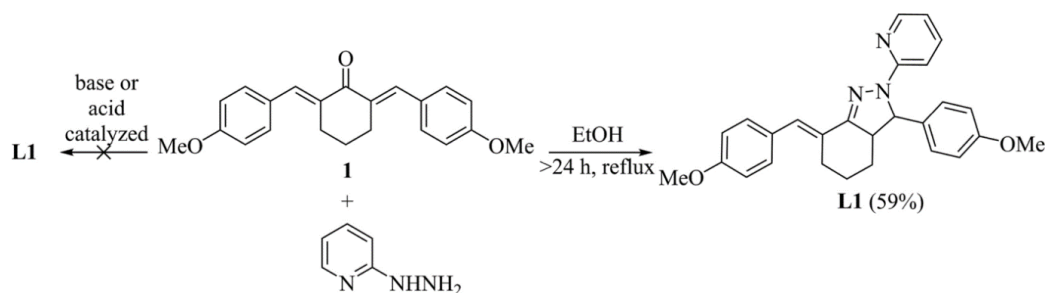
Η εκτεταμένη αναγωγή των ιόντων αργύρου(I), στην οποία αναφερθήκαμε στην εισαγωγή, μπορεί να ελεγχθεί με τη αντίδρασή τους με έναν οργανικό υποκαταστάτη προς σχηματισμό του αντίστοιχου συμπλόκου. Με κατάλληλο σχεδιασμό του μορίου του υποκαταστάτη, είναι δυνατόν, αυτός να έχει τις επιθυμητές φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες, προκειμένου να απελευθερώνει το ιόν αργύρου, τόσο, ώστε να επιτυγχάνεται η μέγιστη δραστηριότητα με τη μικρότερη δυνατή τοξικότητα. Σε αυτό εστίασαμε και στα τρία μέρη/ενότητες της παρούσας έρευνας.

Ειδικά για τα παράγωγα πυραζολίνης-πυριδίνης, ο στόχος ήταν πρωτίστως η σύνθεση του πρώτου συμπλόκου του αργύρου για αυτήν την οικογένεια ενώσεων, η μελέτη της αντιβακτηριδιακής και αντιμυκητιασικής δράσης καθώς και η αναστολή των βακτηριακών βιομεμβρανών. Συμπληρωματικά, σε επίπεδο χημείας μελετήθηκε η δομή και η σταθερότητα του μορίου με φασματοσκοπία NMR, υπολογισμούς DFT, φασματοφωτομετρία UV/Vis και θερμοσταθμική ανάλυση (TGA) και σε επίπεδο βιολογίας η *in vitro* αλληλεπίδραση με το DNA, η αιμολυτική δράση και η κυτταροτοξικότητα έναντι υγιών κυττάρων.

#### 1.2. Σύνθεση

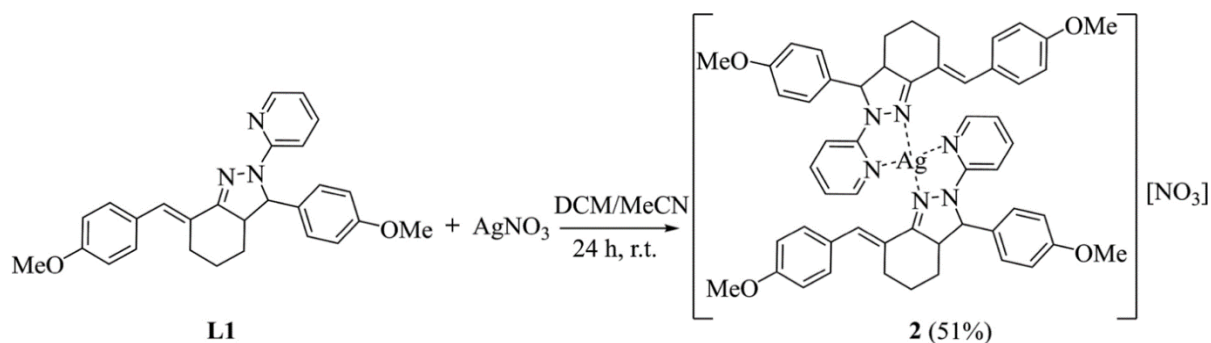
Αρχικά πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της πυραζολίνης (**L1**) που επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί ως υποκαταστάτης. Αυτή, παρασκευάστηκε με την αντίδραση κυκλοποίησης μεταξύ της 2-υδραζινοπυριδίνης και της κατάλληλης διαρυλιδενοκετόνης **1**, η οποία προέκυψε συνθετικά από την κυκλοεξανόνη και την παρα-ανισαλδεΰδη μέσω αντίδρασης τύπου Claisen-Schmidt.

Οι ιδανικές συνθήκες για την αντίδραση κυκλοποίησης, μετά από δοκιμές, αποδείχθηκε πως είναι η χρήση της αιθανόλης ως διαλύτης και οι 72 ώρες διάρκεια της αντίδρασης (Σχήμα 1). Η χρήση οξικού οξέος ή βάσεων, ασθενών, όπως το οξικό νάτριο CH<sub>3</sub>COONa ή ισχυρών, όπως το αιθοξείδιο του νατρίου EtONa ήταν αναποτελεσματική, οδηγώντας σε χαμηλές αποδόσεις (<25%), μη σχηματισμό προϊόντος ή σχηματισμό μόνο ιχνών προϊόντος μη απομονώσιμου. Με αυτό το πρωτόκολλο παρασκευάστηκε η πυραζολίνη **L1** σε καθαρή μορφή και χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση συμπλοκοποίησης χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.



**Σχήμα 1.** Σύνθεση του υποκαταστάτη **L1**.

Η αντίδραση του υποκαταστάτη **L1** με το νιτρικό άργυρο σε μίγμα διχλωρομεθανίου (DCM) και ακετονιτριλίου (MeCN) σε αναλογία μεταλλο:υποκαταστάτης = 1/2 πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες και απέδωσε το σύμπλοκο  $[\text{Ag}(\text{L1})_2]\text{NO}_3$  **2** (Σχήμα 2). Το σύμπλοκο αργύρου **2** είχε μορφή ανοικτόχρωμου κίτρινου άμορφου στερεού, το οποίο μπορεί να αποθηκευτεί σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς ιδιαίτερες συνθήκες φύλαξης ως προς το φως ή την υγρασία.



**Σχήμα 2.** Σύνθεση του συμπλόκου **2**

### 1.3. Μελέτη δομής

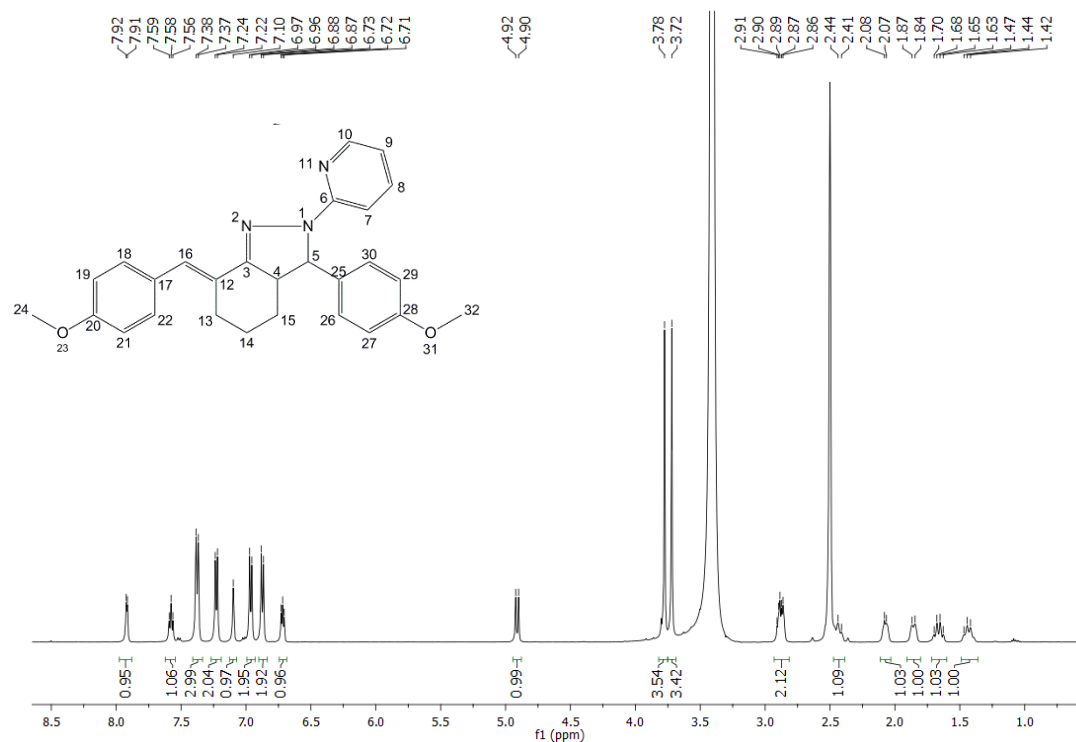
Οι δομές των νέων ενώσεων μελετήθηκε με NMR, TGA, FT-IR, HRMS και UV, X-ray και με υπολογιστικές μελέτες.

#### 1.3.1. Φασματοσκοπία NMR

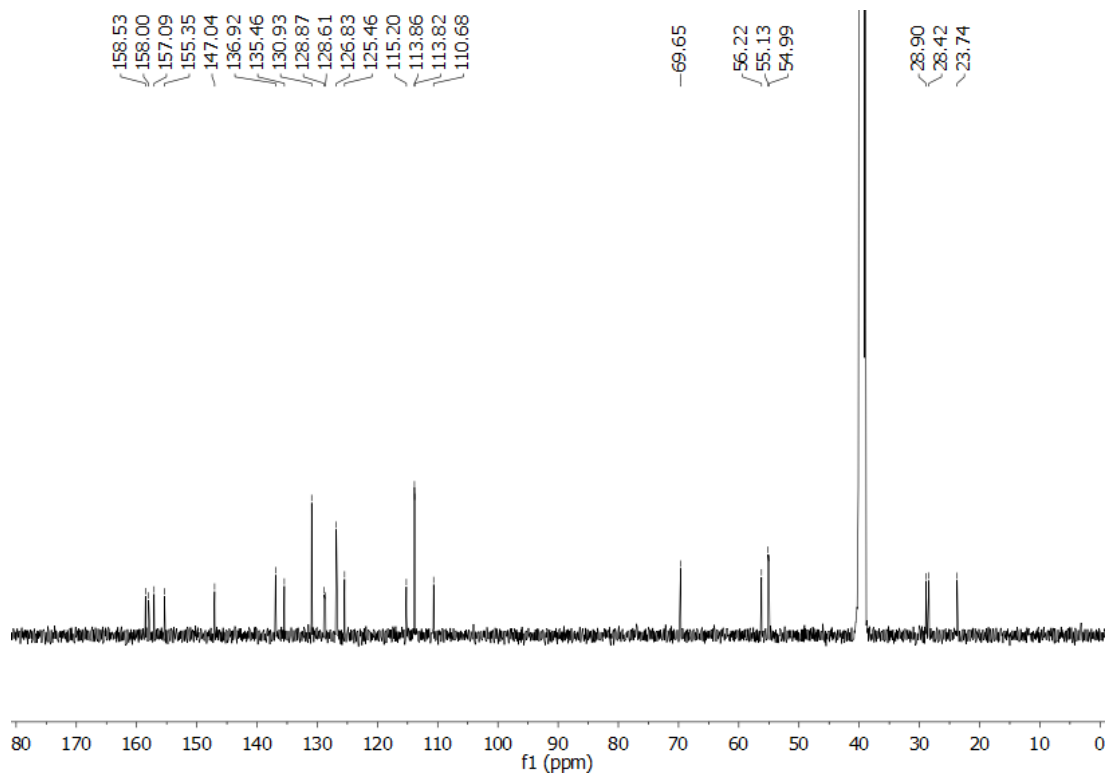
Τόσο ο υποκαταστάτης **L1**, όσο και το σύμπλοκο **2**, καθώς πρόκειται για νέες ενώσεις στη διεθνή βιβλιογραφία, χαρακτηρίστηκαν πλήρως με φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  NMR. Για την αποτίμηση των κορυφών πραγματοποιήθηκαν πειράματα NMR δύο διαστάσεων (2D).

Το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του υποκαταστάτη, χαρακτηρίζεται από την αντιπροσωπευτική διπλή κορυφή για τις πυραζολίνες, που σύμφωνα με την αρίθμηση του σχήματος αντιστοιχεί στο H-5 ( $\delta$ : 4.91 ppm). Αυτό, είναι χαρακτηριστικό της κυκλοποίησης, ενώ τα σήματα του H-10 (γειτονικό πρωτόνιο στο άζωτο της πυριδίνης) και των μεθόξυ ομάδων H-24 και H-32 εμφανίζονται στα 7.92, 3.72 και 3.78 ppm, αντίστοιχα (Εικόνα 3). Αντίστοιχα, στο φάσμα  $^{13}\text{C}$

NMR, ταυτοποιούνται όλα τα σήματα με τα αντίστοιχα άτομα άνθρακα, με πιο χαρακτηριστικό, αυτό του άνθρακα που είναι συνδεδεμένος με διπλό δεσμό με το άζωτο εντός του δακτυλίου, το οποίο εμφανίστηκε στα 155.3 ppm.

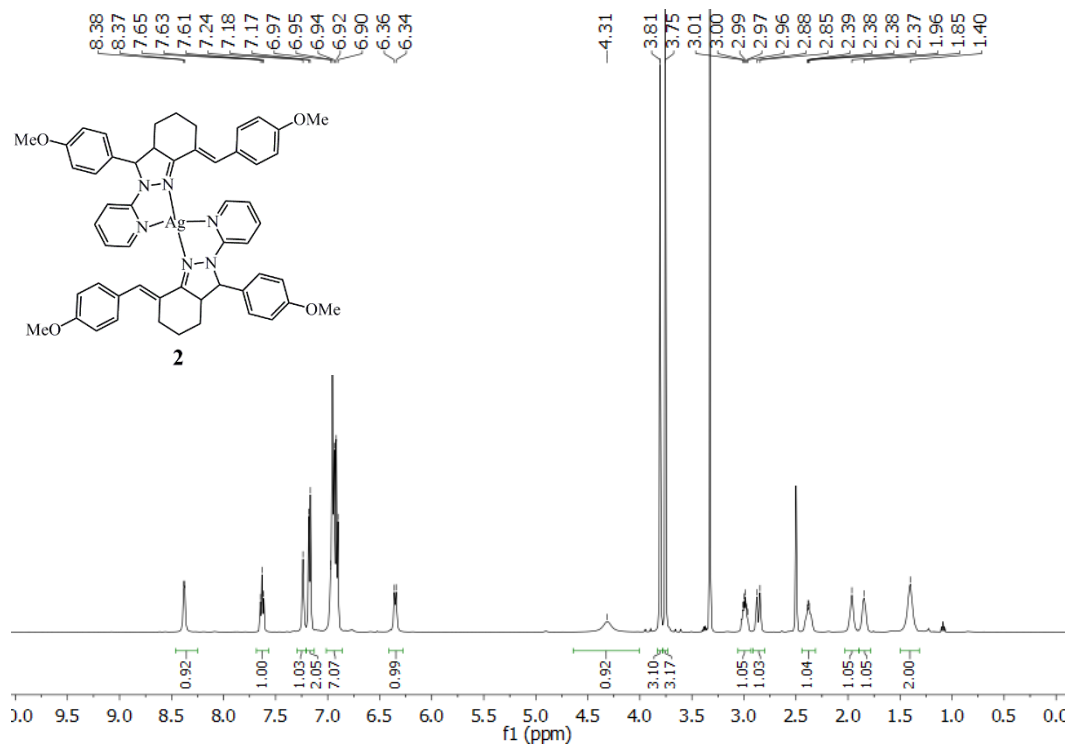


Εικόνα 3. Φάσμα <sup>1</sup>H NMR του υποκαταστάτη L1.

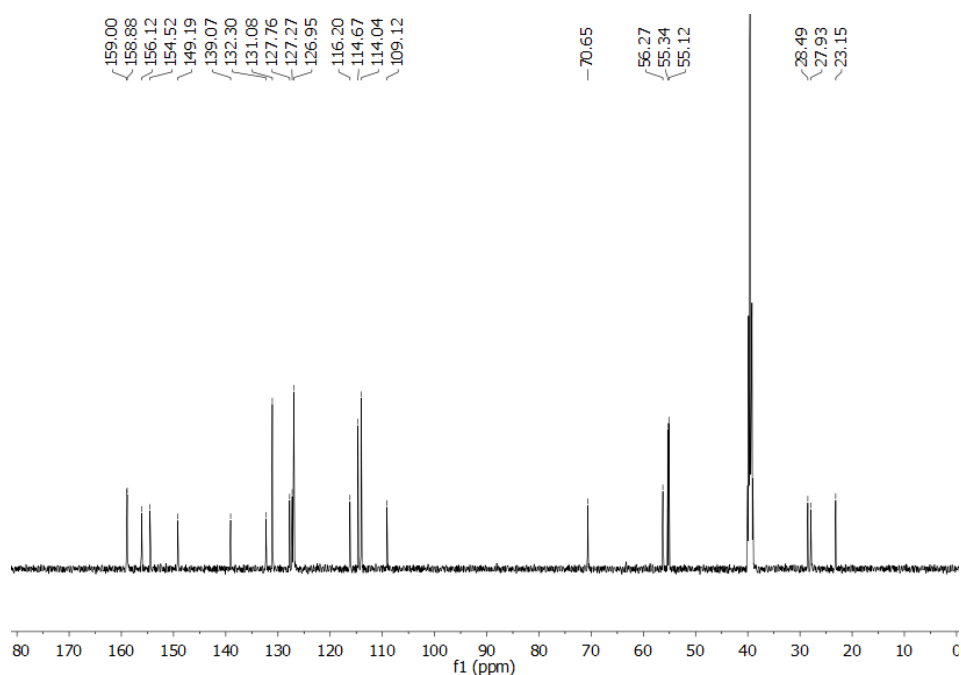


Εικόνα 4. Φάσμα <sup>13</sup>C NMR του υποκαταστάτη L1.

Αναλυτικά, οι αντιστοιχίσεις των σημάτων αναφέρονται στο πειραματικό μέρος. Όσον αφορά στο σύμπλοκο, παρατηρήθηκαν μετατοπίσεις των σημάτων μετά τη συμπλοκοποίηση. Αν και τα περισσότερα σήματα στο  $^{13}\text{C}$  NMR εμφανίζουν μικρές μετατοπίσεις ( $-3.2$  έως  $+2.2$  ppm), ορισμένα σήματα  $^1\text{H}$  παρουσιάζονται σημαντικά προστατευμένα ή αποπροστατευμένα στο σύμπλοκο 1. Το χαρακτηριστικά  $\alpha$ -υδρογόνο της πυριδίνης (H-10) μετακινήθηκε σε χαμηλότερο πεδίο ( $+0.46$  ppm) υποδηλώνοντας τη συναρμογή του ιόντος αργύρου με το άτομο υδρογόνου της πυριδίνης.



Εικόνα 5. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του συμπλόκου 2.



Εικόνα 6. Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR του συμπλόκου 2.

### 1.3.2. Φασματοσκοπία FT-IR

Το φάσμα FT-IR της πυραζολο-πυριδίνης **L1** χαρακτηρίζονται από την ισχυρή απορρόφηση στα  $1590\text{ cm}^{-1}$ , που αποδίδεται στο  $\nu(\text{C}=\text{N})$ . Η κορυφή αυτή μετατοπίστηκε στα  $1600\text{ cm}^{-1}$  στο σύμπλοκο **2** υποδηλώνοντας τη συμμετοχή των ατόμων αζώτου της πυριδίνης και της πυραζολίνης στη συναρμογή με τα ιόντα του μετάλλου. Επιπλέον, η εμφάνιση ισχυρών απορροφήσεων στις περιοχές  $1476\text{-}1431\text{ cm}^{-1}$  και  $1246\text{-}1186\text{ cm}^{-1}$ , όπως και η μετατόπιση από τα  $1030\text{ cm}^{-1}$  στα  $1017\text{ cm}^{-1}$  μπορούν να αποδοθούν στις ομάδες  $\text{C}=\text{N}$  και  $\text{C}-\text{N}$  των δακτυλίων της πυριδίνης και της πυραζολίνης και στη σύμπλεξη με το μέταλλο. Μία επιπλέον κορυφή στα  $545\text{ cm}^{-1}$  εμφανίστηκε στο φάσμα του συμπλόκου, η οποία είναι χαρακτηριστική της δόνησης τάσης  $\text{Ag}-\text{N}$ .

### 1.3.3. Φασματοφωτομετρία UV/Vis και φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης HRMS

Στο φάσμα απορρόφησης της ένωσης **L1** σε διάλυμα DMSO συγκέντρωσης  $20\text{ }\mu\text{M}$ , μία κορυφή με  $\lambda_{\text{max}}=337\text{ nm}$  και  $\varepsilon=2.04 \times 10^4\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  παρατηρήθηκε, ενώ στο σύμπλοκο οι αντίστοιχες τιμές ήταν  $\lambda_{\text{max}}=344\text{ nm}$  με  $\varepsilon=5.37 \times 10^4\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ . Οι κορυφές αυτές αποδίδονται σε μεταπτώσεις  $\pi\text{-}\pi^*$  του συζευγμένου συστήματος της αρυλιδενο πυραζολοπυριδίνης. Η αύξηση στα  $\lambda_{\text{max}}$  και  $\varepsilon$  μετά τη σύμπλεξη παρέχει ξεκάθαρη ένδειξη της συναρμογής με το ιόν του άργυρου.

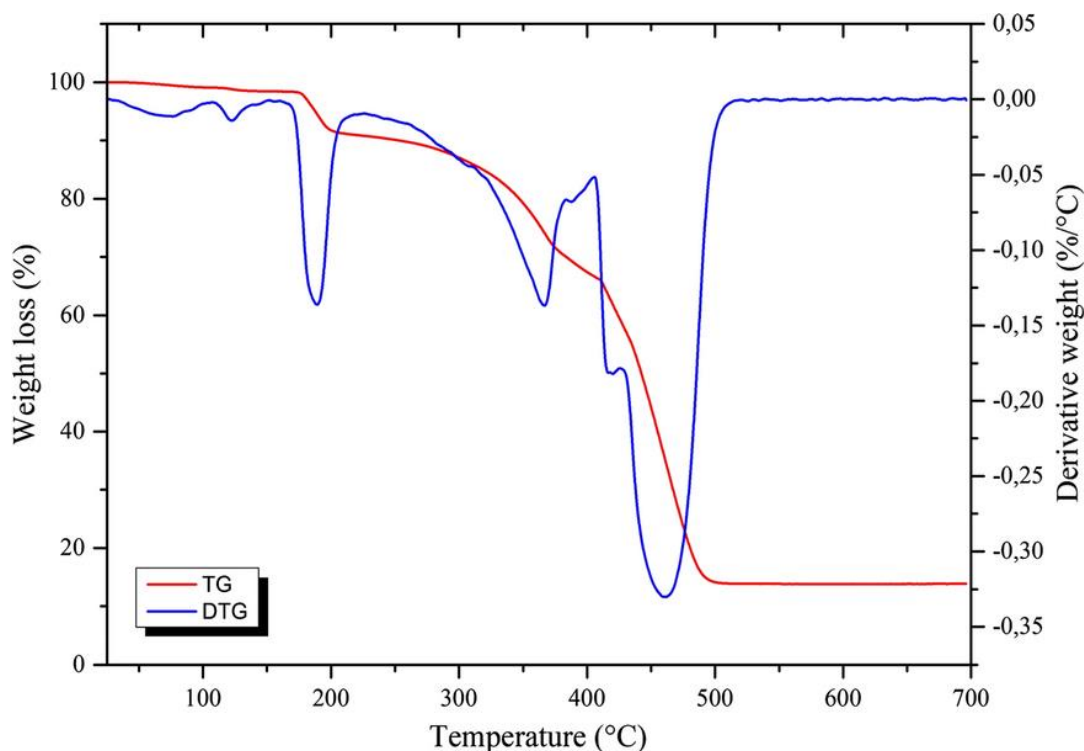
Ο μοριακός τύπος των δομών του υποκαταστάτη και του συμπλόκου επαληθεύτηκε με φασματομετρία μάζας. Ιδιαίτερα για το σύμπλοκο η μέτρηση αυτή είναι σημαντική γιατί με αυτή τη μέθοδο υπολογίζεται η αναλογία μετάλλου προς υποκαταστάτη. Και στις δύο περιπτώσεις η μέτρηση ήταν πολύ ακριβής και εντός των πειραματικά αποδεκτών αποκλίσεων (βλ. πειραματικό μέρος). Στην περίπτωση του συμπλόκου, το μοριακό ιόν δε συμπεριλάμβανε το νιτρικό ανιον ( $\text{NO}_3^-$ ), το οποίο ωστόσο ανιχνεύθηκε από τη στοιχειακή ανάλυση. Δυστυχώς, ακόμη και μετά από επανειλημμένες προσπάθειες, δεν κατέστη δυνατό να σχηματιστούν κρύσταλλοι κατάλληλοι για κρυσταλλογραφική ανάλυση με ακτίνες X.

### 1.3.4. Θερμοβαρυμετρική ανάλυση (TGA)

Στα πλαίσια των αναλύσεων για τη δομή των συμπλόκων, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις θερμοβαρυμετρικής ανάλυσης (thermogravimetric analysis). Οι αναλύσεις αυτές μπορούν να μας δώσουν στοιχεία για τη θερμική σταθερότητα των ενώσεων, για την αφυδάτωσή τους, αν περιέχουν μόρια νερού ή γενικά την απομάκρυνση άλλων μορίων διαλύτη. Στην περίπτωση των συμπλόκων, μπορούμε να συμπεράνουμε αν το μόριο διαλύτη που απομακρύνεται είναι συνδεδεμένο με δεσμό συναρμογής ασθενή ή ισχυρό, ή με πιο χαλαρό δεσμό στο κρυσταλλικό πλέγμα (lattice water/solvent). Ακόμη, μπορούμε να κάνουμε αποτίμηση της κάθε απώλειας βάρους, ώστε να αντιστοιχηθεί σε κάποια επιμέρους ομάδα του μορίου που αποκόπτεται.

Στην προκειμένη περίπτωση, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση για το σύμπλοκο **2** σε θερμοκρασία από  $25$  έως  $700\text{ }^\circ\text{C}$  σε περιβάλλον αέρα και με ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας  $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{λεπτό}$ . Οι μετρήσεις έδειξαν ότι η ένωση **2** είναι σταθερή έως τους  $175\text{ }^\circ\text{C}$  (εικόνα 7). Μετά από αυτήν τη θερμοκρασία, η διάσπαση πραγματοποιήθηκε σε τρία στάδια. Στο πρώτο

στάδιο παρατηρήθηκε μείωση της μάζας κατά 6.73% μεταξύ 175-205 °C και στο δεύτερο στάδιο μειώθηκε η μάζα κατά 20.71% μεταξύ 220-283 °C. Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο, από 383-522 °C πραγματοποιήθηκε η διάσπαση του υποκαταστάτη και ο σχηματισμός οξειδίου του αργύρου ως υπόλειμμα. Η ολική απώλεια μάζας βρέθηκε ίση με 86.15% και είναι κοντά στην υπολογισθείσα τιμή (88.65%).



**Εικόνα 7.** Θερμοδιάγραμμα TG/DTG του συμπλόκου Ag (I) 2

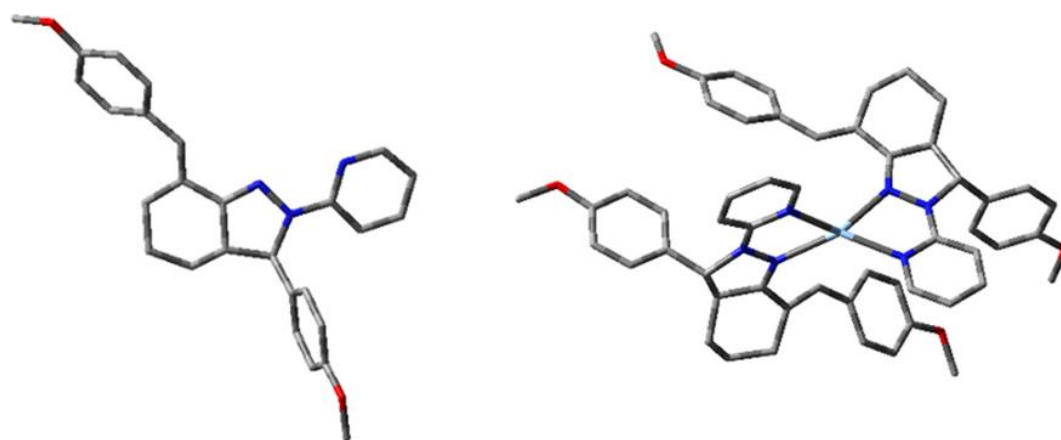
**Πίνακας 1.** Δεδομένα θερμικής ανάλυσης που περιλαμβάνουν τη θερμοκρασία, την κορυφή DT και την ποσοστιαία απώλεια μάζας.

Προϊόν	Εύρος θερμοκρασίας (°C)	Κορυφή DT (°C)	Απώλεια μάζας (%)	
			Υπολογισθείσα	Μετρηθείσα
Σύμπλοκο 2	175-205	189	6.07	6.73
	220-383	366	20.99	20.71
	383-522	460	88.65 <sup>[a]</sup>	86.15 <sup>[a]</sup>

[a] Η % τιμή αντιπροσωπεύει την ολική απώλεια μάζας κατά τη διάσπαση του υποκαταστάτη και την οξείδωση του ιόντος αργύρου προς οξείδιο αργύρου.

### 1.3.5. Θεωρητικοί υπολογισμοί

Οι μοριακές δομές του κατιονικού μέρους του συμπλόκου **2** και του υποκαταστάτη **L1** σχεδιάστηκαν στην αέρια φάση χρησιμοποιώντας τη μέθοδο DFT/B<sub>3</sub>LYP/LANL<sub>2</sub>DZ (Εικόνα 8). Καθώς δεν υπάρχουν πειραματικά δεδομένα για τη δομή των παραγώγων, δεν υπάρχει η δυνατότητα σύγκρισης με τα θεωρητικά αποτελέσματα. Τόσο το κατιονικό μέρος του συμπλόκου **2**, όσο και ο υποκαταστάτης **L1** δεν είναι επίπεδα μόρια, όπως άλλωστε αναμενόταν. Στο σύμπλοκο, οι δύο υποκαταστάτες είναι συνδεδεμένοι με το ιόν αργύρου μέσω δεσμών με τα άτομα αζώτου. Τα μήκη των δεσμών Ag-N υπολογίστηκαν από 2.294 έως 2.454 Å και οι γωνίες των δεσμών βρέθηκαν ίσες μεταξύ τους και 71°. Αυτές οι υπολογισθείσες τιμές μηκών και γωνιών δεσμών, είναι σε συμφωνία με τις πειραματικές τιμές που έχουν αναφερθεί για παρόμοια σύμπλοκα αργύρου(I) [20,21]. Στον πίνακα 2 παρατίθενται επιλεγμένες γωνίες και μήκη δεσμού.



**Εικόνα 8.** Βελτιστοποιημένες δομές με τη μέθοδο DFT/B<sub>3</sub>LYP/LANL<sub>2</sub>DZ του υποκαταστάτη **L1** και του κατιόντος του συμπλόκου **2** (τα άτομα υδρογόνου δεν εμφανίζονται)

**Πίνακας 2.** Επιλεγμένα μήκη και γωνίες δεσμών.

Ag-N1	2.454	N1-N2	1.415	N2'-C'	1.505
Ag-N3	2.294	N2-C	1.502	N2'-C'	1.387
Ag-N1'	2.406	N2-C	1.391	N1-Ag-N3	71.0
Ag-N3'	2.337	N1'-N2'	1.419	N1'-Ag-N3'	70.7

Το μόριο του υποκαταστάτη βρέθηκε πιο πολικό από το σύμπλοκο μόριο. Ακόμη, οι ενέργειες HOMO και LUMO του τελευταίου, έχουν σημαντικά χαμηλότερες τομές από αυτές του υποκαταστάτη και η ενεργειακές μεταπτώσεις του [Ag(L1)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> είναι χαμηλότερες σε σχέση με αυτές του υποκαταστάτη. Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται επιλεγμένες παράμετροι για το σύμπλοκο μόριο **2** και για το **L1**.

**Πίνακας 3.** Επιλεγμένες τιμές για τις ιδιότητες των **L1** και **2**, όπως υπολογίστηκαν με τη μέθοδο DFT/B<sub>3</sub>LYP/LANL<sub>2</sub>DZ

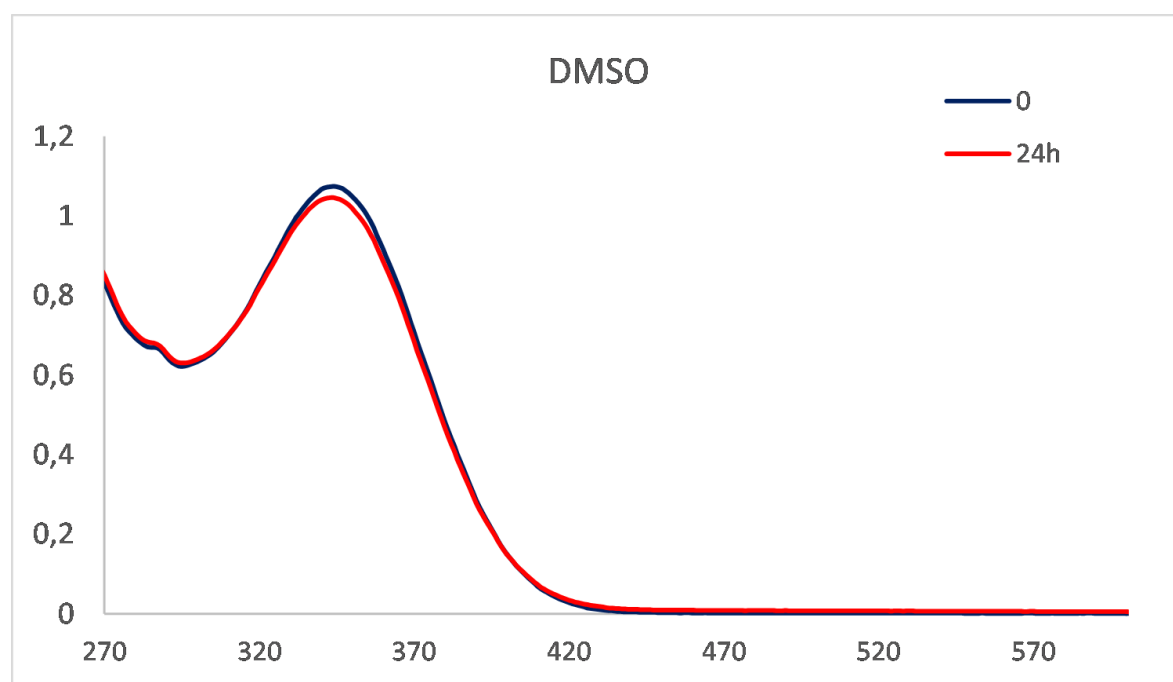
Property	L1	[Ag(L1) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>
μ[D]	<b>6.7</b>	<b>4.1</b>
E <sub>HOMO</sub> [eV]	- 4.959	- 7.304
E <sub>LUMO</sub> [eV]	- 1.339	- 3.980
E <sub>g</sub> [eV]	3.62	3.32

#### 1.4. Σταθερότητα

Η σταθερότητα των μορίων με βιολογική δράση, ιδίως των συμπλόκων είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη συνολική αξιολόγησή τους ως ενώσεις που δυνητικά μπορούν να εξελιχθούν σε χρήσιμες δραστικές ενώσεις για τη φαρμακοβιομηχανία.

Η σταθερότητα της ένωσης **2** μελετήθηκε σε στερεά κατάσταση, αλλά και σε διάλυμα με πειράματα UV/Vis και <sup>1</sup>H NMR. Τα φάσματα απορρόφησης στο υπεριώδες και ορατό (UV/Vis) σε διαλύτη DMSO έδειξαν ότι δεν πραγματοποιούνται σημαντικές αλλαγές εντός 24 ωρών, υποδεικνύοντας τη σταθερότητα του συμπλόκου σε αυτόν το διαλύτη (Εικόνα 9).

**Εικόνα 9.** Πείραμα δοκιμής σταθερότητας σε UV/Vis για το μόριο **2** σε διαλύτη DMSO και συγκέντρωση  $2 \times 10^{-5}$  M.

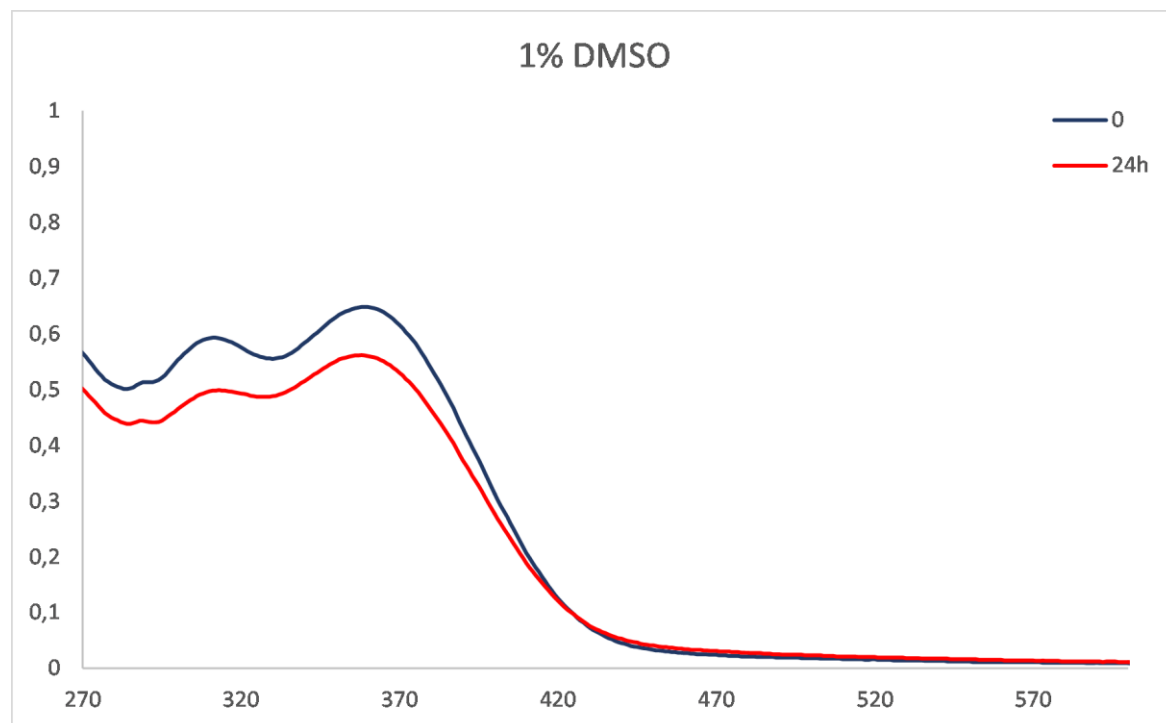


Αντίστοιχα πειράματα σε υδατικό διάλυμα 1% DMSO, έδειξαν μικρή, αλλά όχι αμελητέα μείωση στην απορρόφηση σε όλα τα μήκη κύματος, χωρίς ωστόσο αλλαγή στο μοτίβο του αρχικού φάσματος (Εικόνα 10). Με δεδομένο πάντως, ότι η επιστημονική κοινότητα δεν έχει



καταλήξει ακόμη στο τρόπο δράσης των αντιμικροβιακών συμπλόκων αργύρου, αυτό το φαινόμενο, ενδέχεται να αποτελεί μέρος της υψηλής δραστηριότητας της ένωσης αυτής.

**Εικόνα 10.** Πείραμα δοκιμής σταθερότητας σε UV/Vis για το μόριο **2** σε υδατικό διάλυμα DMSO 1% v/v και συγκέντρωση  $2 \times 10^{-5}$  M.



Ως προς τις συνθήκες φύλαξης, στερεά δείγματα της σύμπλοκης ένωσης **2**, φυλαγμένα σε θερμοκρασία δωματίου και προστατευμένα από το φως, τον αέρα και την υγρασία, χωρίς ιδιαίτερα μέτρα προστασίας από αυτά, εμφάνισαν πανομοιότυπα φάσματα για τουλάχιστον 6 μήνες (χρονικό διάστημα που πραγματοποιήθηκε η εξέταση της σταθερότητας).

Ωστόσο και άσχετα με την έκθεση στο φως, η παρατεταμένη παραμονή σε διάλυμα με οργανικούς διαλύτες, όπως το διχλωρομεθάνιο, το χλωροφόρμιο και ο διαιθυλαιθέρας, οδήγησε στο σχηματισμό μαύρου άμορφου στερεού, που είναι ένδειξη διάσπασης του μορίου.

## 1.5. Πειράματα βιολογικής δράσης

### 1.5.1. Αντιμικροβιακή δραστηριότητα

Προκειμένου να υπολογισθεί η πιθανή αντιμικροβιακή δραστηριότητα της σύμπλοκης ένωσης **2**, του υποκαταστάτη **L1** και της αρχικής ένωσης **1**, πραγματοποιήθηκε προκαταρκτική εξέταση διαλογής (primary screening) έναντι 5 σημαντικών ESKAPE παθογόνων και δύο μυκητών. Συγκεκριμένα, η εξέταση ποσοστιαίας αναστολής πραγματοποιήθηκε σε σταθερή συγκέντρωση δραστικής ουσίας (32  $\mu\text{g/mL}$ ) έναντι των *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* (MRSA, καθώς και των μυκητών *C. neoformans* και *C. albicans* (Πίνακας 4). Στόχος ήταν ο εντοπισμός κάποιας ένωσης με αξιόλογη δραστηριότητα, η οποία στη συνέχεια θα εξεταζόταν πιο ενδελεχώς. Σε αυτές τις αναλύσεις διαπιστώθηκε πως η

αρχική ένωση **1** και ο υποκαταστάτης δεν έχουν αντιμικροβιακή δραστηριότητα, ενώ η σύμπλοκη ένωση **2** χαρακτηρίστηκε ως δραστική έναντι του βακτηρίου *E. Coli* και των μυκητών *C. albicans* και *C. neoformans* με άνω του 90% αναστολή.

**Πίνακας 4.** Συνοπτικά αποτελέσματα προκαταρκτικής εξέτασης (όριο για χαρακτηρισμό ένωσης ως ενεργή 80% και ως μερικώς ενεργή 60-80%)

Ένωση	%Αναστολή έναντι των παθογόνων σε συγκέντρωση δρ. ουσίας 32 µg/mL						
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i>
<b>1</b>	7,37	1,92	7	10,41	1,94	1,54	2,92
<b>L1</b>	11,69	2,17	8,77	7,94	5,6	6,69	-0,84
<b>2</b>	25,68	100,9	42,84	23,98	54,86	99,97	93,63

Επομένως, επανεξετάστηκε σε δοκιμή εξαρτώμενη από τη δόση/συγκέντρωση (dose response assay) σε συγκεντρώσεις 0.25-32, ώστε να προσδιοριστεί η ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής (MIC – minimum inhibitory concentration). Το σύμπλοκο **2** επέδειξε ικανοποιητική έως υψηλή δραστηριότητα έναντι των Gram-αρνητικών βακτηρίων *E. coli* (MIC = 8 µg/mL = 8.3 µM), *P. aeruginosa* (MIC = 16 µg/mL = 16.6 µM) και *A. baumannii* (MIC = 4 µg/mL = 4.15 µM) και πολύ υψηλή δραστηριότητα έναντι των μυκητών *C. albicans* και *C. neoformans* (MIC ≤ 0.25 µg/mL) (Πίνακας 5). Ανάμεσα στα βακτήρια που δοκιμάστηκαν, υψηλότερη δραστηριότητα παρατηρήθηκε έναντι των Gram-αρνητικών ειδών σε σχέση με τα Gram-θετικά, το οποίο αποτελεί αναμενόμενο αποτέλεσμα, καθώς παραπλήσια συμπεριφορά έχει παρατηρηθεί και προηγουμένως σε σύμπλοκα του άργυρου [22,23]. Ωστόσο, σε πρόσφατη δημοσίευση, ο Favargin και συνεργάτες [24] ανακοίνωσαν κάποια σύμπλοκα του αργύρου(I) με αντίθετη συμπεριφορά, επομένως, φαίνεται πως η φύση του υποκαταστάτη είναι αυτή που επιδρά στην αντιμικροβιακή δραστηριότητα.

Ωστόσο, το **2** παρουσίασε και εξαιρετικές αντιμυκητιασικές ιδιότητες. Αυτό το αποδίδουμε στον κατάλληλο σχεδιασμό της ομάδας 2-πυριдино-πυραζολίνης, η οποία δρα ως ένας αποδοτικός υποκαταστάτης αζώτου-αζώτου (NN) σε σχέση με τη δραστηριότητα. Συμπλέκεται δηλαδή με αυτό το μέταλλο, τόσο όσο χρειάζεται, ώστε να είναι πολύ δραστικό. Μόρια που έχουν αναφερθεί στη διεθνή βιογραφία και φέρουν μεικτούς υποκαταστάτες, όπως τριφαινυλοφωσφίνη, 2-μερκαπτοπυριδίνη, ετεροκυκλικές θειόνες, ιμιδαζόλια και άλλα βρέθηκαν λιγότερο ενεργά [22,23,25,26].

Ως πιθανή υποψήφια ένωση για ανάπτυξη ένωσης οδηγού, η **2** μελετήθηκε ως προς την αιμολυτική της δράση και την υτταροτοξικότητα έναντι υγιών κυττάρων. Εντός των μετρούμενων συγκεντρώσεων, δεν παρατηρήθηκε αιμολυτική δράση με HC<sub>50</sub> > 32 µg/mL. Παρά το παραπάνω αποτέλεσμα, που είναι μία ένδειξη χαμηλής τοξικότητας, μετρήθηκε μία τιμή ίση με CC<sub>50</sub> = 7.31 µM για την κυτταροτοξικότητα έναντι κυττάρων HEK-293, η οποία ωστόσο, είναι ίση ή λίγο μικρότερη από τις τιμές MIC έναντι των μικροοργανισμών. Παρόλα αυτά, καθώς αυτά τα παράγωγα βρίσκουν συνήθως εφαρμογή σε τοπικές κρέμες ή σε επιδέσεις πληγών, επιδεικνύοντας χαμηλή συστηματική τοξικότητα λόγω της μικρής απορρόφησης από το δέρμα [27], η παρατηρηθείσα τοξικότητα δεν αποτελεί εμπόδιο στην περαιτέρω ανάπτυξη των εφαρμογών της **2**. Αυτό θα πρέπει να μελετηθεί με *in vivo* πειράματα. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί, πως οι περισσότερες αντιμυκητιασικές ενώσεις

είναι αρκετά τοξικές, όπως η αμφοτερικίνη Β [28]. Τα εν λόγω πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Πανεπιστήμιο του Queensland στην Αυστραλία από την πλατφόρμα CO-ADD (Community for Open Antimicrobial Drug Discovery).

**Πίνακας 5.** Αντιμικροβιακή δραστηριότητα ως MIC, κυτταροτοξικότητα (CC<sub>50</sub>) και αιμολυτική δράση (HC<sub>50</sub>) των 1, L1 και του συμπλόκου 2. <sup>[α]</sup> (CC<sub>50</sub>)

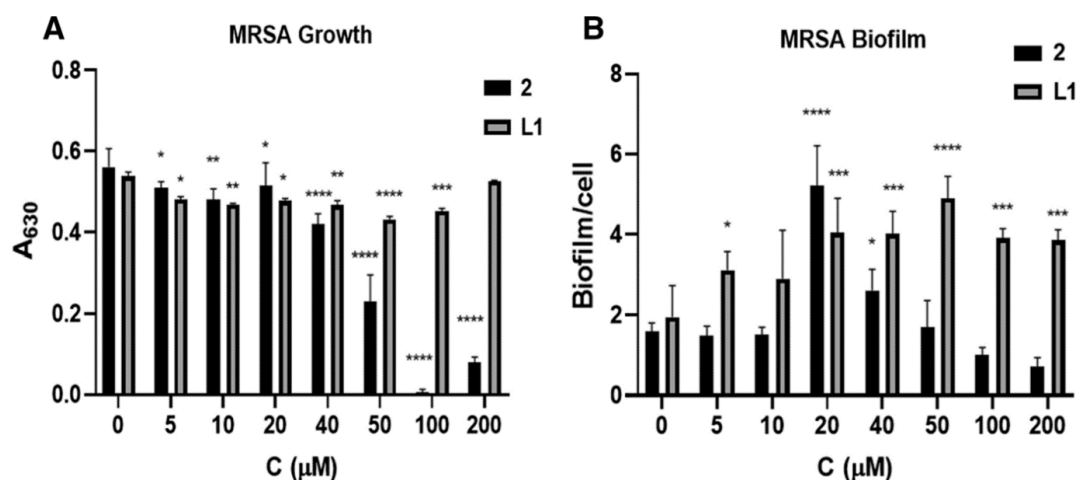
Παράγωγο	Sa	Ec	Kp	Pa	Ab	Ca	Cn	CC <sub>50</sub>	HC <sub>50</sub>
1	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	δν <sup>[β]</sup>	δν
L1	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	δν	δν
2	>32	8	>32	16	4	≤0.25	≤0.25	7.31	>32
Χλωραμφαινικόλη	8	8	>32	>32	>32	>32	>32	-	>32
Φλουκοναζόλη	>32	>32	>32	>32	>32	0.125	8	-	>32
AgNO <sub>3</sub>	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	-	>32

<sup>[α]</sup> Sa: Ανθεκτικό στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* (MRSA), Ec: *Escherichia coli*, Kp: *Klebsiella pneumoniae*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa*, Ab: *Acinetobacter baumannii*, Ca: *Candida albicans*, Cn: *Cryptococcus neoformans*.

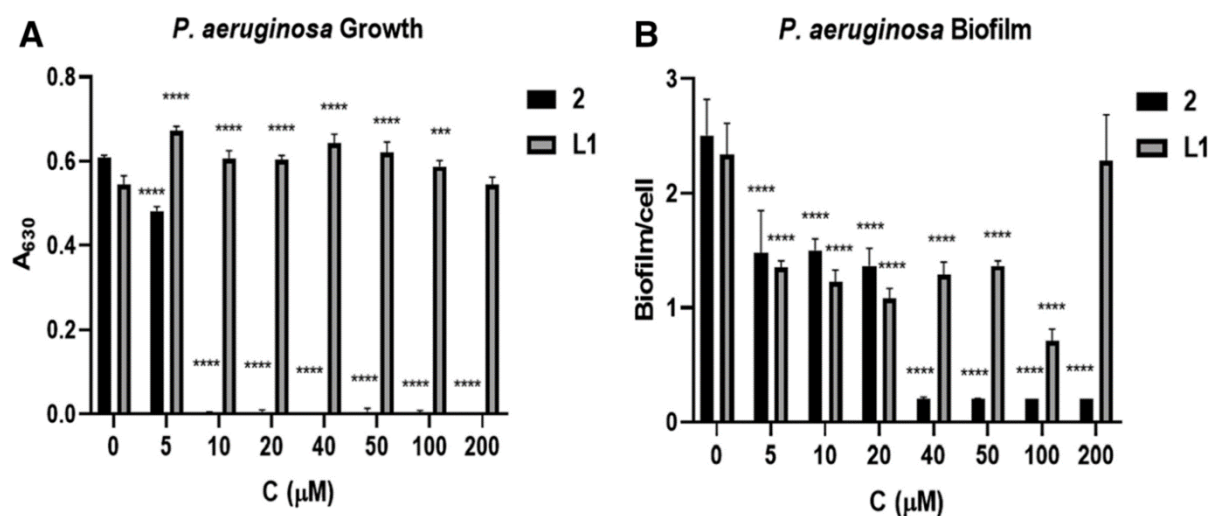
<sup>[β]</sup> δεν υπολογίστηκε.

### 1.5.2. Αναστολή σχηματισμού βιομεμβρανών

Στο πλαίσιο της παρούσας έρευνας, μελετήθηκε και η επίδραση της συγκέντρωσης του υποκαταστάτη **L1** και του συμπλόκου **2** στη δυνατότητα να αναστέλλεται ο σχηματισμός βιομεμβρανών από τα μικρόβια *P. aeruginosa* και τον ανθεκτικό στη μεθικιλίνη *S. aureus* (MRSA). Στο παρακάτω γράφημα (Εικόνα 11) παρουσιάζεται η προαναφερθείσα δραστηριότητα σε σύγκριση με πλαγκτονικά (ελεύθερα) MRSA και ακολουθεί η αντίστοιχη σύγκριση για τα *P. aeruginosa*. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης σε συνεργασία με την Καθηγήτρια Αναστασία Πανταζάκη.



**Εικόνα 11.** Ανάπτυξη του πλαγκτονικού MRSA και του σχηματισμού βιομεμβρανών παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του 2 ή L1.



**Εικόνα 12.** Ανάπτυξη του πλαγκτονικού *P. aeruginosa* και του σχηματισμού βιομεμβρανών παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του **2** ή **L1**.

Καταρχήν για λόγους σύγκρισης, επαναλήφθηκαν τα τεστ σε πλαγκτονικά βακτήρια. Στην περίπτωση του **L1**, δεν παρατηρήθηκε καμία δράση έναντι του MRSA ακόμη στην υψηλότερη συγκέντρωση που ελέγχθηκε, ενώ το σύμπλοκο **2** ανέστειλε αυτά τα βακτήρια σε συγκεντρώσεις πάνω από 20 μM. Και τα δύο αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά που λάβαμε από το Πανεπιστήμιο του Queensland.

Σχετικά με το σχηματισμό βιομεμβρανών, η δράση των δύο παραγώγων παρουσιάζει ενδιαφέρον. Ο υποκαταστάτης **L1** έδειξε μία αρχική αύξηση στο σχηματισμό βιομεμβράνης, η οποία διπλασιάστηκε περίπου στο 20 μM και παρέμεινε σταθερή σε αυτό το υψηλό επίπεδο και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι τα πλαγκτονικά κύτταρα συνυπάρχουν με μία ολοένα αυξανόμενη ποσότητα βιομεμβράνης, υποδηλώνοντας ότι ακόμη κι αν ο υποκαταστάτης δεν μειώνει επαρκώς τον πληθυσμό των πλαγκτονικών βακτηρίων, δημιουργεί ένα εχθρικό περιβάλλον ωθώντας τα βακτήρια προς σχηματισμό βιομεμβρανών ως μία προσαρμογή άμυνας.

Στην περίπτωση του συμπλόκου **2**, παρατηρήθηκε απόκριση σε δύο φάσεις. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, κάτω από 20 μM, ο σχηματισμός βιομεμβρανών παρέμεινε σε χαμηλό επίπεδο και χωρίς μεταβολές, ενώ πάνω από αυτή τη συγκέντρωση πραγματοποιήθηκε σημαντική αύξηση έως και τρεις φορές στα 20 μM. Πάνω από αυτήν τη συγκέντρωση ξεκίνησε η αναστολή της βιομεμβράνης, φτάνοντας σχεδόν σε ολική εξαφάνιση στα 200 μM. Όπως παρατηρήθηκε για το **L1**, τα ελεύθερα κύτταρα και η βιομεμβράνη συνυπήρχαν. Ωστόσο, παρουσία του συμπλόκου **2** μέχρι τα 20 μM υπάρχει μία πολύ μικρή και σταθερή μάζα βιομεμβράνης που είναι περίπου η μισή σε σχέση με το **L1**. Υποθέτοντας ότι το **L1** και το **2** έχουν συγκρίσιμη ικανότητα να δημιουργούν εχθρικό μικροπεριβάλλον, θα περιμέναμε μία παραπλήσια αύξηση στη μάζα της βιομεμβράνης. Ωστόσο, δε συμβαίνει αυτό, υποδεικνύοντας πως το σύμπλοκο **2** είτε δεν ωθεί αρκετά τα πλαγκτονικά κύτταρα να σχηματίσουν βιομεμβράνες, ή ότι πραγματοποιεί μία άμεση αναστολή των μεμβρανών δημιουργώντας μία δυναμική ισορροπία ανάμεσα στις δύο φάσεις των βακτηρίων. Η

εντυπωσιακή αύξηση στο σχηματισμό βιομεμβρανών σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από το MIC είναι σημαντική και έχει παρατηρηθεί και εξηγηθεί στη βιβλιογραφία [29,30].

Όσον αφορά στο *P. aeruginosa*, η επίδραση του **L1** στον πλαγκτονικό πληθυσμό είναι μηδαμινή, όπως αναμενόταν. Το σύμπλοκο **2**, αντίθετα με την περίπτωση του MRSA, έδειξε μία ισχυρή αναστολή σε συγκεντρώσεις άνω των 10  $\mu\text{M}$ , σε συμφωνία και με τα αποτελέσματα του CO-ADD. Επιπλέον, η αύξηση της συγκέντρωσης μείωσε αναλογικά το σχηματισμό βιομεμβρανών. Αυτή η παρατήρηση υποδηλώνει την αυξημένη αναστολή του συμπλόκου **2** έναντι των ελεύθερων βακτηρίων και την εγκαθίδρυση ενός εχθρικού περιβάλλοντος σε συγκεντρώσεις 5-20  $\mu\text{M}$ , οδηγώντας σε σταθερότητα σχηματισμού βιομεμβρανών. Είναι αξιοσημείωτο πως σε συγκεντρώσεις 40-200  $\mu\text{M}$  εξακολουθεί να υπάρχει ένας μικρός αλλά σταθερός πληθυσμός κυττάρων σε μορφή βιομεμβράνης, τη στιγμή που πλαγκτονικά κύτταρα δεν έχουν επιβιώσει. Στην περίπτωση του **L1** η αρχική μάζα βιομεμβράνης μειώνεται περίπου στο μισό σε συγκέντρωση 5-50  $\mu\text{M}$  και στη συνέχεια ανακάμπτει μέχρι το αρχικό της επίπεδο.

Τα παραπάνω αποτελέσματα συσχετίζονται επαρκώς με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Οι Bjarnsholt και συνεργάτες έχουν αναφέρει δεδομένα σχετικά με τη δράση των συμπλόκων αργύρου έναντι βιομεμβρανών σχηματισμένων από βακτήρια *P. aeruginosa*. Σύμφωνα με αυτή τη μελέτη, απαιτείται συγκέντρωση 10-100 φορές μεγαλύτερη για την εξαφάνιση των βιομεμβρανών, σε σχέση με τη συγκέντρωση που απαιτείται για την πλήρη αναστολή των πλαγκτονικών μικροβίων. Τα αποτελέσματά μας, είναι σε συμφωνία, καθώς, όντως απαιτήθηκε περίπου η δεκαπλάσια συγκέντρωση για να συμβεί αυτό.

### 1.5.3. Αλληλεπίδραση με το DNA

Παράλληλα με τα προαναφερθέντα πειράματα, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για την αλληλεπίδραση των ενώσεων **2** και **L1** με το DNA, καθώς αυτό είναι ο στόχος πολλών βιολογικά ενεργών μορίων και η δράση αρκετών αντιβακτηριδιακών φαρμάκων σχετίζεται με την πρόσδεση στο DNA και την αναστολή του διπλασιασμού του [30,31]. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα θερμικής μετουσίωσης και ιζώδους σε συνεργασία με τη συνάδελφο Δρ. Βαρβάρα Μαυροειδή. Παρακάτω, θα αναφερθούν τα αποτελέσματα συνοπτικά.

Οι μετρήσεις θερμικής μετουσίωσης μπορούν να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τον τύπο και την ισχύ της αλληλεπίδρασης παραγώγου – DNA σε διάλυμα. Με αυξανόμενη θερμοκρασία, το DNA διασπάται σε μονές αλυσίδες και παρατηρείται υπερχρωμισμός στο φάσμα του σε UV. Η θερμοκρασία τήξης  $T_m$  και η αύξηση του υπερχρωμισμού ή επηρεάζονται από την αλληλεπίδραση.

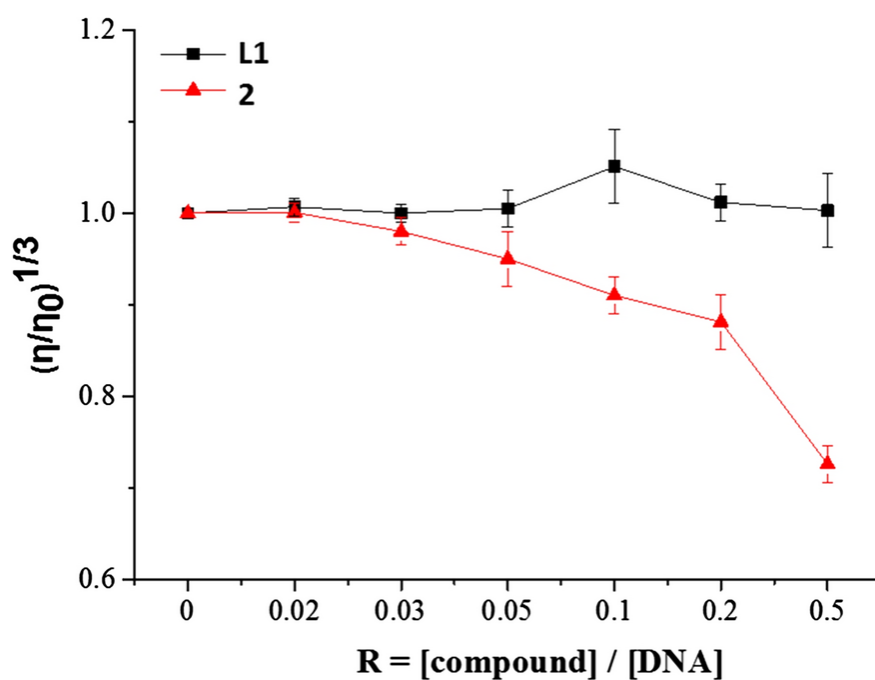
Οι σχετικές μετρήσεις για το **L1** και το **2** παρουσιάζονται στον πίνακα 6. Είναι σαφές πως υπάρχει αλληλεπίδραση με το DNA. Ωστόσο, οι χαμηλές τιμές  $T_m$  αποκλείουν την αλληλεπίδραση μέσω παρεμβολής και υποδεικνύουν διαφορετικό τρόπο πρόσδεσης σε αυτό.

**Πίνακας 6.** Θερμική μετουσίωση ( $\Delta T_m$  and  $\%h$ ) του CT-DNA παρουσία των **L1** και **2** ( $\pm SD$  στις παρενθέσεις). Το R είναι η αναλογία παραγώγου – DNA.

		<b>R = 0</b>		<b>R = 0.01</b>		<b>R = 0.05</b>		<b>R = 0.1</b>		<b>R = 0.33</b>		<b>R = 0.5</b>	
		$\Delta T_m$ (°C)	$\%h$	$\Delta T_m$ (°C)	$\%h$	$\Delta T_m$ (°C)	$\%h$	$\Delta T_m$ (°C)	$\%h$	$\Delta T_m$ (°C)	$\%h$	$\Delta T_m$ (°C)	$\%h$
<b>L1</b>	0	30.1	28.4	0.24	29.1	0.23	29.7	0.28	28.7	0.25	28.9	0.29	28.9
		(0.5)	(2.3)	(0.01)	(1.9)	(0.01)	(2.9)	(0.02)	(2.1)	(0.01)	(3.2)	(0.02)	(3.2)
<b>2</b>	0	30.1	28.9	-0.20	27.1	-0.83	25.9	-1.50	25.1	-1.99	24.9	-2.89	24.9
		(0.5)	(3.6)	(0.02)	(3.8)	(0.08)	(1.6)	(0.09)	(2.9)	(0.10)	(0.26)	(3.2)	(3.2)

Προκειμένου να διερευνήσουμε περαιτέρω τη φύση της αλληλεπίδρασης, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της μέτρησης του ιξώδους υδροδυναμικά, το οποίο είναι ευαίσθητο στις μεταβολές του μήκους του DNA.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 13, δεν παρατηρήθηκε αξιόλογη μεταβολή για τον υποκαταστάτη **L1**. Στην περίπτωση του συμπλόκου **2**, παρατηρήθηκε μία σημαντική μείωση του ιξώδους φτάνοντας την τιμή 0.7 στην αναλογία  $[2]/[DNA] = 0.5$ . Αυτή η μεταβολή συνιστά τη μείωση του μήκους του DNA, που μπορεί να αποδοθεί στην αλληλεπίδρασή του με το ιόν του αργύρου.



**Εικόνα 13.** Επίδραση της αυξανόμενης ποσότητας των **L1** και **2** στο σχετικό ιξώδες του CT-DNA ( $5 \times 10^{-5}$  M) στους 25 °C με αναλογίες R = ένωση / [DNA] από 0 έως 0.5

## 2. Μελέτη σύνθεσης, δομής, αντιβακτηριδιακής και αντιμυκητιασικής δραστηριότητας συμπλόκων του άργυρου(I) με πυραζολίνες που φέρουν ομάδα βενζοϊκού οξέος

(Δημοσίευση 2)

### 2.1. Γενικά

Σε αυτήν τη διακριτή υποενότητα, θα αναφερθεί ο σχεδιασμός, η σύνθεση και η μελέτη συμπλόκων του άργυρου(I) με πυραζολίνες που φέρουν ομάδα βενζοϊκού οξέος. Σε αυτήν την περίπτωση η σύμπλεξη αναμένεται να ακολουθήσει εντελώς διαφορετικό δρόμο, αφού ο υποκαταστάτης φέρει δύο άτομα οξυγόνου από καρβοξυλική ομάδα, αντί δύο ατόμων αζώτου που βρίσκονται σε πιο μακρινή θέση.

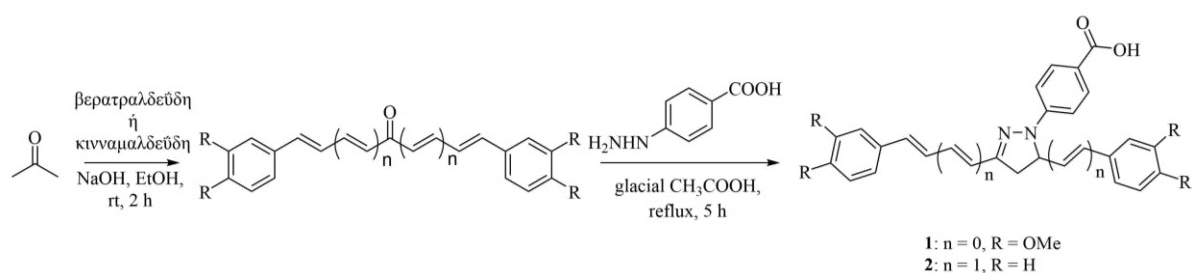
Η λογική του σχεδιασμού είναι η μελέτη της ικανότητας να δεσμεύει τα ιόντα του αργύρου μία ένωση με παρόμοιο πυρήνα πυραζολίνης, αλλά διαφορετικά άτομα πρόσδεσης και οι συνέπειες στη βιολογική δραστηριότητα.

Τα δεδομένα που θα αναφερθούν στην πορεία θα είναι σχετικά περιορισμένα, ως προς τις βιολογικές δράσεις, καθώς δεν είναι όλα στη διάθεσή μας ακόμη και πρόκειται να συμπεριληφθούν σε δημοσίευση που είναι προς υποβολή εντός των επόμενων εβδομάδων.

Για λόγους ευκολίας παρακολούθησης των δεδομένων σε σχέση με τα άρθρα που έχουν ή πρόκειται να δημοσιευθούν, η αρίθμηση θα ακολουθήσει αυτήν της δημοσίευσης και δε σχετίζεται με την προηγούμενη ενότητα.

### 2.2. Σύνθεση

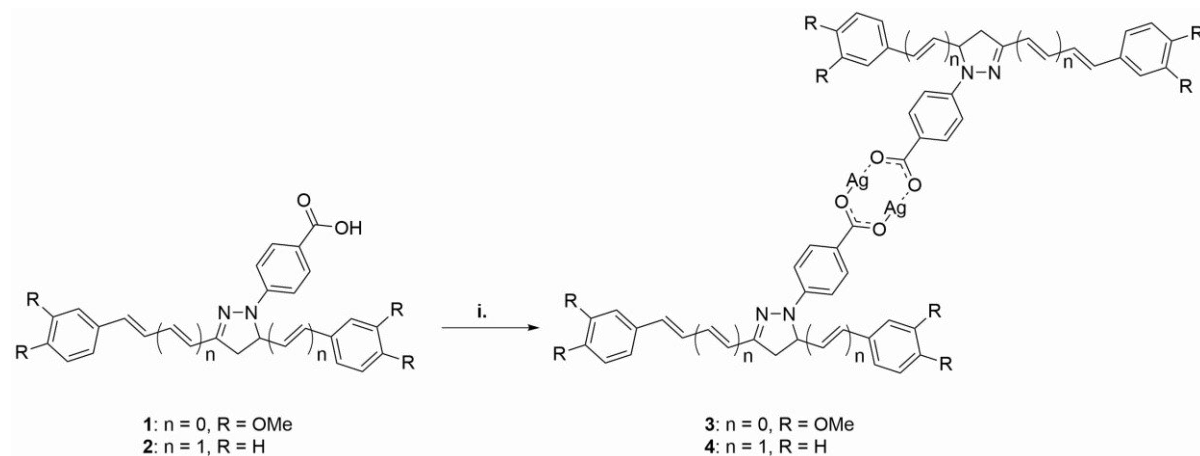
Οι υποκαταστάτες **1** και **2** παρασκευάστηκαν από το 4-υδραζινοβενζοϊκό οξύ και τις κατάλληλες συμμετρικές ακόρεστες κετόνες, οι οποίες προέρχονται από την ακετόνη και τη βερατραλδεΐδη ή τη κινναμαλδεΐδη (Εικόνα 14).



**Εικόνα 14.** Σύνθεση των πυραζολινών **1** και **2** μέσω των αντίστοιχων ενδιάμεσων α,β-ακόρεστων κετονών.

Τα σύμπλοκα αργύρου **3** και **4** παρασκευάστηκαν αναμιγνύοντας ένα μεθανολικό διάλυμα των αντίστοιχων υποκαταστατών **1** και **2** με υδατικό διάλυμα νιτρικού άργυρου(I)  $\text{AgNO}_3$

διαλυμένοι σε νερό σε αναλογία μεταλλικό ιόν:υποκαταστάτης:βάση 1:1:1, αφότου προηγήθηκε αποπρωτονίωση με αραιό διάλυμα υδροξειδίου του καλίου KOH (Εικόνα 15).



**Εικόνα 15.** Σύνθεση και προτεινόμενες δομές των συμπλόκων 3 και 4. Αντιδραστήρια και συνθήκες: i. υδ. KOH (1%), AgNO<sub>3</sub>, μεθανόλη/νερό, θερμοκρασία δωματίου, 30 min

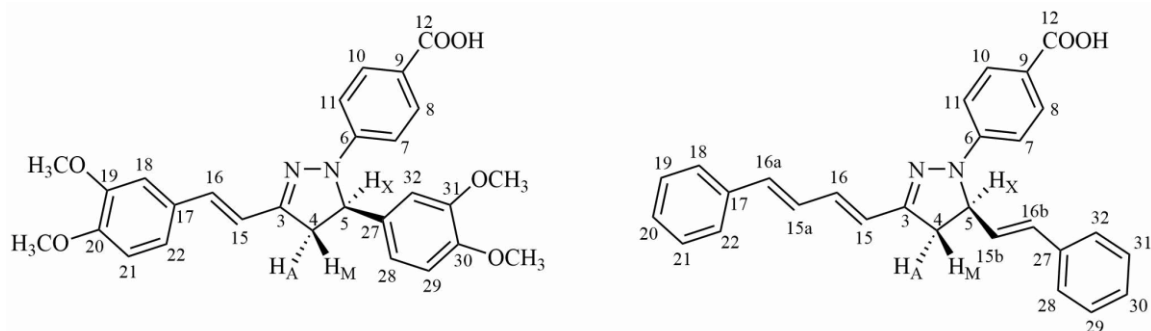
Τα προϊόντα απομονώθηκαν μετά από διήθηση ως σκούρα καφέ ή πράσινα στερεά και χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία NMR και FT-IR. Δυστυχώς, δεν μπορέσαμε να λάβουμε κατάλληλα σχηματισμένους κρυστάλλους για κρυσταλλογραφική ανάλυση. Και τα δύο προϊόντα είναι αδιάλυτα στο νερό, μεθανόλη, αιθανόλη, διαιθυλαιθέρα και εξάνιο, ενώ είναι διαλυτά στο χλωροφόρμιο και σε πολικούς απρωτικούς διαλύτες, όπως το DMSO και το DMF.

### 2.3. Μελέτη δομής

#### 2.3.1. Φασματοσκοπία NMR και FT-IR

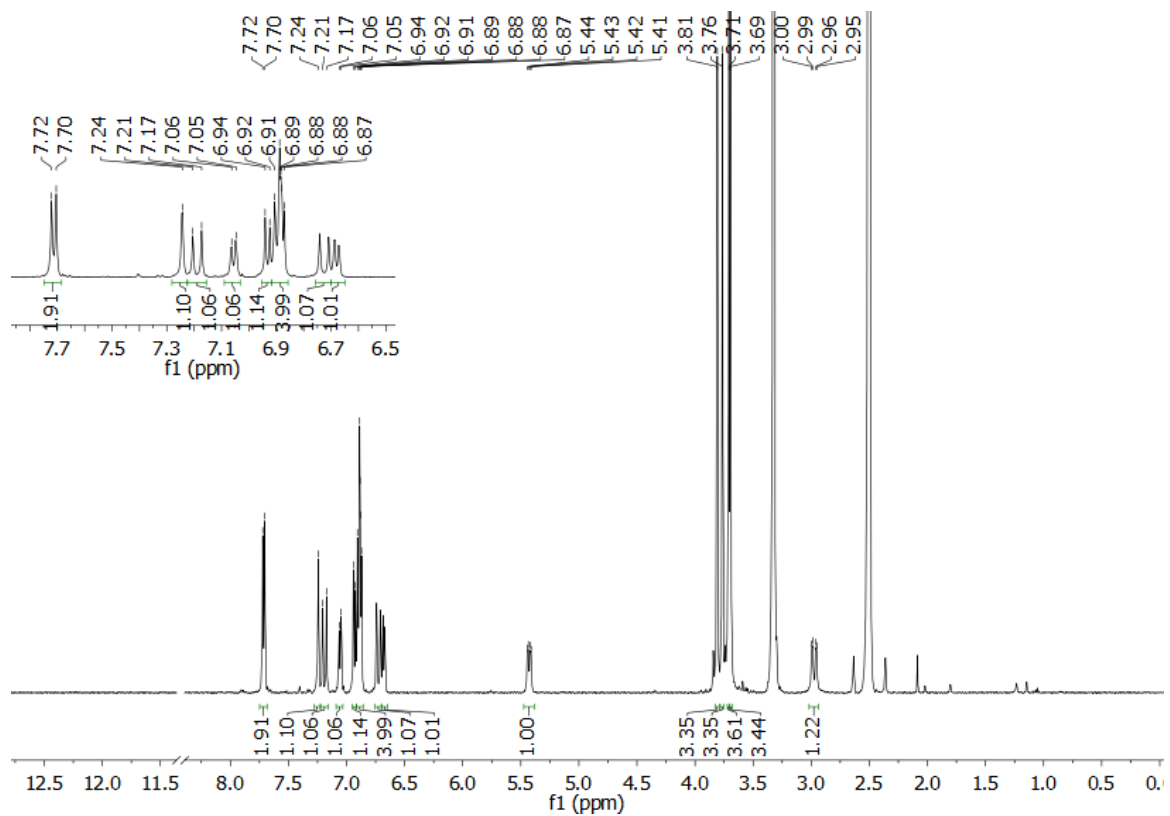
Απουσία κατάλληλων κρυστάλλων για κρυσταλλογραφική ανάλυση, πειράματα με NMR και FT-IR πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να επιβεβαιωθεί η συμπλοκοποίηση και να διερευνηθεί η δομή των προϊόντων.



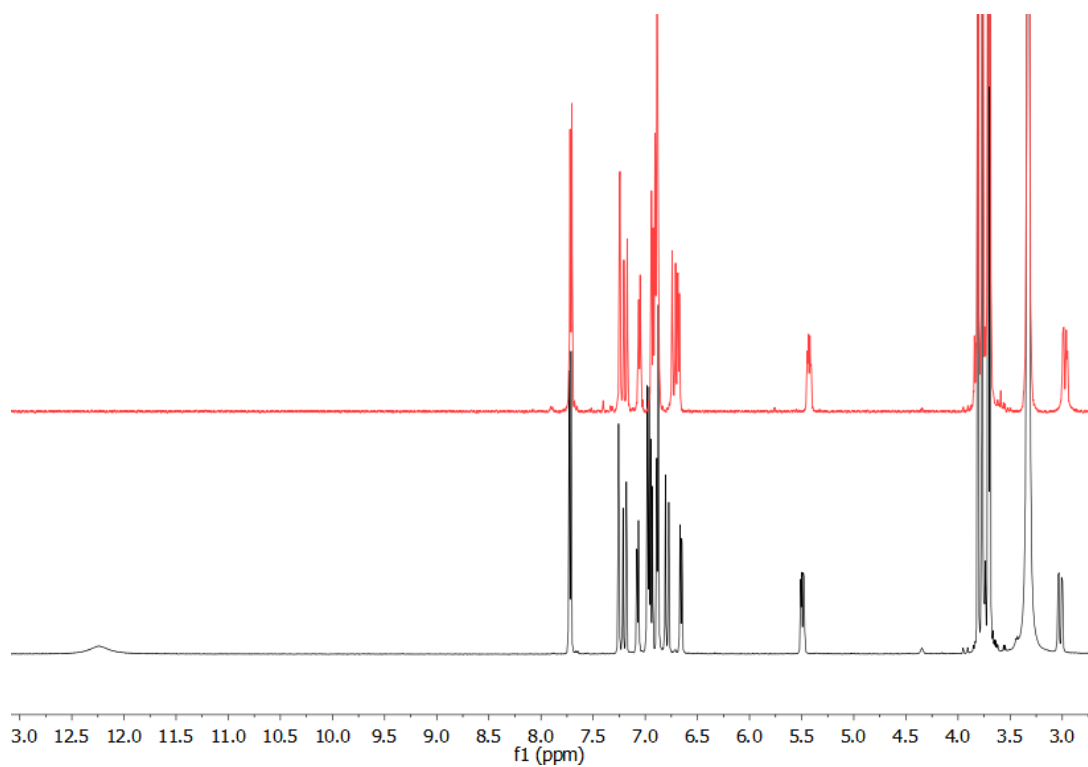


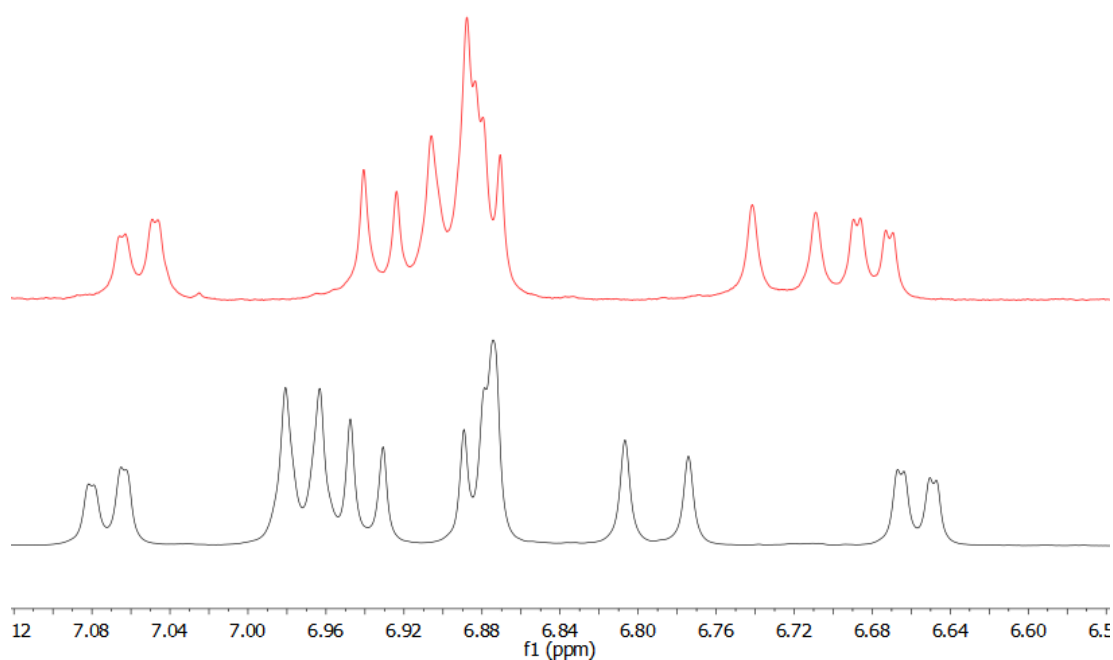
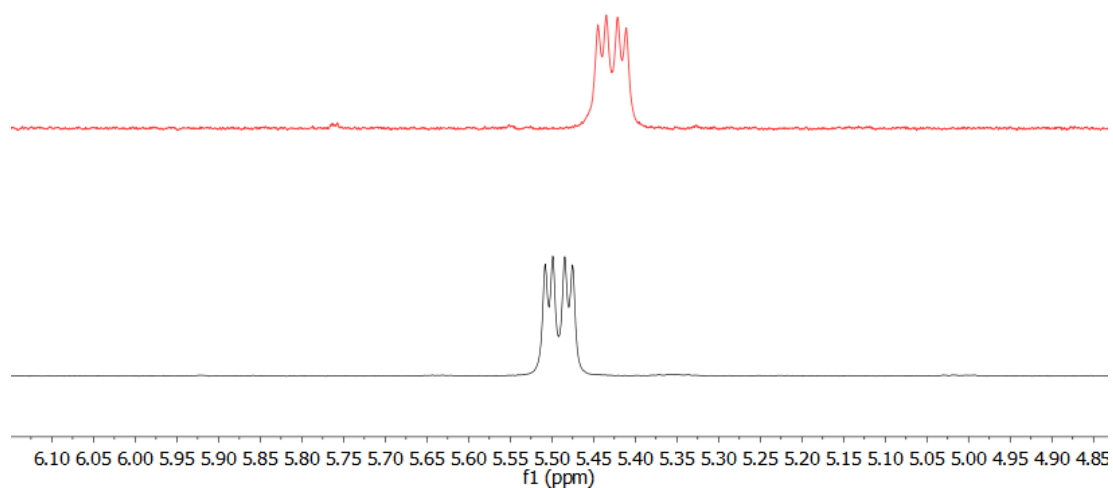
**Εικόνα 16.** Αρίθμηση των ατόμων άνθρακα των υποκαταστατών **1,2** που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των συμπλόκων **3,4**, για την περιγραφή των αποτιμήσεων των φασμάτων NMR. Τα προϊόντα είναι ρακεμικά, αλλά παρουσιάζεται το ένα εναντιομερές για λόγους σαφήνειας και ευκολίας στην περιγραφή.

Ο σχηματισμός του δεσμού Ag-O επιβεβαιώθηκε από την απουσία του σήματος του καρβοξυλικού πρωτονίου στα 12.5 ppm περίπου στα φάσματα <sup>1</sup>H NMR (Εικόνες 17-20) και από την μετατόπιση σε υψηλότερη συχνότητα του καρβονυλικού άνθρακα C-12 (Εικόνα 16) και του γειτονικού αρωματικού C-9 στα φάσματα <sup>13</sup>C NMR (έως 3.0 ppm περίπου) (Εικόνες 21-23). Μερικά επιπλέον πρωτόνια (H-1, H-5, H-16) και άνθρακες (C-5, C-7, C-11) εμφανίζονται ελαφρώς μετατοπισμένοι σε σχέση με τους υποκαταστάτες, αλλά το συνολικό μοτίβο των φασμάτων παραμένει αμετάβλητο. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι τεταρτοταγείς άνθρακες, κυρίως αυτοί του συμπλόκου 4 και ακόμη περισσότερο αυτοί κοντά στα άτομα σύμπλεξης (καρβονυλικοί C-12, C-9, αλλά και C-3 και C-6) δεν εμφανίστηκαν στα πειράματα 1D <sup>13</sup>C NMR, αλλά ανιχνεύθηκαν στα πειράματα <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H HMBC NMR (Εικόνα 24).

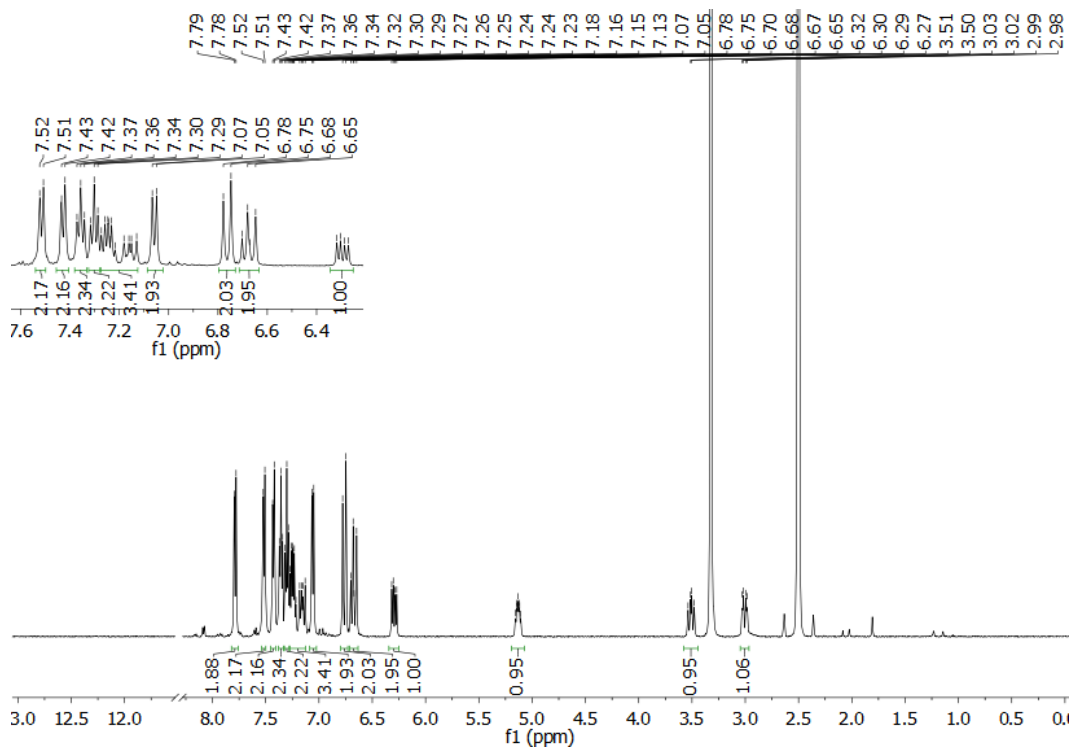


Εικόνα 17. Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της ένωσης 3 σε DMSO-d<sub>6</sub>.

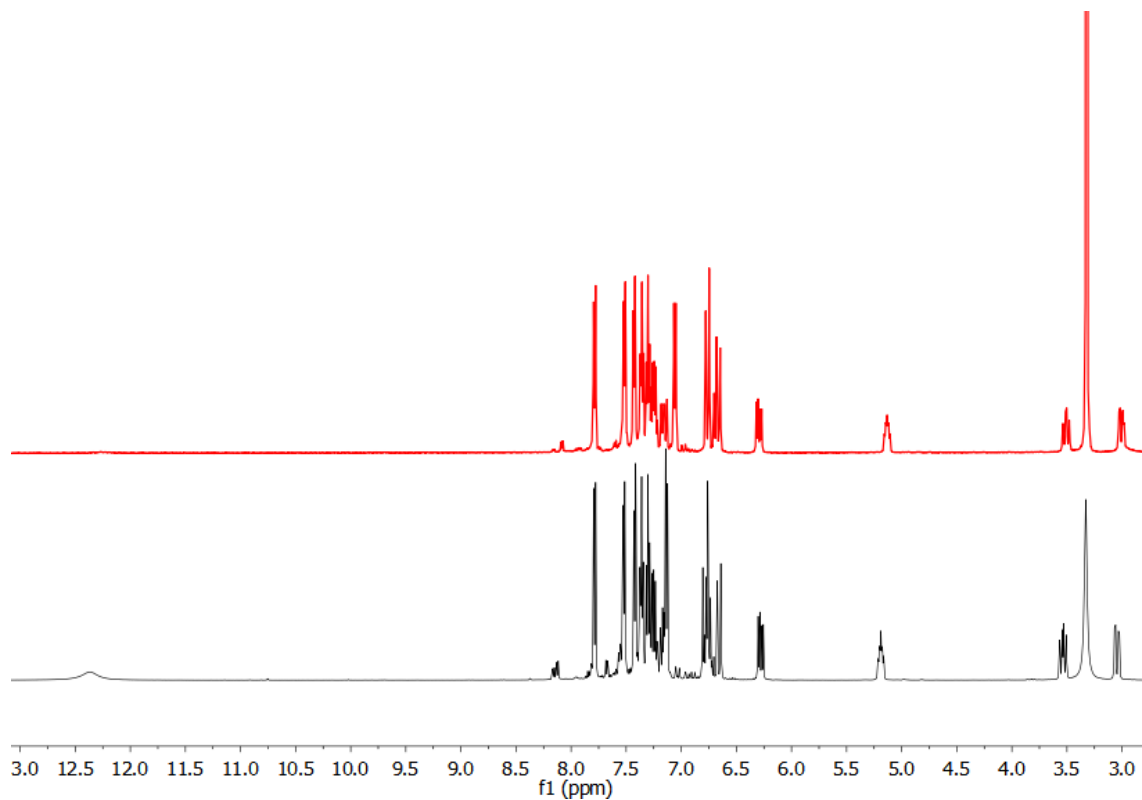


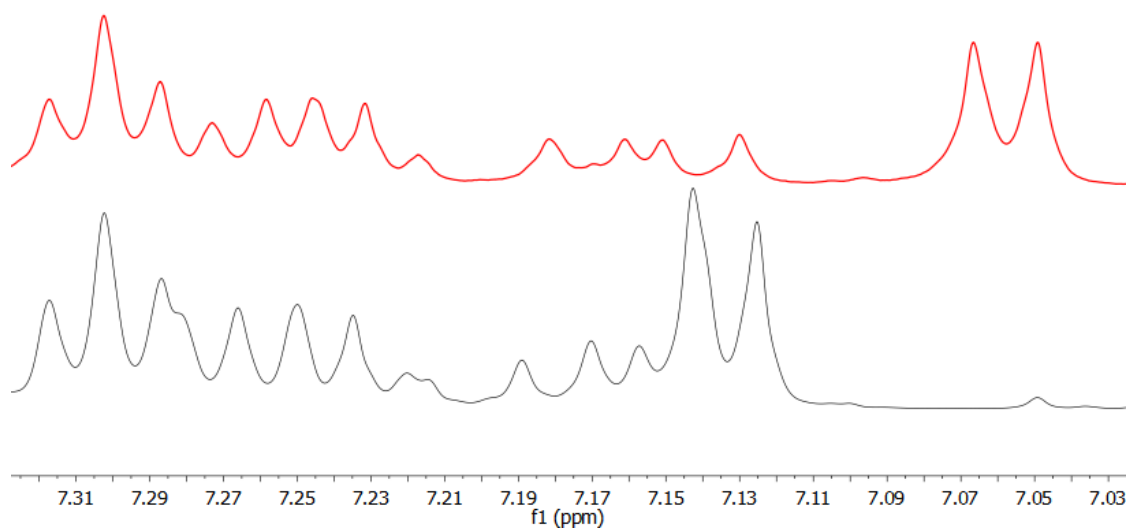
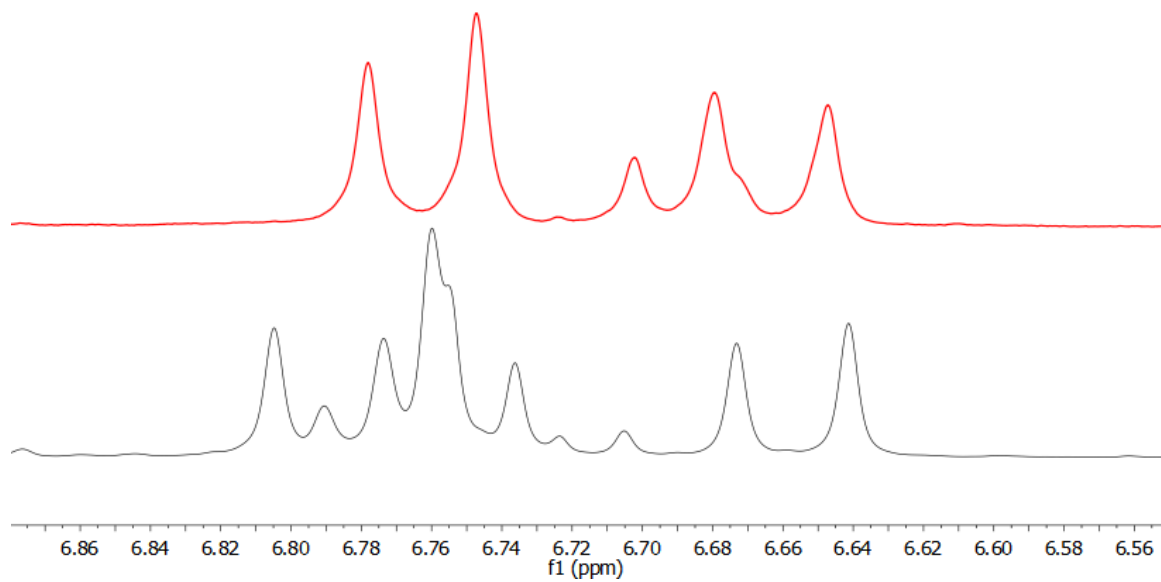


**Εικόνα 18.** Συγκριτικές εικόνες φασμάτων <sup>1</sup>H NMR του συμπλόκου **3** (κόκκινο) με τον υποκαταστάτη **1** (μαύρο).

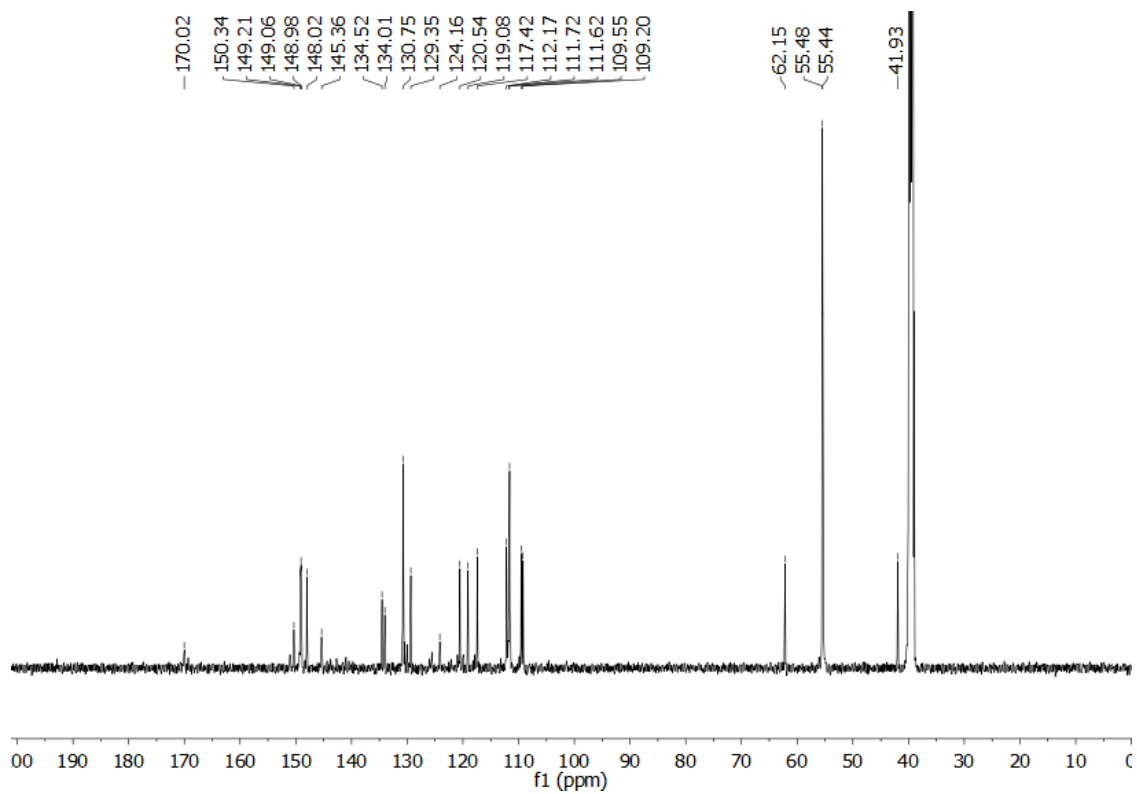


Εικόνα 19. Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της ένωσης 3 σε DMSO-d<sub>6</sub>.

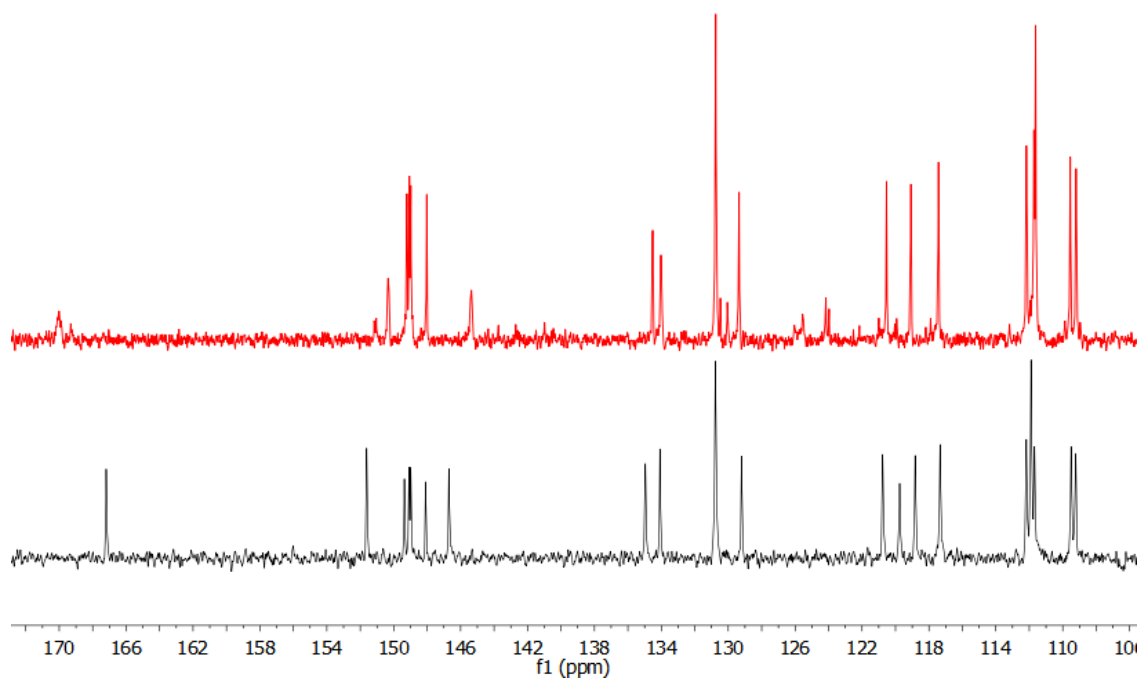




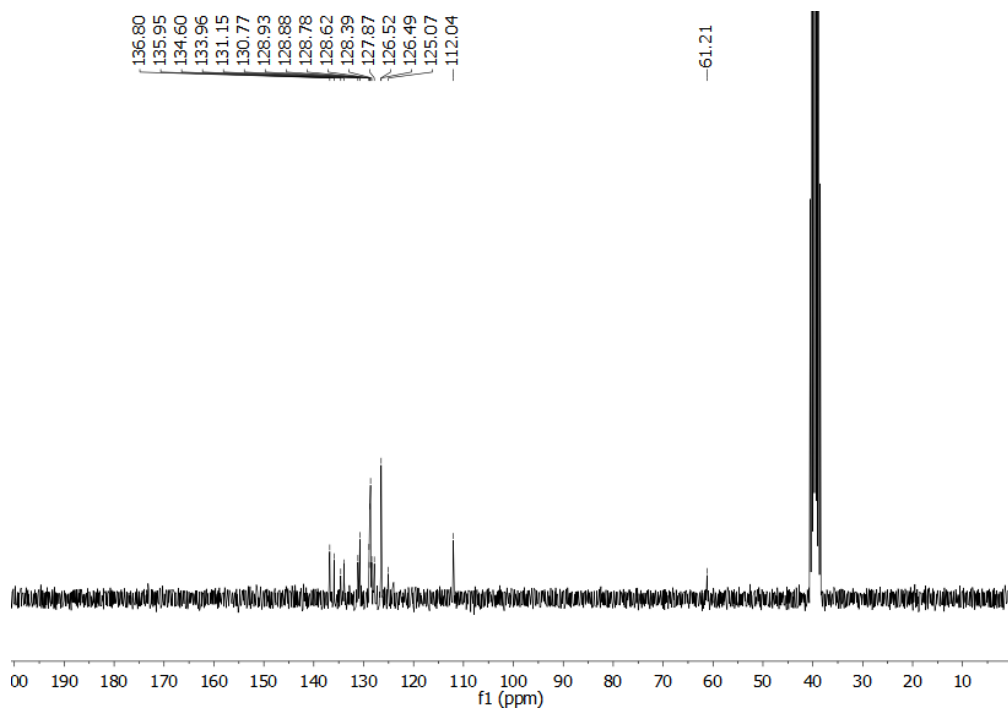
**Εικόνα 20.** Συγκριτικές εικόνες φασμάτων <sup>1</sup>H NMR του συμπλόκου **4** (κόκκινο) με τον υποκαταστάτη **2** (μαύρο).



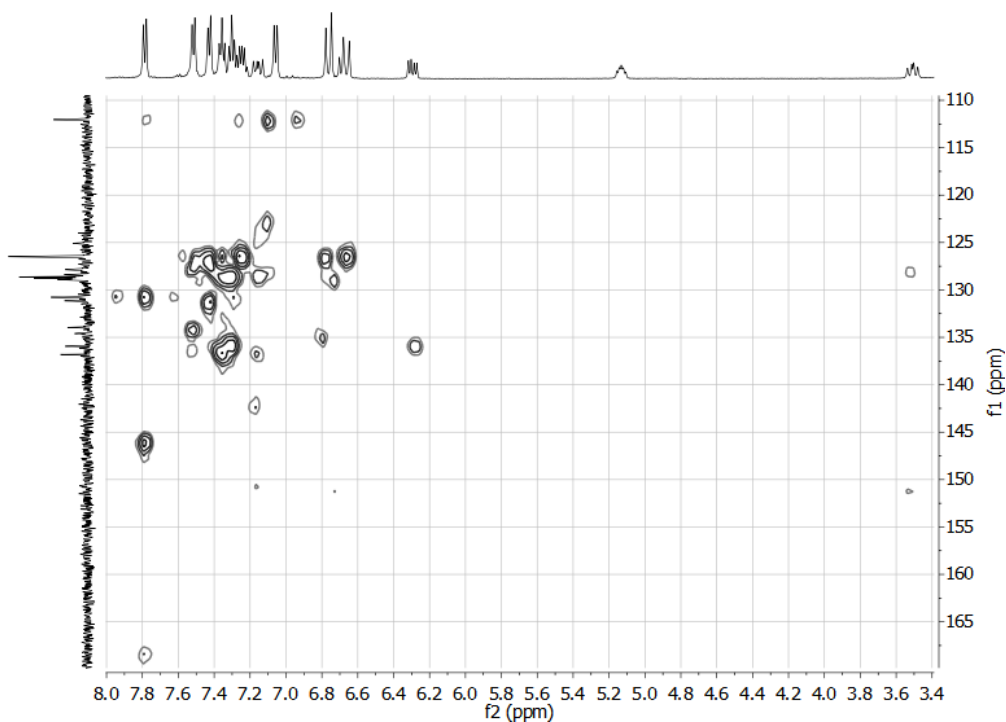
**Εικόνα 21.** Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **3** σε  $\text{DMSO-}d_6$ .



**Εικόνα 22.** Συγκριτικές εικόνες φασμάτων  $^{13}\text{C}$  NMR του συμπλόκου **3** (κόκκινο) με τον υποκαταστάτη **1** (μαύρο).



**Εικόνα 23.** Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **4** σε  $\text{DMSO-}d_6$ .

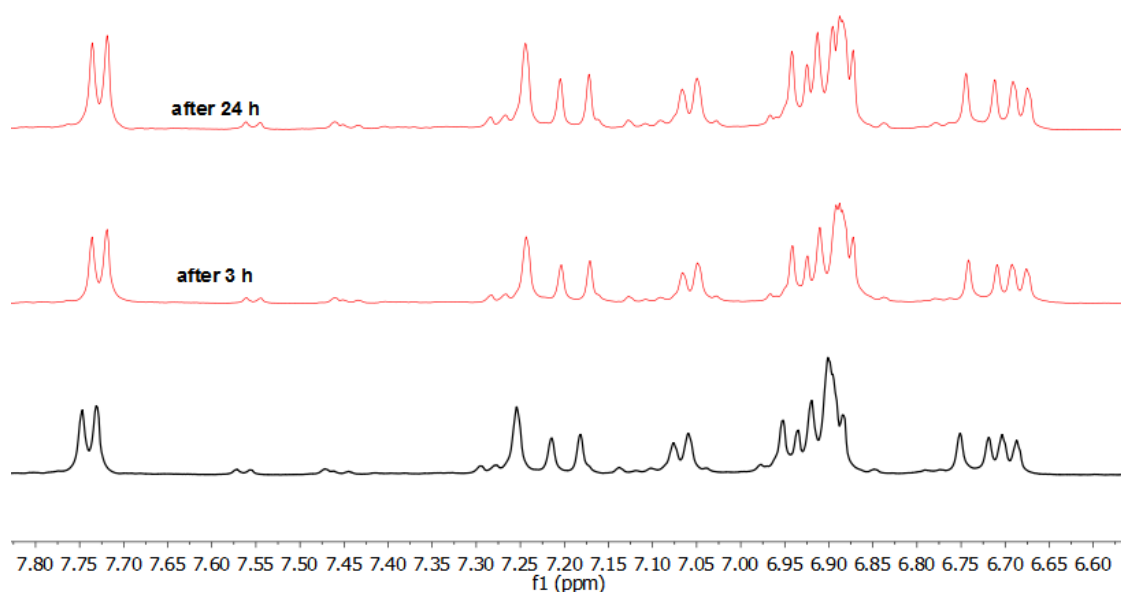


**Εικόνα 24.** Φάσμα  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  HMBC NMR (298 K) της ένωσης **4** σε  $\text{DMSO-}d_6$  με χρόνο μέτρησης 24 h. Το πείραμα δείχνει τους τεταρτοταγείς άνθρακες που δεν ανιχνεύθηκαν στο πείραμα 1D  $^{13}\text{C}$  και τη σταθερότητα και τρόπο συναρμογής του μορίου. Δεν παρατηρήθηκαν νέες ετεροπυρηνικές αλληλεπιδράσεις στο φάσμα HMBC, ειδικά στην περιοχή που εμφανίζεται το καρβονύλιο στα 168.4 ppm.

Το ιόν καρβοξυλίου μπορεί να συναρμοστεί με μέταλλα μέσω γεφυρών ή με ένα μονοδοντικό υποκαταστάτη. Η εξαφάνιση ή μετατόπιση κορυφών FT-IR που συσχετίζονται με συμμετρικές ή ασύμμετρες δονήσεις μπορούν να δώσουν μία ισχυρή ένδειξη για τον τρόπο συναρμογής [33,34]. Σε αυτά τα πειράματα παρατηρήθηκε η εξαφάνιση της κορυφής του καρβονυλίου περίπου στα  $1670\text{ cm}^{-1}$ , υποδηλώνοντας την αποπρωτονίωση του καρβοξυλίου και την ισχυρή αλληλεπίδραση με το ιόν άργυρου(I). Η εμφάνιση νέας κορυφής στα  $1510$  και  $1535\text{ cm}^{-1}$  για τα **3** και **4** αντίστοιχα, που αποδίδονται στην ασύμμετρη δόνηση του συστήματος  $-\text{COO}$  και μίας κορυφής στα  $1375$  και  $1370\text{ cm}^{-1}$  για τα **3** και **4** αποτελούν ένδειξη για σύνδεση τύπου γέφυρας, καθώς η τιμή του  $\Delta\nu$  είναι πολύ κάτω από τα  $200\text{ cm}^{-1}$  ( $135$  και  $165\text{ cm}^{-1}$  για τα **3** και **4**, αντίστοιχα) [35,36].

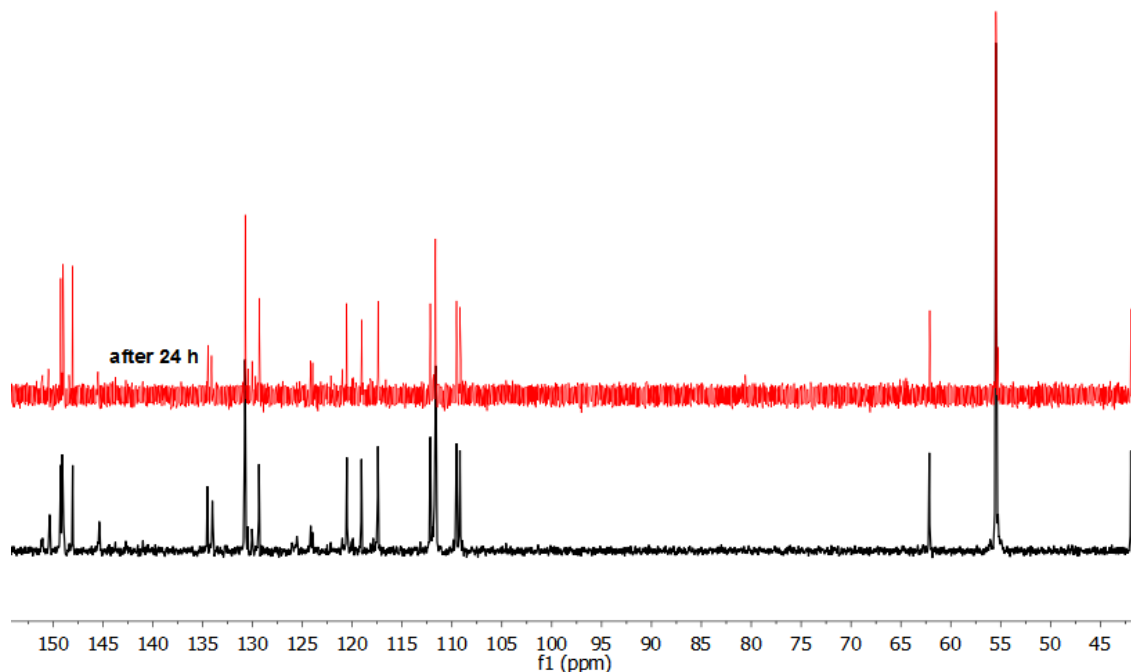
### 2.3.2. Μελέτη σταθερότητας

Η σταθερότητα των συμπλόκων **3** και **4** σε στερεά φάση και σε διάλυμα μετρήθηκε με πειράματα 1D και 2D NMR και φασματοσκοπία UV/Vis. Κατάλληλα προστατευμένα από το φως στερεά δείγματα, αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου υπό κανονικές συνθήκες φύλαξης, παρουσίασαν πανομοιότυπα φάσματα NMR τουλάχιστον για 6 μήνες. Η σταθερότητα του παραγώγου **3** σε διάλυμα DMSO εξετάστηκε πρώτα με NMR. Σε αυτές τις μετρήσεις, η **3** εμφάνισε αμετάβλητα φάσματα μέχρι και 24 ώρες μετά (Εικόνες 25,26).



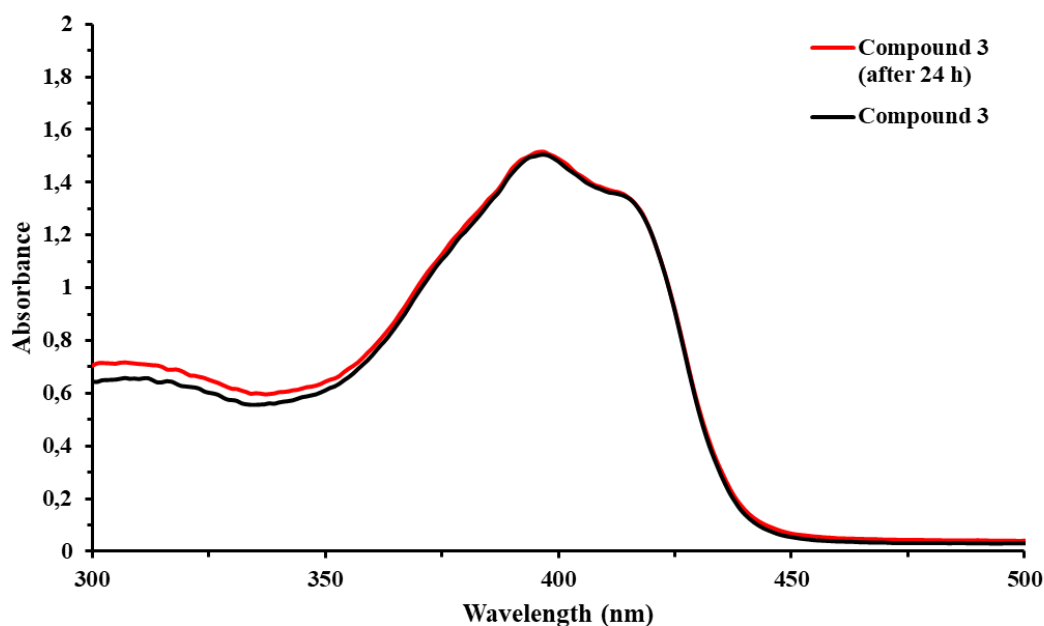
**Εικόνα 25.** Συγκριτικές εικόνες φασμάτων  $^1\text{H}$  NMR του συμπλόκου **3** για δοκιμή σταθερότητας –  $t = 0, 3, 24\text{ h}$ .





**Εικόνα 26.** Συγκριτικές εικόνες φασμάτων  $^{13}\text{C}$  NMR του συμπλόκου **3** για δοκιμή σταθερότητας –  $t = 0, 24 \text{ h}$ .

Η μέτρηση της απορρόφησης της **3** σε UV/Vis σε διάλυμα 10% DMSO σε συγκέντρωση  $2 \times 10^{-5} \text{ M}$  οδήγησε σε πρακτικά απaráλλαχτα φάσματα (Εικόνα 27). Η ένωση **24** παρουσίασε την ίδια συμπεριφορά στο NMR έως 96 ώρες. Επιπλέον, το ίδιο προϊόν επέδειξε σταθερότητα, όπως φαίνεται στο φάσμα  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  HMBC NMR (298 K) σε DMSO- $d_6$  (Εικόνα 24). Αυτό το πείραμα είναι πιο ευαίσθητο στην εμφάνιση νέων ετεροπυρηνικών αλληλεπιδράσεων, που προκαλούνται από διασπάσεις και ως εκ τούτου, θα μπορεί να έχει εμφανίσει νέα σήματα, ειδικά στην περιοχή του καρβονυλίου ή του C-9. Η απουσία οποιασδήποτε νέου σήματος απέδειξε τη σταθερότητα του μορίου. Δυστυχώς, δεν κατέστη δυνατό να πραγματοποιήσουμε δοκιμές σταθερότητας σε υδατικό διάλυμα 1% DMSO, λόγω της ελάχιστης διαλυτότητας του προϊόντος σε αυτό το μίγμα διαλυτών σε θερμοκρασία δωματίου.



Εικόνα 27. Δοκιμή σταθερότητας με UV για τη ένωση 3 σε 10% DMSO ( $2 \times 10^{-5}$  M) για 24 h.

## 2.4. Πειράματα βιολογικής δράσης

### 2.4.1. Αντιμικροβιακή δραστηριότητα

Προκειμένου να υπολογισθεί η πιθανή αντιμικροβιακή δραστηριότητα των σύμπλοκων ενώσεων 3,4 και των υποκαταστατών, πραγματοποιήθηκε προκαταρκτική εξέταση διαλογής (primary screening) έναντι 5 σημαντικών ESKAPE παθογόνων και δύο μυκητών. Συγκεκριμένα, η εξέταση ποσοστιαίας αναστολής πραγματοποιήθηκε σε σταθερή συγκέντρωση δραστικής ουσίας (32  $\mu\text{g/mL}$ ) έναντι των *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* (MRSA, καθώς και των μυκητών *C. neoformans* και *C. albicans* (Πίνακας 7). Στόχος ήταν ο εντοπισμός κάποιας ένωσης με αξιόλογη δραστηριότητα, η οποία στη συνέχεια θα εξεταζόταν πιο ενδελεχώς. Σε αυτές τις αναλύσεις διαπιστώθηκε πως η αρχική ένωση 1 και ο υποκαταστάτης δεν έχουν αντιμικροβιακή δραστηριότητα, ενώ η σύμπλοκη ένωση 2 χαρακτηρίστηκε ως δραστική έναντι του βακτηρίου *E. Coli* και των μυκητών *C. albicans* και *C. neoformans* με άνω του 90% αναστολή.

Πίνακας 7. Συνοπτικά αποτελέσματα προκαταρκτικής εξέτασης (όριο για χαρακτηρισμό ένωσης ως ενεργή 80% και ως μερικώς ενεργή 60-80%)

Ένωση	%Αναστολή έναντι των παθογόνων σε συγκέντρωση δρ. ουσίας 32 $\mu\text{g/mL}$						
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i>
1	10,28	-1,33	7,8	14,38	-0,22	3,25	-41,58
2	35,77	1,6	9,5	11,37	-12,2	0,47	-38,27
3	19,36	<b>102,3</b>	35,65	26,43	62,99	<b>99,3</b>	<b>78,95</b>
4	8,12	<b>102,5</b>	24,04	20,56	30,39	<b>99,43</b>	<b>83,03</b>

**Πίνακας 8.** Αντιμικροβιακή δραστηριότητα ως MIC, κυτταροτοξικότητα (CC<sub>50</sub>) και αιμολυτική δράση (HC<sub>50</sub>) των **1**, **L1** και του συμπλόκου **2**.<sup>[a]</sup> (CC<sub>50</sub>)

Παράγωγο	Sa	Ec	Kp	Pa	Ab	Ca	Cn	CC <sub>50</sub>	HC <sub>50</sub>
<b>3</b>	>32	>32	>32	>32	>32	<=0.25	<=0.25	>32	>32
<b>4</b>	>32	>32	>32	>32	>32	<=0.25	<=0.25	>32	>32
<b>Χλωραμφαινικόλη</b>	8	8	>32	>32	>32	>32	>32	-	>32
<b>Φλουκοναζόλη</b>	>32	>32	>32	>32	>32	0.125	8	-	>32
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	-	>32

<sup>[a]</sup> Sa: Ανθεκτικό στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* (MRSA), Ec: *Escherichia coli*, Kp:

*Klebsiella pneumoniae*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa*, Ab: *Acinetobacter baumannii*, Ca: *Candida albicans*, Cn: *Cryptococcus neoformans*.

<sup>[b]</sup> δεν υπολογίστηκε.

Σε αυτά τα παράγωγα παρατηρήθηκε πολύ υψηλή δραστηριότητα στους δύο μύκητες με MIC μικρότερο ή ίσο από την ελάχιστη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε. Ταυτόχρονα, οι δύο δείκτες τοξικότητας, έδειξαν ότι είναι μη τοξικά. Λόγω αυτών των εξαιρετικών αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για τον προσδιορισμό της αναστολής σε ένα ευρύ πάνελ μυκητών. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν τεστ in vivo σε μοντέλο σκώρου (*Galleria Mellonella*), για τον προσδιορισμό της τοξικότητας. Μέχρι τη συγκέντρωση του 1 mM, που αντιστοιχεί σε 50 mg/kg, η ένωση **2** ήταν μη τοξική. Στους μύκητες, οι ενώσεις επέδειξαν πολύ υψηλή δραστηριότητα, έως 6 nM, που ήταν και η μικρότερη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε.

Τα αποτελέσματα αυτά είναι πολύ υποσχόμενα και θα ανακοινωθούν εντός των επόμενων εβδομάδων στο περιοδικό Chemical Science. Χαρακτηριστικό της σπάνιας δραστηριότητας είναι ότι από τις 1039 ενώσεις που δοκιμάστηκαν, μόλις οι 90 έδειξαν δραστηριότητα έναντι μυκητών και μόλις οι 36 είχαν MIC χαμηλότερο από 2 µg/mL στο *C. neoformans* ή το *C. albicans*. Οι ενώσεις **3** και **4** ήταν δύο από αυτές τις 36.

## Πειραματικό Μέρος

### Γενικά

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι των εταιριών Aldrich, Fluka, Acros Organics και Alfa Aesar και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό, εκτός κι αν αναφέρεται παρακάτω διαφορετικά. Τα φάσματα NMR μετρήθηκαν με ένα όργανο Bruker Avance 500 MHz, που λειτουργεί στα 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) ή 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). Οι χημικές μετατοπίσεις αναφέρονται σε σχέση με το DMSO- $d_6$  ( $^1\text{H} = 2.50$  ppm ή  $^{13}\text{C} = 39.52 \pm 0.06$  ppm). Τα φάσματα UV αλήφθησαν σε ένα φασματοφωτόμετρο Hitachi U-3010. Τα φάσματα IR ελήφθησαν σε ένα φασματόμετρο Perkin-Elmer Spectrum 100-IR χρησιμοποιώντας παστίλιες KBr. Οι αναλύσεις HRMS πραγματοποιήθηκαν στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών σε ένα όργανο UHPLC LC-MSn Orbitrap Velos-Thermo. Ένας στοιχειακός αναλυτής PerkinElmer 2400 CHNS χρησιμοποιήθηκε για τις στοιχειακές αναλύσεις. Η χρωματογραφία στήλης πραγματοποιήθηκε με χρήση silica gel Macherey-Nagel 0.063e0.2 mm/70e230 mesh. Οι χρωματογραφίες λεπτής στοιβάδας (TLC) πραγματοποιήθηκαν σε πλάκες αλουμινίου με επίστρωση Silica Gel 0.20 mm τύπου ALUGRAM SIL G/UV254 της εταιρείας Macherey-Nagel, αναπτύχθηκαν σε συστήματα διαλυτών που αναφέρονται στο πειραματικό μέρος και εμφανίστηκαν σε UV, ανισαλδεϋδη και υπερμαγγανικό κάλιο.

Στο κεφάλαιο αυτό, θα αναφερθεί το πειραματικό μέρος όσον αφορά στη σύνθεση και το χαρακτηρισμό. Το πειραματικό μέρος των βιολογικών τεστ που δεν πραγματοποιήθηκαν από τον γράφοντα, παρατίθενται σε παράρτημα στο τέλος της έκθεσης, αυτούσιο από την αντίστοιχη δημοσίευση.

### Σύνθεση πυραζολίνης L1 (Ενότητα 1)

(E)-7-(4-methoxybenzylidene)-3-(4-methoxyphenyl)-2-pyridyl-3,3a,4,5,6,7-hexahydro-2H-indazole

Σε ένα διάλυμα της ένωσης **1** (167 mg, 0.50 mmol) σε απόλυτη αιθανόλη (9 mL), υπό βρασμό, προστέθηκε στάγδην ένα διάλυμα 2-υδραζινοπυριδίνης (273 mg, 2.50 mmol) σε απόλυτη αιθανόλη (1 mL). Μετά από ανάδευση υπό βρασμό για 72 h, το μίγμα αφέθηκε να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Το στερεό που καταβυθίστηκε, διηθήθηκε υπό κενό και εκπλύθηκε με ψυχρή αιθανόλη. Στη συνέχεια ξηράθηκε, ώστε να το λάβουμε καθαρό ως ανοικτό κίτρινο στερεό. Απόδοση 125 mg (59%), UV-Vis (DMSO)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ): 337 (4.31), FTIR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2930, 1590, 1510, 1475, 1440, 1246, 1185, 1030, 835, 770, 355,  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ): 1.43 (1H, m, H-14), 1.67 (1H, m, H-15), 1.86 (1H, m, H-14), 2.08 (1H, m, H-15), 2.44 (1H, m, H-13), 2.86 (1H, m, H-13), 2.91 (1H, m, H-4), 3.72 (3H, s, OCH<sub>3</sub>(H-32)), 3.78 (3H, s, OCH<sub>3</sub>(H-24)), 4.91 (1H, d,  $J = 11.2$  Hz, H-5), 6.72 (1H, t,  $J = 6.0$  Hz, H-9), 6.88 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-27/H-29), 6.97 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-19/H-21), 7.10 (1H, s, H-16), 7.23 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-26/H-30), 7.38 (2H, 2 × d overlapped,  $J = 8.5$  Hz, H-7 and H-18/H-22), 7.58 (1H, t,  $J = 7.4$  Hz, H-8), 7.92 (1H, d,  $J = 4.2$  Hz, H-10),  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ): 23.7 (C-14), 28.4 (C-13), 28.9 (C-15), 55.0 (MeO(C-32)), 55.1 (MeO(C-24)), 56.2 (C-4), 69.6 (C-5), 110.7 (C-7), 113.8 (C-27/C-29), 113.9 (C-19/C-21), 115.2 (C-9), 125.5 (C-16), 126.8 (C-26/C-30), 128.6 (C-17), 128.9 (C-12), 130.9 (C-18/C-22), 135.5 (C-25), 136.9 (C-8), 147.0

(C-10), 155.3 (C-3), 157.1 (C-6), 158.0 (C-28), 158.5 (C-20); HRMS: calcd for  $[C_{27}H_{28}N_3O_2 + H]^+$  426.2182; found 426.2170.

*Σύνθεση συμπλόκου 2 (Ενότητα 1)*

$[Ag(L1)_2][NO_3]$  (2)

Σε ένα διάλυμα πυραζολίνης L1 σε ξηρό DCM (8 mL) υπο ανάδευση, προστέθηκε στάγδην ένα διάλυμα  $AgNO_3$  (51 mg, 0.30 mmol) σε  $CH_3CN$  (2 mL). Το διάλυμα αναδεύτηκε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για r.t. Το σκούρο καφέ στερεό που σχηματίστηκε διηθήθηκε και το διήθημα εξατμίστηκε σε θερμοκρασία κάτω από 35 °C. Το στερεό φιλμ που προέκυψε εκπλύθηκε με διαιθυλαιθέρα (4 mL) και διαλύθηκε σε πολύ μικρή ποσότητα μεθανόλης. Διαιθυλαιθέρας προστέθηκε ξανά μέχρι να σχηματιστεί εκ νέου μία μικρή ποσότητα σκούρου καφέ στερεού. Το μίγμα διηθήθηκε και το διήθημα εξατμίστηκε προς εμφάνιση ενός κίτρινου στερεού. Απόδοση 74 mg (51%), UV-Vis (DMSO)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ), 344 (4.73), FTIR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 2930, 2345, 2120, 1750–1870, 1600, 1510, 1480, 1431, 1300, 1241, 1173, 1017, 833, 765, 545,  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ): 1.40 (2H, m, H-15/H-14), 1.85 (1H, m, H-14), 1.96 (1H, m, H-15), 2.38 (1H, m, H-13), 2.87 (1H, m, H-13), 2.98 (1H, m, H-4), 3.75 (3H, s, OMe(H-32)), 3.81 (3H, s, OMe(H-20)), 4.31 (1H, br, H-5), 6.35 (1H, d,  $J=8.5$  Hz, H-7), 6.90–6.97 (7H, H-9/H-18/H-19/H-21/H-22/H-27/H-29), 7.18 (2H, d  $J=8.2$  Hz, H-26/H-30), 7.24 (1H, s, H-16), 7.63 (1H, t,  $J=7.4$  Hz, H-8), 8.38 (1H, d,  $J=4.2$  Hz, H-10),  $^{13}C$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ): 23.1 (C-14), 27.9 (C-15), 28.5 (C-13), 55.1 (OMe(C-32)), 55.3 (OMe(C-20)), 56.3 (C-4), 70.1 (C-5), 109.1 (C-7), 114.0, 114.7 (C-19/C-21, C-27/C-29), 116.2 (C-9), 126.9 (C-26/C-30), 127.3 (C-16), 127.8 (C-17), 131.1 (C-18/C-22), 132.3 (C-25), 139.1 (C-8), 149.2 (C-10), 154.5 (C-6), 156.1 (C-3), 158.9 (C-28), 159.0 (C-20), Elemental Analysis found (calcd): C, 63.46 (63.53); H, 5.40 (5.33); Ag, 10.57 (10.46); N, 9.64 (9.71); O, 10.93 (10.97); HRMS: calcd for  $[C_{54}H_{54}^{109}AgN_6O_3]$  959.3254; found 959.3548.

*Σύνθεση συμπλόκων 3 και 4 (Ενότητα 2)*

Ένα σιάλυμα πυραζολίνης **1** (78 mg, 0.16 mmol) ή **2** (67mg, 0.16 mmol) σε MeOH (1 mL) προστέθηκε αργά σε ένα υδατικό διάλυμα KOH (1%, 0.9 mL) σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, προστέθηκε ένα διάλυμα  $AgNO_3$  (27 mg, 0.16 mmol)  $H_2O$  (0.3 mL) απουσία φωτός. Ένα κίτρινο στερεό καταβυθίστηκε αμέσως. Το μίγμα αναδεύτηκε για 30 λεπτά και μετά, το καφέ στερεό διηθήθηκε με φίλτρο Büchner, εκπλήθηκε με αιθανόλη (x2) και νερό (x2) και ξηράθηκε υπό κενό και  $P_2O_5$ . Το στερεό προστατευόταν σε όλες τις διεργασίες με αλουμινόχαρτο.

*(E)-1-(4-Carboxyphenyl)-5-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(3,4-dimethoxystyryl)-2-pyrazoline silver(I) complex 3*

Σκούρο πράσινο στερεό (45 mg, 48% calculated for 0.08 mmol maximum yield); FT-IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 1595, 1510, 1375, 1260, 1135, 1025, 770, 515;  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 2.98 (1H, dd,  $J_{MX} = 4.9$  Hz,  $J_{AM} = 16.9$  Hz,  $CH_AH_M$ ), 3.69 (3H, s, MeO), 3.71 (3H, s, MeO), 3.76 (1H,

overlapped,  $CH_AH_M$ ), 3.76 (3H, s, MeO), 3.81 (3H, s, MeO), 5.43 (1H, dd,  $J_{MX} = 5.1$  Hz,  $J_{AX} = 11.9$  Hz,  $CH_X$ ), 6.68 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz,  $H_{28}$ ), 6.73 (1H, d,  $J = 16.2$  Hz,  $H_{16}$ ), 6.87-6.91 (4H, m,  $H_{21}$ ,  $H_{29}$ ,  $H_{32}$ ), 6.93 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz,  $H_{21}$ ), 7.06 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz,  $H_{22}$ ), 7.19 (1H, d,  $J = 16.2$  Hz,  $H_{15}$ ), 7.24 (1H, s,  $H_{18}$ ), 7.71 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz,  $H_8$ ,  $H_{10}$ );  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 41.9 (C4), 55.4 ( $CH_3O^-$ ), 55.5 ( $CH_3O^-$ ), 62.2 (C5), 109.2 (C18), 109.6 (C32), 111.6 (C7, C11), 111.7 (C29), 112.2 (C21), 117.4 (C28), 119.1 (C15), 121.7 (C9), 120.5 (C22), 129.4 (C17), 130.8 (C8, C10), 134.0 (C27), 134.5 (C16), 145.4 (C6), 148.0 (C30), 149.0 (C31), 149.1 (C20), 149.2 (C19), 150.3 (C3), 170.0 (-COOH).

*1-(4-Carboxyphenyl)-3-((1E,3E)-4-phenylbuta-1,3-dien-1-yl)-5-((E)-styryl)-2-pyrazoline silver(I) complex 4*

Σκούρο καφέ στερεό (43 mg, 51% calculated for 0.08 mmol maximum yield); FT-IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 1595, 1535, 1510, 1370, 1320, 1125, 980, 745, 690, 500;  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 3.01 (1H, dd,  $J_{MX} = 5.2$  Hz,  $J_{AM} = 16.8$  Hz,  $CH_AH_M$ ), 3.51 (1H, dd,  $J_{AX} = 11.5$  Hz,  $J_{AM} = 16.8$  Hz,  $CH_AH_M$ ), 5.19 (1H, ddd,  $J_{MX} = 5.2$  Hz,  $J_{AX} = 11.5$  Hz,  $J_{XH_{15b}} = 7.6$  Hz,  $CH_X$ ), 6.28 (1H, dd,  $J_{H_{15b}H_{16b}} = 16.0$  Hz,  $J_{H_{15}^X} = 7.6$  Hz,  $H-15b$ ), 6.67 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz,  $H-16b$ ), 6.69 (1H, d,  $J = 15.8$  Hz,  $H-16$ ), 6.77 (2H, d overlapped,  $H-15a$ ,  $H-16a$ ), 7.06 (d, 2H,  $J = 8.7$  Hz,  $H-7$ ,  $H-11$ ), 7.13-7.27 (3H, m,  $H-15$ ,  $H-20$ ,  $H-30$ ), 7.30 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz,  $H-29$ ,  $H-31$ ), 7.36 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz,  $H-19$ ,  $H-21$ ), 7.43 (2H, d,  $J = 7.6$  Hz,  $H-28$ ,  $H-32$ ), 7.52 (2H, d,  $J = 7.6$  Hz,  $H-18$ ,  $H-22$ ), 7.79 (d, 2H,  $J = 8.7$  Hz,  $H-8$ ,  $H-10$ );  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 38.7 (C-4), 61.2 (C-5), 112.0 (C-7, C-11), 122.7 (C-9), 125.1 (C-15), 126.49 (Ph), 126.52 (C-18, C-22), 127.9 (C-15b), 128.4, 128.6, 128.8, 128.83, 128.93 (Ph), 130.8 (C-8, C-10), 131.2 (C-16b), 134.0, 134.6, 136.0 (C-16, C-15a, C-16a), 136.8 (C-17), 142.3 (C-27), 145.6 (C-6), 150.7 (C-3), 168.4 (-COOH).

## Συμπεράσματα - Μελλοντικές Προοπτικές

Προκειμένου μία ερευνητική μελέτη να χαρακτηριστεί ως επιτυχημένη ή ως επαρκής (ανάλογα με το πόσο θετικά ήταν τα αποτελέσματά της), απαιτούνται ορισμένες προϋποθέσεις: η χρηματοδότηση, το σωστό εργαστηριακό περιβάλλον (ως προς το έμφυχο υλικό και τα όργανα-σκεύη-αντιδραστήρια), οι καλές συνεργασίες, ο σωστός σχεδιασμός, η αφοσίωση και η τύχη.

Στο εργαστήριο Δομικών Μελετών Βιολογικών και Φαρμακευτικών Μορίων με NMR υπήρχαν αυτές οι προϋποθέσεις. Η άψογη συνεργασία σε όλα τα επίπεδα με την επιβλέπουσα Ερευνήτρια Δρ. Μαρίνα Σαγνού και ο διαθέσιμος χώρος, όργανα και αντιδραστήρια συντέλεσαν στη δημιουργία ενός εποικοδομητικού κλίματος. Ταυτόχρονα, οι συζητήσεις και συμβουλές της Ερευνήτριας και Διευθύντριας Ερευνών Δρ. Μαρίας Πελεκάνου, η συνεργασία με τη Δρ. Βαρβάρα Μαυροειδή ως προς τις βιολογικές αναλύσεις, αλλά και οι χρήσιμες συζητήσεις και προτάσεις του Δρ. Ελευθέριου Χαλέβα ως προς τις αναλύσεις των ανόργανων ενώσεων, ήταν εκ των ουκ άνευ για την επιτυχία αυτής της ερευνητικής εργασίας εντός των στενών χρονικών ορίων, αλλά και της πανδημίας που περιόριζε και περιορίζει οποιαδήποτε δραστηριότητα, από το Μάρτιο του 2020.

Από αυτήν την εργασία προέκυψαν δύο σαφή ερευνητικά επιτεύγματα, που αποτελούν και τις αντίστοιχες δημοσιεύσεις. Η πρώτη ήταν το σύμπλοκο του αργύρου με το διδοντικό υποκαταστάτη NN πυριδινο-πυραζολίνης. Το παράγωγο μελετήθηκε σε βάθος και αποτελεί υποσχόμενη ένωση για μελλοντικές μελέτες. Αυτές μπορούν να περιλαμβάνουν τη σύνθεση μίας βιβλιοθήκης αντίστοιχων ενώσεων, για τη διερεύνηση της σχέσης δομής-δραστικότητας, τη μελέτη της δράσης τους σε ευρύτερο πάνελ μικροβίων και τα *in vivo* τεστ.

Η δεύτερη, αποτέλεσε μεγαλύτερη επιτυχία και τα αποτελέσματα θα παρουσιαστούν σύντομα σε σχετική δημοσίευση που θα μνημονεύει φυσικά το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών. Ήταν οι 2 από τις μόλις 39 ενώσεις που αποδείχθηκαν ως ιδιαίτερες δραστικές ανάμεσα σε 1039 που μετρήθηκαν από την πλατφόρμα του CO-ADD, ως προς την αντιμυκητιασική τους δράση. Οι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από την πλατφόρμα ήταν πιο εξελιγμένες με στόχο την ευρύτερη διερεύνησή τους. Και σε αυτήν την περίπτωση ωστόσο, υπάρχουν περιθώρια για περαιτέρω ανάπτυξη, που θα πραγματοποιηθεί, ελπίζουμε, στο άμεσο μέλλον.

Συνολικά, τα επιτεύγματα φαίνεται να είναι πιο μεγάλα από αυτά που θα περίμενε κανείς από μία προσωπική υποτροφία διάρκειας μόλις δύο ετών σε μία εποχή με αντιξοότητες, ωστόσο, αυτό δεν αποτελεί έκπληξη. Η υποτροφία ήταν προσωπική, όμως, οι αξιόλογες συνεργασίες εκτός του Ιδρύματος (ΕΚΕΔΕ «Δημόκριτος») και η ανεκτίμητη συνεισφορά των συναδέλφων εντός του εργαστηρίου, μετέτρεψαν την επιτυχία της, σαφώς σε ομαδική.

## Βιβλιογραφία

- [1] WHO Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014, Geneva: World Health Organization, 2014. <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/> (ανακτήθηκε Δεκ 10, 2021).
- [2] Alanis, A. J., Arch. Med. Res. 2005, 36, 697-705.
- [3] Cassini et al., Lancet Infect. Dis. 2019, 19, 56-66.
- [4] Walsh, T. J., Groll, A. H., Transpl. Infect Dis. 1999, 1, 247-261.
- [5] Srinivasan, A., Lopez-Ribot, J. L., Ramasubramanian, A. K., Drug Discov. Today, 2014, 11, 66-71.
- [6] Canuto, M. M., Rodero F. G., Lancet Infect Dis. 2002, 2, 550-63.
- [7] Perlin, D. S., Drug Resist. Updat. 2007, 10, 121-130.
- [8] K. D. Mjos, C. Orvig, Chem. Rev., 2014, 114, 4540—4563.
- [9] P. Malfertheine, F. Bazzoli, J.-C. Delchier, K. Celiński, M. Giguère, M. Rivière, F. Mégraud, Lancet, 2011, 377, 905—913.
- [10] W. A. De Boer, R. J. X. M. Van Etten, B. A. M. Van De Wouw, P. M. Schneeberger, A. H. A. M. Van Oijen, J. B. M. J. Jansen, Aliment. Pharmacol. Ther., 2000, 14, 85—89.
- [11] D. J. Barillo, A. R. Barillo, S. Korn, K. Lam, P. S. Attar, Burns, 2017, 43, 1189—1194.
- [12] Liang X, Luan S, Yin Z, He M, He C, Yin L, Zou Y, Yuan Z, Li L, Song X, Lv C, Zhang W (2018) Eur J Med Chem 157:62-80.
- [13] Barillo DJ, Marx DE (2014). Burns 40S:S3-S8.
- [14] Maillard JY, Hartemann P (2013). Crit Rev Microbiol 39:373-383.
- [15] Dabrowiak JC (2017) Metals in Medicine, Chap 7. Wiley, Oxford UK
- [16] Fox CL, Modak SM (1974) Antimicrob Agents Chemother 5:582-588.
- [17] Achar G, Shahini CR, Patil SA, Malecki JG, Pan SH, Lan A, Chen XR, Budagumpi S (2018) J Inorg Biochem 183:43-57.
- [18] Curran R, Lenehan J, McCann M, Kavanagh K, Devereux M, Egan DA, Clifford G, Keane K, Creaven BS, McKee V (2007) Inorg Chem Commun 10:1149-1153.
- [19] Kazachenko AS, Legler AV, Per'yanova OV, Vstavskaya YA, (2000) Pharm Chem J 34:257-258.
- [20] Ovejero P, Asensio E, Heras JV, Campo JA, Cano M, Torres MR, Núñez C, Lodeiro C (2013) Dalton Trans 42:2107-2120.
- [21] Cifuentes-Vaca OL, Andrades-Lagos J, Campanini-Salinas J, Laguna A, Vásquez-Velásquez D, Concepción Gimeno M (2019) Inorg Chim Acta 489:275-279.
- [22] Nawaz S, Isab AA, Merz K, Vasylyeva V, Metzler-Nolte N, Saleem M, Ahmad S (2011) Polyhedron 30:1502-1506.
- [23] Njogu EM, Omondi B, Nyamori VO (2017) J Mol Struct 1135:118-128.
- [24] Favarin LRV, Oliveira LB, Silva H, Micheletti AC, Pizzuti L, Machulek-Júnior A, Caires ARL, Back DF, Lima SM, Andrade LHC, Duarte LFB, Pinto LMC, Casagrande GA (2019) Inorg Chim. Acta 492:235-242.
- [25] Kalinowska-Lis U, Felczak A, Chęcińska L, Szablowska-Gadomska I, Patyna E, Małcki M, Lisowska K, Ochocki J (2016) Molecules 21:87.
- [26] Njogu EM, Martincigh BS, Omondi B, Nyamori VO (2018) Appl Organometal Chem 32:e4554.



- [27] Enna SJ, Bylund DB (2008) xPharm: The Comprehensive pharmacology reference. Elsevier, Pittsburgh
- [28] Hamil RJ (2013) *Drugs* 73:919–934.
- [29] Schilcher K, Andreoni F, Dengler Haunreiter V, Seidl K, Hasse B, Zinkernagel AS (2016) *Antimicrob Agents Chemother* 60:5957–5967.
- [30] Shang W, Rao Y, Zheng Y, Yang Y, Hu Q, Hu Z, Yuan J, Peng H, Xiong K, Tan L, Li S, Zhu J, Li M, Hu X, Mao X, Rao X (2019)
- [31] Waring MJ (1991) Binding of antibiotics to DNA, *Ciba Foundation symposium* 158:128–42.
- [32] Shahabadi N, Hashempour S (2019) *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 38(6):428–447.
- [33] Azócar M. I., Gómez G., Levín P., Paez M., Muñoz H., Dinamarca N. *J. Coord. Chem.* 2014, 67, 3840-3852
- [34] Deacon G. B., Philips R. J. *Coord. Chem. Rev.* 1980, 33, 227-250
- [35] Nomiya K., Takahashi S., Noguchi R. *Dalton Trans.* 2000, 1343-1348
- [36] Alisir S. H., Sariboga B., Caglar S., Buyukgungor O. *J. Mol. Struct.* 2017, 1130, 156-164

## Παραρτήματα

### Πειραματικά δεδομένα βιολογικών πειραμάτων

(παρατίθενται αμετάφραστα από την αντίστοιχη δημοσίευση)

#### Γενικά

For single-point preliminary inhibitory assays, solutions of the samples were prepared in DMSO and water to a final testing concentration of 32 µg/mL, in 384-well, non-binding surface plate (NBS) for each bacterial/fungal strain, and in duplicate ( $n = 2$ ), and keeping the final DMSO concentration to a maximum of 1% DMSO. All the sample preparation was done using liquid handling robots. Colistin and vancomycin were used as positive bacterial inhibitor standards for Gram-negative and Gram-positive bacteria, respectively. Fluconazole was used as a positive fungal inhibitor standard for *C. albicans* and *C. neoformans*.

The compound **2**, which was “flagged” as active in the preliminary screening was then serially diluted 1:twofold for 8 times. Each sample concentration was prepared in 384-well plates, non-binding surface plate (NBS; Corning 3640) for each bacterial/fungal strain, tissue-culture treated (TC-treated; Corning 3712/3764) black for mammalian cell types and polypropylene 384-well (PP; Corning 3657) for haemolysis assays, all in duplicate ( $n = 2$ ), and keeping the final DMSO concentration to a maximum of 0.5%.

Thermal melting and viscosity experiments were carried out using calf thymus DNA (CT-DNA, Sigma Aldrich, USA) in phosphate buffer (0.05 M, pH = 7.2) consisting of  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . The DNA concentration per nucleotide was determined spectrophotometrically by using the molar absorption coefficient of  $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  per nucleotide at 260 nm. Stock solutions of either CT-DNA or **L1** and complex **2** (in DMSO at a concentration of  $10^{-2} \text{ M}$ ) were prepared prior each measurement and the corresponding mixtures were incubated for 24 h at 25 °C to reach the equilibrium state. Each reported measurement value is the average of three independent experiments.

#### Υπολογιστικές μέθοδοι

The geometries of cationic part of complex **2** (and ligand **L1** for comparison) were pre-optimized using the Molecular Mechanics (MM) method. Then, in the DFT calculations the Becke3-Lee-Parr (B3LYP) functional (Becke [1993](#); Lee et al. 1988) with LANL2DZ (Dunning Jr et al. 1977; Hay and Wadt [1985a, b](#); Wadt and Hay. [1985](#)) basis set were used. The hybrid B3LYP functional along with this basis set was applied to study of silver (I)-organic ligand complexes reported in the literature (Fomuta et al. [2017](#); Altürk et al. [2017](#)). All calculations were performed using Gaussian 03 program package (Frisch et al. [2004](#)).

#### Βιολογική αποτίμηση

#### Αντιμικροβιακές αναλύσεις

All bacteria were cultured in Cation-adjusted Mueller Hinton broth (CAMHB) at 37 °C overnight. A sample of each culture was then diluted 40-fold in fresh broth and incubated at 37 °C for 1.5–3 h. The resultant mid-log phase cultures were diluted (Colony Forming Units—CFU/mL measured by OD<sub>600</sub>), then added to each well of the compound containing plates, giving a cell density of  $5 \times 10^5$  CFU/mL and a total volume of 50  $\mu$ L. All the plates were covered and incubated at 37 °C for 18 h without shaking.

Inhibition of bacterial growth was determined measuring absorbance at 600 nm (OD<sub>600</sub>), using a Tecan M1000 Pro monochromator plate reader. The percentage of growth inhibition was calculated for each well, using the negative control (media only) and positive control (bacteria without inhibitors) on the same plate as references. The significance of the inhibition values was determined by modified Z-scores, calculated using the median and Median Absolute Deviation (MAD) of the samples (no controls) on the same plate.

For single-point preliminary screening, samples with inhibition > 80% and Z-Score above 2.5 for either replicate (n = 2 on different plates) when tested at 32  $\mu$ g/mL were classed as actives. Samples with inhibition values between 50 and 80% and Z-Score above 2.5 for either replicate (n = 2 on different plates) were classed as partial actives.

The minimum inhibitory concentration (MIC) of **2** was determined as the lowest concentration at which the growth was fully inhibited in the dose response assay (0.25–32  $\mu$ g/mL), defined by an inhibition  $\geq$  80%. 80% value is used to allow for the fluctuation of growth that is typically 10–20% for any given bacterial or fungi assay.

#### Αντιμυκητιασικές αναλύσεις

Fungi strains were cultured for 3 days on Yeast Extract-Peptone Dextrose (YPD) agar at 30 °C. A yeast suspension of  $1 \times 10^6$  to  $5 \times 10^6$  CFU/mL (as determined by OD<sub>530</sub>) was prepared from five colonies. The suspension was subsequently diluted and added to each well of the compound-containing plates giving a final cell density of fungi suspension of  $2.5 \times 10^3$  CFU/mL and a total volume of 50  $\mu$ L. All plates were covered and incubated at 35 °C for 24 h without shaking.

Growth inhibition of *C. albicans* was determined measuring absorbance at 530 nm (OD<sub>530</sub>), while the growth inhibition of *C. neoformans* was determined measuring the difference in absorbance between 600 and 570 nm (OD<sub>600-570</sub>), after the addition of resazurin (0.001% final concentration) and incubation at 35 °C for additional 2 h. The absorbance was measured using a Biotek Synergy HTX plate reader. The percentage of growth inhibition was calculated for each well, using the negative control (media only) and positive control (fungi without inhibitors) on the same plate. The significance of the inhibition values was determined by modified Z-scores, calculated using the median and MAD of the samples (no controls) on the same plate.

For single-point preliminary screening, samples with inhibition > 80% and Z-Score above 2.5 for either replicate (n = 2 on different plates) when tested at 32  $\mu$ g/mL were classed as actives. Samples with inhibition values between 50 and 80% and Z-Score above 2.5 for either replicate (n = 2 on different plates) were classed as partial actives.

The MIC of the active compound **2** was determined as the lowest concentration at which the growth was fully inhibited in the dose–response assay (0.25–32 µg/mL), defined by an inhibition  $\geq 80\%$  for *C. albicans* and an inhibition  $\geq 70\%$  for *C. neoformans*. Due to a higher variance in growth and inhibition, a lower threshold was applied to the data for *C. neoformans*.

### Κυτταροτοξικές μετρήσεις

Cytotoxicity to human embryonic kidney cells (HEK293) was determined using the resazurin assay as previously described (O'Brien et al. [2000](#); McMillan et al. [2002](#)). Briefly, HEK293 cells were counted manually in a Neubauer hemocytometer and then plated in the 384-well plates containing the compound **2** at an 8-point dose–response (0.25–32 µg/mL) to give a density of 5000 cells/well in a final volume of 50 µL Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) was used as growth media and the cells were incubated together with the compounds for 20 h at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>.

Cytotoxicity (or cell viability) was measured by fluorescence, ex: 560/10 nm, em: 590/10 nm (F<sub>560/590</sub>), after addition of 5 µL of 25 µg/mL resazurin (2.3 µg/mL final concentration) and after incubation for further 3 h at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. The fluorescence intensity was measured using a Tecan M1000 Pro monochromator plate reader, using an automatic gain calculation.

CC<sub>50</sub> (concentration at 50% cytotoxicity) was calculated by curve fitting the inhibition values vs log(concentration) using a sigmoidal dose–response function, with variable fitting values for the bottom, top, and slope. In addition, the maximal percentage of cytotoxicity is reported as D<sub>Max</sub>, indicating any compounds with partial cytotoxicity.

The curve fitting was implemented using Pipeline Pilot's dose–response component, resulting in similar values to curve fitting tools such as GraphPad's Prism and IDBS's XIFit. Any value with > indicate samples with no activity (low D<sub>Max</sub> value) or samples with CC<sub>50</sub> values above the maximum tested concentration (higher D<sub>Max</sub> value).

Cytotoxic samples were classified by CC<sub>50</sub>  $\leq 32$  µg/mL in either replicate (n = 2 on different plates).

### Αιμόλυση

Human whole blood was washed three times with 3 volumes of 0.9% NaCl and then re-suspended in the same solution to a concentration of  $0.5 \times 10^8$  cells/mL, as determined by manual cell count in a Neubauer hemocytometer and used for hemolysis assay as previously described (Ravipati et al. [2015](#)). Briefly, the washed cells were then added to the 384-well compound-containing plates at an 8-point dose–response (0.25–32 µg/mL) for a final volume of 50 µL. After a 10 min agitation on a plate shaker the plates were then incubated for 1 h at 37 °C. After incubation, the plates were centrifuged at 1000 g for 10 min to pellet cells and debris, 25 µL of the supernatant was then transferred to a polystyrene 384-well assay plate.

Hemolysis was determined by measuring the supernatant absorbance at 405 nm (OD<sub>405</sub>). The absorbance was measured using a Tecan M1000 Pro monochromator plate reader.

HC<sub>10</sub> and HC<sub>50</sub> (concentration at 10% and 50% hemolysis, respectively) were calculated by a curve fitting the inhibition values vs log(concentration) using a sigmoidal dose–response function with variable fitting values for top, bottom, and slope. In addition, the maximal percentage of hemolysis is reported as D<sub>Max</sub>, indicating any compounds with partial hemolysis.

The curve fitting was implemented using Pipeline Pilot's dose–response component, resulting in similar values to curve fitting tools such as GraphPad's Prism and IDBS's XIFit. Any value with > indicate samples with no activity (low D<sub>Max</sub> value) or samples with HC<sub>10</sub> values above the maximum tested concentration (higher D<sub>Max</sub> value).

Hemolysis samples were classified by HC<sub>10</sub> ≤ 32 µg/mL in either replicate (n = 2 on different plates). In addition, samples were flagged as partial hemolytic if D<sub>Max</sub> ≥ 50%, even with HC<sub>10</sub> > the maximum tested concentration.

### Σχηματισμός βιομεμβρανών

The ability of MRSA and *P. aeruginosa* ATCC 27,853 to form biofilm in the presence of newly synthesized compounds were tested. Bacteria were grown overnight at 37 °C, in an LB growth medium. Cultures were then diluted 100-times with Tryptone Soybean Broth (TSB) for biofilm formation of MRSA, or with 4-times diluted TSB (TSB/4) for biofilm formation of *P. aeruginosa*. Concentrations of either complex **2** or **L1** (5, 10, 20, 40, 50, 100 or 200 µM) in 200 µl of each sample were transferred in an SPL 96-well microplate. The plate was left still at 37 °C for 24 h. The growth of the cells was measured using an Elisa reader at 630 nm. The cells not attached to the plate were washed away three times with 10 mM phosphate-buffered saline solution, pH 7.4 (PBS) and left to dry for 1 h at 50–60 °C. Crystal violet (CV) (200 µL) solution (0.1%, v/v) were then added in each well and the plate was left at room temperature for 15 min. The dye was washed away thoroughly with tap water, and the plate was left to dry for one more hour at 50–60 °C. Acetic acid 33% (v/v) (200 µL) was finally added to extract bound dye and the absorbance was measured at 570 nm, using an Elisa reader (BioTek Instruments Inc., USA). All samples tested contain the same DMSO concentration and a sample containing DMSO only was also run as a control.

### Αλληλεπίδραση με DNA

*Thermal denaturation:* DNA melting experiments were carried out by monitoring the absorbance of DNA at 258 nm in the temperature range from 25.0 °C to 95.0 °C and temperature was increased at a 0.5 °C/min rate. The melting temperature (T<sub>m</sub>) of DNA was determined as the midpoint of the optically detected transition and the measurement was repeated three times for each sample. The thermal melting experiments were performed in phosphate buffer solution (final percentage of DMSO = 2%) by keeping the DNA concentration constant (5 × 10<sup>-5</sup> M) while varying the concentration of **L1** and complex **2** (0–2.5 × 10<sup>-5</sup> M) to achieve ratios R = [compound] / [DNA] of 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.33, 0.5.

### Μέτρηση ιξώδους

Viscosity measurements were carried out using Ostwald's viscometer (Schott geräte, type 531 01/0a, thermostat Schott geräte GT 1150, meter Schott geräte AVS 300) at 25 °C. The viscometer was thermostated at  $25.0 \pm 0.1$  °C in a constant temperature bath. Flow time of solutions was measured with a digital stopwatch and each sample was measured three times and an average flow time was calculated. The values did not differ by more than 0.2 s from each other. All solutions were filtered through a 0.22 µm filter (Millipore, Billerica, MA) prior to the measurements. Experiments were carried out in phosphate buffer solution (final percentage of DMSO = 2%) by keeping the DNA concentration constant ( $5 \times 10^{-5}$  M) while varying the concentration of **L1** and complex **2** ( $0-2.5 \times 10^{-5}$  M) to achieve ratios  $R = [\text{compound}]/[\text{DNA}]$  of 0, 0.02, 0.033, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5. The intrinsic viscosity  $[\eta]$  was calculated according to the relation  $[\eta] = (t-t_b)/t_b$ , where  $t_b$  is the flow time for the buffer and  $t$  is the observed flow time for DNA in the presence or absence of the compounds. Data were presented as  $(\eta/\eta_0)^{1/3}$  versus  $R$  where  $\eta$  and  $\eta_0$  are the intrinsic viscosities in the presence or absence of the compounds. For the low DNA concentrations used in these experiments, the intrinsic viscosity  $[\eta]$  is proportional to the difference in the flow times for the buffer with and without DNA, resulting in the following Eq. (1) (Cohen, and Eisenber 1969):

$$LL_0 = [\eta]^{1/3} [\eta_0]^{1/3} = (t-t_b)^{1/3} (t_0-t_b)^{1/3}$$

(1)

where  $L$  and  $L_0$  are the DNA lengths and  $[\eta]$  and  $[\eta_0]$  are the intrinsic viscosities with and without the compound. The  $t_b$ ,  $t_0$  and  $t$  are the flow times of the buffer, the plain DNA and the DNA/compound solution, respectively.

### Πρόσδεση στο DNA

The compound efficiency for interaction with pDNA was measured by determining its ability initially, to convert the supercoiled DNA (SC) or the relaxed form (R) of the pDNA to the nicked circular (NC) or/and linear form, and furthermore with CT-DNA to cause up-shift or complete degradation. Reactions, which contained aliquots of 10 µg of each nucleic acid (plasmid pCR2.1 or CT-DNA), were incubated at a constant temperature of 37 °C in the presence of various concentrations of the compound in a buffer A to a final volume of 20 µL. The reaction was terminated by the addition of 5 µL loading buffer consisting of 0.25% w/v bromophenol blue and 30% v/v glycerol in water. The products resulting from interactions of the compound with DNA were separated by electrophoresis on agarose gel (1% w/v), which contained 0.5 µg/mL EtBr in 40 mM Tris-acetate, pH 7.5, 20 mM sodium acetate, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA. Electrophoresis was carried out for 90 min at 5 V cm<sup>-1</sup>, in a horizontal gel apparatus (Mini-SubTM DNA Cell, BioRad). The gels were visualized and photographed under a UV illuminator, based on the excitation of EtBr-DNA complex. All samples tested contain the same DMSO concentration and a sample containing DMSO only was also run as control.

**Η ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ**

**ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ**

*Μαρίνα Σαγνού*

**ΥΠΟΓΡΑΦΗ**

.....

**Ο ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ**

**ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ**

*Δημήτριος Ματιάδης*

**ΥΠΟΓΡΑΦΗ**

.....