



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας  
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών  
ΜΠΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Φαρμακευτικές ουσίες στη μελέτη της θεραπευτικής αντιμετώπισης  
της Λεισμανίασης: in vitro συστήματα ελέγχου και αξιολόγησης**

POST GRADUATE THESIS

**Medicinal substances in the study of Leishmaniasis treatment: in vitro  
control and evaluation systems**



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ /NAME OF STUDENT

**ΜΠΑΛΤΖΗ ΔΗΜΗΤΡΑ**

**BALTZI DIMITRA**

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

**Δρ. Βογιατζάκη Χρυσάνθη, Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας & Ανοσολογίας, ΠΑΔΑ**

Dr. Vogiatzaki Chrysanthi, Laboratory of Molecular Microbiology & Immunology, UNIWA

**ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2022**



Faculty of Health and Caring Professions  
Department of Biomedical Sciences  
Postgraduate program:  
Biomedical methods and technology in diagnosis



POST GRADUATE THESIS

## **Medicinal substances in the study of Leishmaniasis treatment: in vitro control and evaluation systems**

BALTZI DIMITRA

19006

[DBaltzi1@hotmail.gr](mailto:DBaltzi1@hotmail.gr)

FIRST SUPERVISOR

Dr. Vogiatzaki Chrysanthi, Laboratory of Molecular Microbiology & Immunology, UNIWA

SECOND SUPERVISOR

Dr. Karagouni Eudokia, Laboratory of Immunology of Infections, PHI

AIGALEO 2022

## Επιτροπή εξέτασης

Ημερομηνία εξέτασης: 13/12/2022

Όνοματα εξεταστών

Υπογραφή

1<sup>ος</sup> εξεταστής

Δρ. Βογιατζάκη Χρυσάνθη

2<sup>ος</sup> εξεταστής

Δρ. Καραγκούνη Ευδοκία

## **Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας**

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Δήμητρα Μπαλτζή του Σπυρίδωνος με αριθμό μητρώου 19006 φοιτητήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βοϊατρικές Μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου μέχρι το Δεκέμβριο του 2022 και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή.

Η Δηλούσα

Δήμητρα Μπαλτζή

## **Ευχαριστίες**

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας οφείλω να ευχαριστήσω όσους συνέβαλαν στην υλοποίησή της.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στην Επιβλέπουσα μου Δρ. Βογιατζάκη Χρυσάνθη για την ανάθεση του εν λόγω θέματος, τη συνεχή και αμέριστη στήριξη της, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές της.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Δρ. Ευδοκία Καραγκούννη, διευθύντρια ερευνών του τμήματος Ανοσολογίας Λοιμώξεων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, όπου εκεί πραγματοποιήθηκε η διπλωματική εργασία, για την επίβλεψη και την καθοδήγησή της.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Αντωνία Ευσταθίου ερευνήτρια του εργαστηρίου ανοσολογίας λοιμώξεων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ από την οποία εκπαιδεύτηκα, για την αδιάκοπη βοήθειά της και την καθοδήγησή της σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης των πειραματικών διαδικασιών.

Οφείλω ακόμη να ευχαριστήσω τους υπεύθυνους και το προσωπικό της Μονάδας Ομοιοπαθητικών της εταιρείας Korres για τη χορήγηση των ουσιών και τις δυναμοποιήσεις τους που ήταν απαραίτητες για τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω το φαρμακοποιό κ. Μάρκο Φυλιάνο για την επίδειξη των μεθόδων σχετικά με τη δυναμοποίηση των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν.

Τέλος, ευχαριστώ οικογένεια και φίλους για όλη την αγάπη και την κατανόηση.

## **Αφιερώσεις**

Αφιερώνω τη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία στην οικογένεια μου, στους γονείς μου Ουρανία και Σπύρο και στην αδερφή μου Βασιλική, ως ένα ευχαριστώ για τη συνεχή στήριξη και την αγάπη τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## Περίληψη

Η λεισμανίαση είναι μια παρασιτική ασθένεια που προκαλείται από τα πρωτόζωα *Leishmania spp.* που ανήκουν στην οικογένεια των τρυπανοσωματίδων. Εκδηλώνεται σε σπλαχνικές, δερματικές και βλεννογονοδερματικές μορφές ανάλογα το είδος. Είναι μια τροπική παραμελημένη νόσος που συναντάται κυρίως στη Λεκάνη της Μεσογείου, τη Μέση Ανατολή, την Κεντρική Ασία αλλά σταδιακά και στον υπόλοιπο κόσμο με κρούσματα που φτάνουν το 1 εκατομμύριο ετησίως. Η τρέχουσα φαρμακευτική θεραπεία της λεισμανίασης αποτελεί εμπόδιο στην εξάλειψη της νοσου καθώς παρουσιάζει υψηλό κόστος, κυτταροτοξικότητα και σταδιακή ανθεκτικότητα των παρασίτων σε πολλά φάρμακα. Προς αποφυγή όλων των παραπάνω αντενδείξεων τέθηκε η ανάγκη εύρεσης νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Αυτές περιλαμβάνουν σκευάσματα φυσικής προέλευσης με μηχανισμούς δράσης διαφορετικούς από αυτούς των κλασσικών χημικών φαρμάκων, όπως φυτά και ορυκτά, τα οποία δεν παρουσιάζουν τοξικότητα, έχουν χαμηλό κόστος και είναι εύκολη η διάθεσή τους.

Μια κατηγορία των σκευασμάτων αυτών αποτελούν και τα ομοιοπαθητικά φάρμακα, στα οποία αναφέρεται και η παρούσα διπλωματική εργασία. Οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν είναι το *Andrographis paniculata*, *Ferrum arsenicum* και *Antimonium crudum*. Το επιπλέον χρησιμοποιήθηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις. Τα σκευάσματα που παράχθηκαν από τις παραπάνω ουσίες χρησιμοποιήθηκαν σε in vitro πειράματα για αξιολόγηση της αντιλεισμανιακής τους δράσης σε ποικίλες δυναμοποιήσεις με στόχο τη χρήση τους σαν εναλλακτική ή συμπληρωματική θεραπεία για την αντιμετώπιση της ασθένειας.

Τα πειράματα εφαρμόστηκαν σε ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές και προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου. Στην πλειοψηφία των πειραματικών δοκιμών η αναστολή της δράσης των ουσιών ήταν μικρότερη του 20 %. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η δράση της ουσίας *Antimonium crudum*, η οποία χρησιμοποιήθηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις σε προμαστιγώτες και έδειξε μια προσωρινή ανασταλτική δράση σε ποσοστό 38.07 %, η οποία παρέρχεται μετά από 72 ώρες. Θα μπορούσαν να γίνουν περαιτέρω δοκιμές μελλοντικά για μια πιο σαφή εικόνα και διερεύνηση περισσότερων παραγόντων με σκοπό την αναστολή του παρασίτου *Leishmania spp.*

**Λέξεις κλειδιά:** λεισμανίαση, θεραπεία, φαρμακευτικές ουσίες, *Andrographis paniculata*, *Ferrum arsenicum*, *Antimonium crudum*, in vitro.





## Abstract

Leishmaniasis is a parasitological disease caused by protozoans of genus *Leishmania spp.* These parasites belong to the family of trypanosomatids and cause visceral, cutaneous and mucocutaneous forms depending on the species. It is a tropical neglected disease found mainly in the Mediterranean Basin, the Middle East and Central Asia but gradually also in the rest of the world with cases reaching 1 million per year. The current drug treatment of leishmaniasis is an obstacle to eradicating the disease as it presents high cost, cytotoxicity and progressive resistance of the parasites to many drugs.

In order to avoid all the above contraindications, the need to find new therapeutic approaches was raised. These include preparations of natural products with mechanisms of action different from those of classical chemical drugs, such as plants and minerals which do not exhibit toxicity, have low costs and are easily available. A category of these products is the homeopathic medicines. The substances used are *Andrographis paniculata*, *Ferrum arsenicum* and *Antimonium crudum*. *Antimonium crudum* was additionally used at various concentrations. The preparations produced from the above substances were used in in vitro experiments to evaluate their anti-leishmanial activity in various strengths with the aim of using them as an alternative or complementary treatment for the treatment of the disease.

The experiments were applied to intracellular amastigote and promastigote forms of the parasite. In the majority of experimental tests the inhibition of the action of the substances was less than 20 %. Of interest is the activity of the substance *Antimonium crudum* which was used in various concentrations on promastigotes and showed a temporary inhibitory effect at a rate of 38.07% which dissipates after 72 hours. Further studies should be conducted in the future, so as to obtain a clearer image of more factors to inhibit the parasite *Leishmania spp.*

**Key words:** leishmaniasis, treatment, medicinal substances, *Andrographis paniculata*, *Ferrum arsenicum*, *Antimonium crudum*, in vitro.

## Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας .....	iv
Ευχαριστίες .....	v
Αφιερώσεις .....	vi
Περίληψη .....	vii
Abstract.....	x
Περιεχόμενα .....	xi
Εισαγωγή.....	1
Κεφάλαιο 1. ....	3
1.1 Ιστορική Αναδρομή .....	3
1.2 Κατάταξη, Γενετική & Μορφολογία Παρασίτου <i>Leishmania</i> spp. ....	5
1.3 Μετάδοση & Κύκλος Ζωής .....	7
1.3.1 Στάδια εντός του ασπόνδυλου ξενιστή .....	8
1.3.2 Στάδια εντός του σπονδυλωτού ξενιστή .....	9
1.4 Μηχανισμοί Δράσης .....	9
1.4.1 Είσοδος του παρασίτου στα μονοκύτταρα-μακροφάγα.....	9
1.4.2 Επιβίωση μέσα στα μακροφάγα.....	10
1.4.3 Μηχανισμοί έναντι της ανοσοαπόκρισης του ξενιστή.....	12
1.5 Λεισμανίαση .....	14
1.6 Κλινικές Εκδηλώσεις .....	14
1.6.1 Δερματική Λεισμανίαση .....	14
1.6.2 Βλεννογονοδερματική Λεισμανίαση .....	15
1.6.3 Σπλαχνική Λεισμανίαση.....	16
1.6.4 Ασυμπτωματική νόσος .....	17
1.7 Επιδημιολογικά Στοιχεία .....	18
1.8 Παράγοντες κινδύνου για εξάπλωση λεισμανίασης.....	20
1.9 Διάγνωση Λεισμανίασης.....	22
1.10 Θεραπεία Λεισμανίασης.....	26
1.11 Εναλλακτική θεραπεία & ο ρόλος των φυτών ως παραγόντων αντιμετώπισης .....	30
1.12 Ομοιοπαθητική .....	34

1.12.1 Η Ομοιοπαθητική ως Εναλλακτική Μορφή Θεραπείας .....	34
1.12.2 Παρασκευή ομοιοπαθητικών σκευασμάτων .....	36
1.13 Μηχανισμοί Δράσης Ομοιοπαθητικών Σκευασμάτων .....	38
1.14 Χρήση ομοιοπαθητικών σκευασμάτων για τη θεραπεία της Λεϊσμανίασης..	39
Κεφάλαιο 2. Πειραματική Μεθοδολογία .....	42
2.1 Σκοπός.....	42
2.2 Πειραματική Μεθοδολογία .....	42
2.2.1 Υλικά.....	42
2.2.2 Αναλώσιμα Υλικά .....	42
2.2.3 Αντιδραστήρια .....	43
2.2.4 Εργαστηριακός εξοπλισμός .....	43
2.2.5 Διάλυμα .....	44
2.2.6 Παρασιτικά στελέχη & Κυτταρική σειρά των μακροφάγων .....	44
2.2.7 Ομοιοπαθητικές ουσίες.....	44
2.2.8 Αμφοτεροκίνη Β.....	47
2.3 Πειραματικές Μέθοδοι .....	47
2.3.1 Κυτταροκαλλιέργειες .....	47
2.3.2 In vitro έλεγχος επιβίωσης και πολλαπλασιασμού μέσω της μεθόδου Alamar Blue.....	48
2.3.2.1. Έλεγχος κυτταρικής επιβίωσης με τη μέθοδο Alamar blue σε προμαστιγωτές μορφές παρασίτων .....	49
2.3.2.2. Έλεγχος κυτταρικής επιβίωσης με τη μέθοδο Alamar blue σε ενδοκυτταρικές μορφές παρασίτων.....	49
Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα .....	51
3.1 Δράση ουσιών έναντι ευαίσθητων ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών παρασίτων <i>L. Infantum</i> .....	51
3.1.1 Δράση της ουσίας Antimonium crudum I (AC I).....	51
3.1.2 Δράση της ουσίας Ferrum arsenicum (FA) .....	52
3.1.3 Δράση της ουσίας Andrographis paniculata (AP).....	53
3.1.4 Δράση της ουσίας Antimonium crudum II (AC II).....	55
3.1.5 Δράση της ουσίας Αμφοτεροκίνη Β (Am Β).....	56
3.2 Δράση ομοιοπαθητικών ουσιών έναντι ευαίσθητων προμαστιγωτών παρασίτων <i>L. Infantum</i> . .....	59
3.2.1 Πειραματική προσέγγιση με ομοιοπαθητικές ουσίες σε ευαίσθητες προμαστιγωτές μορφές του στελέχους <i>L. Infantum</i> . .....	59

3.2.2 Επιπλέον πειραματική προσέγγιση με ουσίες έναντι ευαίσθητων προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου <i>L. Infantum</i> .....	66
Συζήτηση-Συμπεράσματα.....	76
Αναφορές.....	79

## Εισαγωγή

Η παρασιτική νόσος λεισμανίαση προκύπτει από μόλυνση από πρωτόζωα και εντοπίζεται σε ολόκληρο τον κόσμο. Ειδικότερα, τα πρωτόζωα *Leishmania spp.*, της οικογενείας των τρυπανοσωματίδων, μολύνουν τα μακροφάγα των ιστών και παρεμβαίνουν στον ενδοκυτταρικό τους πολλαπλασιασμό, προκαλώντας αυτή την ετερογενή ομάδα υποτροπικών και τροπικών νοσημάτων, που έχει γίνει γνωστή ως λεισμανίαση (de Santana et al., 2017; Nascimento et al., 2017). Η ασθένεια μπορεί να εκδηλωθεί σε σπλαχνικές, δερματικές και βλεννογονοδερματικές μορφές ανάλογα με τα συμπτώματα της, που κυμαίνονται από δερματικές βλάβες έως θανατηφόρα σπλαχνική νόσο (Pires et al., 2014).

Η λεισμανίαση είναι μια από τις πλέον παραμελημένες τροπικές ασθένειες, εφόσον η εκτιμώμενη παγκόσμια επιβάρυνση της πιστεύεται, ότι είναι υψηλότερη από τους αναφερόμενους αριθμούς λόγω της ελλιπούς αναφοράς, επιτήρησης, καθώς και των ανεπαρκών τεχνικών ανίχνευσης των περιστατικών (Gunathilaka et al., 2020). Η γεωγραφική κατανομή της λεισμανίασης έχει επεκταθεί σημαντικά ανά τον κόσμο, με ταυτόχρονη απότομη αύξηση του αριθμού των περιπτώσεων και την εμφάνιση νέων εστιών ασθένειας (Gunathilaka et al., 2020). Περίπου το 95% των περιπτώσεων δερματικής λεισμανίασης, που είναι και η συνηθέστερη μορφή της νόσου, κάνουν την εμφάνιση τους στην αμερικανική ήπειρο, αλλά παρόμοιες μορφές της παρατηρούνται στη Λεκάνη της Μεσογείου, τη Μέση Ανατολή και την Κεντρική Ασία (de Santana et al., 2017). Σύμφωνα με εκτιμήσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ), ετησίως καταγράφονται 700.000 με 1 εκατομμύριο νέα κρούσματα (WHO, 2021).

Είναι χαρακτηριστικό, ότι τα παράσιτα *Leishmania* πολλαπλασιάζονται αποκλειστικά στα κύτταρα του μονοπυρηνικού συστήματος των φαγοκυττάρων. Παρουσία μόλυνσης από *Leishmania*, τα μακροφάγα αποτελούν, τόσο τα κύτταρα-ξενιστές όσο και τα κύτταρα τελεστές έναντι των παρασίτων. Οι μηχανισμοί που προσδίδουν αντοχή και ευαισθησία στη μόλυνση από *Leishmania* έχουν μελετηθεί ευρέως. Ωστόσο, οι συνέπειες των αρχικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μακροφάγων και των παρασίτων όσον αφορά την ικανότητα της *Leishmania* να επιβιώνει και να πολλαπλασιάζεται μέσα σε αυτά τα κύτταρα παραμένουν ασαφείς

(Pereira et al., 2005). Στο πλαίσιο της ανοσολογικής απόκρισης, οι παράγοντες που προδιαθέτουν για επίλυση ή επιμονή της λοίμωξης, πέραν της σχέσης μεταξύ παρασίτου και κυττάρου ξενιστή, περιλαμβάνουν την υγιή κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή (Gollob et al., 2014; Souza et al., 2016) και το είδος του παρασίτου (Carneiro et al., 2015). Σε συνέχεια της αναγνώρισης του παρασίτου, τα μακροφάγα ενεργοποιούνται και μέσω της διαδικασίας της φαγοκυττάρωσης μπορούν να καταστρέψουν τα παράσιτα μέσω της επαγωγής οξειδωτικής έκρηξης (oxidative burst) και της παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου (Carneiro et al., 2015). Ωστόσο, οι μηχανισμοί διαφυγής των παρασίτων είναι δύσκολο να ξεπεραστούν. Οι υποδοχείς της επιφάνειας των φαγοκυττάρων χρησιμεύουν ως είσοδος για αυτά τα παράσιτα και μπορούν να επηρεάσουν την έκβαση της φαγοκυττάρωσης (Hsiao et al., 2011).

Η πρώτη επιλογή για τη θεραπεία των δερματικών βλαβών της λειψμανίασης είναι τα συνθετικά άλατα πεντασθενούς αντιμονίου (Oliveira et al., 2011), τα οποία επάγουν την αύξηση των διαφόρων προφλεγμονωδών κυτοκινών στο πλάσμα των ασθενών που λαμβάνουν θεραπεία, όπως IL-1b, IL-6, IL- 8 και TNF-α, συμβάλλοντας σε μια πιο αποτελεσματική ανοσοαπόκριση. Ωστόσο, η υψηλή πιθανότητα ανθεκτικότητας στο φάρμακο έχει αναδειχθεί σε περιοριστικό παράγοντα για τη χρήση του πεντασθενούς αντιμονίου. Επιπλέον, έχουν αναφερθεί διάφορες ανεπιθύμητες ενέργειες όπως πόνος στους σκελετικούς μυς, ναυτία, έμετος, διάρροια, κοιλιακό άλγος, πονοκέφαλος, ανορεξία, εξασθένηση, κόπωση, πυρετός, εξάνθημα, ερύθημα και κνίδωση (Oliveira et al., 2014). Υπάρχουν ορισμένα άλλα φάρμακα που χρησιμοποιούνται επίσης για τη θεραπεία της λειψμανίασης, όπως η αμφοτερικίνη Β, η μεφλοκίνη και η χλωροκίνη. Ωστόσο, η τοξικότητα τους και η ανθεκτικότητα τους αποτελούν επίσης περιοριστικούς παράγοντες στη χρήση τους (Mwololo et al., 2015; Chauhan et al., 2018).

Για την αποφυγή της τοξικότητας των υφιστάμενων θεραπειών μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση είναι η ομοιοπαθητική, η οποία αποσκοπεί στη θεραπεία με τη χρήση σκευασμάτων, που παρασκευάζονται από ενώσεις φυσικών ουσιών και περιλαμβάνουν έναν συνδυασμό πολλών διαφορετικών ενώσεων που θεωρούνται χρήσιμες για ένα σύμπτωμα ή ασθένεια, συμπεριλαμβανομένης και της λειψμανίασης (Nascimento et al., 2017).

# Κεφάλαιο 1.

## 1.1 Ιστορική Αναδρομή

Η λειψμανίαση έχει μακρά ιστορία, που χρονολογείται στα 2.500 π.Χ., με αρκετές πρωτόγονες περιγραφές της νόσου να έχουν εντοπιστεί σε αρχαία γραπτά και πρόσφατα μοριακά ευρήματα από αρχαίο αρχαιολογικό υλικό (Akhoundi et al., 2016). Στη δυτική ιατρική, η μελέτη για τις διάφορες ασθένειες, που στη συνέχεια ομαδοποιήθηκαν ως «λειψμανίαση» στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα, σηματοδοτείται από την ευρωπαϊκή αποικιακή επέκταση κατά τον 18<sup>ο</sup> και τον 19<sup>ο</sup> αιώνα. Στην Ινδία, οι καταγραφές για το καλααζάρ, μια ασθένεια που επηρέαζε τα εσωτερικά όργανα (ιδιαίτερα το σπλήνα και το ήπαρ) και έγινε γνωστή ως σπλαχνική λειψμανίαση, αυξήθηκαν από τα μέσα του 19<sup>ου</sup> αιώνα και συνέπεσαν με την έξαρση των εξαιρετικά θανατηφόρων επιδημιών, που ερήμωσε διάφορες περιοχές και χωριά σε εκείνη τη βρετανική αποικία. Αρχικά, συνδέθηκε με την ελονοσία ή το αγκυλόστωμα και ενσωματώθηκε στο φάσμα της λειψμανίασης στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα, ταυτόχρονα με τις δερματολογικές ασθένειες γνωστές σε διάφορα μέρη του κόσμου με διάφορα ονόματα, που υποδεικνύουν τον τόπο απόκτησης τους και έγιναν γνωστές με διάφορες ονομασίες όπως “Aleppo boil”<sup>1</sup>, “Biskra button” κ.λπ. Η «Oriental Sore» ή «ανατολίτικη πληγή» προτάθηκε τη δεκαετία του 1870 ως η γενική ονομασία για τη διευκόλυνση της ιατρικής έρευνας αναφορικά με τη φύση τους (Steverding, 2017; Benchimol, 2020).

Το 1885, ο Cunningham αφού παρατήρησε τον μικροοργανισμό *Leishmania* για πρώτη φορά, κατέληξε στο ότι ο οργανισμός αυτός δεν ήταν βακτήριο. Δεκατρία χρόνια αργότερα, ένας Ρώσος στρατιωτικός χειρουργός, ο Peter Boronsky ανακάλυψε περαιτέρω, ότι ο οργανισμός ήταν ένα πρωτόζωο, κάτι το οποίο επιβεβαιώθηκε και από τον Wright το 1903. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, οι William Leishman και Charles Donovan περιέγραψαν τον παράγοντα που ήταν υπεύθυνος για τη σπλαχνική λειψμανίαση. Ο Leishman, που διεξήγαγε την έρευνα του στην Ινδία παρατήρησε μεγέθυνση της σπλήνας και πυρετό σε ασθενείς σε δείγματα ασθενών μέσω μικροσκοπίου, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Romanowsky για χρώση (Güran, 2018).

---

<sup>1</sup> Το Χαλέπι/ Αλέπο είναι περιοχή της Συρίας



Η σπλαχνική λειψμανίαση αναδύθηκε ως πρόβλημα δημόσιας υγείας μόλις το 1934, οπότε η Υπηρεσία Κίτρινου Πυρετού (Yellow Fever Service) δημιούργησε ένα εργαστήριο για την ανάλυση δειγμάτων ήπατος που είχαν συλλέξει από εκατοντάδες ασθενείς σε ολόκληρη τη Βραζιλία, από ασθενείς που κατέληξαν από ύποπτους πυρετούς. Ο παθολόγος Henrique Penna (1934) αναγνώρισε τη λειψμανίαση σε διαφάνειες που ήταν αρνητικές για κίτρινο πυρετό, με αποτέλεσμα 41 θάνατοι να συσχετιστούν με σπλαχνική λειψμανίαση (Benchimol, 2020).

Τέλος, το 1942, υπήρξαν είχαν αρκετά στοιχεία, ώστε οι θηλυκές αμμόμυγες φλεβοτομίνης να αναγνωριστούν ως ο κύριος φορέας για τη δερματική λειψμανίαση και τη σπλαχνική λειψμανίαση λόγω του γεγονότος, ότι παρατηρήθηκαν κλινικές καταστάσεις μετά από τσίμπημα αμμόμυγας (σκνίπας), που περιγράφηκαν ως ιστοκυτταρώσεις. Όσον αφορά τις εξελίξεις στη διάγνωση της λειψμανίασης, ξεκινώντας από τη μικροσκοπική ταυτοποίηση των παραγόντων, οι ιατρικές τεχνολογίες έχουν προχωρήσει με τον καιρό περαιτέρω σε μεθόδους προσδιορισμού αλληλουχίας DNA με βάση την μοριακή μέθοδο ανάλυσης (PCR)<sup>2</sup> για τον προσδιορισμό συγκεκριμένων ειδών. Η *L. donovani* ήταν το πρώτο είδος παράσιτου, που αναγνωρίστηκε και πήρε το όνομά του ως αναγνώριση του έργου των Leishman και Donovan (Güran, 2018).

Στα τέλη του 20<sup>ου</sup> αιώνα σε πολλές χώρες, όλες οι μορφές λειψμανίασης εμφανίστηκαν ή επανεμφανίστηκαν σε αστικές και αγροτικές περιοχές λόγω των υφιστάμενων περιβαλλοντικών αλλαγών, της παγκοσμιοποίησης, της μετανάστευσης των πληθυσμών, της αστικής ανάπτυξης, των πολέμων και άλλων κοινωνικοοικονομικών διεργασιών, που τελούν σε εξέλιξη σε μεγάλες εκτάσεις αυτών των χωρών (Steverding, 2017; Benchimol, 2020). Παρά το γεγονός αποτελεί μια παραμελημένη τροπική ασθένεια, η γνώση για την ασθένεια αυξάνεται συνεχώς. Αναφορές περιστατικών που αφορούσαν άτομα με ασυνήθιστη λαρυγγική λειψμανίαση και ήταν ταυτόχρονα φορείς του HIV, που εμφανίζουν συμπτώματα λειψμανίασης, όπως δερματικές βλάβες και οζίδια, κατέδειξαν ότι η λειψμανίαση μπορεί να εμφανιστεί ξανά ακόμη και σε συνέχεια θεραπείας, γεγονός που είναι

---

<sup>2</sup> Polymerase Chain Reaction

ενδεικτικό της περιόδου επώασης του παρασίτου (Gökmen et al., 2014; Barroso et al., 2015).

## 1.2 Κατάταξη, Γενετική & Μορφολογία Παρασίτου *Leishmania* spp.

Η λείσμανίαση οφείλεται σε ένα παράσιτο, που είναι ενδοκυτταρικό πρωτόζωο του γένους *Leishmania*, που ανήκουν στην οικογένεια Trypanosomatidae, της τάξης Kinetoplastida (Elmahallawy et al., 2014). Το γένος *Leishmania* περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό ειδών, με τουλάχιστον 39 είδη να περιγράφονται στη βιβλιογραφία, γεγονός που αντικατοπτρίζει την ικανότητα αυτής της ομάδας οργανισμών αφενός να προσβάλει ένα ευρύ φάσμα σπονδυλωτών και ασπόνδυλων ξενιστών και αφετέρου να παράγει ένα ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων στους ανθρώπους (Pace, 2014). Η ταξινόμηση εντός του γένους *Leishmania* δεν έχει ακόμη πλήρως καθιερωθεί, με τις συνεχείς συζητήσεις σχετικά με τους ορισμούς των ειδών και, ως εκ τούτου, τον αριθμό των ειδών, καθώς και για τα υπογένη να είναι συνεχείς. Πρόσφατα μοριακά δεδομένα και φυλογενετικές αναλύσεις υποστηρίζουν την απλοποίηση της ταξινόμησης της *Leishmania* σε λιγότερα είδη. Αυτά τα είδη περιλαμβάνουν τις *L. donovani*, *L. major*, *L. tropica* και *L. mexicana* εντός του υπογένους *L. (Leishmania)* και *L. braziliensis* και *L. guyanensis* εντός του *L. (Viannia)*. Τα ερπετοειδή παράσιτα, που παλαιότερα κατατάσσονταν σε ξεχωριστό γένος, ανήκουν πλέον στο τρίτο και μοναδικό άλλο υπογένος, το *L. (Sauroleishmania)*. Άλλες ομάδες παραμένουν αμφιλεγόμενες, όπως επί παραδείγματι τα παράσιτα που αρχικά τοποθετήθηκαν στο γένος *Endotrypanum* και είδη που σχετίζονται με το *L. enrietti*. Νέα είδη συνεχίζουν να ανακαλύπτονται, ιδιαίτερα σε προηγουμένως ελάχιστα γνωστές ή αντιπροσωπευόμενες ομάδες. Οι καλύτερες ταξινομήσεις βασίζονται στην ποιότητα των δεικτών που χρησιμοποιούνται, ιδανικά ολόκληρου του γονιδιώματος, καθώς και σε επαρκή αριθμό δειγμάτων που είναι αντιπροσωπευτικά της ποικιλομορφίας, κάθε είδους, καθώς και σε ολόκληρο το γένος (Maurício, 2018).

Η λείσμανίαση εμφανίζεται σε τρεις κλινικές μορφές:

- i. **Δερματική λείσμανίαση (CL)<sup>3</sup>**, η οποία προκαλείται από τα παράσιτα *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica* (δερματική λείσμανίαση του Παλαιού Κόσμου), *L. infantum*, *L. chagasi* (στην περιοχή της Μεσογείου και της Κασπίας Θάλασσας),

---

<sup>3</sup> Cutaneous Leishmaniasis

*L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, και *L. guayanensis* (δερματική λεισμανίαση στο Νέο Κόσμος),

- ii. **Βλεννογονοδερματική λεισμανίαση (MCL)<sup>4</sup>** ή εσπουνδία, η οποία προκαλείται από τους *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guayanensis* στον Νέο Κόσμο και περιστασιακά συναντάται στον Παλαιό Κόσμο, που προκαλείται από *L. infantum* και *L. donovani*.
- iii. **Σπλαχνική λεισμανίαση (VL)<sup>5</sup>**, η οποία προκαλείται από είδη του συμπλέγματος *L. donovani* που αποτελούνται κυρίως από *L. infantum*, *L. donovani* και *L. chagasi*. Η VL είναι επίσης γνωστή ως καλααζάρ, μαύρος πυρετός και πυρετός Dumdum

Υπάρχει και μια τέταρτη μορφή, γνωστή ως διάχυτη δερματική λεισμανίαση (DCL)<sup>6</sup>, η οποία προκαλείται από τα *L. amazonensis* και *L. Aethiopica* (Elmahallawy et al., 2014). Αυτά τα είδη μπορούν περαιτέρω να ταξινομηθούν σε υπογένη ανάλογα με τις ανατομικές ποικιλίες των σημείων μόλυνσης. Τα είδη φλεβοτόμου του Παλαιού Κόσμου είναι κοινά σε ερημικές και ημίξηρες περιοχές, ενώ τα είδη φλεβοτόμου του Νέου Κόσμου μεταδίδουν την ασθένεια στον άνθρωπο κοντά στα δάση (Organ & Akbari, 2016; Güran, 2018).

Όπως πολλά άλλα πρωτόζωα παράσιτα, η *Leishmania* έχει διμορφικό κύκλο ζωής και περιλαμβάνει δύο ξενιστές, από τους οποίους ο ένας είναι ασπόνδυλος ξενιστής, η φλεβοτόμος, στην οποία υπάρχει παρόν στην προμαστιγωτή φάση και ο άλλος είναι ο σπονδυλωτός ξενιστής, στον οποίο υπάρχει στη μαστιγωτή φάση. Τα παράσιτα *Leishmania* εμφανίζουν μια ποικιλία διαφορετικών μορφολογιών κυττάρων και έναν αριθμό τύπων κυττάρων (αναπτυξιακές μορφές), που είναι προσαρμοσμένοι είτε στον ξενιστή, είτε στον φορέα. Όπως φαίνεται με άλλα παράσιτα όπως το πλασμώδιο και τα τρυπανοσώματα, ορισμένες από αυτές τις αναπτυξιακές μορφές είναι πολλαπλασιαστικές, ενώ άλλες είναι σε κατάσταση ηρεμίας και προ-προσαρμοσμένες για μετάδοση στον επόμενο ξενιστή (Sunter & Gull, 2017; Abasss & Lazar, 2020).

---

<sup>4</sup> Mucocutaneous Leishmaniasis

<sup>5</sup> Visceral Leishmaniasis

<sup>6</sup> Diffuse Cutaneous Leishmaniasis

Τα παράσιτα στην προμαστιγωτή φάση έχουν επίμηκες σχήμα και έχουν μακριά μαστίγια (flagella), τα οποία είναι διακριτά και αναδύονται από μια θήκη, ενώ αυτά στη μαστιγωτή φάση είναι πιο ωοειδή, διαμέτρου 2,5 μm-5,0 μm και έχουν σχεδόν δυσδιάκριτα μαστίγια (ενδοπλασματικά). Λόγω της ομοιότητας των μαστιγωτών σε όλους τους ιστούς και της δυσκολίας στη διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών, οι προσπάθειες διαφοροποίησης τους πραγματοποιείται μέσω PCR για την ενίσχυση του DNA των κινητοπλαστών από τα δείγματα. Η μαστιγωτή μορφή δυνητικά εστιάζεται περισσότερο στις αισθητηριακές λειτουργίες. Αντίθετα, η μορφολογία της προμαστιγωτής παρέχει προωστική δύναμη, η οποία είναι πιθανώς υπεύθυνη για τη διευκόλυνση της διέλευσης μέσω του πεπτικού σωλήνα (Wheeler et al., 2015; Khan, Andrews & Mittra, 2018; Vaselek et al., 2020). Η μετάβαση από τα στάδια των προμαστιγωτών φάσεων, οι οποίες δεν είναι λοιμώδεις, στις ωοειδείς λοιμώδεις μορφές μαστιγώτη που αναπαράγονται εντός του φαγολυσοσώματος των μακροφάγων θηλαστικών είναι κρίσιμη για τη λοιμογόνο δυναμική του παρασίτου *Leishmania* (Lazar & Abasss, 2020).

### **1.3 Μετάδοση & Κύκλος Ζωής**

Από την παραπάνω ανάλυση προκύπτει, ότι διαφορετικά είδη παρασίτου *Leishmania* προκαλούν ασθένεια στους ανθρώπους, με τα διαφορετικά είδη να ομαδοποιούνται συχνά ανάλογα με το αν εμφανίστηκαν στον Παλαιό Κόσμο ή στον Νέο Κόσμο (Sunter & Gull, 2017). Ο μόνος φορέας που ευθύνεται για τη μετάδοση της λεϊσμανίασης είναι η θηλυκή φλεβοτόμος, που ανήκει στο γέννη *Phlebotomus* spp. στον Παλαιό και *Lutzomyia* spp. στον Νέο Κόσμο (Pace, 2014). Από τα πολλά γνωστά είδη φλεβοτόμου, είναι εγνωσμένο ότι 93 από αυτά μεταδίδουν λεϊσμανίαση. Οι φλεβοτόμοι είναι συνήθως ενεργές κατά τη διάρκεια της νύχτας και έχουν περιορισμένη ικανότητα κίνησης. Έχουν συνήθως μέγεθος 2 mm και μπορούν να σχίσουν το δέρμα, προκειμένου να τραφούν με αίμα. Παρατηρούνται κυρίως στις τροπικές περιοχές, ενώ έχουν εξαπλωθεί στις περιοχές της Βόρειας Ευρώπης λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας και των κλιματικών αλλαγών (Gürgan, 2018).

Η μετάδοση μπορεί να είναι ζωνοτική ή ανθρωπονοτική ανάλογα με τη δεξαμενή. Επισημαίνεται, ότι η λεϊσμανίαση δεν αποτελεί μόνο μια ασθένεια του

ανθρώπου, αλλά μολύνει άλλα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένων άγριων και οικόσιτων ζώων όπως τρωκτικά και σκύλους, δημιουργώντας μια ζωνοτική δεξαμενή, που έχει σοβαρές επιπτώσεις στον έλεγχο της νόσου (Efstathiou & Smirlis, 2021). Οι οικόσιτοι σκύλοι θεωρούνται η κύρια δεξαμενή για τη μετάδοση των ζωνοσών. Στην Αμερική και την Κεντρική Ασία, η αλληλεπίδραση μεταξύ άγριων ζώων και ανθρώπων προκαλεί επίσης ζωνοσογόνο μετάδοση. Οι άνθρωποι με VL αποτελούν τη μόνη δεξαμενή στην ανθρωπονοτική μετάδοση της νόσου (Oryan & Akbari, 2016; Sunter & Gull, 2017).

Τα εμβόλια εξασθενημένων παρασίτων, που θα παρέχουν μακροπρόθεσμη ανοσία και θα αποτρέψουν τη μετάδοση της λείσμανίασης βρίσκονται ακόμη σε εξέλιξη. Οι θεραπείες που απευθύνονται σε μολυσμένους σκύλους στο πλαίσιο της ζωνοτικής μετάδοσης δεν προτιμώνται, εφόσον ενδέχεται να οδηγήσουν σε αυξημένη αντίσταση στα παράσιτα, ενώ μεγάλη είναι και η πιθανότητα μόλυνσης στη φύση, ακόμη και μετά τη θεραπεία. Τα περιλαίμια με δραστικό συστατικό τη δελταμεθρίνη έχουν χρησιμοποιηθεί με αξιοσημείωτη επιτυχία στην πρόληψη της νόσου στους σκύλους (Oryan & Akbari, 2016). Η αποφυγή εξωτερικών χώρων σε ενδημικές περιοχές, η χρήση προστατευτικού ρουχισμού, η χρήση εντομοαπωθητικών, η χρήση κουνουπιέρας, ο ύπνος πάνω από το επίπεδο του εδάφους και η αποφυγή νυχτερινών δραστηριοτήτων είναι μερικές από τις χρήσιμες μεθόδους για την πρόληψη της μετάδοσης στον άνθρωπο (Güran, 2018).

### **1.3.1 Στάδια εντός του ασπόνδυλου ξενιστή**

Η θηλυκή φλεβοτόμος μέσω της τροφής της με αίμα από ένα μολυσμένο άτομο, έρχεται να προσλάβει στο έντερο της μακροφάγα που έχουν επιμολυνθεί με το παράσιτο και βρίσκονται σε αμαστιγωτή μορφή. Στη συνέχεια, το παράσιτο εισέρχεται στο μεσεντέριο, όπου διπλασιάζεται και διπλασιάζεται και μετακινείται στον φάρυγγα, όπου υπόκειται σε μια σειρά μορφολογικών και βιοχημικών διεργασιών και από την μη μολυσματική προκυκλική μορφή μεταβαίνει στη μετακυκλική μορφή του που είναι μολυσματική, ώστε να είναι έτοιμο να μεταφερθεί σε άλλον ξενιστή. Ο κύκλος ζωής της φλεβοτόμου είναι περίπου 10 ημέρες (Abass & Lazar, 2020).

### **1.3.2 Στάδια εντός του σπονδυλωτού ξενιστή**

Όπως προαναφέρθηκε, ο κύκλος ζωής της *Leishmania* ξεκινά όταν η μολυσμένη θηλυκή φλεβοτόμος εγχέει προκυκλικές προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου στον ξενιστή κατά την είσοδο στο δέρμα μέσω του τσιμπήματος. Μέσα σε λίγα λεπτά, οι προμαστιγωτές μορφές προσλαμβάνονται από τα φαγοκυτταρικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων και των ουδετερόφιλων. Δεδομένου ότι τα ουδετερόφιλα έχουν πολύ μικρή διάρκεια ζωής, τα μακροφάγα είναι τα τελικά κύτταρα-ξενιστές για τον πολλαπλασιασμό των παρασίτων *Leishmania*. Μετά την εσωτερίκευση στο φαγολυσόσωμα των μακροφάγων, οι προμαστιγωτές μορφές αρχίζουν να διαφοροποιούνται σε μικρές, μη κινητικές μορφές μαστιγωτών, οι οποίες διαιρούνται πολλές φορές με δυαδική σχάση, διαρρηγνύοντας τελικά τα μακροφάγα, προκειμένου να μολύνουν άλλα παρακείμενα μακροφάγα. Πλήρως διαφοροποιημένοι μολυσματικοί οργανισμοί μεταναστεύουν στο στόμα των φλεβοτόμων και εγχέονται σε άλλο ξενιστή κατά τη διάρκεια του τσιμπήματος (Liu & Uzoona, 2012). Στη δερματική λεισμανίαση, τα παράσιτα μολύνουν τα μακροφάγα που κατοικούν στο δέρμα. Όταν το κύτταρο-ξενιστής γεμίσει με παράσιτα, λύεται και οι απελευθερωμένες μαστιγωτές μορφές θα μολύνουν γειτονικά μακροφάγα. Στη σπλαχνική λεισμανίαση, ωστόσο, οι απελευθερωμένες μαστιγωτές μορφές εξαπλώνονται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος και μολύνουν τα κύτταρα του μονοκυτταρικού συστήματος φαγοκυττάρων (δικτυοενδοθηλιακό σύστημα) του ήπατος, του σπλήνα, του μυελού των οστών, των λεμφαδένων και του εντέρου (Steverding, 2017).

## **1.4 Μηχανισμοί Δράσης**

### **1.4.1 Είσοδος του παρασίτου στα μονοκύτταρα-μακροφάγα**

Η πρόσληψη των προμαστιγωτών μορφών της *Leishmania* από τα κύτταρα ξενιστές είναι μια κλασική διαδικασία, που περιλαμβάνει τη μεσολάβηση των υποδοχέων που ξεκινά τη φαγοκυττάρωση. Ένας αριθμός επιφανειακών μορίων των παρασίτων και των μακροφάγων έχουν εμπλακεί στην αλληλεπίδραση μεταξύ της *Leishmania* και μακροφάγων. Στην περίπτωση των προμαστιγωτών μορφών, οι υποδοχείς του συμπληρώματος (CR)1, CR3 (Mac-1), ο υποδοχέας ινονεκτίνης και ο υποδοχέας

μαννόζης-φουκόζης (MR) στην επιφάνεια των μακροφάγων παίζουν σημαντικό ρόλο στη σύνδεση/προσκόλληση της προμαστιγωτής μορφής (Liu & Uzzona, 2012). Η επιφανειακή λιποφωσφογλυκάνη (LPG)<sup>7</sup>, το μόριο GP63 και οι πρωτεοφωσφογλυκάνες (PPG)<sup>8</sup> σε προμαστιγωτές μορφές της *L. major* είναι επίσης σημαντικοί καθοριστικοί παράγοντες για την έναρξη της φαγοκυττάρωσης και την επακόλουθη ενδοκυτταρική επιβίωση των παρασίτων (Naderer & McConville, 2008), καθώς είναι οι στοχευόμενοι όπως τα θραύσματα αποικοδόμησης του συστατικού C3 του συμπληρώματος (C3b/iC3b), της πρωτεΐνης συνδεόμενης με τη μαννόζη και των γαλακτινών. Επισημαίνεται, ότι η ανεπάρκεια ενός μόνο μορίου (όπως η LPG) δεν είναι επιζήμια για την προσκόλληση, επειδή η φαγοκυττάρωση των παρασίτων με μεταλλαγμένη LPG δεν διακυβεύεται. Ωστόσο, ενώ η ανεπάρκεια της LPG δεν επηρεάζει τη φαγοκυττάρωση, επηρεάζει σημαντικά την ενδοκυτταρική επιβίωση αυτών των μεταλλαγμένων μορφών, υποδηλώνοντας ότι αυτά τα μόρια εξακολουθούν να είναι κρίσιμα για την αναστολή και την ανατροπή του μηχανισμού θανάτωσης του ξενιστή. Στην περίπτωση του σταδίου της μαστιγωτής του μελετώμενου παρασίτου, έχει αποδειχθεί ότι τα επικαλυμμένα με IgG παράσιτα του ξενιστή θα μπορούσαν να συνδεθούν με τους υποδοχείς Fc (FcγR) στα μακροφάγα, ώστε να διευκολύνουν την είσοδο σε αυτά τα κύτταρα. Αυτή η εμπλοκή και η επακόλουθη είσοδος ενεργοποιούν τις οδούς σηματοδότησης κατάντη, που αποτρέπουν τη θανάτωση και προάγουν την ανάπτυξη ενδοκυτταρικών παρασίτων (Liu & Uzzona, 2012; Tomiotto-Pellissier et al., 2018).

#### 1.4.2 Επιβίωση μέσα στα μακροφάγα

Όπως αναλύθηκε ανωτέρω, μόλις η *Leishmania* εισέλθει στον ανθρώπινο ξενιστή, οι μετακυκλικές προμαστιγωτές μορφές εναποτίθενται στο σημείο του δαγκώματος, με αποτέλεσμα τη στρατολόγηση μακροφάγων, που προσπαθούν να επιτεθούν στο παράσιτο με αντιδραστικά μόρια οξυγόνου και αζώτου. Αυτά είναι τα κύτταρα που μολύνει και όπου κατοικεί η *Leishmania*, γεγονός που τους επιτρέπει να επιβιώσουν στον ξενιστή (Arango Duque & Descoteaux, 2015; Sunter & Gull, 2017). Οι

---

<sup>7</sup> Lipophosphoglycan

<sup>8</sup> Proteophosphoglycans

μετακυκλικές προμαστιγωτές μορφές είναι κύτταρα υψηλής κινητικότητας και το παράσιτο είναι σε θέση να μεταναστεύσει μέσω μιας μήτρας κολλαγόνου (de Menezes et al., 2016). Ως εκ τούτου, είναι πιθανό ότι η φαγοκυττάρωση του μπορεί να συμβεί σε θέσεις απομακρυσμένες από το σημείο του δαγκώματος. Επιπλέον, ίσως το φάσμα της νόσου που προκαλείται από τη *Leishmania*, που κυμαίνεται από τη δερματική έως τη σπλαχνική, αντανακλάται στην ικανότητα του παρασίτου να εισβάλλει στον ξενιστή σε θέσεις πέραν εκείνης του δαγκώματος, είτε απευθείας, είτε μέσω της κυκλοφορίας των μολυσμένων μακροφάγων. Η *Leishmania* παράγει πρωτεάση με αυξημένη δραστηριότητα, η οποία μειώνει σημαντικά τη δραστηριότητα των μακροφάγων. Μέσα στο κύτταρο, τα φαγοσώματα καταναλώνουν το παράσιτο, αλλά είναι αναποτελεσματικά, εφόσον το παράσιτο τροποποιεί τις καταστροφικές ιδιότητες του φαγοσώματος (Sunter & Gull, 2017; Güran, 2018).

Οι προμαστιγωτές μορφές είναι επικαλυμμένες με γλυκοκάλυκα, που προστατεύει αυτά τα στάδια από τις υδρολάσες του ξενιστή και το συστατικό του ορού στην κυκλοφορία του αίματος και του πεπτικού συστήματος στα έντομα. Το κύριο συστατικό του γλυκοκάλυκα είναι ένα σύμπλεγμα που αποτελείται από λιποφωσφογλυκάνη (LPG). Η LPG περιλαμβάνει μια μακρά αλυσίδα φωσφογλυκάνης (από επαναλαμβανόμενες μονάδες ολιγοσακχαρίτη-φωσφορικού) που εγκαθίσταται στην πλασματική μεμβράνη μέσω μιας άγκυρας GPI<sup>9</sup> (γλυκοσυλφωσφατιδυλοϊνοσιτόλης). Αξιοσημείωτο είναι, ότι ο επιφανειακός γλυκοκάλυκας της LPG χάνεται εντελώς μετά τη διαφοροποίηση της προμαστιγωτής σε αμαστιγωτή μορφή, υποδηλώνοντας ότι η LPG δεν είναι απαραίτητη για τη λοιμογόνο δράση του παρασίτου. Έχει καταδειχθεί, ότι τα παράσιτα *Leishmania* κατοικούν και αναπαράγονται μέσα σε συστατικά του φαγολυσώματος, με τις αμαστιγωτές μορφές να έχουν αυξημένη ικανότητα να αντέχουν σε περιβάλλον, που είναι πλούσιο σε υδρολυτικά ένζυμα. Ως αποτέλεσμα της παρουσίας τους μέσα στα μακροφάγα, παρεμβαίνουν στο ενδοσώμα και το λυσώμα και αποκτούν τα χαρακτηριστικά των λυσοσωμάτων. Επίσης, ανθίστανται στο όξινο περιβάλλον pH (4,7-5,2), που υπάρχει μέσα στο κενό που τις περιέχει, λόγω της δραστηριότητας του

---

<sup>9</sup> Glycosylphosphatidylinositol



ενζύμου H + ATPase, και θα διέλθουν όλων των μεταβολικών διεργασιών από όλες τις απαραίτητες μεταβολικές διεργασίες, παρά το γεγονός ότι αυτές οι ίδιες διεργασίες εκτελούνται από τις προμαστιγωτές μορφές σε περιβάλλον με ουδέτερο pH (Sunter & Gull, 2017; Abass & Lazar, 2020).

#### **1.4.3 Μηχανισμοί έναντι της ανοσοαπόκρισης του ξενιστή**

Περαιτέρω, τα παράσιτα *Leishmania* έχουν αναπτύξει τον δικό τους τρόπο, προκειμένου να απομειώσουν την αποτελεσματικότητα του ανοσοποιητικού συστήματος. Η τροποποίηση της ικανότητας των υποδοχέων τύπου toll (TLRs)<sup>10</sup> να αναγνωρίζουν τα παθογόνα, η καθυστέρηση της ικανότητας των φαγοσωμάτων να εξολοθρεύουν το παράσιτο μόλις καταναλωθεί, η τροποποίηση της παρουσίας του αντιγόνου των μακροφάγων και της σηματοδότησης του ξενιστή, προκειμένου να επιτευχθεί παραγωγή ή αναστολή ορισμένων κυτοκινών ή χημειοκινών όπως η IL-10 και η IL-12, αποτελούν μερικά από τα παραδείγματα μηχανισμών ανοσοδιαφυγής, που χρησιμοποιούνται τα παράσιτα της λεισμανίασης (Gupta et al., 2013).

Ως προοδευτική νόσος, οι αυξημένες συγκεντρώσεις των κυτοκινών IFN-γ και TNF-α υποδεικνύουν ανοσοκατασταλτικό μηχανισμό για τη λεισμανίαση, ειδικά στην περίπτωση της VL. Η IL-10, η οποία παράγεται από πολλά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα B κύτταρα, τα υποσύνολα T-κυττάρων και τα εγγενή κύτταρα, είναι μια ρυθμιστική κυτοκίνη που είναι υπεύθυνη για την ανοσοκαταστολή και τη μείωση της αποτελεσματικότητας των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων όπως τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα, όπου η αρχική απόκριση εξαρτάται κυρίως από αυτή τη διαδικασία. Για τη VL, η IL-10 βρέθηκε ότι παράγεται κυρίως από κύτταρα CD4 + CD25-Foxp3- στον σπλήνα, υποδηλώνοντας ότι η καταστολή της αντιλεισμανιακής ανοσίας σε επηρεαζόμενα άτομα εξαρτάται από την έκφραση της IL-10 από τα T κύτταρα. Επιπλέον, πειράματα που έγιναν με μοντέλα ποντικών, κατέδειξαν ότι η σηματοδότηση της IL-12 και η παρουσία υψηλής δόσης αντιγόνου μπορεί να οδηγήσει στην ενεργοποίηση των κυττάρων Th1 που συνεκφράζουν την IL-10. Η IL-27 είναι ένας άλλος ρυθμιστής του ανοσοποιητικού συστήματος που παρακινεί τα T κύτταρα να παράγουν IL-10 σε συνέχεια μόλυνσης. Επιπλέον, πιστεύεται ότι ο ρόλος της IL-27 είναι η ρύθμιση προς

---

<sup>10</sup> Toll-like Receptors

τα πάνω της IL-21 από τα T κύτταρα, προκειμένου να επιτευχθούν υψηλά επίπεδα IL-10 (Güran, 2018). Στη μελέτη των Prajapati et al. (2014), ελήφθησαν κύτταρα από σπλήνα ασθενών με VL και ελέγχθηκαν ως προς τα επίπεδα έκφρασης mRNA για διάφορα κύτταρα, προκειμένου να προσδιοριστούν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή IL-10 και IL-27. Τα κύτταρα CD14+ βρέθηκαν να είναι η κύρια πηγή έκφρασης mRNA που σχετίζεται με την IL-27, ενώ τα T κύτταρα CD3+ ήταν η κύρια πηγή τόσο της IL-10, όσο και της IL-21. Για την CL, μοντέλα ποντικών έδειξαν ότι η IL-22 παίζει κρίσιμο ρόλο στην εξέλιξη της παθολογίας της νόσου, εφόσον αυξημένα επίπεδα της IL-22 συνέβαλαν σημαντικά στη διατήρηση της ακεραιότητας του δέρματος και στην πρόληψη περαιτέρω φλεγμονής (Gimblet et al., 2015). Η κυτοκίνη IFN- $\gamma$  είναι ένα άλλο σημαντικό μόριο του ανοσοποιητικού συστήματος που παράγεται από εξαρτώμενα από το παράσιτο λεμφοκύτταρα Th1 CD4+ και σχετίζεται με τον ενδοκυτταρικό έλεγχο των παρασίτων κατά τη μόλυνση. Από την άλλη πλευρά, τα κύτταρα Th2 CD4+ ευθύνονται για την εξέλιξη της νόσου (Güran, 2018).

Οι αμαστιγωτές εντός των μακροφάγων εκτίθενται σε οξειδωτικές και νιτρικές πιέσεις, ως αποτέλεσμα της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS)<sup>11</sup> και δραστικών μορφών αζώτου από τα μακροφάγα. Επιπλέον, οι μεταβολικές διεργασίες μέσα στο παράσιτο, όπως η μιτοχονδριακή αναπνοή, οδηγούν επίσης σε οξειδωτικό στρες. Έτσι, η μερική ή πλήρης διαγραφή οποιουδήποτε από τους οξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς της *Leishmania* οδηγεί σε απώλεια μολυσματικότητας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η τρυπανοθειόνη, που αποτελείται από δύο μόρια γλουταθειόνης που συνδέονται με την πολυαμίνη σπερμιδίνη. Η τρυπανοθειόνη συνδέεται με πολλές διεργασίες που εκτελούνται από τη γλουταθειόνη σε άλλους οργανισμούς, όπως ο μεταβολισμός των υπεροξειδίων, αν και τα ένζυμα που εμπλέκονται στη σύνθεση και την ανακύκλωση της οξειδωμένης τρυπανοθειόνης είναι απαραίτητα. Έτσι, αυτό το ένζυμο είναι ο κύριος στόχος της γραμμής αντιμετώπισης σε αντιλεϊσμάνιακά φάρμακα, όπως το τρισθενές και το πεντασθενές αντιμόνιο. Τέλος, αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι οι οξειδωτικοί αμυντικοί

---

<sup>11</sup> Reactive oxygen species

μηχανισμοί της *Leishmania* είναι πολύ σημαντικοί στη λοιμογόνο δράση και την παθογένεια του παρασίτου (Abass & Lazar, 2020).

## 1.5 Λεισμανίαση

Η λεισμανίαση αποτελείται από ένα σύμπλεγμα ασθενειών με τις κλινικές εκδηλώσεις της να κυμαίνονται από δερματικά έλκη έως συστηματική πολυοργανική νόσο. Συγκεκριμένοι οργανισμοί συνδέονται συχνά με μια τυπική κλινική εικόνα, αν και αυτή μπορεί να είναι μεταβλητή (Aronson et al., 2016).

Οι λεισμανιάσεις αποτελούν μια από τις πλέον παραμελημένες τροπικές ασθένειες (NTD)<sup>12</sup> και απαντώνται σε όλες τις ηπείρους εκτός από την Ωκεανία. Αντιπροσωπεύοντας τις συνηθέστερες μολυσματικές ασθένειες, οι NTDs περιλαμβάνουν 20 παρασιτικές, βακτηριακές, ιογενείς, πρωτοζωικές και ελμινθικές λοιμώξεις. Έχουν χαρακτηριστεί ως «ασθένειες των φτωχών», λόγω του αυξημένου τους επιπολασμού σε φτωχούς πληθυσμούς, ανεξάρτητα από την εισοδηματική κατάσταση μιας χώρας. Μολύνουν πάνω από ένα δισεκατομμύριο ανθρώπους σε περισσότερες από 140 χώρες, με περίπου το 90% της παγκόσμιας επιβάρυνσης να εντοπίζεται στην Αφρική. Αν και οι παραμελημένες τροπικές ασθένειες δεν συμβάλλουν σημαντικά στους παγκόσμιους θανάτους, προκαλούν αναπηρία και παραμένουν οι συνηθέστερες λοιμώξεις μεταξύ των φτωχών παγκοσμίως, εμποδίζοντάς τους να ξεφύγουν από τη φτώχεια και επηρεάζοντας τα μέσα διαβίωσης τους, όπως η γεωργία και η κτηνοτροφία και επηρεάζοντας τα γνωστικά, αναπτυξιακά και εκπαιδευτικά αποτελέσματά τους (Wamai et al., 2020).

## 1.6 Κλινικές Εκδηλώσεις

### 1.6.1 Δερματική Λεισμανίαση

Η πιο κοινή μορφή λεισμανίασης είναι η CL με 0,7–1,3 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις να καταγράφονται παγκοσμίως σε ετήσια βάση (Steverding, 2017). Η CL εμφανίζεται με τρεις διαφορετικές μορφές, την εντοπισμένη δερματώδη λεισμανίαση (LCL)<sup>13</sup>, τη διάχυτη δερματική λεισμανίαση (DCL) και τη βλεννογονοδερματική λεισμανίαση

---

<sup>12</sup> Neglected Tropical Diseases

<sup>13</sup> Localised Cutaneous Leishmaniasis

(MCL). Η LCL χαρακτηρίζεται από δερματικές αλλοιώσεις και έλκη σε εκτεθειμένα μέρη του σώματος, αφήνοντας μόνιμες ουλές. Η DCL είναι λιγότερο συνηθισμένη και διακρίνεται από την LCL από την ανάπτυξη πολλαπλών, αργά εξελισσόμενων οζιδίων χωρίς εξέλκωση που εκτείνονται σε ολόκληρο το σώμα (Afghan et al., 2011). Στο αντίθετο άκρο του φάσματος, η διάχυτη δερματική λειψμανίαση (DCL) προκαλείται από πολυπαρασιτική νόσο με κυριαρχία των παρασιτικών μακροφάγων και χωρίς κοκκιωματώδη φλεγμονή. Αυτό το φάσμα της κλινικής εικόνας και της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή είναι παρόμοιο με τις κλινικές εκδηλώσεις που παρατηρούνται στο φάσμα της λέπρας (Aronson et al., 2016; Steverding, 2017). Οι βλάβες μπορούν να επουλωθούν αυθόρμητα σε λίγους μήνες, ή σε ορισμένες ακραίες περιπτώσεις, μπορεί να χρειαστούν λίγα χρόνια, προκειμένου να επιλυθούν. Αν και η CL είναι αυτοπεριοριζόμενη και μη απειλητική για τη ζωή, η συσσώρευση της CL συχνά οδηγεί σε παραμορφωμένους σχηματισμούς στο δέρμα (Mohammadi et al., 2017). Μετά την επούλωση της αρχικής δερματικής βλάβης, η ασθένεια εξαπλώνεται στους βλεννογόνους της μύτης, του στόματος και του λαιμού. Στη συνέχεια, τα έλκη του βλεννογόνου προκαλούν καταστροφή του ρινικού διαφράγματος, των χειλιών και της υπερώας που οδηγεί σε εκτεταμένη παραμόρφωση του προσώπου και το παράσιτο μπορεί να εισβάλει στον λάρυγγα και την τραχεία, οδηγώντας σε απώλεια φωνής (Steverding, 2017; Abass & Lazar, 2020).

### **1.6.2 Βλεννογονοδερματική Λειψμανίαση**

Η MCL περιορίζεται στη Λατινική Αμερική. Το παράσιτο που εξαπλώνεται γύρω από το σημείο του αρχικού δαγκώματος χρησιμοποιώντας τη λεμφική οδό και μολύνει τον βλεννογόνο της μύτης ή του στόματος οδηγώντας σε ML (Mansueto et al., 2014). Το ανοσοποιητικό σύστημα που αντιδρά στο παράσιτο στην άκρη της μύτης επηρεάζει τα τοιχώματα των αεραγωγών προκαλώντας απόφραξη του αυλού που σχετίζεται με νέκρωση του χόνδρου στη μύτη. Σε αντίθεση με τη CL, η ML δεν είναι μια ασθένεια που αυτοπεριορίζεται του και μπορεί να προκαλέσει μόνιμα δερματικά προβλήματα. Η καταστροφή της άκρης της μύτης είναι μια σοβαρή κατάσταση που μπορεί να επηρεάσει τους ασθενείς στην κοινωνική τους ζωή, ενώ τα αναπνευστικά προβλήματα είναι συχνό αποτέλεσμα της ML σε ασθενείς λόγω των αποφραγμένων αεραγωγών (Mans et al., 2017).

### 1.6.3 Σπλαχνική Λεισμανίαση

Στη σπλαχνική λεισμανίαση, το παράσιτο προσβάλλει τα εσωτερικά όργανα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος και η μόλυνση εξελίσσεται χωρίς συμπτώματα σε σοβαρή, εξελισσόμενη σε αυτό που ονομάζεται Καλααζάρ. Μετά από τσίμπημα της φλεβοτόμου, τα συμπτώματα αρχίζουν να εμφανίζονται από 10 ημέρες έως ένα έτος, αλλά συχνότερα εμφανίζονται από 2-4 μήνες (Abass & Lazar, 2020). Η VL είναι η πιο σοβαρή μορφή λεισμανίασης με περίπου 0,2-0,4 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις να εμφανίζονται παγκοσμίως κάθε χρόνο. Είναι η θανατηφόρα μορφή λεισμανίασης με ποσοστό θνησιμότητας 75–95% εάν αφεθεί χωρίς θεραπεία (Gürgan, 2018). Τα μακροφάγα που επηρεάζονται από το παράσιτο μεταδίδουν τη μόλυνση σε όλο το σώμα και οι ασθενείς αναπτύσσουν πανκυτταροπενία και ανοσοκαταστολή (Organ & Akbary, 2016). Τα συμπτώματα της VL περιελάμβαναν ακανόνιστο πυρετό, απώλεια βάρους, ηπατομεγαλία, σπληνομεγαλία (μερικές φορές ηπατοσπληνομεγαλία), αναιμία και μειωμένη αποτελεσματικότητα του μυελού των οστών, συνοδευόμενη από δευτερογενή μόλυνση με βακτήρια λόγω ασθενούς ανοσίας του σώματος, μειωμένη παραγωγή λευκών αιμοσφαιρίων και αιμορραγία από τους βλεννογόνους λόγω της χαμηλής παραγωγής αιμοπεταλίων και τελικώς θάνατο (Steverding, 2017; Abass & Lazar, 2020).

Συνθήκες καταστολής του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως λοίμωξη από HIV ή ανοσοκατασταλτικές θεραπείες σε μεταμοσχευμένους ασθενείς και σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα, επηρεάζουν την ικανότητα της ανοσολογικής απόκρισης να επιλύει τη μόλυνση και επιτρέπουν την επανενεργοποίηση της νόσου από τη λανθάνουσα κατάσταση (Antinori et al., 2012). Η επανενεργοποίηση της χρόνιας λοίμωξης μπορεί να επέλθει σε μεγάλο διάστημα μετά την αρχική επαφή με το παράσιτο. Η επιδημία του HIV έχει τροποποιήσει την επιδημιολογία και τα κλινικά χαρακτηριστικά της VL. Και τα δύο παθογόνα, ο HIV και η *Leishmania*, μολύνουν το ίδιο κύτταρο ξενιστή, το μακροφάγο, και δημιουργούν έναν φαύλο κύκλο όπου το παράσιτο *Leishmania* προκαλεί μια πιο ισχυρή παραγωγή HIV-1 και ο ιός μεσολαβεί σε μεγαλύτερη παρασιτική αναπαραγωγή. Επιπλέον, οι ασθενείς με HIV είναι πιο πιθανό να αναπτύξουν VL λόγω της εξάντλησης τόσο της κυτταρικής, όσο και της χυμικής απόκρισης στη *Leishmania*. Η συμπτωματική νόσος αναπτύσσεται συχνότερα

από την επανενεργοποίηση μιας λανθάνουσας λοίμωξης, αλλά μπορεί επίσης να εμφανιστεί μετά από πρωτογενή μόλυνση. Η κλινική παρουσίαση της VL σε ασθενείς με HIV λοίμωξη είναι παρόμοια με αυτή που παρατηρείται σε άτομα που δεν έχουν μολυνθεί με HIV. Η κύρια διαφορά είναι το χαμηλότερο ποσοστό ανταπόκρισης στη θεραπεία και το επακόλουθο υψηλό ποσοστό υποτροπής της νόσου, ειδικά σε εκείνους που δεν λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία υψηλής δραστηριότητας (HAART)<sup>14</sup> (Saporito et al., 2013; Cloots, 2021).

Μόλις εγκατασταθεί η HAART, οι υποτροπές μειώνονται, αλλά δεν προλαμβάνονται πλήρως. Στην πραγματικότητα, χαμηλού επιπέδου συνεχής επιμονή του DNA της *Leishmania* στο περιφερικό αίμα έχει εντοπιστεί σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία, παρά την επαρκή κλινική ανταπόκριση στη συγκεκριμένη θεραπεία, που οδηγεί σε μια κλινική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από εναλλασσόμενες ασυμπτωματικές και συμπτωματικές περιόδους. Ωστόσο, τα χαμηλά, αλλά ανιχνεύσιμα επίπεδα DNA του παρασίτου στο περιφερικό αίμα δεν προμηνύουν πάντα μια κλινική υποτροπή. Τις τελευταίες δεκαετίες, η λεισμανίαση έχει αναφερθεί συχνότερα μεταξύ των ληπτών μοσχευμάτων, κυρίως στην περιοχή της Μεσογείου. Τα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται σε αυτούς τους ασθενείς εμποδίζουν την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων, μεταβάλλοντας έτσι τους αμυντικούς μηχανισμούς έναντι των ενδοκυτταρικών μικροοργανισμών (Saporito et al., 2013; Lindoso et al., 2018).

#### **1.6.4 Ασυμπτωματική νόσος**

Η ασυμπτωματική λοίμωξη από *Leishmania* μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάδοση του παρασίτου σε ενδημικές περιοχές. Προς το παρόν δεν υπάρχει συναίνεση για τον ορισμό της ασυμπτωματικής λοίμωξης, ούτε υπάρχει ασφαλής και προσιτή δοκιμασία για την αναγνώρισή της (Ibarra-Meneses et al., 2022). Η ασυμπτωματική λοίμωξη αντιπροσωπεύει περίπου το 20-60% των μολύνσεων σε ενδημικές περιοχές (Singh et al., 2014). Γενικά περιγράφεται από θετική ορολογική εξέταση, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)<sup>15</sup> ή δερματική δοκιμασία

---

<sup>14</sup> Highly Active Antiretroviral Treatment

<sup>15</sup> Polymerase Chain Reaction

λεϊσμανίασης (LST)<sup>16</sup> σε άτομα που είναι προφανώς υγιή (Saha et al., 2017; Owen et al., 2021).

Ο ασυμπτωματικός πληθυσμός είναι ζωτικής σημασίας για διάφορους λόγους. Πρώτον, μπορεί κάλλιστα να χρησιμεύσει ως δεξαμενή παρασίτων, αποτελώντας κίνδυνο για τη δημόσια υγεία (Ibarra-Meneses et al., 2022). Η ανοσοκαταστολή είναι ένας από τους παράγοντες κινδύνου που μπορεί να αυξήσει την εξέλιξη σε κλινική εκδήλωση σε ασυμπτωματικά άτομα. Η μόλυνση από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV), τα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα και η μεταμόσχευση οργάνων είναι οι πιο ευρέως μελετημένοι παράγοντες κινδύνου για συνλοίμωξη με Λεϊσμανίαση. Η μόλυνση από τον ιό HIV αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης VL κατά 100–2320 φορές, ενώ ο κίνδυνος αυξάνεται κατά 20–100 φορές μετά τη θεραπεία με ανοσοκατασταλτικά φάρμακα και μετά από μεταμόσχευση οργάνων. Ως εκ τούτου, θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή σε αυτόν τον ασυμπτωματικό ανοσοκατασταλαμένο πληθυσμό σε ενδημικές περιοχές (Comai et al., 2021).

Το περαιτέρω ενδιαφέρον για τον ασυμπτωματικό πληθυσμό προέρχεται από το μυστήριο που περιβάλλει την εξέλιξη της νόσου της λεϊσμανίασης. Είναι γνωστό, ότι ένα μεγάλο ποσοστό όσων έχουν μολυνθεί με *Leishmania spp.* δεν παρουσιάζουν ποτέ κλινικές εκδηλώσεις της νόσου (Singh et al., 2014). Έχει προταθεί ότι η εξέλιξη προς τη συμπτωματική VL πιθανότατα προκύπτει από έναν συνδυασμό διαφόρων παραγόντων ξενιστή, παρασίτου και κοινωνικοδημογραφικών παραγόντων (Chakravarty et al., 2019). Μια σαφέστερη κατανόηση των πολλαπλών παραγόντων που οδηγούν στην ανάπτυξη κλινικής λεϊσμανίασης θα μπορούσε να ρίξει φως στη θεραπεία ασυμπτωματικών ασθενών για τη βελτίωση της έκβασης της νόσου, καθώς και τη μείωση της μετάδοσης των παρασίτων από αυτή τη δυνητικά σημαντική δεξαμενή (Ibarra-Meneses et al., 2022).

## 1.7 Επιδημιολογικά Στοιχεία

Η ασθένεια είναι ευρέως διαδεδομένη στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές και εντοπίζεται σε 98 χώρες στην Ευρώπη, την Αφρική, την Ασία και την Αμερική. Ωστόσο,

---

<sup>16</sup> Leishmanin Skin Test

πάνω από το 90% των νέων κρουσμάτων εμφανίζονται σε μόλις 13 χώρες (Αφγανιστάν, Αλγερία, Μπαγκλαντές, Βολιβία, Βραζιλία, Κολομβία, Αιθιοπία, Ινδία, Ιράν, Περού, Νότιο Σουδάν, Σουδάν και Συρία). Υπολογίζεται ότι επηρεάζει περίπου 12 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως και 1,5-2 εκατομμύρια νέα περιστατικά αναφέρονται κάθε χρόνο, αλλά μικρός μόνο αριθμός περιστατικών θα αναπτύξει τη νόσο και 20.000-30.000 τελικά θα πεθάνουν (Steverding, 2017; Inceboz, 2019).

Η λεισμανίαση κατατάσσεται στη δεύτερη θέση σε θνησιμότητα αμέσως μετά την ελονοσία και στην τέταρτη θέση ως προς τη νοσηρότητα μεταξύ άλλων μεταδοτικών ασθενειών (Handler et al., 2015). Το ξέσπασμα του HIV στη δεκαετία του 1990 που είχε ως αποτέλεσμα τη συνμόλυνση HIV/VL και τη γενική υπερθέρμανση του πλανήτη αυξάνοντας τον πιθανό βιότοπο για τη φλεβοτόμο οδήγησε στον διπλασιασμό του αριθμού των κρουσμάτων από το 1987 έως το 2014 παρά την ανάπτυξη προηγμένων ιατρικών τεχνολογιών (Pace, 2014). Υπολογίζεται ότι κάθε χρόνο περίπου 400.000 άτομα διαγιγνώσκονται με VL, με ποσοστό θνησιμότητας 10% που φτάνει έως και 20% σε ορισμένες περιοχές (Gürgan, 2018). Μεταξύ των άλλων κοινών μορφών της νόσου, η CL είναι η συνηθέστερη. Από την άλλη πλευρά, η VL είναι η πιο θανατηφόρα, όπου ο θάνατος συμβαίνει συνήθως 2 χρόνια μετά την πρώτη μετάδοση (Inceboz, 2019). Η Ανατολική Αφρική, η Βραζιλία και η Ινδική υποήπειρος είναι κόκκινη περιοχή για κρούσματα VL, ενώ τα κρούσματα CL κυμαίνονται σε υψηλά επίπεδα στη Μέση Ανατολή, την περιοχή της Μεσογείου, την Κεντρική Ασία και τις χώρες της Λατινικής Αμερικής (Di Muccio et al., 2015). Σε ευρωπαϊκές χώρες, όπου η λεισμανίαση δεν είναι ενδημική, τα άτομα που ταξιδεύουν σε ενδημικές περιοχές για διάφορους λόγους, όπως στρατιωτικές υποχρεώσεις, τουριστικές εργασίες και διακοπές είναι η κύρια αιτία εμφάνισης λεισμανίασης. Η περιοχή της Μεσογείου, η Δυτική Ασία και η Αμερική συγκεντρώνουν το 90% του 1 εκατομμυρίου κρουσμάτων CL, ενώ η ML καταγράφει 35.000 περιπτώσεις σε αυτές τις περιοχές (Gürgan, 2018; Inceboz, 2019). Μεταξύ των ειδών, η *L. major* παρουσιάζει τη μεγαλύτερη γεωγραφική κατανομή στην περιοχή της Μέσης Ανατολής σε σύγκριση με τις *Leishmania tropica* και *Leishmania infantum*. Το *L. infantum* προκάλεσε ζωονοτικές νόσους και το *L. tropica* ανθρωπονοτικές μεταδόσεις (Mohammadi et al., 2017).



Οι λεισμανιάσεις συνδέονται στενά με γεωγραφικούς και κοινωνικοοικονομικούς παράγοντες, που επηρεάζουν τους φτωχότερους πληθυσμούς, με 1 δισεκατομμύριο ανθρώπους να κινδυνεύουν να μολυνθούν, κυρίως σε ενδημικές αγροτικές περιοχές. Η ανακάλυψη φαρμάκων για τις παραμελημένες τροπικές ασθένειες είναι περιορισμένη, καθώς τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για ασθένειες στις φτωχότερες περιοχές του κόσμου θα αποφέρουν ελάχιστα ή καθόλου κέρδη στις φαρμακευτικές εταιρείες (Efstathiou & Smirlis, 2021). Ο υψηλότερος επιπολασμός εντοπίζεται σε φτωχές χώρες όπως η Ινδία, η Βραζιλία, η Αιθιοπία και το Αφγανιστάν. Συγκεκριμένα, έχει σημειωθεί αύξηση στις αναφορές περιπτώσεων CL στη Συρία, την Αλγερία στη Μεσόγειο και την Ινδία (Oryan & Akbari, 2016). Η κακή στέγαση, οι ανεπαρκείς συνθήκες υγιεινής, η ελλειμματική διαχείριση των απορριμμάτων, η φτώχεια, ο υποσιτισμός και η αλλαγή στις κλιματικές συνθήκες όπως η θερμοκρασία, οι βροχοπτώσεις και η υγρασία είναι κοινά χαρακτηριστικά αυτών των χωρών. Τα παιδιά που διαβιούν σε αυτές τις χώρες θεωρούνται η κύρια αιτία μετάδοσης παρασίτων, καθώς είναι η πιο ευάλωτη πληθυσμιακή ομάδα στο τσίμπημα της φλεβοτόμου (Palma et al., 2021).

Οι επιδημιολογικές ανησυχίες για τη λεισμανίαση έχουν αυξηθεί πολύ τα τελευταία 30 χρόνια. Η συνλοίμωξη HIV/*Leishmania* και οι φλεβοτόμοι κάνουν την εμφάνιση τους σε περιοχές, που δεν υπήρχαν, όπως οι Ηνωμένες Πολιτείες και ο Καναδάς και ο μεγάλος κίνδυνος να αποκτήσει η *Leishmania* ανθεκτικότητα στα φάρμακα με την πάροδο του χρόνου, την καθιστούν παράγοντα υψηλού κινδύνου παγκοσμίως. Μια άλλη σημαντική ανησυχία για τη λεισμανίαση είναι η αυξημένη αύξηση αντίστασης από πλευράς παρασίτου στις τρέχουσες μεθόδους θεραπείας, γεγονός που την καθιστά ακόμη πιο επικίνδυνη (Ribeiro et al., 2018).

### **1.8 Παράγοντες κινδύνου για εξάπλωση λεισμανίασης**

Η αύξηση της συχνότητας και του επιπολασμού της λεισμανίασης αποδίδεται κυρίως σε αρκετούς παράγοντες κινδύνου που είναι σαφώς ανθρωπογενείς. Γενικά, οι περιβαλλοντικές συνθήκες, η κοινωνικοοικονομική κατάσταση, οι δημογραφικές και ανθρώπινες συμπεριφορές αποτελούν μεγάλους κινδύνους εξάπλωσης της λεισμανίασης στον άνθρωπο. Επίσης, η αύξηση της παγκόσμιας συχνότητας της

λεισμανίασης αποδίδεται κυρίως στην αύξηση αρκετών παραγόντων κινδύνου όπως η μεγάλη μετανάστευση, η αποψίλωση των δασών, η αστικοποίηση και η ανοσοκαταστολή. Το περιβάλλον και οι μετακινήσεις πληθυσμών, πιθανότατα οδηγούν σε αλλαγές στον αριθμό, το εύρος και την πυκνότητα των φορέων και των δεξαμενών και, κατά συνέπεια, μπορεί να αυξήσουν την έκθεση του ανθρώπου σε μολυσμένες φλεβοτόμους (Oryan & Akbari, 2016; Eid et al., 2018).

Η λεισμανίαση, ειδικά η σπλαχνική της μορφή, τείνει να επηρεάζει τους φτωχότερους ανθρώπους και τις περιθωριοποιημένες κοινωνίες, ιδιαίτερα τους ανθρώπους που βρίσκονται κοντά σε υδάτινους πόρους, ζουν σε υγρά σπίτια και βρίσκονται κοντά σε συσσωρευμένα σκουπίδια, λύματα και εκμεταλλεύσεις ζώων (Hasker et al., 2012· Oryan & Akbari, 2016). Ένας ακόμη συχνός παράγοντας μετάδοσης, είναι οι ανθρώπινοι οικισμοί κοντά σε ένα πρωτογενές δάσος. Όταν τα οικολογικά περιβάλλοντα διαταράσσονται, οι άνθρωποι είναι πιο πιθανό να εκτεθούν σε δεξαμενές και φορείς που αυξάνουν τον κίνδυνο για λεισμανίαση. Άλλοι κοινοί παράγοντες περιλαμβάνουν το φύλο, την ηλικία και τις υπαίθριες δραστηριότητες. Υπάρχει ένα μοτίβο σε ορισμένες κοινωνίες, όπου οι άνδρες σε ηλικία εργασίας είναι συνήθως πιο εκτεθειμένοι λόγω των δραστηριοτήτων τους στη γεωργία και τη δασοκομία. Μια άλλη ομάδα παραγόντων σχετίζεται με τις συνθήκες στέγασης. Όταν οι τοίχοι, οι στέγες και τα δάπεδα δεν είναι κατασκευασμένα από ανθεκτικά υλικά, μπορούν να δημιουργηθούν ρωγμές, που αποτελούν καταφύγιο ή πύλη για φορείς προς τα νοικοκυριά. Επιπλέον, η χρήση του ξύλου ως καυσίμου μαγειρέματος είναι ένας παράγοντας κινδύνου, εφόσον υποτίθεται ότι αυξάνει την έκθεση όταν χρησιμοποιείται σε ανοιχτό περιβάλλον. Μια άλλη άποψη ωστόσο, την αντιλαμβάνεται ως προστατευτική, υποστηρίζοντας ότι πιθανώς ο καπνός απομακρύνει τους φορείς (Eid et al., 2018).

Ένας άλλος παράγοντας μετάδοσης, είναι η χρήση ηλεκτρικής ενέργειας σε εσωτερικούς χώρους. Έχει προταθεί ότι είναι προστατευτική, με την έννοια ότι το φως έλκει τους φορείς και τους απομακρύνει από τους ανθρώπους. Ένας άλλος αντιφατικός παράγοντας είναι η παρουσία οικόσιτων ζώων όπως σκύλοι, χοίροι ή κοτόπουλα. Ορισμένες μελέτες έχουν βρει έναν προστατευτικό ρόλο στην παρουσία τους, υποστηρίζοντας ότι τα ζώα αποτελούν την προτιμώμενη πηγή αίματος για τις φλεβοτόμους (Ranasinghe et al., 2013). Ωστόσο, άλλες μελέτες έχουν προτείνει, ότι

τα οικόσιτα ζώα θα μπορούσαν να προσελκύσουν τους φορείς πιο κοντά στον άνθρωπο, καθιστώντας τα έτσι έναν σημαντικό κίνδυνο (Votýrka et al., 2012; Araujo et al., 2016).

Εκτός από τις οικονομικές, κοινωνικές και πολιτιστικές συνθήκες, ο επιπολασμός της λεισμανίασης επηρεάζεται και από οικολογικούς παράγοντες. Η περιοχή βλάστησης και οι κλιματικοί παράγοντες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία πολλαπλασιασμού και ανάπτυξης των φλεβοτόμων και στην επακόλουθη εστία λεισμανίασης (Golpayegani et al., 2018). Περαιτέρω, έχει αναφερθεί ότι η αποψίλωση των δασών έχει οδηγήσει σε αύξηση της λεισμανίασης (Dawit & Shishay, 2014).

Η λεισμανίαση εντοπίζεται ολοένα και περισσότερο στους ταξιδιώτες που επιστρέφουν από τροπικές και υποτροπικές περιοχές και το ευρύ κλινικό φάσμα και η περιορισμένη επιστήμη της νόσου μεταξύ των κλινικών γιατρών και των ταξιδιωτών συχνά οδηγούν σε λανθασμένη αρχική διάγνωση (Güran, 2018). Υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα για τη συχνότητα της λεισμανίασης στους ταξιδιώτες στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες, επειδή ο αριθμός των εκτεθειμένων ταξιδιωτών είναι συχνά άγνωστος, η ασθένεια συνήθως διαγιγνώσκεται λάθος και αυτοθεραπεύεται. Η εμφάνιση εισαγόμενων κρουσμάτων έχει αυξηθεί, επειδή εμφανίζονται περισσότερα κρούσματα λόγω του αυξανόμενου αριθμού ταξιδιωτών σε ενδημικές χώρες (Oryan & Akbari, 2016).

## **1.9 Διάγνωση Λεισμανίασης**

Στις αναπτυσσόμενες χώρες, όπου η ασθένεια δεν είναι διαδεδομένη, η ύπαρξη εργαστηριακών εγκαταστάσεων επιτρέπει την επαρκή και αποτελεσματική παρακολούθηση της νόσου. Ωστόσο, σε αναπτυσσόμενες χώρες με μεγάλο αριθμό ασθενών σε αγροτικές περιοχές, είναι απαραίτητα απλά διαγνωστικά εργαλεία για χρήση στο πεδίο. Η εργαστηριακή διάγνωση της VL περιλαμβάνει μικροσκοπική παρατήρηση και καλλιέργεια από δείγματα, ανίχνευση αντιγόνου, ορολογικές εξετάσεις και ανίχνευση του DNA του παρασίτου (Aronson et al., 2016; Ibarra-Meneses et al., 2020). Τα πρώιμα συμπτώματα που προκαλούν υποψίες για λεισμανίαση μπορεί να επικαλύπτονται με εκείνα άλλων εμπύρετων ασθενειών,

όπως η ελονοσία και ο δάγγειος πυρετός, επομένως είναι απαραίτητη η εξειδικευμένη διάγνωση (Kumar et al., 2020).

Η διάγνωση οριστικοποιείται μέσω του άμεσου εντοπισμού των παρασίτων σε κλινικά δείγματα, καθώς και μέσω μοριακών μεθόδων. Τα δείγματα που χρησιμοποιούνται συνήθως λαμβάνονται μέσω αναρρόφησης από το σπλήνα ή το μυελό των οστών. Η παρουσία των μαστιγωτών μορφών μπορεί επίσης να προσδιοριστεί σε άλλα δείγματα όπως βιοψίες ήπατος, λεμφαδένων και επιχρίσματα περιφερικού αίματος. Η ευαισθησία δειγμάτων μυελού των οστών που έχουν υποστεί χρώση κατά Giemsa είναι περίπου 60%-85%. Σε περίπτωση αναρρόφησης από το σπλήνα, η ευαισθησία είναι υψηλότερη (93%), αλλά η δειγματοληψία σχετίζεται με κίνδυνο θανατηφόρου αιμορραγίας σε περίπτωση που πραγματοποιηθεί από άπειρο επαγγελματία υγείας. Προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία, μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες χρωστικές. Η ευαισθησία στα επιχρίσματα περιφερικού αίματος είναι χαμηλή, ιδιαίτερα σε άτομα με χαμηλή παρασιταίμια. Επιπλέον, τα αποτελέσματα εξαρτώνται από την τεχνική εμπειρία και την ποιότητα των επεξεργασμένων δειγμάτων. Η καλλιέργεια του παρασίτου μπορεί να βελτιώσει τη διαγνωστική ευαισθησία, αλλά είναι κοπιώδης, χρονοβόρα και δαπανηρή διαδικασία και επομένως σπανίως χρησιμοποιείται για κλινική διάγνωση. Υπάρχουν νέες μέθοδοι καλλιέργειας που βελτιώνουν την ευαισθησία, όπως η μέθοδος μικροκαλλιέργειας (MCM). Οι πρόσφατες τροποποιήσεις αυτής της μεθόδου περιλαμβάνουν τη χρήση της στιβάδας των εμπύρηνων κυττάρων (buffy coat) και του περιφερικού αίματος των μονοπύρηνων κυττάρων (Thakur, Joshi & Kaur, 2020; Ejazi et al., 2021).

Προκειμένου να ξεπεραστούν οι περιορισμοί των παρασιτολογικών μεθόδων διάγνωσης, έχουν αναπτυχθεί ανοσολογικές μέθοδοι (Singh & Sundar 2015). Αυτές οι μέθοδοι βασίζονται στην παρουσία συγκεκριμένων χυμικών αποκρίσεων (Elmahallawy et al., 2014). Το σήμα κατατεθέν τόσο της MCL, όσο και της CL είναι η πολύ χαμηλή χυμική ανοσοαπόκριση. Έτσι, οι ανοσολογικές δοκιμές δεν χρησιμοποιούνται συχνά σε περιοχές όπου επικρατεί η CL, καθώς τα κυκλοφορούντα αντισώματα είναι πολύ χαμηλά και σε περιοχές με παράσιτα διασταυρούμενης αντίδρασης όπως το *Trypanosoma cruzi*, η ειδικότητα μπορεί να ποικίλει. Ωστόσο, στη VL, παρατηρείται υπερανοσοσφαιριναιμία. Χρησιμοποιώντας αυτή την

αλληλεπίδραση μεταξύ ξενιστών και παρασίτων, έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι ανίχνευσης αντισωμάτων για τη διάγνωση της λείσμανίασης. Μερικές από αυτές τις διαγνωστικές μεθόδους είναι η ενζυμική ανοσοπροσοφθητική δοκιμασία (ELISA) ή ενζυμικός ανοσοπροσδιορισμός, η κηλίδωση western, ο έμμεσος ανοσοφθορισμός και η δοκιμασία άμεσης οροσυγκόλλησης (DAT). Η ευαισθησία αυτών των ανοσολογικών εξετάσεων εξαρτάται κυρίως από τον προσδιορισμό και τη μεθοδολογία τους, ενώ η ειδικότητα τους εξαρτάται από το αντιγόνο και όχι από την ορολογική μορφή που χρησιμοποιείται (Elmahallawy et al. 2014; Thakur et al., 2020).

Η δοκιμασία ELISA είναι μια από τις πιο ευαίσθητες οροδιαγνωστικές μεθόδους για τη VL. Ωστόσο, η ευαισθησία της βασίζεται στο αντιγόνο που χρησιμοποιείται (Singh & Sundar, 2015). Αν και η ELISA συνιστά μια τεχνική με αυξημένη ειδικότητα και ευαισθησία, η ανάγκη ύπαρξης εξειδικευμένου προσωπικού, εξελιγμένων τεχνολογιών και η απαίτηση ηλεκτρικής ενέργειας περιορίζει τη χρήση της μόνο σε προηγμένα εργαστήρια σε ανεπτυγμένες χώρες (Elmahallawy et al., 2014).

Στη δοκιμή ανοσοφθορισμού, ένας δείκτης φθορισμού συνδέεται με ένα αντίσωμα, το οποίο καταλήγει σε ένα μόριο αναφοράς που είναι ταχύ, εύκολο στη μέτρηση και δεσμεύεται σε ένα μόριο-στόχο με υψηλή ειδικότητα. Αυτή η δοκιμή μπορεί να είναι και άμεση, όπου το επισημασμένο αντίσωμα δεσμεύει το αντιγόνο και έμμεση στην οποία το δευτερεύον πολυκλωνικό αντίσωμα δεσμεύει το παρασκευασμένο αντιγόνο. Αυτή η δοκιμασία συγκαταλέγεται στις δοκιμασίες που εκτελούνται συχνά για την ανίχνευση των αντι-λείσμανιακών αντισωμάτων με τη χρήση των προμαστιγωτών μορφών. Ωστόσο, έχουν παρατηρηθεί διασταυρούμενες αντιδράσεις με τρυπανοσωμικούς ορούς. Για να ελαχιστοποιηθούν αυτές οι διασταυρούμενες αντιδράσεις, ως αντιγόνα χρησιμοποιούνται οι προμαστιγωτές μορφές (Rezvan, Nourian, & Hamoon Navard, 2017).

Η δοκιμασία άμεσης οροσυγκόλλησης (DAT), αποτελεί μια απλή, αξιόπιστη, οικονομικά αποδοτική και ημιποσοτική δοκιμή. Η DAT έχει εγκριθεί σε διάφορες χώρες, όπως η Ινδία, η Βραζιλία, το Νεπάλ, το Σουδάν, το Μπαγκλαντές, η Κένυα και η Αιθιοπία. Αυτή η δοκιμή εξαρτάται από τη συγκόλληση των προμαστιγωτών μορφών της Λείσμανίας που αντιδρούν με τα αντι-λείσμανιακά αντισώματα που οδηγούν σε συγκόλληση των προμαστιγωτών μορφών (Elmahallawy et al.,

2014;Thakur et al., 2020). Η δοκιμή είναι οικονομική και εύκολη στην εκτέλεση. Έτσι, μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο στο εργαστήριο, όσο και στο πεδίο. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της δοκιμής αυτής κυμαίνεται από 70,5–100% και 53–100%, αντίστοιχα (Bangert et al., 2018). Η δοκιμασία συγκόλλησης με λατέξ (LAT) αποτελεί μια εκ των πιο προσφάτων δοκιμασιών, που αναπτύχθηκαν για την ταχεία ανίχνευση του αντιλεισμανιακού αντισώματος κατά των αντιγόνων A2 που λαμβάνονται από τη μαστιγωτή μορφή και των ακατέργαστων αντιγόνων από τις προμαστιγωτές μορφές. Εν συγκρίσει με τη DAT, η ευαισθησία της ανήλθε σε 88,4% και η ειδικότητα ήταν 93,5% (Akhoundi et al., 2013).

Ωστόσο, οι ανωτέρω δοκιμασίες έχουν ορισμένους περιορισμούς, εφόσον μεταξύ άλλων είναι χρονοβόρες, μεταβλητές στην απόδοση και μη κατάλληλες για ένα μόνο δείγμα δοκιμής (Lénêque et al., 2020). Οι μοριακές δοκιμές παρέχουν ικανοποιητικά αποτελέσματα ως προς την ειδικότητά τους, αλλά γενικά πραγματοποιούνται σε ένα καλά εξοπλισμένο εργαστήριο, το οποίο διαθέτει πρόσβαση σε ακριβό εξοπλισμό (Burza, Croft & Boelaert, 2018). Επιπλέον, η λήψη των αποτελεσμάτων αυτών των εργαστηριακών δοκιμασιών μπορεί να απαιτήσει επιπλέον χρόνο λόγω της ανάγκης μεταφοράς δειγμάτων από κέντρα συλλογής περιορισμένων πόρων στα εργαστήρια δοκιμών (Ejazi et al., 2021).

Οι βιοαισθητήρες τύπου ταινίας ξηρών αντιδραστηρίων πλευρικής ροής (Lateral flow biosensors - LFB) είναι οι συσκευές που βασίζονται σε χάρτινες ανοσοχρωματογραφικές ταινίες μίας χρήσης, όπου τα ξηρά αντιδραστήρια ενεργοποιούνται με την τοποθέτηση υγρού δείγματος. Οι LFB είναι σημαντικοί για τη διάγνωση καθώς είναι ευαίσθητοι, ειδικοί, οικονομικοί, και προσιτοί, ενώ δεν απαιτούν εξοπλισμό. Οι δοκιμασίες που βασίζονται στην ανοσοχρωματογραφία είναι εύκολες στη χρήση και παρέχουν γρήγορα ποιοτικά αποτελέσματα. Οι ταινίες πλευρικής ροής για τα αντιγόνα rK39 είναι διαθέσιμες στο εμπόριο για την ανίχνευση της σπλαχνικής λεισμανίασης, αλλά η απόδοσή τους εξακολουθεί να μην είναι η βέλτιστη (Thakur et al., 2020).

Η ενδοδερμική δοκιμασία (Leishmanin skin test-LST) ή η λεγόμενη αντίδραση Montenegro προχωρούν στη μέτρηση της αντίδρασης καθυστερημένης υπερευαισθησίας (delayed-type hypersensitivity - DTH). Οι δερματικές αντιδράσεις υπερευαισθησίας καθυστερημένου τύπου αναγνωρίζονται ως θετικές, όταν  $LST > 5$

mm και αρνητικές, όταν  $LST < 5$  mm (Elmahallawy et al. 2014; Thakur et al., 2020). Ωστόσο, σε περιοχές, όπου ενδημεί η VL, η ευαισθησία αυτής της δοκιμασίας σε ασυμπτωματικές λοιμώξεις είναι παρόμοια ή και υψηλότερη από αυτή άλλων ορολογικών δοκιμασιών. Η LST δείχνει υψηλότερη ευαισθησία 86,4–100% και είναι απλή στη χρήση (Antonio et al., 2014), γεγονός που την καθιστά μια πολύτιμη μέθοδος για τον εντοπισμό της έκθεσης στα παράσιτα *Leishmania* και τη διάκριση των ασυμπτωματικών περιπτώσεων σε επιδημιολογικές έρευνες (Carstens-Kass et al., 2021).

### **1.10 Θεραπεία Λεισμανίασης**

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι θεραπείας ανάλογα με την αποτελεσματικότητα του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή και τον τύπο της Λεισμανίας που τον επηρεάζει, καθώς και τον τρόπο μετάδοσης του παρασίτου. Παράγοντες του ξενιστή, όπως η γενετική ή η ανοσολογική απόκριση ή παράγοντες που σχετίζονται με τη θεραπεία, όπως η δόση, η διάρκεια και η ολοκλήρωση της θεραπείας και τέλος παράγοντες που σχετίζονται με το παράσιτο, όπως η εγγενής ευαισθησία του είδους και η έλλειψη αντίστασης στη φαρμακευτική αγωγή είναι σημαντικοί καθοριστικοί παράγοντες στη θεραπεία της νόσου. Η μακρά περίοδος επώασης του παρασίτου *Leishmania* το καθιστά πρόκληση στις μεθόδους ανίχνευσης και έγκαιρης θεραπείας. Εάν είναι δυνατόν, θα πρέπει να εφαρμόζεται έγκαιρη θεραπεία, προκειμένου να αποτραπεί περαιτέρω η εξάπλωση του παρασίτου. Η έλλειψη αποτελεσματικών εμβολίων έρχεται περισσότερο να περιπλέξει τη θεραπεία της λεισμανίασης (Gürgan, 2018). Τα άλατα πεντασθενούς αντιμονίου (SbV), το στιβογλυκονικό νάτριο και N-μεθυλογλυκαμίνη, η λιποσωμική αμφοτερικίνη Β, η μιλτεφοσίνη και η παραμυκίνη είναι μερικά από τα ευρέως χρησιμοποιούμενα φάρμακα στη θεραπεία ρουτίνας (Anversa et al., 2018).

Τα άλατα πεντασθενούς αντιμονίου (SbV) είναι διαθέσιμα από το 1920 και με τη μορφή στιβογλυκονικού από το 1945. Αποτελούν τη θεραπεία μονοθεραπείας πρώτης γραμμής για τη VL και εξακολουθούν να βρίσκονται στη λεισμανίαση του σκύλου (CanL) (Efsthathiou & Smirlis, 2021). Μετά από εκτεταμένη χρήση για 70 χρόνια, ο μηχανισμός δράσης τους παραμένει άγνωστος, αν και έχει περιγραφεί μια

ποικιλία βιοχημικών επιδράσεων (π.χ. αναστολή της DNA τοποϊσομεράσης I) Frézard et al., 2014). Δύο κύριοι λόγοι έχουν περιορίσει τη χρήση των SbV και πιο συγκεκριμένα, οι παρενέργειες/τοξικότητα και η εμφάνιση ανθεκτικότητας και θεραπευτικών αποτυχιών (Ponte-Sucre et al., 2017). Η φαρμακευτική αγωγή με άλατα αντιμονίου έχει συσχετιστεί με τοπικό πόνο σε περίπτωση έγχυσης με ενδομυϊκή ένεση και σοβαρές παρενέργειες όπως η καρδιοτοξικότητα, η παγκρεατίτιδα, η ηπατοτοξικότητα και η νεφροτοξικότητα. Ωστόσο, ο μηχανισμός της τοξικότητας των ενώσεων SbV δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως και θα μπορούσε να συσχετιστεί με το υπολειμματικό SbIII των παρασκευασμάτων (Kato et al., 2014; Ollás-Molero et al., 2021).

Η αμφοτερικίνη Β (AmB) είναι ένα αντιβιοτικό πολυένιο που λαμβάνεται μέσω ζύμωσης του *Streptomyces nodosus* και αποτελεί θεραπεία αναφοράς για συστηματικές μυκητιάσεις (π.χ. *Candida*). Η αντιλεϊσμανική της δράση ανακαλύφθηκε τη δεκαετία του 1960. Ο μηχανισμός δράσης του αντιβιοτικού σχετίζεται κυρίως με τη διαφορική σύνδεση της εργοστερόλης στη μεμβράνη της *Leishmania*. Ο εν λόγω μηχανισμός δράσης και η απουσία εργοστερόλης σε κύτταρα θηλαστικών εξηγούν πιθανώς τη λειψμανοκτόνο δράση και την κλινική θεραπεία των μολυσμένων ατόμων, καθώς και τις σχεδόν αμελητέες αναφορές αντίστασης στη λειψμανία σε αυτό το μόριο (Ollás-Molero et al., 2021). Η AmB παρουσιάζει δύο βασικά μειονεκτήματα: την τοξικότητα της ελεύθερης AmB, της δεοξυχολικής ένωσης και την υψηλή τιμή (Güran, 2018; Efstathiou & Smirlis, 2021). Η τοξικότητα της AmB μπορεί να μειωθεί χρησιμοποιώντας υψηλές συγκεντρώσεις του μορίου, αν πιο επιτυχημένες είναι οι λιπιδικές μορφές όπως τα Amphocil®, Abelcet® και, ιδιαίτερα οι λιποσωμικές AmB και Ambisome® (Shirzadi, 2019). Η λιποσωμική μορφή της αμφοτερικίνης είναι πολύ πιο ασφαλής χωρίς να χάνει την αποτελεσματικότητά της έναντι των λειψμανιακών λοιμώξεων. Ωστόσο, η υψηλή τιμή της την καθιστά μη προσιτή για πολλούς ασθενείς σε πολλές χώρες του κόσμου. Η λιποσωμική AmB (Fungisome®) και άλλα συστήματα χορήγησης φαρμάκων χαμηλής τιμής (π.χ. νιοσώματα, μικροσφαίρες αλβουμίνης, χιτοζάνης, νανοδίσκοι) θα μπορούσαν να είναι βιώσιμες λύσεις για χώρες χαμηλού εισοδήματος (Faustino & Pinheiro, 2020).

Η μιλτεφοσίνη, ένα παράγωγο της αλκυλοφωσφοχολίνης, ανακαλύφθηκε και αναπτύχθηκε τη δεκαετία του 1980 ως αντινεοπλασματικό φάρμακο λόγω της



ικανότητάς του να προκαλεί επιλεκτική απόπτωση σε κύτταρα όγκου. Η αντιλεϊσμανιακή του δράση *in vivo* εντοπίστηκε τη δεκαετία του 1990 και έχει θεωρηθεί εναλλακτική της χημειοθεραπείας για τη λεισμανίαση, με κλινική αποτελεσματικότητα συγκρίσιμη με εκείνη της AmB (Ollás-Molero et al., 2021). Τα κύρια μειονεκτήματα αυτού του μορίου σχετίζεται με τη μεγάλη ημιζωή του ( $t_{1/2}$ ) στον οργανισμό (>120 ώρες) και τις υψηλές πιθανότητες τερατογένεσης (Anversa et al., 2018; Efstathiou & Smirlis, 2021). Αυτά αποκλείουν τη χρήση μιτεφοσίνης κατά τη διάρκεια των γόνιμων ετών των γυναικών (ή πρέπει να υποβληθούν σε αντισυλληπτική θεραπεία). Επιπλέον, η μεγάλη διάρκεια  $t_{1/2}$  και η δυνατότητα αυτοθεραπείας (μπορεί να χορηγηθεί από το στόμα χωρίς ιατρική επίβλεψη) υπό λιγότερο αυστηρές συνθήκες θα μπορούσαν να ευνοήσουν την εμφάνιση ανθεκτικότητας. Στην πραγματικότητα, είναι σχετικά εύκολο να δημιουργηθούν ανθεκτικές γραμμές του *L. donovani* υπό εργαστηριακές συνθήκες, ενώ έχει αναφερθεί και επιβεβαιωθεί εργαστηριακά η απώλεια κλινικής αποτελεσματικότητας (Deer et al., 2017; Carnielli et al., 2019; Ollás-Molero et al., 2021).

Η παρομομυκίνη (μονομυκίνη, αμινοσιδίνη), ένα χαμηλού κόστους αμινογλυκοσιδικό αντιβιοτικό που παράγεται από την Pfizer και λαμβάνεται από το *Streptomyces krestomuceticus*, ανακαλύφθηκε τη δεκαετία του 1950. Είναι αποτελεσματική ενάντια σε μια ποικιλία παρασιτικών παραγόντων (*Giardia*, *Entamoeba*), ενώ η αντιλεϊσμανιακή της δράση αναφέρθηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1990 και στη συνέχεια επιβεβαιώθηκε. Ο μηχανισμός δράσης της σχετίζεται προφανώς με την αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης μέσω ειδικής δέσμευσης στο 16S ριβοσωμικό RNA (Ollás-Molero et al., 2021). Η χαμηλή τιμή και η σπάνια τοξικότητα, η σύντομη διάρκεια θεραπείας και η αποτελεσματικότητα φαίνεται να καθιστούν αυτό το αντιβιοτικό πρώτης γραμμής θεραπεία για τη λεισμανίαση. Δυστυχώς, εάν χρησιμοποιηθεί σε μονοθεραπεία υπάρχει μεγάλος κίνδυνος δημιουργία αντίστασης (Bhandari et al., 2014; Anversa et al., 2018).

Η πενταμιδίνη έχει δείξει υψηλή τοξικότητα (π.χ. καρδιοτοξικότητα, μείωση της αρτηριακής πίεσης, μη αναστρέψιμο ισοουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη), όταν χρησιμοποιήθηκε έναντι της VL. Ο μηχανισμός δράσης έχει συσχετιστεί με τη συσσώρευση του φαρμάκου στο παράσιτο και τη δέσμευση του

DNA του κινητοπλάστη μετά την είσοδό του μέσω μεταφορέων αργινίνης και πολυαμίνης (Brindha et al., 2021). Δεδομένης της αναφερόμενης τοξικότητας στη θεραπεία της VL, αυτή η ένωση χρησιμοποιείται κυρίως κατά της CL (Sasidharan & Saudagar, 2021) και η αντίσταση στη *Leishmania* έχει συσχετιστεί με την ανοδική ρύθμιση της εκροής του φαρμάκου, η οποία οδηγεί σε χαμηλά επίπεδα της αρωματικής διαμίνης στο κυτοσόλιο και στο μιτοχόνδριο (Sing et al., 2016).

Το παγκόσμιο πρόβλημα αντοχής στα αντιβιοτικά έχει προκύψει και στη θεραπεία της λεισμανίασης, με αυξημένες αναφορές περί αποτυχημένης θεραπείας (Steverding, 2017). Η ανθρωπωνωτική μετάδοση είναι η κύρια αιτία αντοχής των φαρμάκων στα είδη *Leishmania*. Η παράβλεψη της συνιστώμενης ποσότητας και της συχνότητας κατανάλωσης του φαρμάκου, η μειωμένη συγκέντρωση του φαρμάκου που επηρεάζει το παράσιτο, η αναστολή της ενεργοποίησης του φαρμάκου, η αδρανοποίηση του δραστικού φαρμάκου και οι αλλαγές στη γονιδιακή ενίσχυση του ξενιστή είναι μερικά σημαντικά παραδείγματα μηχανισμών ανάπτυξης αντοχής στη φαρμακευτική αγωγή. Αν και οι μηχανισμοί αντοχής των ειδών *Leishmania* στα φάρμακα δεν έχουν διευκρινιστεί με επαρκή λεπτομέρεια, η εμπλοκή μεταφορέων ABC τύπου Ρ-γλυκοπρωτεΐνης (Pgp) και γονιδίου *Idmdr1* έχει ανιχνευθεί σε ανθεκτικά στη θεραπεία παράσιτα (Tanwar, Fatima & Hameed, 2014; Socolsky et al., 2016). Επιπλέον, τα υψηλά επίπεδα θειόλης φαίνεται πως διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη αντοχής, καθώς εμποδίζουν τη μείωση των πεντασθενών αντιμονίων σε τρισθενή αντιμονικά (Anversa et al., 2018; Olías-Molero et al., 2021).

Συνολικά, η τρέχουσα χημειοθεραπεία της λεισμανίασης δεν είναι ικανοποιητική όσον αφορά τις οδούς χορήγησης και τη διάρκεια των θεραπειών, την υψηλή τιμή των πιο αποτελεσματικών και ασφαλών φαρμάκων (π.χ. λιποσωμικής AmB), τις σοβαρές παρενέργειες (π.χ. τερατογένεση ως αποτέλεσμα χορήγησης μυλτεφοσίνης, γαστρεντερικές διαταραχές κ.λπ.) και την τοξικότητα (Martínez-Valencia et al., 2017; Olías-Molero et al., 2021). Επιπλέον, οι αναφορές για την εμφάνιση αντοχής τόσο στα κλασικά φάρμακα, όσο και στα πιο πρόσφατα χρησιμοποιούμενα μόρια αυξάνονται, ιδιαίτερα στις περιοχές που είναι περισσότερο αναγκαία (Ponte-Sucre et al., 2017). Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται επί του παρόντος κατά της λεισμανίασης ναι μεν επιφέρουν την κλινική θεραπεία μολυσμένων ατόμων, αλλά κανένα από τα διαθέσιμα φάρμακα δεν προκαλεί

παρασιτολογική θεραπεία. Αυτό έχει παρατηρηθεί σε ανθρώπινες περιπτώσεις CL (Martínez-Valencia et al., 2017) με επίμονη λοίμωξη από *Leishmania* παρά την κλινική ίαση. Στην VL, η εμμονή της νόσου και οι επακόλουθες υποτροπές συνδέονται ιδιαίτερα με τους ανοσοκατασταλμένους ασθενείς, όπου οι υποτροπές αποτελούν τον κανόνα (Saporito et al., 2013). Αυτό το εύρημα έχει συσχετιστεί με τα κοκκίωματα που περιέχουν *Leishmania* και υπογραμμίζει τη στενή σύνδεση μεταξύ της μόλυνσης από λεισμανία και της βλάβης της λειτουργικότητας του ανοσοποιητικού συστήματος (Oliás-Molero et al., 2021).

Καθώς η τρέχουσα χημειοθεραπεία παρουσιάζει πολυάριθμα μειονεκτήματα και δεν υπάρχει ανθρώπινο εμβόλιο κατά της λεισμανίασης, η ανάγκη ανακάλυψης νέας αποτελεσματικής χημειοθεραπείας είναι επείγουσα. Για το σκοπό αυτό, οι μελέτες συνδυαστικής θεραπείας κατά της δερματικής και της σπλαχνικής λεισμανίασης κάνουν όλο και συχνότερα την εμφάνιση τους (Bahrami, Oryan & Bemami, 2021; Efstathiou & Smirlis, 2021), ενώ η επαναχρησιμοποίηση φαρμάκων όπως το artesunate, ένα αποτελεσματικό φάρμακο για τη θεραπεία της ελονοσίας, είναι λογική προσέγγιση για την καταπολέμηση της νόσου (Machín et al., 2021).

### **1.11 Εναλλακτική Θεραπεία & ο ρόλος των φυτών ως παραγόντων αντιμετώπισης**

Από την αρχαιότητα, φυτικές, ζωικές και μεταλλικές ενώσεις χρησιμοποιούνται στην κλασική ιατρική κατά των ανθρώπινων ασθενειών. Για αιώνες, αυτές οι προσεγγίσεις ήταν οι μόνες διαθέσιμες προσεγγίσεις για τη θεραπεία ορισμένων ανθρώπινων ασθενειών (Petrovska, 2012). Λόγω των μειονεκτημάτων της υπάρχουσας φαρμακοθεραπείας πολλές ερευνητικές ομάδες δείχνουν ενδιαφέρον για φυσικά προϊόντα για την αποκάλυψη νέων χημειοθεραπειών, προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανές παρενέργειες (Efstathiou & Smirlis, 2021). Για παράδειγμα, έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε αυτά τα φυτά έδειξαν ότι το σκόρδο, η αψιθιά, τα καρύδια, το θυμάρι, το φυτό χέννας, η μιμόζα, η αλόη, τα μαύρα φασόλια κ.λπ. είναι αποτελεσματικά στη δερματική λεισμανίαση (Bahmani et al., 2015). Η αντιλεισμανιακή δράση ορισμένων φυτών έχει αποδοθεί στην παρουσία ενώσεων όπως αλκαλοειδή, χαλκόνες, τριτερπενοειδή, ναφθοκινόνες, κινόνες, τερπένια, στεροειδή, λιγνάνες, σαπωνίνες και флаβονοειδή, ενώ αιθέρια έλαια και

εκχυλίσματα μεγάλου αριθμού φυτών έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικά έναντι διαφόρων ειδών του παρασίτου *Leishmania* (Oryan, 2015). Τα κύρια πλεονεκτήματα των φυτικών αυτών υλικών περιλαμβάνουν την προστασία από τοξικές επιδράσεις, την ενίσχυση του θεραπευτικού αποτελέσματος, την αυξημένη ασφάλεια, την αύξηση του χρόνου κατακράτησης και την άμυνα έναντι της φυσικής και χημικής αποδόμησης (Wang et al., 2016).

Αρκετά φυτά βρέθηκαν να παρουσιάζουν θεραπευτική δράση κατά της λεισμανίασης, όπως τα *Kalanchoe pinnata*, *Plumbago scandens*, *Physalis angulata*, *Piper aduncum*, *Tabernaemontana australis* και *Phyllanthus amarus* (Bahmani et al., 2015). Τα αλκαλοειδή, ως δευτερογενείς μεταβολίτες, είναι ιδιαίτερα σημαντικά στα φυτά ως πηγή προστασίας έναντι διαφόρων μικροοργανισμών και φυτοφάγων. Αυτές οι ενώσεις είναι εξίσου απαραίτητες για τον άνθρωπο όταν εφαρμόζονται για την καταπολέμηση παρασίτων. Ένας μεγάλος αριθμός αλκαλοειδών έχουν βρεθεί, ότι παρουσιάζουν αξιολογική λεισμανοκτόνο δράση, αλλά χωρίς κλινικά αποτελέσματα λόγω έλλειψης κλινικών δοκιμών. Η χημική δομή των αλκαλοειδών με τεκμηριωμένη λεισμανοκτόνο δράση σχετίζεται με την κινολίνη, την ινδόλη, την ισοκινολίνη, τη διβενζυλισοκινολίνη, τα οιστρογόνα, τη βενζοκινολιζιδίνη, τα διτερπένια, την πυρρολιδίνη, την ακριδόνη, και τη β-καρβολίνη- (Souto et al., 2019).

Οι βιοδραστικές ενώσεις των ειδών *Artemisia*, συμπεριλαμβανομένης της αρτεμισίνης και του αρτεμηθέρα, είναι αποτελεσματικές κατά της λεισμανίασης. Τα φυτά αυτής της οικογένειας περιλαμβάνουν την Αρτεμισία και τον κατιφέ (Soosaraei et al., 2017). Τα κύρια συστατικά αυτού του φυτού περιλαμβάνουν γλυκοσίδες, κουμαρίνες, τερπενοειδή και στερόλες, πολυακετυλένιο και φλαβονοειδή όπως η κερκετίνη και τα καρποτενοειδή που έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Το αιθέριο έλαιο της Αρτεμισίας περιλαμβάνει τη σινεόλη, ενώ στα εκχυλίσματα της, οι τανίνες και τα φλαβονοειδή έχουν αντισηπτική δράση (Bahmani et al., 2015). Για παράδειγμα, το artesunate, το πιο σταθερό παράγωγο της σεσκιτερπενικής λακτόνης που προέρχεται από ένα κινέζικο φυτό, φαίνεται να έχει αντιλεισμανική δράση και να αποτρέπει τον πόνο και τη νευροφλεγμονή που προκαλείται από το *L. amazonensis* σε ποντικούς BALB/c (Gugliandolo et al., 2020).

Στη Βολιβία, 38 φυτά έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία δερματικών προβλημάτων και 8 εξ αυτών συνιστώνται από την ιατρική *Tacana* για τη θεραπεία

της λεισμανίασης (Arévalo-López et al., 2018). Σε μια δοκιμή παρήχθησαν εκχυλίσματα με όλα αυτά τα φυτά και η λεισμανοκτόνος δράση προσδιορίστηκε σε προμαστιγωτικές μορφές του *L. (L.) amazonensis* και του *L. (V.) braziliensis*. Παρατηρήθηκε ότι το 42,1% από αυτά ήταν δραστικά και το 23,7% ιδιαίτερα δραστικά, ενώ η λεισμανοκτόνος δράση του 34,2% εξ αυτών εξαρτιόταν από το μέρος του φυτού που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή των εκχυλισμάτων. Όσον αφορά τα φυτά που ενδείκνυται ειδικά για τη θεραπεία της λεισμανίασης, εκχυλίσματα που παράγονται με τα φύλλα του *Hyptis mutabilis* (Lamiaceae) και του φλοιού των *Jacaranda glabra* (Bignoniaceae) και *Tessaria integrifolia* (Asteraceae) ήταν δραστικά στα *L. (L.) amazonensis* και *L. (V.) braziliensis*. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι τα κλάσματα που καθαρίστηκαν από τα ακατέργαστα αιθανολικά εκχυλίσματα του *J. glabra* και του *T. integrifolia* ήταν επίσης δραστικά έναντι των προμαστιγωτών μορφών των *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) aethiopica*, *L. (V.) braziliensis* και *L. (V.) lainsoni*. Αν και τα εκχυλίσματα και τα κλάσματα που παράγονται με αυτά τα φυτά εμφάνισαν δράση πολλαπλών ειδών, σημειώθηκε ότι οι επιλεκτικοί δείκτες αυτών των φυσικών φαρμάκων ήταν χαμηλοί σε σύγκριση με την αμφοτερικίνη B (Passero et al., 2021).

Στην Αιθιοπία τα φρέσκα φύλλα του *Ranunculus multifidus* Forsk χρησιμοποιούνται παραδοσιακά για τη θεραπεία διαφόρων παθήσεων, συμπεριλαμβανομένης της λεισμανίασης και της εκρίζωσης των εντερικών σκουληκιών. Στη μελέτη των Sirak et al. (2021), η ανεμονίνη που απομονώθηκε από τα φρέσκα φύλλα του *R. multifidus* αξιολογήθηκε για τις *in vitro* αντιλεισμανικές και αντισχιστοσωμικές ιδιότητες της με ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

Διαφορετικά είδη φυτών από την οικογένεια Bignoniaceae έχουν επίσης βρεθεί ότι αντιμετωπίζουν συμπτώματα που σχετίζονται με τη λεισμανίαση. Μεταξύ αυτών των φυτών, καταδείχθηκε ότι η ναφθοκινόνη λαπαχόλη, που καθαρίστηκε από *Handroanthus serratifolius* (Vahl) SOGrose, ήταν δραστική (*in vitro*) σε αμαστιγωτές μορφές του *L. (L.) amazonensis* (Costa et al., 2017) και ο πιθανός μηχανισμός δράσης αυτού του μορίου περιλαμβάνει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Εκτός από τις *in vitro* μελέτες, καταδείχθηκε ότι η λαπαχόλη, χορηγούμενη από το στόμα για 10 ημέρες, μείωσε τον αριθμό των αμαστιγωτών μορφών του *L. (L.) amazonensis* στην πειραματική δερματική λεισμανίαση και παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στα

σπληνικά και ηπατικά παράσιτα σε σπλαχνική λεισμανίαση που προκαλείται από *L. (L.) infantum* (Araújo et al., 2019).

Τα φυτά από την οικογένεια των Aporcynaceae είναι πλούσια σε βιοδραστικούς δευτερογενείς μεταβολίτες (Kaunda & Zhang, 2017) και τέτοια μόρια μπορεί να έχουν δραστηριότητα σε μορφές ιστού μαστιγωτών μορφών της λεισμανίασης. Από αυτή την άποψη, διαπιστώθηκε ότι το γένος *Tabernaemontana* έχει αναφερθεί αρκετές φορές σε διαφορετικές κοινότητες ως έχον θεραπευτικά συμπτώματα που σχετίζονται με τη λεισμανίαση, αλλά υπάρχουν ελάχιστες σχετικές κλινικές μελέτες. Ωστόσο, έχει επαληθευτεί ότι η λεισμανοκτόνος δράση των μορίων που καθαρίζονται από ένα συγγενικό είδος, το *T. catharinensis* A. DC., μπορεί να συνδέεται με την ανοσοτροποποιητική δράση αυτού του γένους. Επιπλέον, επαληθεύτηκε ότι το λεισμανοκτόνο μόριο βοακαμίνη, ένα αλκαλοειδές ινδόλης, επέφερε αλλαγές στα μιτοχόνδρια, τον κινητοπλάστη και τον πυρήνα των προμαστιγωτών των *L. (L.) amazonensis* και *L. (L.) donovani*, και τέτοιες μορφολογικές αλλαγές συσχετίστηκαν με τη χαλαρωτική δράση της τοποϊσομεράσης IB (Passero et al., 2021). Επιπρόσθετα, επαληθεύτηκε ότι τα ποντίκια BALB/c που είχαν μολυνθεί με άγριου τύπου ή ανθεκτικό στα φάρμακα *L. donovani* που έλαβαν θεραπεία με 2,5 και 5 mg/kg βοακαμίνης από την ενδοπεριτοναϊκή οδό δύο φορές την εβδομάδα για τρεις εβδομάδες εμφάνισαν λιγότερα παράσιτα στον σπλήνα και στο ήπαρ εν συγκρίσει με την ομάδα ελέγχου (Chowdhury et al., 2017).

Μεταξύ άλλων, οι ινδιουμπίνες, μια οικογένεια φυσικών ενώσεων ινδόλης που χρησιμοποιήθηκαν για αιώνες στην παραδοσιακή κινεζική ιατρική και βρίσκονται σε φυτά λουλακιού (*Isatis* spp., *Polygonum* spp.) και σε θαλάσσιους οργανισμούς (οικογένεια οστρακοειδών *Murex*, *Hexaplex trunculus*), είναι ισχυροί αντι-τρυπανοσωματιδικοί παράγοντες, ενώ το ολικό φαινολικό κλάσμα του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου, που αποτελεί βασικό προϊόν στη μεσογειακή διατροφή, επέδειξε αντιλεισμανιακή δράση και *in vivo* επαγωγή αποκρίσεων που προκαλούνται από T κύτταρα σε πειραματική δερματική λεισμανίαση (Efstathiou & Smirlis, 2021).

## 1.12 Ομοιοπαθητική

### 1.12.1 Η Ομοιοπαθητική ως Εναλλακτική Μορφή Θεραπείας

Η ομοιοπαθητική είναι μια δημοφιλής, αν και πολυσυζητημένη, ιατρική πρακτική (Donelli & Antonelli, 2021). Η ομοιοπαθητική είναι ένα σύστημα ιατρικής που ακολουθεί τρεις θεμελιώδεις κατευθυντήριες γραμμές, δηλαδή 1) το ελάχιστο φάρμακο, 2) την ελάχιστη δόση και 3) τη μέγιστη ομοιότητα. Ιστορικά η έννοια του «το όμοιο θεραπεύει το όμοιο» προήλθε από την εποχή του πατέρα της ιατρικής Ιπποκράτη (Das, 2018). Η ομοιοπαθητική ως φιλοσοφία και εναλλακτική ιατρική πρακτική (Burks, 2020) εφευρέθηκε για πρώτη φορά από τον Γερμανό γιατρό Samuel Hahnemann (1755-1843) και βασίζεται στη χορήγηση φαρμάκων, στα οποία οι δραστικές ουσίες είναι τόσο αραιωμένες, ώστε δεν υπάρχει ανιχνεύσιμο ίχνος από αυτές στο τελικό προϊόν (Grimes, 2012). Στις εμπειρικές του μελέτες, ο Hahnemann ανέφερε ότι η αυτοχορήγηση ενός κοινού ανθελονοσιακού φαρμακευτικού φυτού (Cinchona) είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση των ίδιων συμπτωμάτων της ελονοσίας, αλλά σε πιο ήπιο βαθμό. Αυτό τον οδήγησε στο να θέσει τα θεμέλια ενός νέου ιατρικού συστήματος που ονομαζόταν «ομοιοπαθητική», ένα ουσιαστικό που προέρχεται από τον συνδυασμό δύο ελληνικών όρων: του «όμοιος», ένα πρόθεμα που σημαίνει «ίδιο» και την «παθητική», ένα επίθημα που συνήθως υποδηλώνει όλες τις ασθένειες (Nelson et al., 2019).

Ο Hahnemann δήλωσε ότι η κατάλληλη θεραπεία της νόσου πρέπει να επιλεγεί από τον ομοιοπαθητικό επαγγελματία με βάση την αρχή που συνοψίζεται σε μια λατινική έκφραση: «*similia similibus curantur*» που συνοψίζει την αρχή της θεραπευτικής ομοιότητας (Grimes, 2012). Με άλλα λόγια, συνιστάται ένα θεραπευτικό φάρμακο για μια δεδομένη ασθένεια εάν οι φαρμακολογικές δόσεις της αρχικής ουσίας θα είχαν θεωρητικά τα ίδια αποτελέσματα στον οργανισμό με τα συμπτώματα της νόσου. Η παρασκευή ενός ομοιοπαθητικού φαρμάκου συνεπάγεται μια διαδοχική υψηλή αραιώση της αρχικής ουσίας, μαζί με μερικές μηχανικές κρούσεις, οι οποίες έχουν επικρατήσει ως δυναμοποιήσεις και οι οποίες πιστεύεται, ότι ενισχύουν την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου (Donelli & Antonelli, 2021).

Κάθε ομοιοπαθητικό προϊόν φέρει συνήθως μια λατινική ονομασία (για παράδειγμα: *Aconitum napellus*) που υποδηλώνει την αρχική ουσία που έχει υποστεί

διαδοχικές αραιώσεις. Τα λατινικά χρησιμοποιούνται λόγω ιστορικής παράδοσης και επειδή καθιστούν ευκολότερη και πλέον ξεκάθαρη κατανόηση τους διεθνώς. Μαζί με το όνομά τους, τα ομοιοπαθητικά προϊόντα συχνά περιέχουν μια σύντομη περιγραφή του «πόσο» έχουν αραιωθεί: Για παράδειγμα, «30 CH» σημαίνει ότι η αρχική αρχή έχει αραιωθεί κατά 100 (συνήθως σε ένα υδροαλκοολικό διάλυμα) για 30 φορές. Πιο συγκεκριμένα, το «CH» σημαίνει «Hahnemann's Centesimal [αραίωση]», παραπέμποντας έτσι στη μέθοδο παρασκευής ομοιοπαθητικών φαρμάκων που επινόησε ο Γερμανός ιατρός. Τα κοινά σκευάσματα ομοιοπαθητικών προϊόντων που βρίσκονται στην αγορά συνήθως περιλαμβάνουν κόκκους που περιέχουν σακχαρόζη ή/και λακτόζη, σφαιρίδια (μικρότερα από κόκκους) και υγρές σταγόνες, που προορίζονται για από του στόματος κατανάλωση. Είναι επίσης διαθέσιμα και άλλα σκευάσματα για τοπικές εφαρμογές όπως κρέμες, αλοιφές, οφθαλμικές σταγόνες και ρινικά σπρέι (Nelson et al., 2019; Donelli & Antonelli, 2021).

Οι εξαιρετικά μικρές ποσότητες που χρησιμοποιούνται παρασκευάζονται με σειριακή αραιώση εκχυλισμάτων μέσω της βίαιης ανακίνησης (κρούσης) ενός δοχείου με αραιωμένο εκχύλισμα. Τα φάρμακα χορηγούνται από το στόμα και οι ασθενείς μερικές φορές λαμβάνουν έως και 50 διαφορετικά εκχυλίσματα καθημερινά. Μια εναλλακτική θεωρία προτείνει, ότι η ασθένεια θεραπεύεται με την επαγωγή προστατευτικής ανοσίας. Είναι αμφίβολο, για θεωρητικούς λόγους, εάν οι εξαιρετικά μικρές ποσότητες του λαμβανόμενου υλικού θα μπορούσαν να έχουν κάποιο θεραπευτικό αποτέλεσμα. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία δεν είναι τυποποιημένα, ενώ οι ανεπιθύμητες ενέργειες είναι απίθανες λόγω της μικρής ποσότητας του υλικού που χορηγείται. Οι πραγματικοί κίνδυνοι είναι η ψυχολογική εξάρτηση και η καθυστέρηση στην εγκαθίδρυση αποτελεσματικής θεραπείας (Burks, 2020).

Η εξατομίκευση που εφαρμόζεται στην ομοιοπαθητική είναι μια προσπάθεια κατανόησης του ασθενούς. Είναι σημαντικό να διαγνωστεί ο ασθενής με μια βαθύτερη κατανόηση της σύστασής του/της, της ιδιοσυγκρασίας του, των παραπόνων, της γενετικής σύνθεσης, του προσωπικού, του παρελθόντος και του παρόντος ιστορικού κ.λπ. Αυτή είναι μια μοναδική διαδικασία δημιουργίας του προφίλ του ασθενούς. Αυτή η προσέγγιση τώρα αναδύεται ως ένα εντελώς νέο πεδίο προσωποποιημένης ιατρικής. έχοντας πλέον μεγαλύτερη κατανόηση της γενετικής



και των γονιδιακών εκφράσεων, η εξατομίκευση είναι πιθανό να αποκτήσει πιο ορθολογική θέση στην επιστήμη της Ομοιοπαθητικής (Das, 2019).

Η Ομοιοπαθητική ακολουθεί μια ολιστική προσέγγιση προς τον άρρωστο μέσω της προώθησης της εσωτερικής ισορροπίας σε νοητικό, συναισθηματικό, πνευματικό και σωματικό επίπεδο. Ωστόσο, παρά τις όποιες θεραπευτικές αποδείξεις, θεωρείται ως μια ανορθόδοξη ιατρική πρακτική από τους σκεπτικιστές της. Σε κάποιο βαθμό, υπάρχει αμφιβολία για την επιστημονική βάση του συστήματος αυτού, ακόμη και μεταξύ αυτών που το εφαρμόζουν, κυρίως λόγω της συνεχούς επίθεσης από τους σκεπτικιστές και επίσης λόγω της αδυναμίας εξήγησης ορισμένων αρχών που παραμένουν αντισυμβατικές (Das, 2019).

### **1.12.2 Παρασκευή ομοιοπαθητικών σκευασμάτων**

Η κλασική διαδικασία παρασκευής ομοιοπαθητικών φαρμάκων περιλαμβάνει λειοτρίβηση σε λακτόζη και/ή σειριακή αραιώση σε διαλύματα αιθανόλης-νερού και εναιώρηση (έντονοι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι ανακίνησης με το χέρι ή μέσω εξειδικευμένων αυτόματων μηχανημάτων, τους δυναμοποιητές) σε γυάλινα φιαλίδια που περιέχουν διαλύματα αιθανόλης-νερού. Συνήθεις παράγοντες αραιώσης είναι 1 μέρος μητρικού βάμματος της δραστικής ουσίας σε 9 μέρη αραιωτικού (1/10, δεκαδική αναλογία, D ή X ισχύς) και 1 μέρος πηγή σε 99 μέρη αραιωτικού (1/100, εκατοστιαία ή C ισχύς). Τα βάμματα των δραστικών ουσιών είναι συνήθως φυτικής, ορυκτής ή ζωικής φύσης (Bell & Koithan, 2012).

Μόλις ξεκινήσουν τα στάδια αραιώσης και λειοτρίβησης σε λακτόζη και/ή υποδοχές σε υγρούς διαλύτες, οποιοδήποτε ομοιοπαθητικό φάρμακο χαμηλής ισχύος που παρασκευάζεται πάνω από τα μητρικά βάμματα, π.χ. 1X έως 23X ή 1C έως 11C, θα πρέπει θεωρητικά να εξακολουθεί να περιέχει μόρια χύδην της αρχικής δραστικής ουσίας, καθώς να είναι πηγή νανοσωματιδίων. Θεωρητικά, τα επαναλαμβανόμενα στάδια αραιώσης αφήνουν προοδευτικά λιγότερα και λιγότερα μόρια της αρχικής δραστικής ουσίας, έως ότου τελικά κανένα δεν θα παραμείνει σε διάλυμα αραιωμένο πέρα από τον αριθμό του Avogadro ( $6 \times 10^{23}$ ), δηλαδή δυναμοποιήσεις μεγαλύτερες από 24X ή 12C. Οι συνήθεις κλινικές χημικές αναλύσεις μπορούν στην καλύτερη περίπτωση να βρουν σχετικά χαμηλούς αριθμούς μορίων της δραστικής ουσίας. Ως αποτέλεσμα, οι ιατροί που εξασκούν τη συμβατική ιατρική

και οι χημικοί απορρίπτουν την αληθοφάνεια της ομοιοπαθητικής λόγω της υποτιθέμενης έλλειψης επαρκούς δραστικής ουσίας για την επαγωγή ενός «συνηθισμένου» φαρμακολογικού αποτελέσματος δόσης-απόκρισης. Στην τυπική κλινική φαρμακολογία, οι χαμηλότερες "δόσεις" δραστικής ουσίας θα πρέπει να έχουν μικρότερες επιδράσεις, έως ότου δεν υπάρχουν καθόλου βιολογικές επιδράσεις (Bell & Koithan, 2012; Tournier et al., 2021).

Οι υποθέσεις περί αποτελεσματικότητας των ομοιοπαθητικών σκευασμάτων είναι φαινομενικά έγκυρες, εάν ισχύουν οι υποκείμενες υποθέσεις - δηλαδή ότι τα ομοιοπαθητικά φάρμακα είναι συνηθισμένες, διαλυμένες και αραιωμένες χημικές δραστικές ουσίες σε πραγματικό διάλυμα που θα μπορούσαν να δράσουν μόνο φαρμακολογικά, με γραμμικές σχέσεις δόσης-απόκρισης. Ωστόσο, οι διαδικασίες λειοτρίβησης και εναιώρησης στην παρασκευή κλασικών ομοιοπαθητικών φαρμάκων μπορεί στην πραγματικότητα να είναι ακατέργαστες χειροκίνητες μέθοδοι που δημιουργούν νανοσωματίδια «από πάνω προς τα κάτω» του αρχικού υλικού. Τα νανοσωματίδια κυμαίνονται σε μεγέθη από 1 νανόμετρο (nm) σε μια κλίμακα έως 1000 nm ή περισσότερο, αν και πολλές έρευνες της νανοεπιστήμης επικεντρώνονται σε ειδικές επίκτητες ιδιότητες μικρών νανοσωματιδίων κάτω των 100 nm. Η λειοτρίβηση με γουδί και γουδοχέρι είναι μια χειροκίνητη μέθοδος μηχανικής λείανσης, παρόμοια με την άλεση με σφαιρίδια που χρησιμοποιείται στη σύγχρονη νανοτεχνολογία. Όπως οι σύγχρονες μέθοδοι μικρορρευστοποίησης της νανοτεχνολογίας, οι χειροκίνητες ανακινήσεις εισάγουν έντονους στροβιλισμούς, συγκρούσεις σωματιδίων και δυνάμεις διάτμησης στο διάλυμα που αποκόπτουν όλο και μικρότερα σωματίδια της δραστικής ουσίας, καθώς και το πυρίτιο από τα τοιχώματα των γυάλινων δοχείων ή φιαλιδίων. Ο συνδυασμένος αντίκτυπος αυτών των μηχανικών διαδικασιών νανομεγέθυνσης θα ήταν η τροποποίηση των ιδιοτήτων του φαρμάκου, δημιουργώντας νανοσωματίδια πηγής θεραπείας, καθώς και κρυστάλλους πυριτίου και άμορφα νανοσωματίδια (Bell & Koithan, 2012; Upadhyay, 2019; Farvadi & Fatemeh, 2019).

### 1.13 Μηχανισμοί Δράσης Ομοιοπαθητικών Σκευασμάτων

Έχουν προταθεί αρκετές υποθέσεις για να εξηγήσουν τις προκλινικές και κλινικές επιδράσεις των ομοιοπαθητικών σκευασμάτων. Ωστόσο, μέχρι στιγμής λείπουν σταθερά πειραματικά στοιχεία για την υποστήριξη αυτών των υποθέσεων (Bellavite et al., 2014· Guedes et al., 2018). Οποιοσδήποτε επεξηγήσεις για τα ειδικά θεραπευτικά αποτελέσματα που προκαλούνται από τα ομοιοπαθητικά φάρμακα θα πρέπει να καλύπτουν δύο τομείς: τον φαρμακευτικό τρόπο δράσης και τον φαρμακολογικό τρόπο δράσης (Tournier et al., 2021). Οι τελευταίες θα έπρεπε να απαντήσουν στο βασικό ερώτημα της φαρμακοδυναμικής, δηλαδή πώς λειτουργούν τα ομοιοπαθητικά φάρμακα σε ζωντανούς οργανισμούς, ενώ οι πρώτες θα πρέπει να επικεντρωθούν στο ερώτημα περί των επιπτώσεων τους σε φυσικοχημικό επίπεδο (Tournier et al., 2019). Οι Bellavite et al. (2014), εντόπισαν τρεις κύριες εννοιολογικές προσεγγίσεις για μια πιθανή εξήγηση συγκεκριμένων θεραπευτικών επιδράσεων των ομοιοπαθητικών σκευασμάτων: (1) το σχηματισμό μικροσυσσωματωμάτων συστάδων νερού ή clathrates, (2) τη Κβαντική Χρωμοδυναμική (QCD) και (3) τα νανοσωματίδια από την αρχική ουσία.

1. Η θεωρία περί συσσωματωμάτων νερού: Γύρω από μόρια της αρχικής ουσίας, αναμένεται να σχηματιστούν συσσωματώματα μορίων νερού, που αντικατοπτρίζουν το σχήμα αυτών των μορίων. Εικάστηκε ότι αυτά τα συσσωματώματα θα μπορούσαν να επιβιώσουν και να αυτοαναπαραχθούν ακόμη και αν τα μόρια σχηματισμού αραιωθούν κατά τη διαδικασία της δυναμοποίησης. Αυτά τα συσσωματώματα υποτέθηκε ότι χρησιμεύουν ως φορέας πληροφοριών των αρχικών μορίων, τα οποία θα μπορούσαν να αποκρυπτογραφηθούν από υποδοχείς στις κυτταρικές επιφάνειες (Bellavite et al., 2014, Tournier et al., 2019, 2021).
2. Η Κβαντική Χρωμοδυναμική (QCD) αναπτύχθηκε από τους Preparata και Del Giudice et al. Αυτή η θεωρία προβλέπει τον σχηματισμό σταθερών υδάτινων περιοχών ή περιοχών στο νερό, οι οποίες —με τη μεταφορά ορισμένων πληροφοριών σχετικών με το υλικό που ενισχύεται— θα μπορούσαν να εξηγήσουν συγκεκριμένες θεραπευτικές ιδιότητες των ομοιοπαθητικών παρασκευασμάτων (Bono et al., 2012; Tournier et al., 2019).

3. Πιο πρόσφατα, έχει υποτεθεί, ότι ο μηχανισμός δράσης των ομοιοπαθητικών σκευασμάτων έγκειται στα νανοσωματίδια στοιχείων που αντιστοιχούν στο αρχικό υλικό, από το οποίο κατασκευάστηκε το ομοιοπαθητικό δείγμα (Uradhyay, 2019; Tournier et al., 2021).
4. Τέλος, προς συμπλήρωση της εικόνας αναφέρεται μια τέταρτη προσέγγιση που επικαλείται μη τοπικά αποτελέσματα που βρίσκονται σε επεκτάσεις της κβαντικής θεωρίας σε μακροκλίμακες, όπως η Weak Quantum Theory (WQT). Αυτή η θεωρία χρησιμεύει ως επίσημο πλαίσιο για να περιγράψει πιθανές κβαντικές επιδράσεις εμπλοκής μεταξύ του ασθενούς, της ομοιοπαθητικής ουσίας και του ιατρού για την περιγραφή των κλινικών επιπτώσεων της ομοιοπαθητικής (Beauvais, 2017).

Άλλες υποθέσεις έχουν προταθεί για να εξηγήσουν τα αποτελέσματα της ομοιοπαθητικής θεραπείας σε φυσικοχημικό επίπεδο, όπως οι νανοφουσαλίδες (Demangeat, 2015), η επιταξία (Tournier et al., 2021), η όρμηση (Chikramane et al., 2017), οι ενώσεις πυριτίου, οι ισοτοπικές συσχετίσεις θέσης, τα αμινοξέα και τα πεπτίδια κ.λπ. Ωστόσο, οι τέσσερις κύριες εννοιολογικές προσεγγίσεις της αποτελεσματικότητας της ομοιοπαθητικής θεραπείας που σκιαγραφήθηκαν νωρίτερα είναι επί του παρόντος οι πιο συχνά συζητημένες υποθέσεις εντός της ομοιοπαθητικής ερευνητικής κοινότητας (Tournier et al., 2021).

### **1.14 Χρήση ομοιοπαθητικών σκευασμάτων για τη θεραπεία της Λεισμανίασης**

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ανοσοτροποποιητικές επιδράσεις των ομοιοπαθητικών φαρμάκων σε ασθένειες που προκαλούνται από το *Leishmania sp.* και άλλα παράσιτα (Falkowski-Temporini et al., 2016). Το Antimonium crudum 30x, είναι ένα ομοιοπαθητικό φάρμακο που καλύπτει σχεδόν το σύνολο των συμπτωμάτων της λεισμανίασης (Rodrigues de Santana et al., 2014; Cajueiro et al., 2017). Οι Rodrigues de Santana et al. (2014) διαπίστωσαν, ότι σε ποντίκια με CL που έλαβαν θεραπεία Antimonium crudum 30x, κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης, υπήρξε σημαντική αύξηση της μακροσκοπικής βλάβης, που σχετίζεται με φλεγμονώδες οίδημα, καθώς και αύξηση του αριθμού των ελεύθερων μαστιγωτών μορφών και των B

λεμφοκυττάρων εντός της βλάβης. Αύξηση των Β λεμφοκυττάρων (κυρίως Β-2 κυττάρων) παρατηρήθηκε επίσης στον τοπικό λεμφαδένα, τον σπλήνα και το περιτόναιο. Στη χρόνια φάση, η φλεγμονώδης διαδικασία στην εστία της λοίμωξης μειώθηκε, με μειωμένη μετανάστευση φαγοκυττάρων και περιτοναϊκή αύξηση των κυττάρων Β-1α (πρόδρομοι των κυττάρων που παράγουν ανοσοσφαιρίνη Β-2) και των κυττάρων Τ CD8+. Ο στόχος μιας μελέτης που διεξήχθη από τους Cajueiro et al. (2017) είχε ως στόχο να αξιολογήσει τον επιπολασμό της απόκρισης Th1/Th2, τις ιστολογικές αλλαγές σπλήνα και τη συμμετοχή μεγακαρυοκυττάρων στη διαδικασία ανοσοτροποποίησης ποντικών BALB/c με AVL, που έλαβαν θεραπεία με Antimonium crudum 30x. Σύμφωνα με τα ευρήματά τους, πριν/μετά (BioLi30x) και μετά τη θεραπεία (Antimonium crudum 30x) παρουσιάστηκε μείωση των μεγακαρυοκυττάρων/αλλαγών στο σπλήνα λόγω ανοσοτροποποίησης των ζωικών διεργασιών, ελέγχοντας τη διαδικασία μόλυνσης, πιθανώς από την υπεροχή της κυτοκίνης Th1.

Η ενσωμάτωση του andrographolide, ενός διτερπενοειδούς που εκχυλίζεται από το ποώδες είδος *Andrographis paniculata* (Acanthaceae), με διαφορετικές νανοσκευάσματα πολυ (λακτίδιο-συν-γλυκολιδίου) (PLGA) ενίσχυσε την αντιλεϊσμανιακή δράση του andrographolide έναντι των αξενικών και ενδοκυτταρικών μορφωμάτων του *L. donovani*. Μεταξύ των σκευασμάτων που δοκιμάστηκαν, τα φορτωμένα με ανδρογραφολίδη νανοσωματίδια 175 nm παρουσίασαν την καλύτερη αντιλεϊσμανιακή δράση (IC50 = 36 και 28  $\mu$ M για αξενικούς και ενδοκυτταρικούς αμαστιγωτές, αντίστοιχα) (Roy et al., 2010). Το *Andrographis paniculata* μπορεί να θεωρηθεί μια ενδιαφέρουσα πηγή αντιλεϊσμανικών παραγόντων (Vermelho et al., 2013).

Οι Nascimento et al. (2017) στόχευαν στην αξιολόγηση της επίδρασης του M1, ενός πολύπλοκου ομοιοπαθητικού προϊόντος, στην αλληλεπίδραση μακροφάγου-Λεϊσμανίας in vitro και in vivo σε ποντίκια με *L. amazonensis*. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν σε αυτή τη μελέτη υποδεικνύουν ότι, γενικά, τα εξαιρετικά αραιωμένα προϊόντα πυροδοτούν γρήγορες και αποτελεσματικές αποκρίσεις από ζωντανούς οργανισμούς, κύτταρα και ποντίκια, κατά της λεϊσμανίασης, αλλάζοντας το προφίλ των κυτοκινών, αυξάνοντας το NO ( $p < 0,05$ ), μειώνοντας το παρασιτικό φορτίο ( $p < 0,001$ ), και τροποποιώντας την κλασική ωρίμανση και βιογένεση των παρασιτοφόρων

κενοτοπίων ( $p < 0,001$ ). Το σύμπλεγμα M1 μείωσε τον ενδοκυτταρικό δείκτη ( $p < 0,001$ ) και το ποσοστό των μολυσμένων μακροφάγων ( $p < 0,05$ ), αποτρέποντας την ανάπτυξη βλαβών ( $p < 0,05$ ) που προκαλούνται από το *L. Amazonensis*, αυξάνοντας την απόκριση Th1 ( $p < 0,05$ ). Επομένως το σύμπλεγμα M1 μπορεί να είναι καλός υποψήφιος για μια συμπληρωματική θεραπεία σε σχέση με τις συμβατικές θεραπείες, αφού όλες οι παράμετροι που παρατηρήθηκαν *in vitro* και *in vivo* βελτιώθηκαν.

Οι Joshi et al. (2020) αξιολόγησαν την αντιλειτουργική αποτελεσματικότητα ενός υπερ-αραιωμένου ομοιοπαθητικού φαρμάκου (Iodium 30c) σε πειραματική σπλαχνική λεισμανίαση (VL). Βάσει των ευρημάτων, τα ζώα που έλαβαν το ομοιοπαθητικό σκεύασμα παρουσίασαν σημαντικά μειωμένο φορτίο παρασίτου (σε  $1503 \pm 39$  μονάδες Leishman Donovan, LDU) σε σύγκριση με τους μολυσμένους μάρτυρες ( $4489 \pm 256$  LDU) ( $p < 0,05$ ). Επομένως, η μέση θεραπευτική αποτελεσματικότητα του Iod30c ανήλθε σε 66,5%. Επιπλέον, ο πληθυσμός των CD4+ και CD8+ T κυττάρων αυξήθηκε σημαντικά ( $p < 0,05$ ) μετά τη θεραπεία. Δεν παρατηρήθηκε τοξικότητα, όπως αποδείχθηκε από βιοχημικές και ιστοπαθολογικές μελέτες του ήπατος και των νεφρών. Η αποτελεσματικότητα της προφύλαξης με το Iodium 30c ήταν 58,3%, ενώ η θεραπευτική αποτελεσματικότητα της αμφοτερικίνης B ήταν 85,9%.

## Κεφάλαιο 2. Πειραματική Μεθοδολογία

### 2.1 Σκοπός

Η παρούσα πειραματική εργασία αποσκοπεί να διερευνήσει την αντιλεϊσμμανιακή δράση των ομοιοπαθητικών σκευασμάτων *Adrophagis paniculata*, *Antimonium crudum* και *Ferrum arsenicum*. Τα εν λόγω σκευάσματα θα αξιολογηθούν *in vitro* σε ένα εύρος δυναμοποιήσεων, προκειμένου να διακριβωθεί η δραστηριότητά τους και εάν θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια εναλλακτική μορφή θεραπείας για την λεϊσμμανίαση, που φέρει το πλεονέκτημα της μη τοξικότητας, εν αντιθέσει με τη θεραπεία πρώτης γραμμής της νόσου.

Προς επίρρωση του ερευνητικού αυτού στόχου, πραγματοποιήθηκε η κάτωθι πειραματική διεργασία:

- *In vitro* μελέτη της δράσης των ομοιοπαθητικών σκευασμάτων *Andrographis paniculata*, *Antimonium crudum* (I και II) και *Ferrum arsenicum* κατά της λεισμμανίασης στην προμαστιγωτή και στην ενδοκυτταρική μορφή των παρασίτων: *Leishmania infantum*, η οποία εμφανίζει ανθεκτικότητα στην υφιστάμενη θεραπεία και *Leishmania infantum*, η οποία εμφανίζει ευαισθησία στην υφιστάμενη θεραπεία.

Στην παρασκευή των σκευασμάτων συνέβαλε καθοριστικά το προσωπικό της Μονάδας Ομοιοπαθητικών της εταιρείας Korres, καθώς και του Ινστιτούτου Παστέρ.

### 2.2 Πειραματική Μεθοδολογία

#### 2.2.1 Υλικά

Όσον αφορά τα αντιδραστήρια και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας πειραματικής μελέτης, αυτά περιγράφονται ακολούθως:

#### 2.2.2 Αναλώσιμα Υλικά

Τα αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα κάτωθι:

- Αιματοκυτταρόμετρα για τη μέτρηση παρασίτων και μακροφάγων (*Malassez* και *Neubauer* αντίστοιχα).
- Δοκιμαστικά κωνικά σωληνάρια διαμετρήματος 15 ml και 50 ml (*Sarstedt*, *Greiner*)

- Πλάκες flat-bottom 96 φρεατίων για την καλλιέργεια παρασίτων/μακροφάγων (Greiner Cellstar)
- Πλαστικά ρύγχη πιπέτων (tips) (Greiner bio-one)
- Πλαστικούς ξύστες αποστειρωμένους (Kisker Biotech)
- Πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρισης Eppendorf διαμετρήματος 1,5 ml (Sarstedt)
- Φιλμ σφράγισης (Parafilm M Rolls)
- Φλάσκες για την καλλιέργεια 25 cm<sup>2</sup> χωρίς φίλτρο (για καλλιέργεια παρασίτων)
- Φλάσκες για την καλλιέργεια 25 cm<sup>2</sup> με φίλτρο (για καλλιέργεια μακροφάγων).

### 2.2.3 Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα κάτωθι:

- Αντιδραστήριο Alamar Blue, προκειμένου να ελεγχθεί η κυτταρική επιβίωση των μακροφάγων
- Θρεπτικά υλικά για την πραγματοποίηση κυτταροκαλλιεργειών. Αυτά περιλαμβάνουν εμβρυικό ορό προερχόμενο από μόσχο και απενεργοποιημένο στους 56°C για διάστημα 30 λεπτών (min), RPMI 1640, Schneider's.
- Πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη και γλουταμίνη (αντιβιοτικά) για την πραγματοποίηση κυτταροκαλλιεργειών.
- Ρυθμιστικό διάλυμα HEPES
- Απιονισμένο νερό (purified water)
- Φορμαλίνη (για ακινητοποίηση των παρασίτων στην πλάκα κατά τη μέτρηση).

### 2.2.4 Εργαστηριακός εξοπλισμός

Ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει:

- Αναγνώστη μικροπλακών Elisa
- Υδατόλουτρο
- Πιπέτες μεταβλητού όγκου 2μl/20 μl/200 μl, καθώς και 1000 μl
- Θάλαμο κάθετης νηματικής ροής



- Επωαστικός κλίβανος 37°C και 25°C για τις καλλιέργειες των ευκαρυωτικών κυττάρων και των παρασίτων, αντίστοιχα
- Μικροσκόπιο για την μέτρηση των παρασίτων και μακροφάγων
- Δυναμοποιητή για την κρούση των σκευασμάτων
- Ζυγός ακριβείας.

### 2.2.5 Διάλυμα

Στο πλαίσιο της παρασκευής του PBS έγινε χρήση απιονισμένου νερού, το οποίο είχε αποσταχθεί δις (dd H<sub>2</sub>O).

<b>PBS pH 7.4 (1 L), 10X</b>	
NaCl	80g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	14.4g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.4g
KCl	2g

### 2.2.6 Παρασιτικά στελέχη & Κυτταρική σειρά των μακροφάγων

Όσον αφορά τα παρασιτικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν αυτά είναι τα κάτωθι:

- *Leishmania infantum*, το οποίο εμφανίζει ανθεκτικότητα στην υφιστάμενη θεραπεία με τη χρήση συνθετικών αλάτων πεντασθενούς αντιμονίου,
- *Leishmania infantum*, το οποίο εμφανίζει ευαισθησία στην υφιστάμενη θεραπεία,

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε είναι αυτή των μακροφάγων από ποντικό J774.1 της ATCC<sup>17</sup>.

### 2.2.7 Ομοιοπαθητικές ουσίες

Οι ομοιοπαθητικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι κάτωθι:

- *Andrographis paniculata*,
- *Antimonium crudum* (I και II),
- και *Ferrum arsenicum*

<sup>17</sup> American Type Culture Collection, Manassas, VA

Τις παραπάνω ουρίες τις προμηθευτήκαμε από τη μονάδα παραγωγής ομοιοπαθητικών φαρμάκων της εταιρίας Korres. Οι ουσίες αυτές ήταν ήδη δυναμοποιημένες σε διάφορες δυναμοποιήσεις και διαλυτοποιημένες με αλκοόλη 50%. Για την παραγωγή των δυναμοποιήσεων που επιθυμούσαμε για τα πειράματά μας πραγματοποιήθηκαν τρεις απόπειρες για την παρασκευή τους.

Η πρώτη απόπειρα αφορούσε την τελική δυναμοποίηση των σκευασμάτων με κρούσεις σε δυναμοποιητή σύμφωνα με τις αρχές της Ομοιοπαθητικής από την ομάδα Korres του Naxos Apothecary. Στη δεύτερη οι ουσίες ήταν ήδη έτοιμες σε τελικές δυναμοποιήσεις για τα επιθυμητά πειράματα, και τέλος η τρίτη απόπειρα ήταν με σκευάσματα των οποίων οι τελικές δυναμοποιήσεις έγιναν με χειροκίνητες κρούσεις στο εργαστήριο Ανοσολογίας Λοιμώξεων του ΕΙΠ.

#### **2.2.7.1 Παρασκευή διαλυτοποιήσεων των ομοιοπαθητικών σκευασμάτων**

Κατά την πρώτη δοκιμή των πειραμάτων οι ουσίες οι οποίες προμηθευτήκαμε ήταν οι ακόλουθες, με τις αντίστοιχες δυναμοποιήσεις:

Για τις πρωμαστιγωτές και ενδοκυτταρικές μορφές των παρασίτων,

- *Andrographis paniculata* : 5cH, 6 cH, 7 cH, 8 cH, 9 cH, 10 cH, 11 cH, 49 cH, 99 cH και 149 cH
- *Ferrum arsenicum* : 28 cH, 29 cH, 30 cH, 49 cH, 99 cH και 149 cH
- *Antimonium crudum I* : 10 cH, 11 cH, 12 cH, 49 cH, 99 cH και 149 cH
- *Antimonium crudum II* : 49 cH, 99 cH και 149 cH

Οι παραπάνω διαλυτοποιήσεις έγιναν με διαλύτη την αιθανόλη. Εν συνεχεία, για τις τελικές επιθυμητές δυναμοποιήσεις των σκευασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη εκτέλεση των πειραμάτων , έγινε αραιώση 1/100 με απεσταγμένο νερό (purified water) σε αποστειρωμένα φιαλίδια. Ακολούθησε δυναμοποίηση με κρούση των φιαλιδίων σε δυναμοποιητή στο εργαστήριο του Naxos Apothecary. Τα τελικά πλέον σκευάσματα προστέθηκαν εντός ολίγων ορών από την παρασκευή τους στις καλλιέργειες των κυττάρων.

Τα διαλύματα που προέκυψαν φαίνονται παρακάτω:

- *Andrographis paniculata* : 6cH, 7 cH, 8 cH, 9 cH, 10 cH, 11 cH, 12 cH, 50 cH, 100 cH και 150 cH

- *Ferrum arsenicum* : 29 cH, 30 cH, 31 cH, 50 cH, 100 cH και 150 cH
- *Antimonium crudum I* : 11 cH, 12 cH, 13 cH, 50 cH, 100 cH και 150 cH
- *Antimonium crudum II* : 50 cH, 100 cH και 150 cH.

Στη δεύτερη πειραματική δοκιμή προμηθευτήκαμε τα ομοιοπαθητικά σκευάσματα (ήδη δυναμοποιημένα) στις τελικές αναλογίες που επιθυμούσαμε και έτοιμα για χρήση. Τα σκευάσματα που παραλήφθηκαν ήταν τα ακόλουθα:

Για τις προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου,

- *Andrographis paniculata*: 6cH, 7 cH, 8 cH και 9 cH
- *Ferrum arsenicum*: 29 cH, 30 cH και 31 cH
- *Antimonium crudum I*: 11 cH, 12 cH, 13 cH και 14 cH
- *Antimonium crudum II*: 11 cH, 12 cH, 13 cH, 14 cH, 50 cH, 100 cH και 150 cH.

Και για τις ενδοκυττάρειες μορφές του παρασίτου,

- *Andrographis paniculata*: 4 cH, 5 cH, 6 cH, 7 cH, 8 cH, 11 cH, 12 cH, 13 cH, 29 cH, 30 cH και 31 cH
- *Ferrum arsenicum*: 10 cH, 11 cH, 12 cH, 13 cH, 14 cH, 29 cH, 30 cH και 31 cH
- *Antimonium crudum I*: 11 cH, 12 cH και 13 cH
- *Antimonium crudum II*: 5 cH, 6 cH και 7 cH.

Οι τελικές δυναμοποιήσεις έγιναν από τα κεντρικά εργαστήρια της εταιρίας Korres με τη χρήση δυναμοποιητή και διαλυμένα σε purified water. Η προσθήκη τους έγινε 24 ώρες μετά από την παρασκευή τους στις καλλιέργειες των κυττάρων.

Στην τελευταία πειραματική απόπειρα τα σκευάσματα παρελήφθησαν στις αρχικές δυναμοποιήσεις:

Για τις προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου,

- *Andrographis paniculata*: 5 cH, 6 cH και 7 cH
- *Ferrum arsenicum*: 28 cH, 29 cH και 30 cH
- *Antimonium crudum I*: 10 cH, 11 cH και 12 cH.

Για τις ενδοκυττάρειες μορφές του παρασίτου,

- *Andrographis paniculata*: 3 cH, 4 cH, 5 cH, 6 cH, 7 cH ,10 cH, 11 cH και 12 cH
- *Ferrum arsenicum*: 10 cH, 11 cH και 12 cH
- *Antimonium crudum I*: 10 cH, 11 cH και 12 cH.

Για τις τελικές δυναμοποιήσεις των παραπάνω σκευασμάτων έγινε αραιώση 1/100 με απεσταγμένο νερό σε αποστειρωμένα φιαλίδια. Τα φιαλίδια αυτά υπέστησαν δέκα χειροκίνητες κάθετες κρούσεις. Έτσι, οι τελικές δυναμοποιήσεις προέκυψαν ως εξής:

Αυτές που αφορούσαν τις προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου :

- *Andrographis paniculata*: 6 cH, 7 cH και 8 cH
- *Ferrum arsenicum*: 29 cH, 30 cH και 31 cH
- *Antimonium crudum I*: 11 cH, 12 cH και 13 cH.

Αυτές που αφορούσαν τις αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου:

- *Andrographis paniculata*: 4 cH, 5 cH, 6 cH, 7 cH, 8 cH ,11 cH, 12 cH και 13 cH
- *Ferrum arsenicum*: 11 cH, 12 cH και 13 cH
- *Antimonium crudum I*: 11 cH, 12 cH και 13 cH.

Εκτός από τις ομοιοπαθητικές ουσίες που προσθέσαμε για να παρατηρήσουμε την αντιλεϊσμανιακή τους δράση, χρησιμοποιήσαμε επίσης και την ουσία *Antimonium crudum II*, μη δυναμοποιημένη, αραιωμένη στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις: 20 μM, 10 μM, 5 μM, 2.5 μM και 1 μM.

### 2.2.8 Αμφοτεροκίνη Β

Η αμφοτεροκίνη Β (AmB) προστέθηκε σαν θετικός μάρτυρας τόσο στις ανθεκτικές, όσο και στις ευαίσθητες στη θεραπεία προμαστιγωτές και ενδοκυττάριας μορφές του παρασίτου της λεϊσμανίασης σε συγκεντρώσεις 1 μM, 2,5 μM, 5μM, 10μM και 20 μM.

## 2.3 Πειραματικές Μέθοδοι

### 2.3.1 Κυτταροκαλλιέργειες

Οι προμαστιγωτές μορφές *L. Infantum* καλλιεργηθήκαν εντός θρεπτικού υλικού RPMI-1640, που είχε εμπλουτιστεί με 10% FBS, 10mM ρυθμιστικό διάλυμα HEPES και με τις αντιβιοτικές ουσίες πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (τελικής συγκέντρωσης 100 U/ml). Η διατήρηση των παρασίτων απαιτεί θερμοκρασία 25°C, καθώς και την απουσία CO<sub>2</sub>. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η συλλογή των παρασίτων κατά τη στατική φάση της ανάπτυξής τους, η οποία συμπίπτει με την 5<sup>η</sup>-6<sup>η</sup> ημέρα της πραγματοποιηθείσας καλλιέργειας. Σε αυτή τη φάση ο αριθμός των παρασίτων

ανέρχεται σε  $2-2.5 \times 10^7$  ανά ml. Η διατήρηση τους για μικρό διάστημα πρέπει να γίνει σε διάλυμα RPMI/20% FBS/10% DMSO στους  $-80^\circ \text{C}$ . Αν είναι επιθυμητή η διατήρηση τους για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, θα πρέπει να διατηρηθούν σε υγρό άζωτο.

Η καλλιέργεια των μακροφάγων J774.1 έγινε παρομοίως εντός θρεπτικού υλικού RPMI-1640, που είχε εμπλουτιστεί με 10% FBS, 10mM ρυθμιστικό διάλυμα HEPES και με τις αντιβιοτικές ουσίες πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (τελικής συγκέντρωσης 100 U/ml) και απαιτεί ποσότητα  $4 \times 10^5$  μακροφάγα ανά ml. Η επώαση πραγματοποιείται σε κλίβανο με σταθερή θερμοκρασία  $37^\circ \text{C}$  και ατμόσφαιρα 5%  $\text{CO}_2$ . Τα μακροφάγα διατηρούνται περίπου για 7 ημέρες, έως ότου καλυφθεί ο τάπητας της φλάσκας κατά προσέγγιση στο 80%. Ο χρόνος που απαιτούν τα μακροφάγα για να διπλασιαστούν ανέρχεται περίπου σε 24 ώρες. Ζωντανά είναι εκείνα που εξακολουθούν να είναι προσκολλημένα στην επιφάνεια του τάπητα, ενώ νεκρά είναι τα αιωρούμενα εντός του υλικού της καλλιέργειας. Κατά τη στατική φάση της ανάπτυξης η ποσότητα τους ανέρχεται σε  $2 \times 10^6$  μακροφάγα ανά ml. Κατά το στάδιο της ανακαλλιέργειας πραγματοποιείται αρχικά απομάκρυνση του υπερκείμενου υλικού, γιατί σε αυτό περιέχονται τα νεκρά μακροφάγα και στη συνέχεια προστίθεται νέο υλικό. Με τη χρήση του ξύστη, πραγματοποιείται η ανάκτηση των ζωντανών μακροφάγων που στη συνέχεια θα εμβολιαστούν στη νέα κυτταροκαλλιέργεια. Αντίστοιχα, η διατήρηση τους για μικρό διάστημα πραγματοποιείται σε διάλυμα RPMI/20% FBS/10% DMSO στους  $-80^\circ \text{C}$ . Αν είναι επιθυμητή η διατήρηση τους για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, θα πρέπει να διατηρηθούν σε υγρό άζωτο. Η περισυλλογή τους πραγματοποιείται μέσω φυγοκέντρωσης στα 1.000 rpm για 10 λεπτά και σε θερμοκρασία δωματίου.

### **2.3.2 In vitro έλεγχος επιβίωσης και πολλαπλασιασμού μέσω της μεθόδου Alamar Blue**

Η Alamar Blue (ρεσαζουρίνη) αποτελεί μια χρωστική ουσία, η οποία χρησιμοποιείται κατά κόρον σε πειραματικές δοκιμασίες που περιλαμβάνουν την επώαση κυττάρων με την προσθήκη ουσιών και έχει αξιοποιηθεί σε διάφορες πτυχές της παρακολούθησης της κυτταρικής ανάπτυξης και βιωσιμότητας, της απόπτωσης, της λειτουργίας και ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, στην κυτταροτοξικότητα και στη δοκιμή της αντιμικροβιακής ευαισθησίας. Καθώς η χρωστική ουσία δέχεται

ηλεκτρόνια από τα μεταβολικά ενδιάμεσα του ζωντανού κύτταρου, η ρεσαζουρίνη μεταβάλλεται από την οξειδωμένη, μη φθορίζουσα, μπλε κατάσταση στην ανηγμένη, φθορίζουσα, ροζ κατάσταση (Rampersad, 2012). Η εν λόγω μέθοδος χρησιμοποιήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας πειραματικής διαδικασίας για την αξιολόγηση της επιβίωσης και του πολλαπλασιασμού τόσο των προμαστιγωτών και ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών της *Leishmania*.

### **2.3.2.1. Έλεγχος κυτταρικής επιβίωσης με τη μέθοδο Alamar blue σε προμαστιγωτές μορφές παρασίτων**

Σε πλάκα κυτταροκαλλιέργειας επιστρώθηκαν τα προμαστιγωτά παράσιτα. Για την επίστρωση απαιτήθηκαν  $3125 \times 10^3$  παράσιτα/φρεάτιο ( $2.5 \times 10^6$  παράσιτα/ml), τα οποία συλλέχθηκαν στη στατική φάση ανάπτυξης όπου ο πλυθυσμός τους είναι σχετικά σταθερός ( $2.5 \times 10^7$  παράσιτα/ml). Στη συνέχεια έγινε προσθήκη των ομοιοπαθητικών ουσιών. Η κάθε δυναμοποιημένη ομοιοπαθητική ουσία τοποθετήθηκε ανα τριπλέτα στα φρεάτια της πλάκας. Ο συνολικός όγκος στο κάθε φρεάτιο ήταν 200 μl. Η ομοιοπαθητική ουσία απετέλεσε το 20% του τελικού όγκου, δηλαδή 40 μl, ενώ το εναιώρημα των παρασίτων που προστέθηκε ήταν 160μl. Έγινε επίσης χρήση μαρτύρων. Ως μάρτυρας ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε τριπλέτα φρεατίων στα οποία έγινε προσθήκη παρασίτων μόνο με υλικού κυτταροκαλλιέργειας PRPMI -1640 χωρίς ομοιοπαθητική ουσία, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας προστέθηκε σκέτο υλικό κυτταροκαλλιέργειας απουσία παρασίτων και ουσίας. Ακολούθησε προσθήκη συμπληρωματικής δόσης ομοιοπαθητικών ουσιών, ίση με το 1% του συνολικού όγκου σε κάθε φρεάτιο (2μl ουσίας/φρεάτιο) και έπειτα επώασης στους 25 °C απουσία CO<sub>2</sub> για επιπλέον 48 ώρες. Ύστερα τοποθετήθηκε διάλυμα χρωστικής Alamar blue 20μl, και μετά από 24 ώρες έγινε φωτομέτρηση της πλάκας σε Elisa Plate Reader στα 570nm και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων σε σχέση με τις τιμές των οπτικών απορροφήσεων που προέκυψαν.

### **2.3.2.2. Έλεγχος κυτταρικής επιβίωσης με τη μέθοδο Alamar blue σε ενδοκυτταρικές μορφές παρασίτων**

Σε πλάκα κυτταροκαλλιέργειας μετρήθηκαν και επιστρώθηκαν μακροφάγα κυτταρικής σειράς J774.1, με αριθμό  $8 \times 10^4$  ανα φρεάτιο δηλαδή  $4 \times 10^5$  κύτταρα/ml. Ο

όγκος που προστέθηκε σε κάθε φρεάτιο ήταν 100 μl από το εναιώρημα κυττάρων και 100 μl από υλικό κυτταροκαλλιέργειας RPMI -1640. Τα μακροφάγα επώαστηκαν σε κλίβανο στους 37°C, σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> για 24 ώρες. Μετά απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, και προστέθηκαν τα προμαστιγωτά παράσιτα στην πλάκα με τα μακροφάγα, αφού πρώτα μετρήθηκαν. Η ποσότητα που απαιτήθηκε ήταν 16 x 10<sup>5</sup> ανά φρεάτιο, δηλαδή 8 x 10<sup>6</sup> παράσιτα/ml. Ακολούθησε επώαση στους 37°C, σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> για άλλες 24 ώρες. Σε αυτό το διάστημα τα παράσιτα εισχώρησαν στα μακροφάγα και τα επιμόλυναν. Το υπερκείμενο υλικό αφαιρέθηκε και έγινε έκπλυση των φρεατίων με σκοπό την απομάκρυνση των ελεύθερων παρασίτων που δεν εισέβαλαν στα μακροφάγα. Έγινε χρήση αποστειρωμένου διαλύματος PBS και η έκπλυση επαναλήφθηκε τρεις φορές. Μετά προστέθηκαν 160μl θρεπτικό υλικό RPMI ανα φρεάτιο. Το PBS όπως και το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήσαμε είχε παραμείνει στο υδατόλουτρο στους 37 °C, έτσι ώστε να μην γίνει αποκόλληση των μακροφάγων από τα τοιχώματα της πλάκας. Ακολούθησε προσθήκη των ομοιοπαθητικών ουσιών στις διάφορες δυναμοποιήσεις ανά τριπλετα ίση με το 20% του τελικού όγκου μέσα στο φρεάτιο, δηλαδή 40μl. Έγινε επώαση για 24 ώρες στους 37°C, σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub>. Μετά το πέρας των 24 ωρών τα μολυσμένα μακροφάγα ενισχύθηκαν με επιπλέον συμπληρωματική δόση ομοιοπαθητικών ουσιών ίση με το 1% του τελικού όγκου ανα φρεάτιο (2μl) και έγινε επώαση για επιπλέον 48-72 ώρες στους 37°C, σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub>. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και έγινε προσθήκη διαλύματος 0.01% SDS σε PBS 1x σε όγκο 100 μl ανά φρεάτιο. Η πλάκα τοποθετήθηκε σε επωαστικό κλίβανο για τουλάχιστον 30 λεπτά στους 37°C, σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> για να σπάσει η μεμβράνη των μακροφάγων και να γίνει απελευθέρωση των αμαστιγωτών μορφών των παρασίτων στην πλάκα. Ύστερα προστέθηκε θρεπτικό υλικό Sneider's με 20% FBS 100μl σε κάθε φρεάτιο. Οι πλάκα τυλίχτηκε με φιλμ σφράγισης και επώαστηκαν στους 25 °C για 48 ώρες. Τέλος έγινε προσθήκη του διαλύματος Alamar blue 20μl ανά φρεάτιο, η πλάκα επώαστηκε στους 25 °C και μετά από 24 ώρες έγινε φωτομέτρηση σε Elisa Plate Reader στα 570nm και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων σε σχέση με τις τιμές των οπτικών απορροφήσεων που προέκυψαν.

## Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα

### 3.1 Δράση ουσιών έναντι ευαίσθητων ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών παρασίτων *L. Infantum*

#### 3.1.1 Δράση της ουσίας *Antimonium crudum I (AC I)*

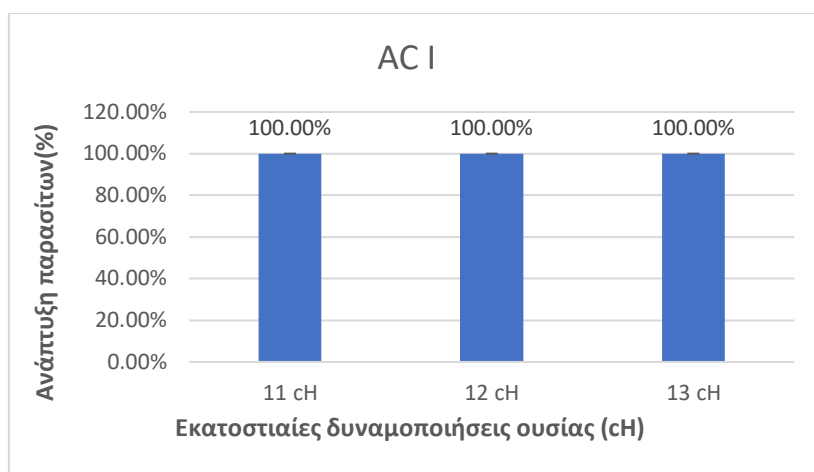
Οι αρχικές δυναμοποιήσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση των παρακάτω πειραμάτων ήταν οι 10 cH, 11 cH και 12 cH. Τα διαλύματα δυναμοποιήθηκαν με κρούσεις σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής. Τα τελικά σκευάσματα προέκυψαν στις δυναμοποιήσεις 11 cH, 12 cH και 13 cH (βλ. Πίν. 1). Αυτά ελέγχθηκαν για την αντιλειτουργική τους δράση στις προς εξέταση ευαίσθητες ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *L. infantum*.

*Πίνακας 1. Αντιλειτουργική δράση ουσίας Antimonium crudum I (ACI) που ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις 11 cH, 12 cH και 13 cH. Τα αποτελέσματα της αντιλειτουργικής της δράσης αξιολογήθηκαν με τη μέθοδο Alamar blue. Τα αποτελέσματα προέκυψαν από επανάληψη ανεξάρτητων πειραμάτων*

Ομοιοπαθητική ουσία	Εκατοστιαίες δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)	Ανάπτυξη ενδοκυτταρικής μορφής παρασίτου ευαίσθητου <i>L. Infantum</i> στην υπάρχουσα θεραπεία (%)
<i>Antimonium crudum I (AC I)</i>	11 cH	100%
	12 cH	100%
	13 cH	100%

Στις παραπάνω δυναμοποιήσεις του *Antimonium crudum I (AC I)* από 11 cH έως και 13 cH που εξετάστηκαν, διαπιστώθηκε πλήρης ανάπτυξη των αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου σε ποσοστό 100 % (βλ. Γράφ. 1). Επομένως η προς εξέταση ουσία δεν είχε κάποια αντιπαρασιτική δράση.





Γράφημα 1. Απεικόνιση της ανάπτυξης (%) των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L.infantum* ευαίσθητου προς την υπάρχουσα θεραπεία ύστερα από την προσθήκη της προς εξέταση ομοιοπαθητικής ουσίας *Antimonium crudum I* (AC I) σε διάφορες δυναμοποιήσεις. Η πλήρης ανάπτυξη των αμαστιγωτών μορφών των παρασίτων αντιστοιχεί στο 100%. Επομένως η τιμή 100 % αποτελεί το θετικό μάρτυρα ανάπτυξης. Αντίθετα, η πλήρης αναστολή τους αντιστοιχεί στο 0%.

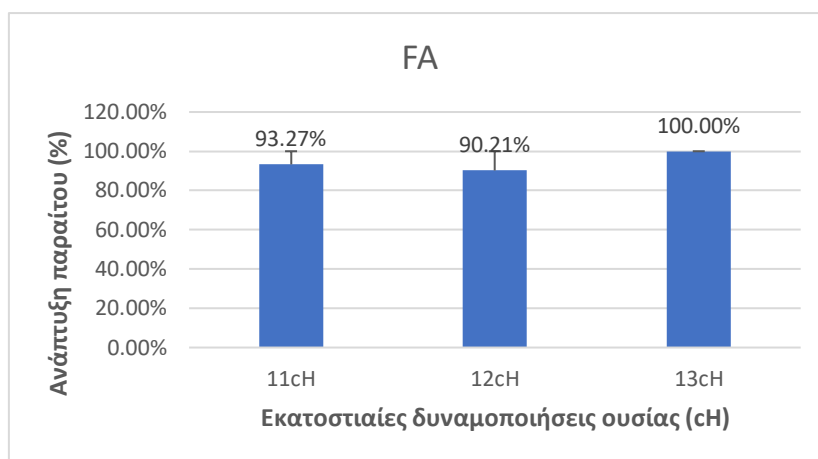
### 3.1.2 Δράση της ουσίας *Ferrum arsenicum* (FA)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση των παρακάτω πειραμάτων ήταν οι 10 cH, 11 cH και 12 cH (βλ. Πίν. 2). Τα διαλύματα δυναμοποιήθηκαν με κρούσεις σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής. Τα τελικά σκευάσματα προέκυψαν στις δυναμοποιήσεις 11 cH, 12 cH και 13 cH. Αυτά ελέγχθηκαν για την αντιλειτουργική τους δράση στις προς εξέταση ευαίσθητες ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *L.infantum*.

Πίνακας 2. Αντιλειτουργική δράση ουσίας *Ferrum arsenicum* (FA) που ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις 11 cH, 12 cH και 13 cH. Τα αποτελέσματα της αντιλειτουργικής της δράσης αξιολογήθηκαν με τη μέθοδο *Alatar blue*. Τα αποτελέσματα προέκυψαν από επανάληψη ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική ουσία	Εκατοστιαίες δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)	Ανάπτυξη ενδοκυτταρικής μορφής παρασίτου <i>L. Infantum</i> ευαίσθητο στην υπάρχουσα θεραπεία (%)
<i>Ferrum arsenicum</i> (FA)	11 cH	93.27%
	12 cH	90.21%
	13 cH	100.00%

Στις παραπάνω δυναμοποιήσεις του *Ferrum arsenicum* (FA) που εξετάστηκαν διαπιστώθηκε πλήρης ανάπτυξη των αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου. Επομένως η προς εξέταση ουσία δεν είχε κάποια αντιπαρασιτική δράση. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι η μικρότερη δυνατή αναστολή στην ανάπτυξη των παρασίτων που παρατηρήθηκε ήταν στη δυναμοποίηση 12 cH σε ποσοστό 9.79 % (βλ. Γράφ. 2).



Γράφημα 2. Απεικόνιση της ανάπτυξης (%) των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L. infantum* ευαίσθητου προς την υπάρχουσα θεραπεία ύστερα από την προσθήκη της προς εξέταση ομοιοπαθητικής ουσίας *Ferrum arsenicum* (FA) στις δυναμοποιήσεις 11 cH, 12 cH και 13 cH. Η πλήρης ανάπτυξη των αμαστιγωτών μορφών των παρασίτων αντιστοιχεί στο 100%. Επομένως η τιμή 100 % αποτελεί το θετικό μάρτυρα ανάπτυξης. Αντίθετα, η πλήρης αναστολή τους αντιστοιχεί στο 0%.

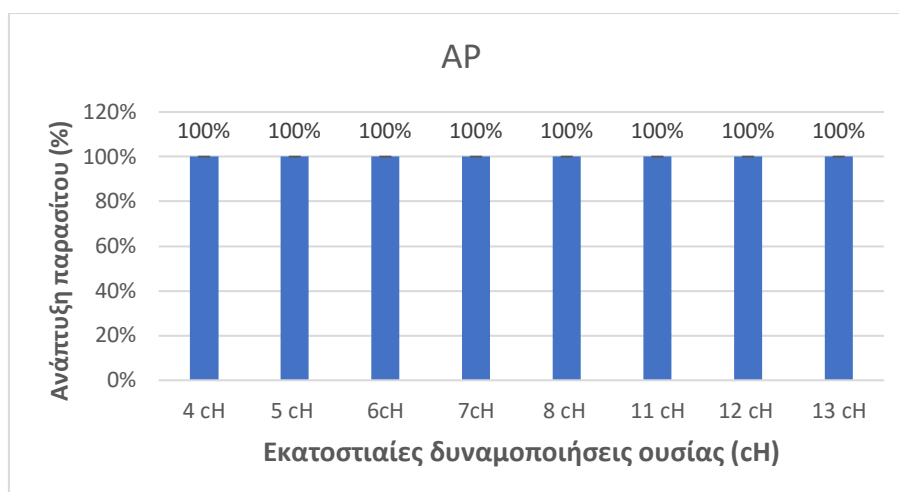
### 3.1.3 Δράση της ουσίας *Andrographis paniculata* (AP)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση των παρακάτω πειραμάτων ήταν οι 3 cH, 4 cH, 5 cH, 6 cH, 7 cH, 10 cH, 11 cH και 12 cH. Τα διαλύματα δυναμοποιήθηκαν με κρούσεις σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής. Τα τελικά σκευάσματα προέκυψαν στις δυναμοποιήσεις 4 cH, 5 cH, 6 cH, 7 cH, 8 cH, 11 cH, 12 cH και 13 cH (βλ. Πίν. 3). Αυτά ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις προς εξέταση ευαίσθητες ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *L. infantum*.

Πίνακας 3. Αντιελίσμμανιακή δράση ουσίας *Andrographis paniculata* (AP) που ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις 4 cH, 5 cH, 6 cH, 7 cH, 8 cH, 11 cH, 12 cH και 13 cH. Τα αποτελέσματα της αντιελίσμμανιακής της δράσης αξιολογήθηκαν με τη μέθοδο *Alatae blue* και προέκυψαν από επανάληψη ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική ουσία	Εκατοστιαίες δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)	Ανάπτυξη ενδοκυτταρικής μορφής παρασίτου <i>L. Infantum</i> ευαίσθητο στην υπάρχουσα θεραπεία (%)
<b><i>Andrographis paniculata</i> (AP)</b>	4 cH	100%
	5 cH	100%
	6 cH	100%
	7 cH	100%
	8 cH	100%
	11 cH	100%
	12 cH	100%
	13 cH	100%

Στις παραπάνω δυναμοποιήσεις του *Andrographis paniculata* (AP) από 4 cH έως και 13 cH που εξετάστηκαν, διαπιστώθηκε πλήρης ανάπτυξη των αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου σε ποσοστό 100 % (βλ. Γράφ. 3). Επομένως η προς εξέταση ουσία δεν είχε κάποια αντιπαρασιτική δράση.



Γράφημα 3. Απεικόνιση της ανάπτυξης (%) των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L. infantum* ευαίσθητου προς την υπάρχουσα θεραπεία ύστερα από την προσθήκη της προς εξέταση ομοιοπαθητικής ουσίας *Andrographis paniculata* (AP) στις δυναμοποιήσεις 4 cH, 5 cH, 6 cH, 7 cH, 8 cH, 11 cH, 12 cH και 13 cH. Η πλήρης ανάπτυξη των αμαστιγωτών μορφών των παρασίτων αντιστοιχεί στο 100%. Επομένως η τιμή 100 % αποτελεί το θετικό μάρτυρα ανάπτυξης. Αντίθετα, η πλήρης αναστολή τους αντιστοιχεί στο 0%.

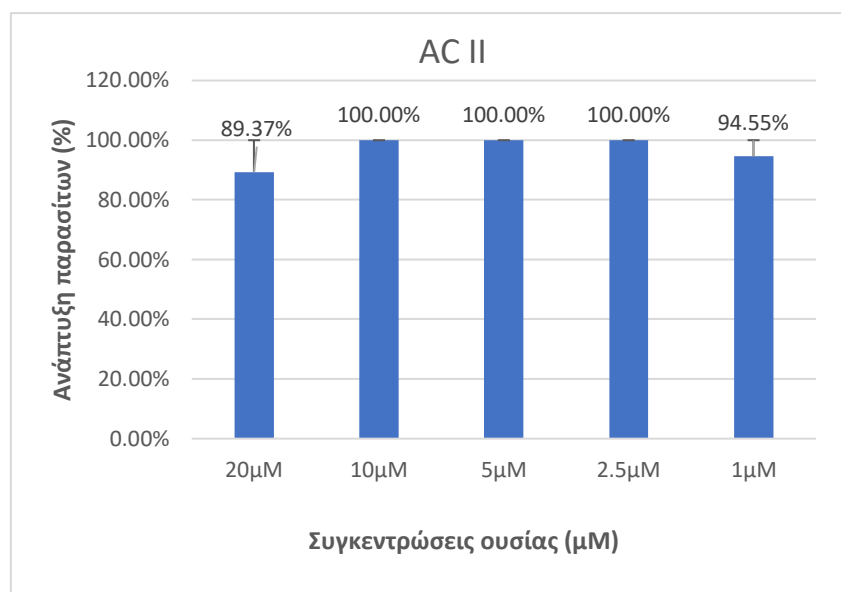
### 3.1.4 Δράση της ουσίας *Antimonium crudum II* (AC II)

Η πυκνή ουσία *Antimonium crudum II* (AC II) ελέγχθηκε για την αντιπαρασιτική της δράση. Προστέθηκε στα ευαίσθητα ενδοκυτταρικά αμαστιγωτά παράσιτα αραιωμένα σε διαλύματα τελικών συγκεντρώσεων 20 μM, 10 Μμ, 5 μM, 2.5 μM και 1 μM (βλ. Πίν. 4).

Πίνακας 4. Αντιλεϊσμμανιακή δράση ουσίας *Antimonium crudum II* (AC II) που ελέγχθηκε στις τελικές συγκεντρώσεις 20 μM, 10 Μμ, 5 μM, 2.5 μM και 1 μM. Τα αποτελέσματα της αντιλεϊσμμανιακής της δράσης αξιολογήθηκαν με τη μέθοδο *Alatae blue* και προέκυψαν από επανάληψη ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ουσία	Συγκεντρώσεις ουσίας (μM)	Ανάπτυξη ενδοκυτταρικής μορφής παρασίτου <i>L. infantum</i> ευαίσθητο στην υπάρχουσα θεραπεία (%)
<b><i>Antimonium crudum II</i> (AC II)</b>	20 μM	89.37%
	10 μM	100%
	5 μM	100%
	2.5 μM	100%
	1 μM	94.55%

Στις παραπάνω συγκεντρώσεις της πυκνής ουσίας *Antimonium crudum II* (AC II) που εξετάστηκαν διαπιστώθηκε πλήρης ανάπτυξη των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L.infantum*. Επομένως η προς εξέταση ουσία δεν είχε κάποια αντιπαρασιτική δράση. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι η μικρότερη δυνατή αναστολή που παρατηρήθηκε ήταν στη συγκέντρωση 20  $\mu$ M σε ποσοστό 89.37 % που είναι πολύ κοντά στο θετικό μάρτυρα (100%) (βλ. Γράφ. 4).



Γράφημα 4. Απεικόνιση της ανάπτυξης (%) των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L.infantum* ευαίσθητου προς την υπάρχουσα θεραπεία ύστερα από την προσθήκη της προς εξέταση ουσίας *Antimonium crudum II* (AC II) στις συγκεντρώσεις 20  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 2.5  $\mu$ M και 1  $\mu$ M. Η πλήρης ανάπτυξη των αμαστιγωτών μορφών των παρασίτων αντιστοιχεί στο 100%. Επομένως η τιμή 100 % αποτελεί το θετικό μάρτυρα ανάπτυξης. Αντίθετα, η πλήρης αναστολή τους αντιστοιχεί στο 0%.

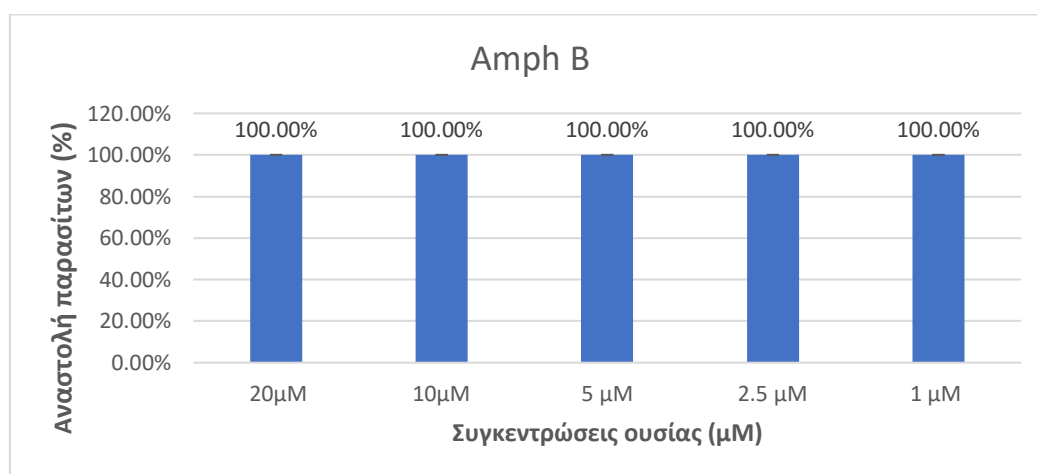
### 3.1.5 Δράση της ουσίας Αμφοτερικίνη Β (Amph B)

Το φάρμακο Αμφοτερικίνη Β (Amph B) χρησιμοποιήθηκε ως ουσία αναφοράς στα πειράματα που αφορούν τον έλεγχο της αντιπαρασιτικής δράσης των παραπάνω ουσιών έναντι στις ευαίσθητες προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *L.infantum*. Ο έλεγχος της δράσης της Αμφοτερικίνη Β (Amph B) έγινε με τη μέθοδο Alamar blue. Η ουσία προστέθηκε στα προμαστιγωτά παράσιτα αραιωμένα σε διαλύματα τελικών συγκεντρώσεων 20  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 2.5  $\mu$ M και 1  $\mu$ M (βλ. Πίν. 5).

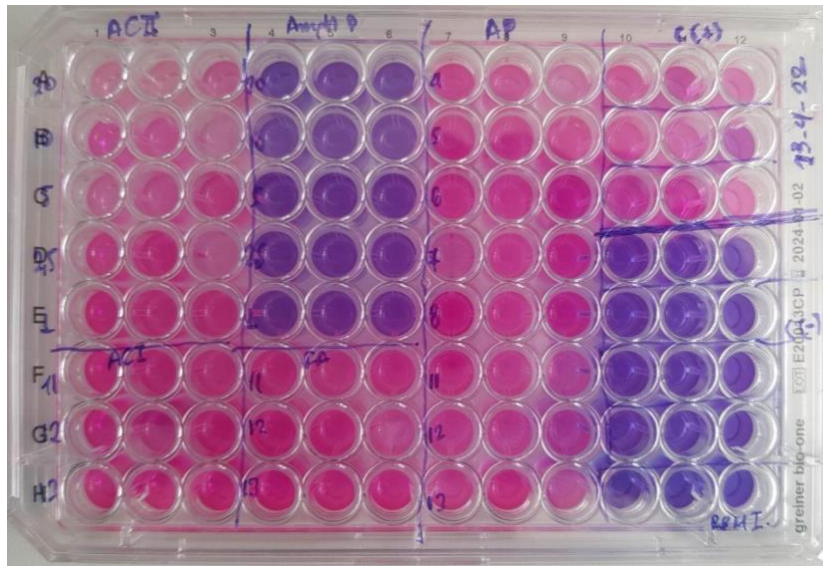
Πίνακας 5. Αντιλειτουργική δράση ουσίας Αμφοτερικίνης Β (Amph B) που ελέγχθηκε στις τελικές συγκεντρώσεις 20  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 2.5  $\mu\text{M}$  και 1  $\mu\text{M}$  σε ευαίσθητες προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *L.infantum*. Τα αποτελέσματα της αντιλειτουργικής της δράσης αξιολογήθηκαν με τη μέθοδο Alamar blue και προέκυψαν από επανάληψη ανεξάρτητων πειραμάτων

Ουσία	Συγκεντρώσεις ουσίας ( $\mu\text{M}$ )	Αναστολή ενδοκυτταρικής μορφής παρασίτου <i>L. Infantum</i> ευαίσθητο στην υπάρχουσα θεραπεία (%)
<b>Αμφοτερικίνη Β (Amph B)</b>	20 $\mu\text{M}$	100.00 %
	10 $\mu\text{M}$	100.00 %
	5 $\mu\text{M}$	100.00 %
	2.5 $\mu\text{M}$	100.00 %
	1 $\mu\text{M}$	100.00 %

Στις παραπάνω συγκεντρώσεις της ουσίας Αμφοτερικίνης Β (Am B) που εξετάστηκαν για τη δράση τους διαπιστώθηκε πλήρης αναστολή των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L.infantum* (βλ. Γράφ. 5). Η αντιπαρασιτική δράση της ουσίας Αμφοτερικίνης Β (Am B) επιβεβαιώθηκε, καθώς προκάλεσε αναστολή του πολλαπλασιασμού των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών παρασίτων για αυτόν τον λόγο χρησιμοποιείται και ως ουσία αναφοράς.



Γράφημα 5. Απεικόνιση της αναστολής (%) των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L.infantum* ευαίσθητου προς την υπάρχουσα θεραπεία ύστερα από την προσθήκη της ουσίας Αμφοτερικίνης Β (Amph B) στις συγκεντρώσεις 20  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 2.5  $\mu\text{M}$  και 1  $\mu\text{M}$ . Η πλήρης αναστολή των αμαστιγωτών μορφών των παρασίτων αντιστοιχεί στο 100%. Αντίθετα, η πλήρης ανάπτυξη τους αντιστοιχεί στο 0%.



Εικόνα 1. Πλάκα κυτταροκαλλιέργειας στην οποία έχουν προστεθεί οι αμασιγωτές ενδοκυτταρικές μορφές του παρασίτου *L. Infantum* ευαίσθητο στην υπάρχουσα θεραπεία και έχουν επωαστεί με ουσίες σε διάφορες δυναμοποιήσεις και συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα της αντιπαρασιτικής δράσης των παραπάνω ουσιών που προέκυψαν ύστερα από το πέρας των πειραμάτων αξιολογήθηκαν με τη βοήθεια της μεθόδου Alamar blue και της χρωστικής ρεσαζουρίνης. Πιο αναλυτικά, οι ομοιοπαθητικές ουσίες και οι δυναμοποιήσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: Antimonium crudum I (AC I): 11 cH, 12 cH και 13 cH, Andrographis paniculata (AP): 4 cH, 5cH, 6 cH, 7 cH, 8 cH, 11 cH, 12cH και 13 cH, Ferrum arsenicum (FA): 11 cH, 12cH και 13 cH. Και οι ουσίες σε διάφορες συγκεντρώσεις Antimonium crudum II (AC II): 20μM, 10 μM, 5 μM, 2.5 μM και 1 μM και Αμφοτερικίνη Β (Amph B): 20 μM, 10 μM, 5 μM, 2.5 μM και 1 μM. Τέλος χρησιμοποιήθηκε αρνητικός C (-) και θετικός C (+) μάρτυρας.

### 3.2 Δράση ομοιοπαθητικών ουσιών έναντι ευαίσθητων προμαστιγωτών παρασίτων *L. Infantum*.

#### 3.2.1 Πειραματική προσέγγιση με ομοιοπαθητικές ουσίες σε ευαίσθητες προμαστιγωτές μορφές του στελέχους *L. Infantum*.

##### 3.2.1.1 Δράση της ουσίας *Antimonium crudum I (AC I)*

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση των παρακάτω πειραμάτων ήταν οι 10 cH, 11 cH, 12 cH και 13 cH. Τα διαλύματα δυναμοποιήθηκαν με κρούσεις σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής. Τα τελικά σκευάσματα προέκυψαν στις δυναμοποιήσεις 11 cH, 12 cH, 13 cH και 14 cH. Αυτά ελέγχθηκαν για την αντιλειτουργική τους δράση στις προς εξέταση ευαίσθητες προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *L.infantum* (βλ. Πίν. 6).

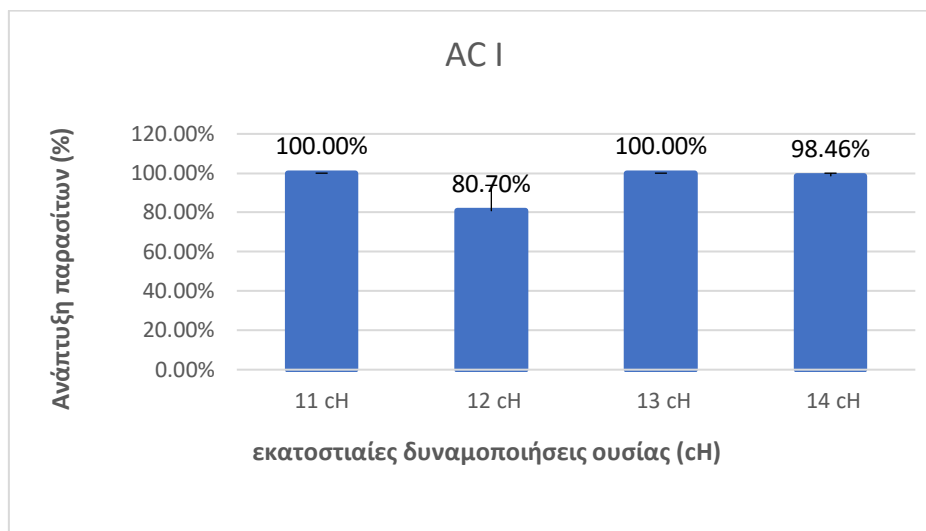
*Πίνακας 6. Αντιλειτουργική δράση ουσίας Antimonium crudum I (ACI) που ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις 11 cH, 12 cH, 13 cH και 14 cH. Τα αποτελέσματα της αντιλειτουργικής της δράσης αξιολογήθηκαν με τη μέθοδο Alatar blue. Τα αποτελέσματα προέκυψαν από επανάληψη ανεξάρτητων πειραμάτων.*

Ομοιοπαθητική ουσία	Εκατοστιαίες δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)	Ανάπτυξη προμαστιγωτής μορφής παρασίτου <i>L. Infantum</i> ευαίσθητο στην υπάρχουσα θεραπεία (%)
<i>Antimonium crudum I (AC I)</i>	11 cH	100.00%
	12 cH	80.70%
	13 cH	100.00%
	14 cH	98.46%

Στις παραπάνω δυναμοποιήσεις του *Antimonium crudum I (ACI)* από 11 cH έως και 14 cH που εξετάστηκαν, διαπιστώθηκε πλήρης ανάπτυξη των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου σε ποσοστό. Επομένως η προς εξέταση ουσία δεν είχε κάποια αντιπαρασιτική δράση. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι η μικρότερη δυνατή



αναστολή που παρατηρήθηκε στην ανάπτυξη των παρασίτων ήταν στη δυναμοποίηση 12 cH σε ποσοστό 19.3 % (βλ. Γράφ. 6).



Γράφημα 6. Απεικόνιση της ανάπτυξης (%) των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L.infantum* ευαίσθητου προς την υπάρχουσα θεραπεία ύστερα από την προσθήκη της προς εξέταση ομοιοπαθητικής ουσίας Antimonium crudum I (AC I) στις δυναμοποιήσεις 11 cH, 12 cH, 13 cH και 14 cH. Η πλήρης ανάπτυξη των προμαστιγωτών μορφών των παρασίτων αντιστοιχεί στο 100%. Επομένως η τιμή 100 % αποτελεί το θετικό μάρτυρα ανάπτυξης. Αντίθετα, η πλήρης αναστολή τους αντιστοιχεί στο 0%.

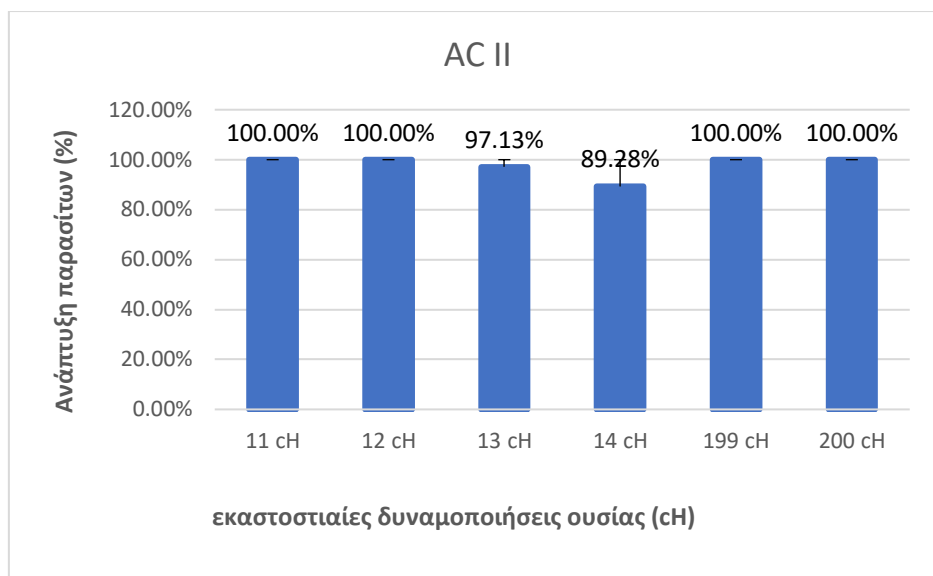
### 3.2.1.2 Δράση της ουσίας Antimonium crudum II (AC II)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση των παρακάτω πειραμάτων ήταν οι 10 cH, 11 cH, 12 cH, 13 cH, 198 cH και 199 cH. Τα διαλύματα δυναμοποιήθηκαν με κρούσεις σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής. Τα τελικά σκευάσματα προέκυψαν στις δυναμοποιήσεις 11 cH, 12 cH, 13 cH, 14 cH, 199 cH και 200 cH (βλ. Πίν. 7). Αυτά ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμμανιακή τους δράση στις προς εξέταση ευαίσθητες προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *L.infantum*.

Πίνακας 7. Αντιλείσμανιακή δράση ουσίας Antimonium crudum I (ACI) που ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις 11 cH, 12 cH, 13 cH, 14 cH, 199 cH και 200 cH. Τα αποτελέσματα της αντιλείσμανιακής της δράσης αξιολογήθηκαν με τη μέθοδο Alatar blue. Τα αποτελέσματα προέκυψαν από επανάληψη ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική ουσία	Εκατοστιαίες δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)	Ανάπτυξη προμαστιγωτής μορφής παρασίτου <i>L. Infantum</i> ευαίσθητο στην υπάρχουσα θεραπεία (%)
<i>Antimonium crudum II (AC II)</i>	11 cH	100.00%
	12 cH	100.00%
	13 cH	97.13%
	14 cH	89.28%
	199 cH	100.00%
	200 cH	100.00%

Στις παραπάνω δυναμοποιήσεις του *Antimonium crudum II (AC II)* από 11 cH έως και 200 cH που εξετάστηκαν, διαπιστώθηκε πλήρης ανάπτυξη των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου. Επομένως η προς εξέταση ουσία δεν είχε κάποια αντιπαρασιτική δράση. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι η μικρότερη δυνατή αναστολή που παρατηρήθηκε στην ανάπτυξη των παρασίτων ήταν στη δυναμοποίηση 12 cH σε ποσοστό 19.3 % (βλ. Γράφ. 7).



Γράφημα 7. Απεικόνιση της ανάπτυξης (%) των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L.infantum* ευαίσθητου προς την υπάρχουσα θεραπεία ύστερα από την προσθήκη της προς εξέταση ομοιοπαθητικής ουσίας *Antimonium crudum II* (AC II) στις δυναμοποιήσεις 11 cH, 12 cH, 13 cH, 14 cH, 199 cH και 200 cH. Η πλήρης ανάπτυξη των προμαστιγωτών μορφών των παρασίτων αντιστοιχεί στο 100%. Επομένως η τιμή 100 % αποτελεί το θετικό μάρτυρα ανάπτυξης. Αντίθετα, η πλήρης αναστολή τους αντιστοιχεί στο 0%.

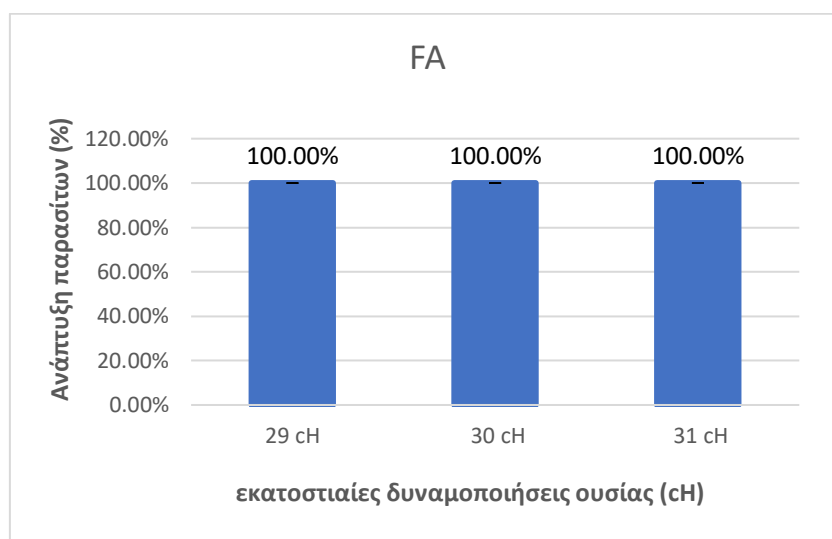
### 3.2.1.3 Δράση της ουσίας *Ferrum arsenicum* (FA)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση των παρακάτω πειραμάτων ήταν οι 28 cH, 29 cH και 30 cH. Τα διαλύματα δυναμοποιήθηκαν με κρούσεις σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής. Τα τελικά σκευάσματα προέκυψαν στις δυναμοποιήσεις 29 cH, 30 cH και 31 cH (βλ. Πίν. 8). Αυτά ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις προς εξέταση ευαίσθητες προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *L.infantum*.

Πίνακας 8. Αντιελμμανιακή δράση ουσίας Ferrum arsenicum (FA) που ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις 29 cH, 30 cH και 31 cH. Τα αποτελέσματα της αντιελμμανιακής της δράσης αξιολογήθηκαν με τη μέθοδο Alatar blue. Τα αποτελέσματα προέκυψαν από επανάληψη ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική ουσία	Εκατοστιαίες δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)	Ανάπτυξη προμαστιγωτής μορφής παρασίτου ευαίσθητου στην υπάρχουσα θεραπεία (%)
<i>Ferrum arsenicum (FA)</i>	29 cH	100.00%
	30 cH	100.00%
	31 cH	100.00%

Στις παραπάνω δυναμοποιήσεις του *Ferrum arsenicum (FA)* από 29 cH έως και 31 cH που εξετάστηκαν, διαπιστώθηκε πλήρης ανάπτυξη των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου σε ποσοστό 100 % (βλ. Γράφ. 8). Επομένως η προς εξέταση ουσία δεν είχε κάποια αντιπαρασιτική δράση.



Γράφημα 8. Απεικόνιση της ανάπτυξης (%) των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L.infantum* ευαίσθητου προς την υπάρχουσα θεραπεία ύστερα από την προσθήκη της προς εξέταση ομοιοπαθητικής ουσίας *Ferrum arsenicum (FA)* στις δυναμοποιήσεις 29 cH, 30 cH και 31 cH. Η πλήρης ανάπτυξη των προμαστιγωτών μορφών των παρασίτων αντιστοιχεί στο 100%. Επομένως η τιμή 100 % αποτελεί το θετικό μάρτυρα ανάπτυξης. Αντίθετα, η πλήρης αναστολή τους αντιστοιχεί στο 0%.

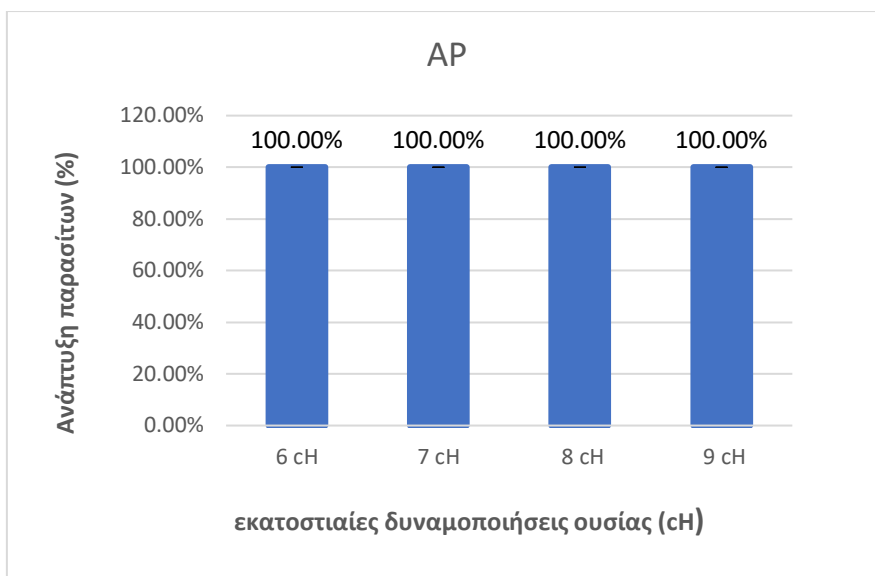
### 3.2.1.4 Δράση της ουσίας *Andrographis paniculata* (AP)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση των παρακάτω πειραμάτων ήταν οι 5 cH, 6 cH, 7 cH και 8 cH. Τα διαλύματα δυναμοποιήθηκαν με κρούσεις σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής. Τα τελικά σκευάσματα προέκυψαν στις δυναμοποιήσεις 6 cH, 7 cH, 8 cH και 9 cH (βλ. Πίν. 9). Αυτά ελέγχθηκαν για την αντιλειτουργική τους δράση στις προς εξέταση ευαίσθητες ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *L.infantum*.

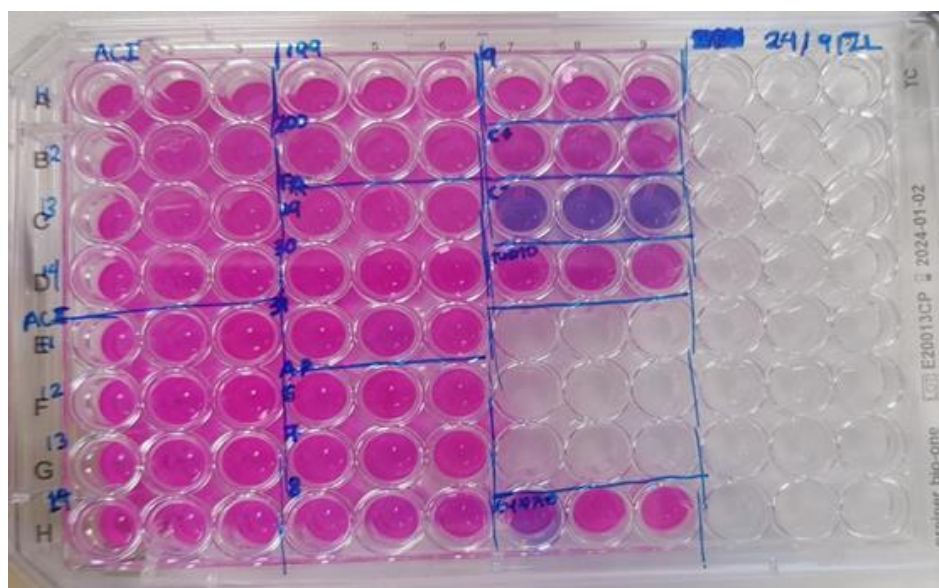
Πίνακας 9. Αντιλειτουργική δράση ουσίας *Andrographis paniculata* (AP) που ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις 6 cH, 7 cH, 8 cH και 9 cH. Τα αποτελέσματα της αντιλειτουργικής της δράσης αξιολογήθηκαν με τη μέθοδο *Alatae blue* και προέκυψαν από επανάληψη ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική ουσία	Εκατοστιαίες δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)	Ανάπτυξη προμαστιγωτής μορφής παρασίτου ευαίσθητου στην υπάρχουσα θεραπεία (%)
<i>Andrographis paniculata</i> (AP)	6 cH	100.00%
	7 cH	100.00%
	8 cH	100.00%
	9 cH	100.00%

Στις παραπάνω δυναμοποιήσεις του *Andrographis paniculata* (AP) από 6 cH έως και 9 cH που εξετάστηκαν, διαπιστώθηκε πλήρης ανάπτυξη των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου σε ποσοστό 100 % (βλ. Γράφ. 9). Επομένως η προς εξέταση ουσία δεν είχε κάποια αντιπαρασιτική δράση.



Γράφημα 9. Απεικόνιση της ανάπτυξης (%) των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L.infantum* ευαίσθητου προς την υπάρχουσα θεραπεία ύστερα από την προσθήκη της προς εξέταση ομοιοπαθητικής ουσίας *Andrographis paniculata* (AP) στις δυναμοποιήσεις 6 cH, 7 cH, 8 cH και 9 cH. Η πλήρης ανάπτυξη των προμαστιγωτών μορφών των παρασίτων αντιστοιχεί στο 100%. Επομένως η τιμή 100 % αποτελεί το θετικό μάρτυρα ανάπτυξης. Αντίθετα, η πλήρης αναστολή τους αντιστοιχεί στο 0%.



Εικόνα 2. Πλάκα κυτταροκαλλιέργειας στην οποία έχουν προστεθεί οι προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *L. Infantum* ευαίσθητο στην υπάρχουσα θεραπεία και έχουν επωαστεί με ουσίες σε διάφορες δυναμοποιήσεις. Τα αποτελέσματα της αντιπαρασιτικής δράσης των παραπάνω ουσιών που προέκυψαν ύστερα από το πέρας των πειραμάτων αξιολογήθηκαν με τη βοήθεια της μεθόδου *Alamar blue* και της χρωστικής ρεσαζουρίνης. Πιο αναλυτικά, οι ομοιοπαθητικές ουσίες και οι δυναμοποιήσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: *Antimonium crudum* I (AC I): 11 cH, 12 cH, 13 cH και 14 cH, *Antimonium crudum* II (AC II): 11 cH, 12 cH, 13 cH, 14 cH, 199 cH και 200 cH, *Andrographis paniculata* (AP): 6 cH, 7 cH, 8 cH και 9 cH, *Ferrum arsenicum* (FA): 29 cH, 30 cH και 31 cH. Τέλος χρησιμοποιήθηκε αρνητικός C (-) και θετικός C (+) μάρτυρας.

### 3.2.2 Επιπλέον πειραματική προσέγγιση με ουσίες έναντι ευαίσθητων προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L. Infantum*

Έγινε επιπλέον μια πειραματική απόπειρα για τη δράση των ουσιών σε ευαίσθητες προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *L. Infantum*. Εκτός από τη δράση των ομοιοπαθητικών ουσιών εκλέχθηκε και η δράση της ουσίας *Antimonium crudum II* (AC II) και της ουσίας αναφοράς Αμφοτερικίνης Β σε διάφορες συγκεντρώσεις.

#### 3.2.2.1 Δράση της ουσίας *Antimonium crudum I* (AC I)

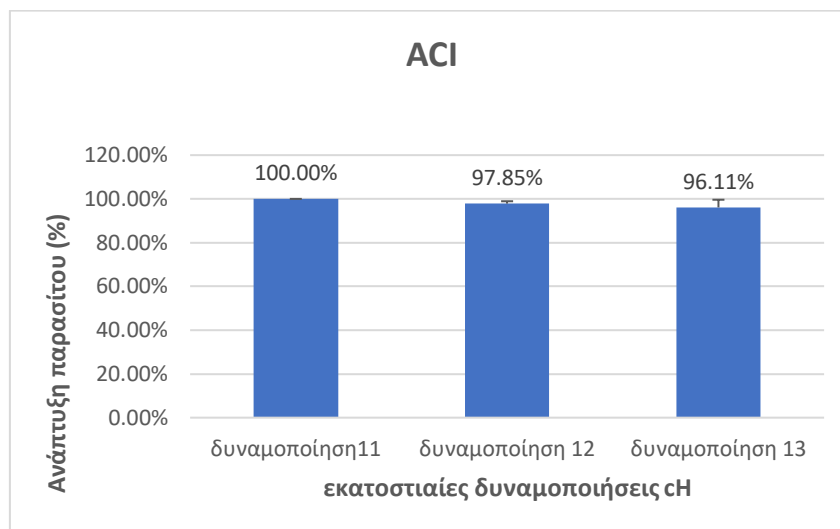
Οι αρχικές δυναμοποιήσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση των παρακάτω πειραμάτων ήταν οι 10 cH, 11 cH και 12 cH. Τα διαλύματα δυναμοποιήθηκαν με κρούσεις σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής. Τα τελικά σκευάσματα προέκυψαν στις δυναμοποιήσεις 11 cH, 12 cH και 13 cH (βλ. Πίν. 10). Αυτά ελέγχθηκαν για την αντιλειτουργική τους δράση στις προς εξέταση ευαίσθητες προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *L.infantum*.

Πίνακας 10. Αντιλειτουργική δράση ουσίας *Antimonium crudum I* (ACI) που ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις 11 cH, 12 cH, 13 cH και 14 cH. Τα αποτελέσματα της αντιλειτουργικής της δράσης αξιολογήθηκαν με τη μέθοδο *Alatar blue*. Τα αποτελέσματα προέκυψαν από επανάληψη ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική ουσία	Εκατοστιαίες δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)	Ανάπτυξη προμαστιγωτής μορφής παρασίτου ευαίσθητου στην υπάρχουσα θεραπεία (%)
<i>Antimonium crudum I</i> (AC I)	11 cH	100.00 %
	12 cH	97.85 %
	13 cH	96.11 %

Στις παραπάνω δυναμοποιήσεις του *Antimonium crudum I* (ACI) από 11 cH έως και 13 cH που εξετάστηκαν, διαπιστώθηκε πλήρης ανάπτυξη των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου. Επομένως η προς εξέταση ουσία δεν είχε κάποια αντιπαρασιτική δράση. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι η μεγαλύτερη δυνατή

αναστολή που παρατηρήθηκε στα προμαστιγωτά παράσιτα ήταν στη δυναμοποίηση 13 cH με ποσοστό ανάπτυξης 96.11 % (βλ. Γράφ. 10).



Γράφημα 10. Απεικόνιση της ανάπτυξης (%) των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L.infantum* ευαίσθητου προς την υπάρχουσα θεραπεία ύστερα από την προσθήκη της προς εξέταση ομοιοπαθητικής ουσίας Antimonium crudum I (ACI) στις δυναμοποιήσεις 11 cH, 12 cH και 13 cH. Η πλήρης ανάπτυξη των προμαστιγωτών μορφών των παρασίτων αντιστοιχεί στο 100%. Επομένως η τιμή 100 % αποτελεί το θετικό μάρτυρα ανάπτυξης. Αντίθετα, η πλήρης αναστολή τους αντιστοιχεί στο 0%.

### 3.2.2.2 Δράση της ουσίας Ferrum arsenicum (FA)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση των παρακάτω πειραμάτων ήταν οι 28 cH, 29 cH και 30 cH. Τα διαλύματα δυναμοποιήθηκαν με κρούσεις σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής. Τα τελικά σκευάσματα προέκυψαν στις δυναμοποιήσεις 29 cH, 30 cH και 31 cH (βλ. Πίν. 11). Αυτά ελέγχθηκαν για την αντιλεισμανιακή τους δράση στις προς εξέταση ευαίσθητες προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *L.infantum*.

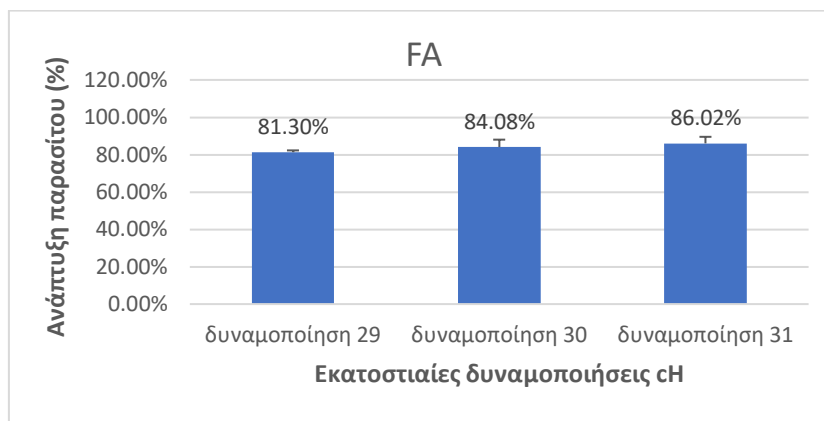
Πίνακας 11. Αντιλεισμανιακή δράση ουσίας Ferrum arsenicum (FA) που ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις 29 cH, 30 cH και 31 cH. Τα αποτελέσματα της αντιλεισμανιακής της δράσης αξιολογήθηκαν με τη μέθοδο Alamar blue.

Ομοιοπαθητική ουσία	Εκατοστιαίες δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)	Ανάπτυξη προμαστιγωτής μορφής παρασίτου ευαίσθητου στην υπάρχουσα θεραπεία (%)
<i>Ferrum arsenicum (FA)</i>	29 cH	81.30 %



	30 cH	84.08 %
	31 cH	86.02 %

Στις παραπάνω δυναμοποιήσεις του *Ferrum arsenicum* (FA) από 29 cH έως και 31 cH που εξετάστηκαν, διαπιστώθηκε πλήρης ανάπτυξη των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου. Επομένως η προς εξέταση ουσία δεν είχε κάποια αντιπαρασιτική δράση. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι η μικρότερη δυνατή αναστολή που παρατηρήθηκε στην ανάπτυξη των παρασίτων ήταν στη δυναμοποίηση 29 cH σε ποσοστό 19.67 % (βλ. Γράφ. 11).



Γράφημα 11. Απεικόνιση της ανάπτυξης (%) των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L.infantum* ευαίσθητου προς την υπάρχουσα θεραπεία ύστερα από την προσθήκη της προς εξέταση ομοιοπαθητικής ουσίας *Ferrum arsenicum* (FA) στις δυναμοποιήσεις 29 cH, 30 cH και 31 cH. Η πλήρης ανάπτυξη των προμαστιγωτών μορφών των παρασίτων αντιστοιχεί στο 100%. Επομένως η τιμή 100 % αποτελεί το θετικό μάρτυρα ανάπτυξης. Αντίθετα, η πλήρης αναστολή τους αντιστοιχεί στο 0%.

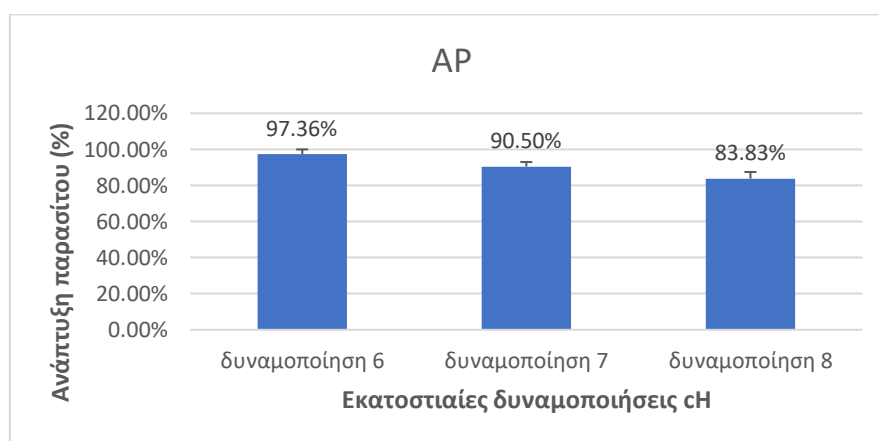
### 3.2.2.3 Δράση της ουσίας *Andrographis paniculata* (AP)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση των παρακάτω πειραμάτων ήταν οι 5 cH, 6 cH και 7 cH. Τα διαλύματα δυναμοποιήθηκαν με κρούσεις σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής. Τα τελικά σκευάσματα προέκυψαν στις δυναμοποιήσεις 6 cH, 7 cH και 8 cH (βλ. Πίν. 12). Αυτά ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις προς εξέταση ευαίσθητες ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *L.infantum*.

Πίνακας 12. Αντιλεϊσμανιακή δράση ουσίας *Andrographis paniculata* (AP) που ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις 6 cH, 7 cH και 8 cH. Τα αποτελέσματα της αντιλεϊσμανιακής της δράσης αξιολογήθηκαν με τη μέθοδο *Alatar blue*

Ομοιοπαθητική ουσία	Εκατοστιαίες δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)	Ανάπτυξη προμαστιγωτής μορφής παρασίτου ευαίσθητου στην υπάρχουσα θεραπεία (%)
<i>Andrographis paniculata</i> (AP)	6 cH	97.36 %
	7 cH	90.50 %
	8 cH	83.83 %

Στις παραπάνω δυναμοποιήσεις του *Andrographis paniculata* (AP) από 6 cH έως και 8cH που εξετάστηκαν, διαπιστώθηκε πλήρης ανάπτυξη των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου. Επομένως η προς εξέταση ουσία δεν είχε κάποια αντιπαρασιτική δράση. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι η μεγαλύτερη δυνατή αναστολή που παρατηρήθηκε στην ανάπτυξη των παρασίτων ήταν στη δυναμοποίηση 8 cH με ποσοστό ανάπτυξης 83.83 % (βλ. Γράφ. 12).



Γράφημα 12. Απεικόνιση της ανάπτυξης (%) των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L.infantum* ευαίσθητου προς την υπάρχουσα θεραπεία ύστερα από την προσθήκη της προς εξέταση ομοιοπαθητικής ουσίας *Andrographis paniculata* (AP) στις δυναμοποιήσεις 6 cH, 7 cH και 8 cH. Η πλήρης ανάπτυξη των προμαστιγωτών μορφών των παρασίτων αντιστοιχεί στο 100%. Επομένως η τιμή 100 % αποτελεί το θετικό μάρτυρα ανάπτυξης. Αντίθετα, η πλήρης αναστολή τους αντιστοιχεί στο 0%.

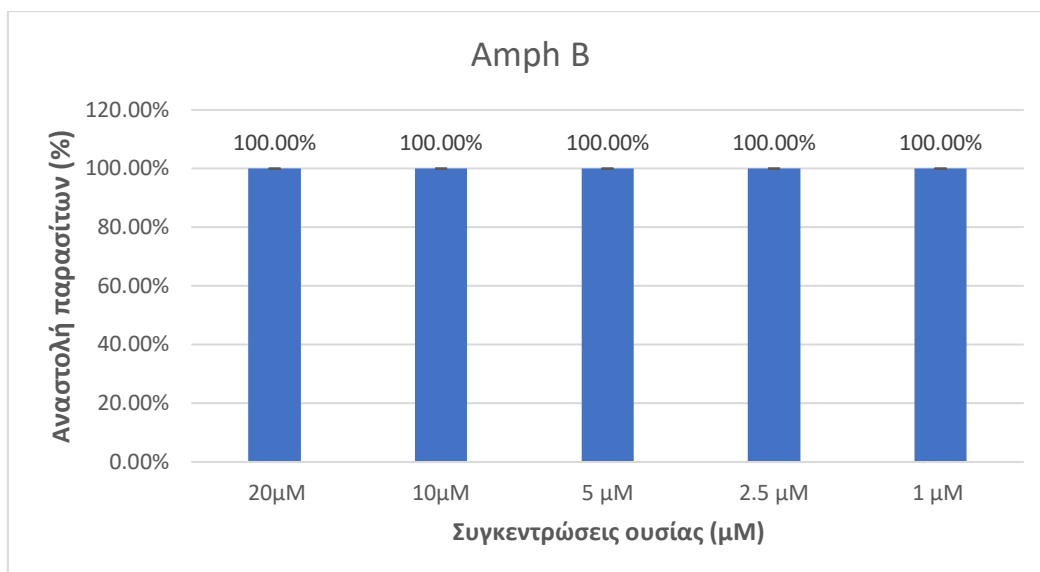
### 3.2.2.4 Δράση της ουσίας Αμφοτερικίνης Β (Amph B)

Το φάρμακο Αμφοτερικίνη Β (Amph B) χρησιμοποιήθηκε ως ουσία αναφοράς στα πειράματα που αφορούν τον έλεγχο της αντιπαρασιτικής δράσης των παραπάνω ουσιών έναντι στις ευαίσθητες προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *L.infantum*. Ο έλεγχος της δράσης της Αμφοτερικίνης Β (Amph B) έγινε με τη μέθοδο Alamar blue. Η ουσία προστέθηκε στα ευαίσθητα προμαστιγωτά παράσιτα αραιωμένη σε διαλύματα τελικών συγκεντρώσεων 20 μΜ, 10 Μμ, 5 μΜ, 2.5 μΜ και 1 μΜ (βλ. Πίν. 13).

Πίνακας 13. Αντιεϊσμανιακή δράση ουσίας Αμφοτερικίνης Β (Amph B) που ελέγχθηκε στις τελικές συγκεντρώσεις 20 μΜ, 10 Μμ, 5 μΜ, 2.5 μΜ και 1 μΜ σε ευαίσθητες προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *L.infantum*. Τα αποτελέσματα της αντιεϊσμανιακής της δράσης αξιολογήθηκαν με τη μέθοδο Alamar blue και προέκυψαν από επανάληψη ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ουσία	Συγκεντρώσεις ουσίας (μΜ)	Αναστολή προμαστιγωτής μορφής παρασίτου <i>L. Infantum</i> ευαίσθητο στην υπάρχουσα θεραπεία (%)
Αμφοτερικίνη Β (Amph B)	20 μΜ	100.00 %
	10 μΜ	100.00 %
	5 μΜ	100.00 %
	2.5 μΜ	100.00 %
	1 μΜ	100.00 %

Στις παραπάνω συγκεντρώσεις της ουσίας Αμφοτερικίνης Β (Amph B) που εξετάστηκαν για τη δράση τους διαπιστώθηκε πλήρης αναστολή των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L.infantum*. Η αντιπαρασιτική δράση της ουσίας Αμφοτερικίνης Β (Amph B) επιβεβαιώθηκε καθώς προκάλεσε αναστολή του πολλαπλασιασμού των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών παρασίτων για αυτόν τον λόγο χρησιμοποιείται και ως ουσία αναφοράς (βλ. Γράφ. 13).



Γράφημα 13. Απεικόνιση της αναστολής (%) των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L. infantum* ευαίσθητου προς την υπάρχουσα θεραπεία ύστερα από την προσθήκη της ουσίας Αμφοτερικίνης Β (*Amph B*) στις συγκεντρώσεις 20 μΜ, 10 Μμ, 5 μΜ, 2.5 μΜ και 1 μΜ. Η πλήρης αναστολή των αμαστιγωτών μορφών των παρασίτων αντιστοιχεί στο 100%. Αντίθετα, η πλήρης ανάπτυξη τους αντιστοιχεί στο 0%.

### 3.2.2.5 Δράση της ουσίας *Antimonium crudum II* (AC II)

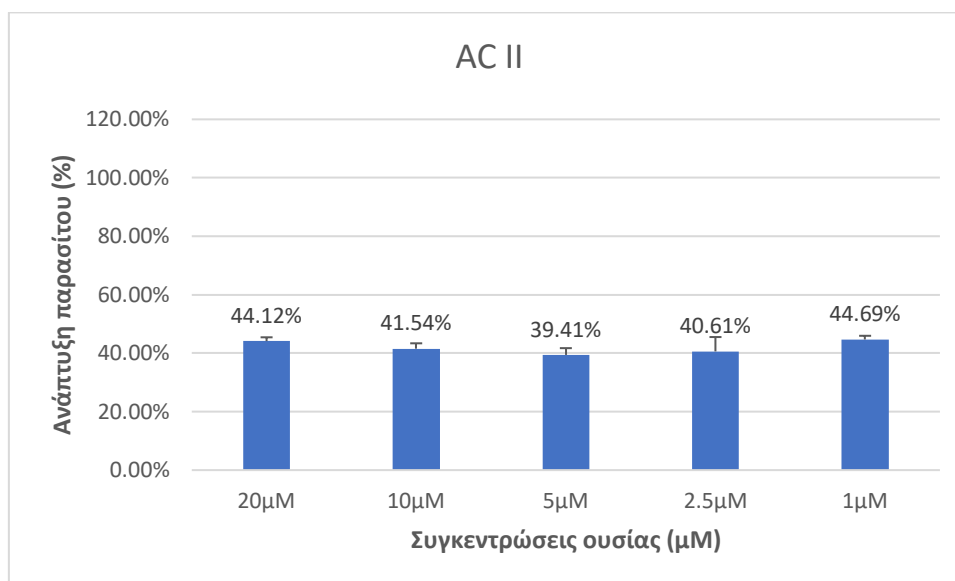
Μέτρηση της πλάκας των προμαστιγωτών παρασίτων *L. infantum* ευαίσθητων στην υπάρχουσα θεραπεία ύστερα από 24 ώρες επώασης με τη χρωστική ρεσαζουρίνη.

Η πυκνή ουσία *Antimonium crudum II* (AC II) ελέγχθηκε για την αντιπαρασιτική της δράση. Προστέθηκε στα ευαίσθητα προμαστιγωτά παράσιτα αραιωμένη σε διαλύματα τελικών συγκεντρώσεων 20 μΜ, 10 Μμ, 5 μΜ, 2.5 μΜ και 1 μΜ (βλ. Πίν. 14).

Πίνακας 14. Αντιλείσμανιακή δράση ουσίας *Antimonium crudum II* (AC II) που ελέγχθηκε στις τελικές συγκεντρώσεις 20 μΜ, 10 Μμ, 5 μΜ, 2.5 μΜ και 1 μΜ. Τα αποτελέσματα της αντιλείσμανιακής της δράσης αξιολογήθηκαν με τη μέθοδο *Alamar blue*.

Ουσία	Συγκεντρώσεις ουσίας (μΜ)	Ανάπτυξη προμαστιγωτής μορφής παρασίτου <i>L. Infantum</i> ευαίσθητου στην υπάρχουσα θεραπεία (%)
<b><i>Antimonium crudum II</i> (AC II)</b>	20 μΜ	44.12 %
	10 μΜ	41.54 %
	5 μΜ	39.41 %
	2.5 μΜ	40.61 %
	1 μΜ	44.69 %

Στις παραπάνω συγκεντρώσεις του *Antimonium crudum II* (AC II) από 20  $\mu\text{M}$  έως και 1  $\mu\text{M}$  που εξετάστηκαν, διαπιστώθηκε αναστολή των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου. Επομένως η προς εξέταση ουσία είχε κάποια αντιπαρασιτική δράση. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι η ανάπτυξη των προμαστιγωτών παρασίτων δεν ξεπέρασε σε ποσοστό το 43.14 % (βλ. Γράφ. 14).



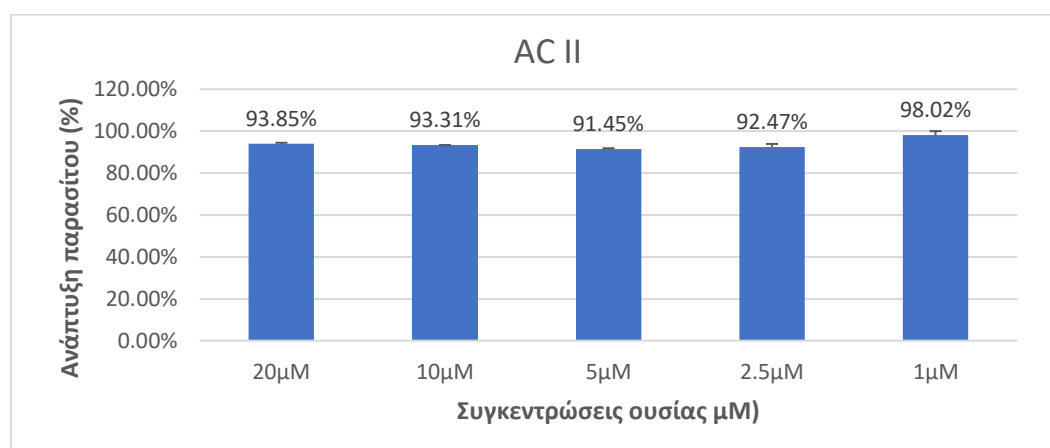
Γράφημα 14. Απεικόνιση της ανάπτυξης (%) των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L.infantum* ευαίσθητου προς την υπάρχουσα θεραπεία ύστερα από την προσθήκη της προς εξέταση ουσίας *Antimonium crudum II* (AC II) στις συγκεντρώσεις 20  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 2.5  $\mu\text{M}$  και 1  $\mu\text{M}$ . Τα αποτελέσματα προέκυψαν από μέτρηση της πλάκας μετά από 24 ώρες επώασης ύστερα από την προσθήκη της χρωστικής ρεσαζουρίνης. Η πλήρης ανάπτυξη των προμαστιγωτών μορφών των παρασίτων αντιστοιχεί στο 100%. Επομένως η τιμή 100 % αποτελεί το θετικό μάρτυρα ανάπτυξης. Αντίθετα, η πλήρης αναστολή τους αντιστοιχεί στο 0%.

- Μέτρηση της πλάκας των προμαστιγωτών παρασίτων *L.infantum* ευαίσθητων στην υπάρχουσα θεραπεία ύστερα από 72 ώρες επώασης με τη χρωστική ρεσαζουρίνη (βλ. Πίν. 15).

Πίνακας 15. Αντιλειτουργική δράση ουσίας Antimonium crudum II (AC II) που ελέγχθηκε στις τελικές συγκεντρώσεις 20 μM, 10 μM, 5 μM, 2.5 μM και 1 μM. Τα αποτελέσματα της αντιλειτουργικής της δράσης αξιολογήθηκαν με τη μέθοδο Alamar blue.

Ουσία	Συγκεντρώσεις ουσίας (μM)	Ανάπτυξη προμαστιγωτής μορφής παρασίτου <i>L. Infantum</i> ευαίσθητου στην υπάρχουσα θεραπεία (%)
<b>Antimonium crudum II (AC II)</b>	20 μM	93.85 %
	10 μM	93.31 %
	5 μM	91.45 %
	2.5 μM	92.47 %
	1 μM	98.02 %

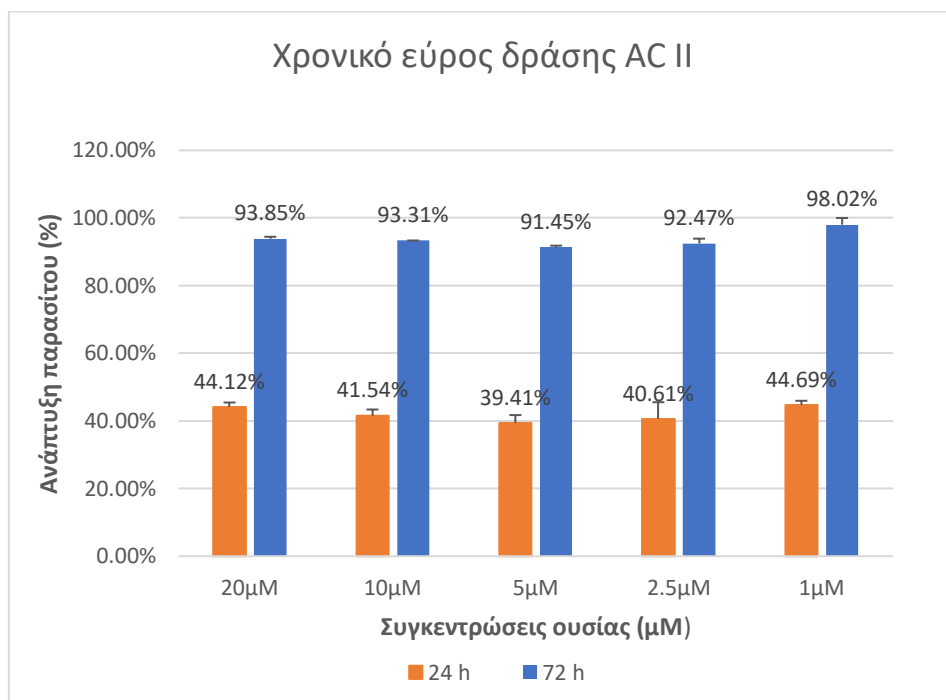
Στις παραπάνω συγκεντρώσεις του *Antimonium crudum II (AC II)* από 20 μM έως και 1 μM που εξετάστηκαν, δε διαπιστώθηκε αναστολή των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου. Επομένως η προς εξέταση ουσία δε παρουσιάζει μετά από 72 ώρες κάποια αντιπαρασιτική δράση. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι η ανάπτυξη των προμαστιγωτών παρασίτων ήταν σε ποσοστό πάνω από 90 % σε όλες τις συγκεντρώσεις (βλ. Γράφ. 15).



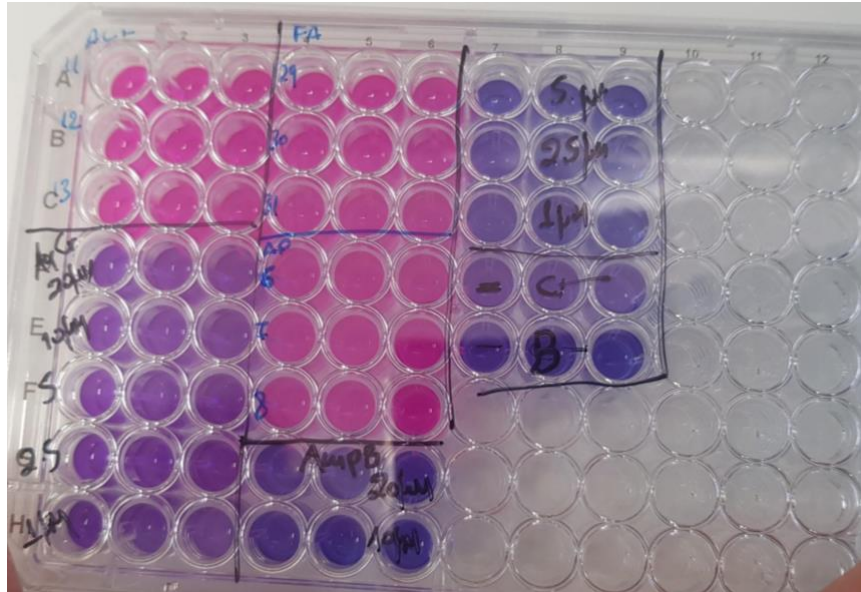
Γράφημα 15. Απεικόνιση της ανάπτυξης (%) των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L. infantum* ευαίσθητου προς την υπάρχουσα θεραπεία ύστερα από την προσθήκη της προς εξέταση ουσίας *Antimonium crudum II (AC II)* στις συγκεντρώσεις 20 μM, 10 μM, 5 μM, 2.5 μM και 1 μM. Τα αποτελέσματα προέκυψαν από μέτρηση της πλάκας μετά από 72 ώρες επώασης ύστερα από την προσθήκη της χρωστικής ρεσαζουρίνης. Η πλήρης ανάπτυξη των προμαστιγωτών μορφών των παρασίτων αντιστοιχεί στο 100%. Επομένως η τιμή 100 % αποτελεί το θετικό μάρτυρα ανάπτυξης. Αντίθετα, η πλήρης αναστολή τους αντιστοιχεί στο 0%.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα της μέτρησης της πλάκας με τη μέθοδο της Alamar blue παρατηρήσαμε διαφορά στην αναστολή των παρασίτων το χρονικό διάστημα των δύο μετρήσεων μεταξύ 24 και 72 ωρών. Στην πλάκα

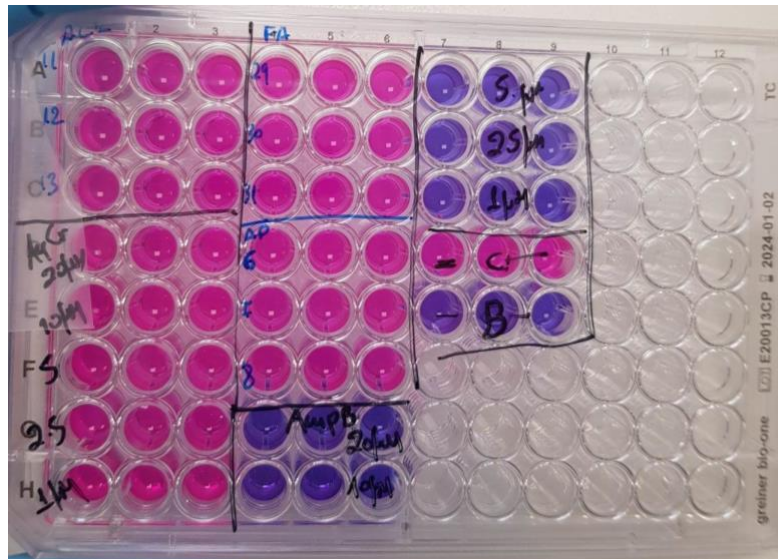
κυταροκαλλιέργειας οι ευαίσθητες προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *L.infantum* επώασθησαν με την πυκνή ουσία *Antimonium crudum II (AC II)* σε διάφορες συγκεντρώσεις και στη συνέχεια προστέθηκε το διάλυμα με τη χρωστική ρεσαζουρίνης. Μετά από την πρώτη μέτρηση 24 ώρες ύστερα από την προσθήκη της χρωστικής παρατηρήθηκε αναστολή της ανάπτυξης των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου με μεγαλύτερη αυτή της συγκέντρωση 5  $\mu\text{M}$ . Σε αυτήν ανάπτυξη ήταν 39.41 %. Μετά ακολούθησε δεύτερη μέτρηση στις 72 ώρες όπου η ανάπτυξη των προμαστιγωτών παρασίτων έχει αυξηθεί σημαντικά με μεγαλύτερο ποσοστό αυτό της συγκέντρωσης 1 $\mu\text{M}$  της ουσίας σε ποσοστό 98.02 %. Από αυτό συμπεραίνουμε ότι το *Antimonium crudum II (AC II)* έχει αντιπαρασιτική δράση η οποία όμως είναι παροδική και παρέρχεται ύστερα από το πέρας των 48 ωρών (βλ. Γράφ. 16).



Γράφημα 16. Απεικόνιση του εύρους δράσης της προς εξέταση ουσίας *Antimonium crudum II (AC II)* στις συγκεντρώσεις 20  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 2.5  $\mu\text{M}$  και 1  $\mu\text{M}$  στο χρονικό διάστημα μεταξύ των δυο μετρήσεων της πλάκας στις 24 και 72 ώρες με τη μέθοδο *Alagar blue*. Τα δεδομένα με το πορτοκαλί χρώμα αφορούν την ανάπτυξη (%) των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L.infantum* ευαίσθητου προς την υπάρχουσα θεραπεία τις πρώτες 24 ώρες επώασης με τη χρωστική ενώ τα δεδομένα με το μπλέ χρώμα συμβολίζουν την ανάπτυξη (%) κατά τη δεύτερη μέτρηση της πλάκας στις 72 ώρες επώασης με τη χρωστική.



Εικόνα 3. Πλάκα κυτταροκαλλιέργειας στην οποία έχουν προστεθεί οι προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *L. Infantum* ευαίσθητο στην υπάρχουσα θεραπεία και έχουν επωαστεί με ουσίες σε διάφορες δυναμοποιήσεις και συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα της αντιπαρασιτικής δράσης των παραπάνω ουσιών που προέκυψαν ύστερα από το πέρας των πειραμάτων αξιολογήθηκαν με τη βοήθεια της μεθόδου Alamar blue και της χρωστικής ρεσαζουρίνης. Η μέτρηση έγινε 24 ώρες μετά την επώαση των παρασίτων με τη χρωστική. Πιο αναλυτικά, οι ομοιοπαθητικές ουσίες και οι δυναμοποιήσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: Antimonium crudum I (AC I): 11 cH, 12 cH και 13 cH, Andrographis paniculata (AP): 6 cH, 7 cH και 8 cH, Ferrum arsenicum (FA): 29 cH, 30cH και 31 cH. Και οι ουσίες σε διάφορες συγκεντρώσεις Antimonium crudum II (AC II): 20μM, 10 μM, 5 μM, 2.5 μM και 1 μM και Αμφοτερικίνη Β (Ampr B): 20 μM, 10 μM, 5 μM, 2.5 μM και 1 μM. Τέλος χρησιμοποιήθηκε αρνητικός C (-) και θετικός C (+) μάρτυρας.



Εικόνα 4. Πλάκα κυτταροκαλλιέργειας στην οποία έχουν προστεθεί οι προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *L. Infantum* ευαίσθητο στην υπάρχουσα θεραπεία και έχουν επωαστεί με ουσίες σε διάφορες δυναμοποιήσεις και συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα της αντιπαρασιτικής δράσης των παραπάνω ουσιών που προέκυψαν ύστερα από το πέρας των πειραμάτων αξιολογήθηκαν με τη βοήθεια της μεθόδου Alamar blue και της χρωστικής ρεσαζουρίνης. Η μέτρηση έγινε 72 ώρες μετά την επώαση των παρασίτων με τη χρωστική. Πιο αναλυτικά, οι ομοιοπαθητικές ουσίες και οι δυναμοποιήσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: Antimonium crudum I (AC I): 11 cH, 12 cH και 13 cH, Andrographis paniculata (AP): 6 cH, 7 cH και 8 cH, Ferrum arsenicum (FA): 29 cH, 30cH και 31 cH. Και οι ουσίες σε διάφορες συγκεντρώσεις Antimonium crudum II (AC II): 20μM, 10 μM, 5 μM, 2.5 μM και 1 μM και Αμφοτερικίνη Β (Ampr B): 20 μM, 10 μM, 5 μM, 2.5 μM και 1 μM. Τέλος χρησιμοποιήθηκε αρνητικός C (-) και θετικός C (+) μάρτυρας.



## Συζήτηση-Συμπεράσματα

Η τρέχουσα φαρμακευτική θεραπεία της λεισμανίασης αποτελεί εμπόδιο στην εξάλειψη της νόσου καθώς παρουσιάζει υψηλό κόστος, κυτταροτοξικότητα και σταδιακή ανθεκτικότητα των παρασίτων σε πολλά φάρμακα. Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν ομοιοπαθητικά φάρμακα και φαρμακευτικές ουσίες σε *in vitro* πειράματα για τη διερεύνηση της αντιλεισμανιακής τους ικανότητας. Στόχος ήταν ο προσδιορισμός της αντιπαρασιτικής δράσης των εκάστοτε φυσικών ουσιών, μέσα από μια σειρά διαδοχικών δυναμοποιήσεων και αραιώσεων για την κάθε μια, σε εξωκυτταρικές προμαστιγωτές και υποχρεωτικά ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *leishmania spp.* Οι ουσίες αυτές ήταν οι *Andrographis paniculata*, *Ferrum arsenicum* ( $\text{AsFeH}_{13}\text{O}_9^+$ ) και *Antimonium crudum* ( $\text{Sb}_2\text{S}_3$ ) που αναφέρθηκαν και παραπάνω, οι οποίες με μια σειρά κρούσεων δυναμοποιήθηκαν σε ομοιοπαθητικά σκευάσματα. Τα σκευάσματα στη συνέχεια αξιοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των δοκιμών. Εκτός από τις ομοιοπαθητικές ουσίες, χρησιμοποιήθηκε επιπλέον η ουσία *Antiminium crudum* και στην αρχική της μορφή αραιωμένη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Πραγματοποιήθηκαν διάφορες εκδοχές στις πειραματικές δοκιμές οι οποίες συγκρίθηκαν μεταξύ τους και οδήγησαν στο τελικό αποτέλεσμα. Σε μια εξ αυτών οι δυναμοποιήσεις που χρειάζονταν οι ουσίες έγιναν με ειδικό μηχάνημα (δυναμοποιητή) που εκτελούσε κάθετες και οριζόντιες κρούσεις σε κάθε σκεύασμα και ύστερα, εντός λίγης ώρας το τελικό διάλυμα προστέθηκε στην πλάκα κυτταροκαλλιέργειας. Μια άλλη προσέγγιση ήταν η χρήση έτοιμων ήδη δυναμοποιημένων σκευασμάτων στις τελικές δυναμοποιήσεις που επιθυμούσαμε και εισαγωγή τους μετά από 24 ώρες από την παρασκευή τους. Τέλος στις πιο πρόσφατες πειραματικές δοκιμές εκτελέστηκαν δέκα χειροκίνητες κρούσεις και η τοποθέτηση των σκευασμάτων στην πλάκα κυτταροκαλλιέργειας έγινε κατευθείαν μετά από την παρασκευή τους. Τα αποτελέσματα των πειραματικών δοκιμών αξιολογήθηκαν με τη μέθοδο Alamar blue.

Σε όλες τις περιπτώσεις δυναμοποιήσεις των ομοιοπαθητικών σκευασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, η αναστολή που παρουσιάστηκε ήταν < 20% στις προμαστιγωτές και ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου. Ωστόσο στο

πείραμα που προστέθηκε *Antimonium crudum* στην αρχική του μορφή παρατηρήθηκε αναστολή της ανάπτυξης των προμαστιγωτών παρασίτων στις συγκεντρώσεις από 1  $\mu\text{M}$  έως και 20  $\mu\text{M}$  σε ποσοστό <60 %. Η μικρότερη ανάπτυξη παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση 5 $\mu\text{M}$  με ποσοστό 39.41 %. Η ανασταλτική αυτή δράση φαίνεται να χάνεται μετά από 72 ώρες με την ανάπτυξη στην ίδια συγκέντρωση να φτάνει σε ποσοστό το 91.45 %. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η αποτελεσματικότητα του *Antimonium crudum* ως θεραπευτικού παράγοντα έναντι της λεισμανίασης έχει καταδειχθεί και σε άλλες μελέτες (Rodrigues de Santana et al., 2014; Cajueiro et al., 2017; de Santana et al., 2017). Περαιτέρω, η απώλεια της ανασταλτικής δράσης του έναντι των προμαστιγωτών παρασίτων μετά τις 72 ώρες, μπορεί να αποδοθεί στην σταδιακή αποδυνάμωση της δραστηριότητας του και ενδεχομένως το εύρημα αυτό να είναι χρήσιμο ως προς τη συχνότητα χορήγησης της εν λόγω ουσίας.

Επιπλέον, με τη χρήση της Αμφοτερικίνης Β παρατηρήθηκε αναστολή της ανάπτυξης των παρασίτων και στις αμαστιγωτές, αλλά και στις προμαστιγωτές μορφές σε ποσοστό 100 % από τη συγκέντρωση 1 $\mu\text{M}$  έως και 20  $\mu\text{M}$  της ουσίας. Η αναστολή αυτή αποτελεί αναμενόμενο εύρημα, καθώς η Αμφοτερικίνη έχει αποδεδειγμένη λεισμανιακή δράση και αποτελεί μορφή θεραπείας δεύτερης γραμμής για τη συγκεκριμένη ασθένεια (Oliás-Molero et al., 2021). Μεταξύ των πλεονεκτημάτων της συγκαταλέγεται η έλλειψη τοξικότητας και ιδιαίτερα στις λιποσωμικές της μορφές AmB και Ambisome® (Shirzadi, 2019; Faustino & Pin-heiro, 2020). Τα ως άνω αποτελέσματα που προέκυψαν από την χρήση της Αμφοτερικίνης Β υποδηλώνουν την αποτελεσματικότητα της πειραματικής μεθοδολογίας και επιβεβαιώνουν ότι η απουσία ανασταλτικής δράσης των υπολοίπων ουσιών, που ελέγχθηκαν πειραματικά, οφείλεται στις επιλεχθείσες δυναμοποιήσεις, καθώς και στον τρόπο παρασκευής των διαλυμάτων.

Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι η απουσία αντιλεισμανιακής δράσης των μελετώμενων ουσιών δεν υποδεικνύει απαραίτητα ότι αυτές δεν παρουσιάζουν δραστηριότητα στον ξενιστή, εφόσον η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε *in vitro*. Άλλωστε, υποστηρίζεται ότι η ομοιοπαθητική θεραπεία αποσκοπεί στην διέγερση και ταυτόχρονα την ενίσχυση των αμυντικών μηχανισμών του οργανισμού, προκειμένου αυτός εν συνεχεία να καταπολεμήσει την εκάστοτε νόσο. Περαιτέρω, έχει

καταδειχθεί ότι τα ομοιπαθητικά σκευάσματα παρουσιάζουν μια σειρά ανοσορυθμιστικών λειτουργιών, εφόσον επηρεάζουν την έκκριση κυτοκινών που σχετίζονται με τη φλεγμονή (Nascimento et al.,2017). Ως εκ τούτου για την περαιτέρω διερεύνηση της αντιλειτουργικής δράσης των υπό μελέτη ουσιών, προτείνεται η πραγματοποίηση in vivo μελετών.

Περαιτέρω, η μελλοντική έρευνα θα πρέπει να κινηθεί στην κατεύθυνση της εξεύρεσης της χρυσής τομής μεταξύ του πλεονεκτήματος της έλλειψης τοξικότητας, αλλά και των βέλτιστων δυναμοποιήσεων, προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή ανασταλτική δράση και να παρακαμφθούν τα εμπόδια στην εξάλειψη της νόσου, ήτοι το υψηλό κόστος, την κυτταροτοξικότητα και τη σταδιακή ανθεκτικότητα των παρασίτων στους υφιστάμενους θεραπευτικούς παράγοντες.

## Αναφορές

- Abass, K. S., & Lazar, L. M. T. Y. (2020). Morphology, life cycle, pathogenesis and virulence factors of Genus Leishmania: A Review. *Plant Archives*, 20(2), 4057-4060.
- Afghan, A. K., Kassi, M., Kasi, P. M., Ayub, A., Kakar, N., & Marri, S. M. (2011). Clinical manifestations and distribution of cutaneous leishmaniasis in pakistan. *Journal of tropical medicine*, 2011, 359145. doi: 10.1155/2011/359145
- Akhoundi, B., Mohebal, M., Shojaee, S., Jalali, M., Kazemi, B., Bandehpour, M., Keshavarz, H., Edrissian, G. H., Eslami, M. B., Malekafzali, H., & Kouchaki, A. (2013). Rapid detection of human and canine visceral leishmaniasis: assessment of a latex agglutination test based on the A2 antigen from amastigote forms of *Leishmania infantum*. *Experimental parasitology*, 133(3), 307–313.
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(3), e0004349.
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., & WHO Leishmaniasis Control Team (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one*, 7(5), e35671.
- Antinori, S., Schifanella, L., & Corbellino, M. (2012). Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 31(2), 109–118.
- Antonio, L., Fagundes, A., Oliveira, R. V., Pinto, P. G., Bedoya-Pacheco, S. J., Vasconcellos, E., Valete-Rosalino, M. C., Lyra, M. R., Passos, S. R., Pimentel, M. I., & Schubach, A. (2014). Montenegro skin test and age of skin lesion as predictors of treatment failure in cutaneous leishmaniasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 56(5), 375–380.

- Anversa, L., Tiburcio, M., Richini-Pereira, V. B., & Ramirez, L. E. (2018). Human leishmaniasis in Brazil: A general review. *Revista da Associacao Medica Brasileira (1992)*, *64*(3), 281–289.
- Arango Duque, G., & Descoteaux, A. (2015). Leishmania survival in the macrophage: where the ends justify the means. *Current opinion in microbiology*, *26*, 32–40.
- Araujo, A. R., Portela, N. C., Feitosa, A. P., Silva, O. A., Ximenes, R. A., Alves, L. C., & Brayner, F. A. (2016). Risk factors associated with American Cutaneous Leishmaniasis in an Endemic Area of Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, *58*, 86.
- Araújo, I., de Paula, R. C., Alves, C. L., Faria, K. F., Oliveira, M. M., Mendes, G. G., Dias, E., Ribeiro, R. R., Oliveira, A. B., & Silva, S. (2019). Efficacy of lapachol on treatment of cutaneous and visceral leishmaniasis. *Experimental parasitology*, *199*, 67–73.
- Arévalo-Lopéz, D., Nina, N., Ticona, J. C., Limachi, I., Salamanca, E., Udaeta, E., et al. (2018). Leishmanicidal and Cytotoxic Activity from Plants Used in Tacana Traditional Medicine (Bolivia). *J. Ethnopharmacology* *216*, 120–133. doi:10.1016/j.jep.2018.01.023.
- Aronson, N., Herwaldt, B. L., Libman, M., Pearson, R., Lopez-Velez, R., Weina, P., Carvalho, E., Ephros, M., Jeronimo, S., & Magill, A. (2017). Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *96*(1), 24–45.
- Bahmani, M., Saki, K., Ezatpour, B., Shahsavari, S., Eftekhari, Z., Jelodari, M., Rafieian-Kopae, M., & Sepahvand, R. (2015). Leishmaniosis phytotherapy: review of plants used in Iranian traditional medicine on leishmaniasis. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, *5*(9), 695–701.
- Bahrami, S., Oryan, A., & Bemani, E. (2021). Efficacy of amiodarone and voriconazole combination therapy in cutaneous leishmaniasis in the mice experimentally infected with *Leishmania major*. *Journal of infection and chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, *27*(7), 984–990.

- Bangert, M., Flores-Chávez, M. D., Llanes-Acevedo, I. P., Arcones, C., Chicharro, C., García, E., Ortega, S., Nieto, J., & Cruz, I. (2018). Validation of rK39 immunochromatographic test and direct agglutination test for the diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis in Spain. *PLoS neglected tropical diseases*, *12*(3), e0006277.
- Barroso, D. H., Silva, C. E. F., e Vasconcelos, A. C. D. P., Cavalcanti, S. M, d. M., de Brito, M. E. F., & Medeiros, A. C. R. (2015). Post-kala-azar dermal leishmaniasis in two different clinical contexts. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, *90*(3), 108-110.
- Beauvais F. (2017). 'Unconventional' experiments in biology and medicine with optimized design based on quantum-like correlations. *Homeopathy : the journal of the Faculty of Homeopathy*, *106*(1), 55–66.
- Bell, I. R., & Koithan, M. (2012). A model for homeopathic remedy effects: low dose nanoparticles, allostatic cross-adaptation, and time-dependent sensitization in a complex adaptive system. *BMC complementary and alternative medicine*, *12*, 191.
- Bellavite, P., Marzotto, M., Oliosio, D., Moratti, E., & Conforti, A. (2014). High-dilution effects revisited. 2. Pharmacodynamic mechanisms. *Homeopathy: the journal of the Faculty of Homeopathy*, *103*(1), 22–43.
- Benchimol, J. L. (2020). Leishmaniasis of the New World from a historical and global perspective, from the 1930s to the 1960s. *História, Ciências, Saúde – Manguinhos, Rio de Janeiro*, *27*, 95-122.
- Bhandari, V., Sundar, S., Dujardin, J. C., & Salotra, P. (2014). Elucidation of cellular mechanisms involved in experimental paromomycin resistance in *Leishmania donovani*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *58*(5), 2580–2585.
- Bogdan, C., Gessner, A., Solbach, W., & Röllinghoff, M. (1996). Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Current opinion in immunology*, *8*(4), 517–525.
- Bono, I., Del Giudice, E., Gamberale, L., & Henry, M. (2012). Emergence of the coherent structure of liquid water. *Water*, *4*(3), 510–532.
- Brindha, J., Balamurali, M., & Chanda, K. (2021). An Overview on the Therapeutics of Neglected Infectious Diseases-Leishmaniasis and Chagas Diseases. *Frontiers in chemistry*, *9*, 622286.

- Burks, A.W. (2020). Homeopathy, in *Middleton's Allergy: Principles and Practice*, 98, 1599-1611.e1. Διαθέσιμο στο: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B978032354424500099X> [τελευταία πρόσβαση 12.12.2021].
- Burza, S., Croft, S. L., & Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *Lancet (London, England)*, 392(10151), 951–970.
- Cajueiro, A., Goma, E. P., Dos Santos, H., Almeida Rodrigues, I., Toma, H. K., Araújo, S. M., Bonamin, L. V., Gomes, N., Castelo-Branco, M., de Souza Dias, E. P., Dos Santos Pyrrho, A., & Holandino, C. (2017). Homeopathic medicines cause Th1 predominance and induce spleen and megakaryocytes changes in BALB/c mice infected with *Leishmania infantum*. *Cytokine*, 95, 97–101.
- Carneiro, M. B., Lopes, M. E., Vaz, L. G., Sousa, L. M., dos Santos, L. M., de Souza, C. C., Campos, A. C., Gomes, D. A., Gonçalves, R., Tafuri, W. L., & Vieira, L. Q. (2015). IFN- $\gamma$ -Dependent Recruitment of CD4(+) T Cells and Macrophages Contributes to Pathogenesis During *Leishmania amazonensis* Infection. *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 35(12), 935–947.
- Carneiro, P. P., Conceição, J., Macedo, M., Magalhães, V., Carvalho, E. M., & Bacellar, O. (2016). The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *PloS one*, 11(2), e0148084.
- Carnielli, J., Monti-Rocha, R., Costa, D. L., Molina Sesana, A., Pansini, L., Segatto, M., Mottram, J. C., Costa, C., Carvalho, S., & Dietze, R. (2019). Natural Resistance of *Leishmania infantum* to Miltefosine Contributes to the Low Efficacy in the Treatment of Visceral Leishmaniasis in Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 101(4), 789–794.
- Carstens-Kass, J., Paulini, K., Lypaczewski, P., & Matlashewski, G. (2021). A review of the leishmanin skin test: A neglected test for a neglected disease. *PLoS neglected tropical diseases*, 15(7), e0009531.
- Chakravarty, J., Hasker, E., Kansal, S., Singh, O. P., Malaviya, P., Singh, A. K., Chourasia, A., Singh, T., Sudarshan, M., Singh, A. P., Singh, B., Singh, R. P., Ostyn, B., Fakiola, M., Picado, A., Menten, J., Blackwell, J. M., Wilson, M. E., Sacks, D.,

- Boelaert, M., ... Sundar, S. (2019). Determinants for progression from asymptomatic infection to symptomatic visceral leishmaniasis: A cohort study. *PLoS neglected tropical diseases*, *13*(3), e0007216.
- Chauhan, K., Kaur, G., & Kaur S. (2018). Activity of rutin, a potent favonoid against SSG-sensitive and -resistant *Leishmania donovani* parasites in experimental leishmaniasis. *Int Immunopharmacol.*, *64*, 372-385.
- Chikramane, P. S., Suresh, A. K., Kane, S. G., & Bellare, J. R. (2017). Metal nanoparticle induced hormetic activation: a novel mechanism of homeopathic medicines. *Homeopathy: the journal of the Faculty of Homeopathy*, *106*(3), 135–144.
- Chowdhury, S. R., Kumar, A., Godinho, J., De Macedo Silva, S. T., Zuma, A. A., Saha, S., Kumari, N., Rodrigues, J., Sundar, S., Dujardin, J. C., Roy, S., De Souza, W., Mukhopadhyay, S., & Majumder, H. K. (2017). Voacamine alters *Leishmania* ultrastructure and kills parasite by poisoning unusual bi-subunit topoisomerase IB. *Biochemical pharmacology*, *138*, 19–30.
- Cloots, K., Marino, P., Burza, S., Gill, N., Boelaert, M., & Hasker, E. (2021). Visceral Leishmaniasis-HIV Coinfection as a Predictor of Increased *Leishmania* Transmission at the Village Level in Bihar, India. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *11*, 604117.
- Comai, G., Mistral De Pascali, A., Busutti, M., Morini, S., Ortalli, M., Conte, D., Re, M. C., La Manna, G., & Varani, S. (2021). Screening strategies for the diagnosis of asymptomatic *Leishmania* infection in dialysis patients as a model for kidney transplant candidates. *Journal of nephrology*, *34*(1), 191–195.
- Costa, E. V., Brígido, H. P., Silva, J. V., Coelho-Ferreira, M. R., Brandão, G. C., & Dolabela, M. F. (2017). Antileishmanial Activity of *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. Grose (Bignoniaceae). *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, *2017*, 8074275.
- Das, E. (2019). Understanding the Principles of Homeopathy on a Research Perspective. *Journal of Complementary Medicine & Alternative Healthcare*, *9*(2), JCMAN.MS.ID.555756.
- Das, S. (2018). Mechanism of action of homoeopathic medicines. *International Journal of Advanced Research*, *6*(2), 1757-1769.



- Dawit, G., & Shishay, K. (2014). Epidemiology, Public Health Impact and Control Methods of the Most Neglected Parasite Diseases in Ethiopia: A Review. *World Journal of Medical Sciences* 10 (2), 94-102.
- de Menezes, J. P., Saraiva, E. M., & da Rocha-Azevedo, B. (2016). The site of the bite: Leishmania interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. *Parasites & vectors*, 9, 264.
- de Santana, F. R., Dalboni, L. C., Nascimento, K. F., Konno, F. T., Alvares-Saraiva, A. M., Correia, M., Bomfim, M., Casarin, R., Perez, E. C., Lallo, M. A., Peres, G. B., Laurenti, M. D., Benites, N. R., Buchi, D. F., & Bonamin, L. V. (2017). High dilutions of antimony modulate cytokines production and macrophage - Leishmania (L.) amazonensis interaction in vitro. *Cytokine*, 92, 33–47.
- Deep, D. K., Singh, R., Bhandari, V., Verma, A., Sharma, V., Wajid, S., Sundar, S., Ramesh, V., Dujardin, J. C., & Salotra, P. (2017). Increased miltefosine tolerance in clinical isolates of Leishmania donovani is associated with reduced drug accumulation, increased infectivity and resistance to oxidative stress. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(6), e0005641.
- Demangeat J. L. (2015). Gas nanobubbles and aqueous nanostructures: the crucial role of dynamization. *Homeopathy: the journal of the Faculty of Homeopathy*, 104(2), 101–115.
- Di Muccio, T., Scalone, A., Bruno, A., Marangi, M., Grande, R., Armignacco, O., Gradoni, L., & Gramiccia, M. (2015). Epidemiology of Imported Leishmaniasis in Italy: Implications for a European Endemic Country. *PloS one*, 10(6), e0129418.
- Donelli, D., & Antonelli, M. (2021). Homeopathy and Psychological Therapies. *Encyclopedia*, 1, 57–64.
- Efstathiou, A., & Smirlis, D. (2021). Leishmania Protein Kinases: Important Regulators of the Parasite Life Cycle and Molecular Targets for Treating Leishmaniasis. *Microorganisms*, 9, 691.
- Eid, D., Guzman-Rivero, M., Rojas, E., Goicolea, I., Hurtig, A. K., Illanes, D., & San Sebastian, M. (2018). Risk factors for cutaneous leishmaniasis in the rainforest of Bolivia: a cross-sectional study. *Tropical medicine and health*, 46, 9.
- Ejazi, S. A., Choudhury, S. T., Bhattacharyya, A., Kamran, M., Pandey, K., Das, V., Das, P., da Silva, F. O., Costa, D. L., Costa, C., Rahaman, M., Goswami, R. P., & Ali, N.

- (2021). Development and Clinical Evaluation of Serum and Urine-Based Lateral Flow Tests for Diagnosis of Human Visceral Leishmaniasis. *Microorganisms*, 9(7), 1369.
- Elmahallawy, E. K., Sampedro Martinez, A., Rodriguez-Granger, J., Hoyos-Mallecot, Y., Agil, A., Navarro Mari, J. M., & Gutierrez Fernandez, J. (2014). Diagnosis of leishmaniasis. *Journal of infection in developing countries*, 8(8), 961–972.
- Falkowski-Temporini, G. J., Lopes, C. R., Massini, P. F., Brustolin, C. F., Sandri, P. F., Ferreira, É. C., Aleixo, D. L., Pala, N. R., & de Araújo, S. M. (2016). Predominance of Th1 response, increase of megakaryocytes and Kupffer cells are related to survival in *Trypanosoma cruzi* infected mice treated with *Lycopodium clavatum*. *Cytokine*, 88, 57–61.
- Farvadi, F., & Hashemi, F. (2019). Homeopathy and Nanomedicine: Alien Twins. *Homeopathy: the journal of the Faculty of Homeopathy*, 108(4), 294–295.
- Faustino, C., & Pinheiro, L. (2020). Lipid Systems for the Delivery of Amphotericin B in Antifungal Therapy. *Pharmaceutics*, 12(1), 29.
- Frézard, F., Monte-Neto, R., & Reis, P. G. (2014). Antimony transport mechanisms in resistant leishmania parasites. *Biophysical reviews*, 6(1), 119–132.
- Gimblet, C., Loesche, M. A., Carvalho, L., Carvalho, E. M., Grice, E. A., Artis, D., & Scott, P. (2015). IL-22 Protects against Tissue Damage during Cutaneous Leishmaniasis. *PloS one*, 10(8), e0134698.
- Gökmen, T. G., Haytoglu, S., Güran, M., Kuşçu, F., & Köksal F. (2014). A multidisciplinary approach to an uncommon case of laryngeal leishmaniasis in Turkey. *Journal of Vector Borne Diseases*, 51(2), 140-143.
- Gollob, K. J., Viana, A. G., & Dutra, W. O. (2014). Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection. *Parasite immunology*, 36(8), 367–376.
- Golpayegani, A. A., Moslem, A. R., Akhavan, A. A., Zeydabadi, A., Mahvi, A. H., & Allah-Abadi, A. (2018). Modeling of Environmental Factors Affecting the Prevalence of Zoonotic and Anthroponotic Cutaneous, and Zoonotic Visceral Leishmaniasis in Foci of Iran: a Remote Sensing and GIS Based Study. *Journal of arthropod-borne diseases*, 12(1), 41–66.

- Grimes, D. R. (2012). Proposed mechanisms for homeopathy are physically impossible: Original Article. *Focus Altern. Complement. Ther.*, 17, 149–155.
- Guedes, J., Bonamin, L. V., & Capelozzi, V. L. (2018). Water-Related Mechanisms Proposed for Storing and Transmitting Homeopathic Information: Putative Links with Biological Responses. *Homeopathy : the journal of the Faculty of Homeopathy*, 107(3), 172–180.
- Gugliandolo, E., Palma, E., Peritore, A. F., Siracusa, R., D'Amico, R., Fusco, R., Licata, P., & Crupi, R. (2020). Effect of Artesunate on *Leishmania Amazonensis* Induced Neuroinflammation and Nociceptive Behavior in Male Balb/C Mice. *Animals: an open access journal from MDPI*, 10(4), 557.
- Gunathilaka, N., Semege, S., Pathirana, N., Manamperi, N., Udayanga, L., Wijesinghe, H., Premaratne, P., & Fernando, D. (2020). Prevalence of cutaneous leishmaniasis infection and clinico-epidemiological patterns among military personnel in Mullaitivu and Kilinochchi districts of the Northern Province, early war-torn areas in Sri Lanka. *Parasites & vectors*, 13(1), 263.
- Gupta, G., Oghumu, S., & Satoskar, A. R. (2013). Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis. *Advances in applied microbiology*, 82, 155–184.
- Güran, M. (2018). An Overview of Leishmaniasis: Historic to Future Perspectives. *Intechopen*. doi: 10.5772/intechopen.81643.
- Handler, M. Z., Patel, P. A., Kapila, R., Al-Qubati, Y., & Schwartz, R. A. (2015). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 73(6), 897–910.
- Hasker, E., Singh, S. P., Malaviya, P., Picado, A., Gidwani, K., Singh, R. P., Menten, J., Boelaert, M., & Sundar, S. (2012). Visceral leishmaniasis in rural bihar, India. *Emerging infectious diseases*, 18(10), 1662–1664.
- Hsiao, C. H., Ueno, N., Shao, J. Q., Schroeder, K. R., Moore, K. C., Donelson, J. E., & Wilson, M. E. (2011). The effects of macrophage source on the mechanism of phagocytosis and intracellular survival of *Leishmania*. *Microbes and infection*, 13(12-13), 1033–1044.
- Ibarra-Meneses, A. V., Corbeil, A., Wagner, V., Onwuchekwa, C., & Fernandez-Prada, C. (2022). Identification of asymptomatic *Leishmania* infections: a scoping review. *Parasites & vectors*, 15(1), 5.

- Inceboz, T. (2021). Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis. *Intechopen*. doi: 10.5772/intechopen.86359.
- Joshi, J., Bandral, C., Manchanda, R. K., Khurana, A., Nayak, D., & Kaur, S. (2020). The Effect of Iodium 30c on Experimental Visceral Leishmaniasis. *Homeopathy: the journal of the Faculty of Homeopathy*, 109(4), 213–223.
- Kato, K. C., Morais-Teixeira, E., Reis, P. G., Silva-Barcellos, N. M., Salaün, P., Campos, P. P., Dias Corrêa-Junior, J., Rabello, A., Demicheli, C., & Frézard, F. (2014). Hepatotoxicity of pentavalent antimonial drug: possible role of residual Sb(III) and protective effect of ascorbic acid. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(1), 481–488.
- Kaunda, J. S., & Zhang, Y. J. (2017). The Genus *Carissa*: An Ethnopharmacological, Phytochemical and Pharmacological Review. *Natural products and bioprospecting*, 7(2), 181–199.
- Khan, Y., Andrews, N., & Mitra, B. (2018). ROS regulate differentiation of visceralizing *Leishmania* species into the virulent amastigote form. *Parasitology Open*, 4, E19. doi:10.1017/pao.2018.15.
- Kumar, A., Pandey, S. C., & Samant, M. (2020). A spotlight on the diagnostic methods of a fatal disease Visceral Leishmaniasis. *Parasite immunology*, 42(10), e12727.
- Lévêque, M. F., Lachaud, L., Simon, L., Battery, E., Marty, P., & Pomares, C. (2020). Place of Serology in the Diagnosis of Zoonotic Leishmaniasis With a Focus on Visceral Leishmaniasis Due to *Leishmania infantum*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 67.
- Lindoso, J., Moreira, C., Cunha, M. A., & Queiroz, I. T. (2018). Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives. *HIV/AIDS (Auckland, N.Z.)*, 10, 193–201.
- Liu, D., & Uzonna, J. E. (2012). The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, 83.
- Machín, L., Nápoles, R., Gille, L., & Monzote, L. (2021). *Leishmania amazonensis* response to artemisinin and derivatives. *Parasitology international*, 80, 102218.

- Mans, D. R., Kent, A. D., Hu, R. V. P. F., & Schallig, H. D. (2017). Epidemiological, biological and clinical aspects of Leishmaniasis with special emphasis on Busi Yasi in Suriname. *Journal of Clinical and Experimental Dermatology Research*, 8(2), 388.
- Mansueto, P., Seidita, A., Vitale, G., & Cascio, A. (2014). Leishmaniasis in travelers: a literature review. *Travel medicine and infectious disease*, 12(6 Pt A), 563–581.
- Martínez-Valencia, A. J., Daza-Rivera, C. F., Rosales-Chilama, M., Cossio, A., Casadiego Rincón, E. J., Desai, M. M., Saravia, N. G., & Gómez, M. A. (2017). Clinical and parasitological factors in parasite persistence after treatment and clinical cure of cutaneous leishmaniasis. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(7), e0005713.
- Masoudi, S., & Abbassi, J. (2017). Antibacterial Activity and Comparison of the Volatile Oils of *Tanacetum tenuisetum* (Boiss.) Podl. Obtained by Three Different Methods of Extraction. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 16(Suppl), 188–196.
- Maurício, I. L. (2018). *Leishmania Taxonomy. The Leishmaniases: Old Neglected Tropical Diseases*, 15–30. doi:10.1007/978-3-319-72386-0\_2
- Mohammadi, M. A., Bamorovat, M., Fasihi Harandi, M., Karimi, T., Sharifi, I., & Aflatoonian, M. R. (2017). Comparison of Three PCR-based Methods for Simplicity and Cost Effectiveness Identification of Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania tropica*. *Iranian journal of parasitology*, 12(2), 215–223.
- Mondelaers, A., Hendrickx, S., Van Bockstal, L., Maes, L., & Caljon, G. (2018). Miltefosine-resistant *Leishmania infantum* strains with an impaired MT/ROS3 transporter complex retain amphotericin B susceptibility. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 73(2), 392–394.
- Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., & Saravia, N. G. (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet (London, England)*, 366(9496), 1561–1577.
- Mwololo, S. W., Mutiso, J. M., Macharia, J. C., Bourdichon, A. J., & Gicheru, M. M. (2015). In vitro activity and in vivo efficacy of a combination therapy of diminazene and chloroquine against murine visceral leishmaniasis. *Journal of biomedical research*, 29(3), 214–223.
- Naderer, T., & McConville, M. J. (2008). The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cellular microbiology*, 10(2), 301–308.

- Nascimento, K. F., de Santana, F. R., da Costa, C., Kaplum, V., Volpato, H., Nakamura, C. V., Bonamin, L. V., & de Freitas Buchi, D. (2017). M1 homeopathic complex trigger effective responses against *Leishmania (L) amazonensis* in vivo and in vitro. *Cytokine*, 99, 80–90.
- Nelson, D. H., Perchaluk, J. M., Logan, A. C., & Katzman, M. A. (2019). The Bell Tolls for Homeopathy: Time for Change in the Training and Practice of North American Naturopathic Physicians. *Journal of evidence-based integrative medicine*, 24, 2515690X18823696.
- Olías-Molero, A. I., de la Fuente, C., Cuquerella, M., Torrado, J. J., & Alunda, J. M. (2021). Antileishmanial Drug Discovery and Development: Time to Reset the Model?. *Microorganisms*, 9(12), 2500.
- Oliveira, L. F., Schubach, A. O., Martins, M. M., Passos, S. L., Oliveira, R. V., Marzochi, M. C., & Andrade, C. A. (2011). Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta tropica*, 118(2), 87–96.
- Oliveira, W. N., Ribeiro, L. E., Schieffer, A., Machado, P., Carvalho, E. M., & Bacellar, O. (2014). The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine*, 66(2), 127–132.
- Oryan A. (2015). Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. *Iranian journal of veterinary research*, 16(1), 1–19.
- Oryan, A., & Akbari, M. (2016). Worldwide risk factors in leishmaniasis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(10), 925-932.
- Owen, S. I., Hossain, F., Ghosh, P., Chowdhury, R., Hossain, M. S., Jewell, C., Cruz, I., Picado, A., Mondal, D., & Adams, E. R. (2021). Detection of asymptomatic *Leishmania* infection in Bangladesh by antibody and antigen diagnostic tools shows an association with post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) patients. *Parasites & vectors*, 14(1), 111.
- Pace, D. (2014). Leishmaniasis. *The Journal of Infection*, 69(S1), S10-S18.
- Palma, D., Mercuriali, L., Figuerola, J., Montalvo, T., Bueno-Marí, R., Millet, J. P., Simón, P., Masdeu, E., & Rius, C. (2021). Trends in the Epidemiology of Leishmaniasis in the City of Barcelona (1996-2019). *Frontiers in veterinary science*, 8, 653999.

- Passero, L., Brunelli, E., Sauini, T., Amorim Pavani, T. F., Jesus, J. A., & Rodrigues, E. (2021). The Potential of Traditional Knowledge to Develop Effective Medicines for the Treatment of Leishmaniasis. *Frontiers in pharmacology*, *12*, 690432.
- Pereira, W. K., Lonardon, M. V., Grespan, R., Caparroz-Assef, S. M., Cuman, R. K., & Bersani-Amado, C.A. (2005). Immunomodulatory effect of Canova medication on experimental *Leishmania amazonensis* infection. *The Journal of infection*, *51*(2), 157–164.
- Petrovska B. B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy reviews*, *6*(11), 1–5.
- Pires, M. Q., Madeira, M., Bittencourt, V. R., & Pacheco, R. (2014). Cutaneous and visceral leishmaniasis co-infection in dogs from Rio de Janeiro, Brazil: evaluation by specific PCR and RFLP-PCR assays. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *47*(2), 243–246.
- Ponte-Sucre, A., Gamarro, F., Dujardin, J. C., Barrett, M. P., López-Vélez, R., García-Hernández, R., Pountain, A. W., Mwenechanya, R., & Papadopoulou, B. (2017). Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS neglected tropical diseases*, *11*(12), e0006052.
- Prajapati, V. K., Awasthi, K., Gautam, S., Yadav, T. P., Rai, M., Srivastava, O. N., & Sundar, S. (2011). Targeted killing of *Leishmania donovani* in vivo and in vitro with amphotericin B attached to functionalized carbon nanotubes. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *66*(4), 874–879.
- Rampersad, S. N. (2012). Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel, Switzerland)*, *12*(9), 12347–12360.
- Ranasinghe, S., Wickremasinghe, R., Munasinghe, A., Hulangamuwa, S., Sivanantharajah, S., Seneviratne, K., Bandara, S., Athauda, I., Navaratne, C., Silva, O., Wackwella, H., Matlashewski, G., & Wickremasinghe, R. (2013). Cross-sectional study to assess risk factors for leishmaniasis in an endemic region in Sri Lanka. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *89*(4), 742–749.
- Rezvan, H., Nourian, A. R., Hamoon Navard, S. (2017). An Overview on *Leishmania* Diagnosis. *JoMMID*, *5*(1 and 2), 1-11.

- Ribeiro, P., Dias, D. S., Lage, D. P., Costa, L. E., Martins, V. T., Tavares, G., Mendonça, D., Lima, M. P., Oliveira, J. S., Steiner, B. T., Machado-de-Ávila, R. A., Roatt, B. M., Chávez-Fumagalli, M. A., Menezes-Souza, D., Duarte, M. C., Teixeira, A. L., & Coelho, E. (2018). Evaluation of a Leishmania hypothetical protein administered as DNA vaccine or recombinant protein against Leishmania infantum infection and its immunogenicity in humans. *Cellular immunology*, 331, 67–77.
- Rodrigues de Santana, F., de Paula Coelho, C., Cardoso, T. N., Perez Hurtado, E. C., Roberti Benites, N., Dalastra Laurenti, M., & Villano Bonamin, L. (2014). Modulation of inflammation response to murine cutaneous Leishmaniasis by homeopathic medicines: Antimonium crudum 30cH. *Homeopathy: the journal of the Faculty of Homeopathy*, 103(4), 264–274.
- Rohousova, I., Talmi-Frank, D., Kostalova, T., Polanska, N., Lestinova, T., Kassahun, A., Yasur-Landau, D., Maia, C., King, R., Votypka, J., Jaffe, C. L., Warburg, A., Hailu, A., Volf, P., & Baneth, G. (2015). Exposure to Leishmania spp. and sand flies in domestic animals in northwestern Ethiopia. *Parasites & vectors*, 8, 360.
- Roy, P., Das, S., Bera, T., Mondol, S., & Mukherjee, A. (2010). Andrographolide nanoparticles in leishmaniasis: characterization and in vitro evaluations. *International journal of nanomedicine*, 5, 1113–1121.
- Saha, P., Ganguly, S., Chatterjee, M., Das, S. B., Kundu, P. K., Guha, S. K., Ghosh, T. K., Bera, D. K., Basu, N., & Maji, A. K. (2017). Asymptomatic leishmaniasis in kala-azar endemic areas of Malda district, West Bengal, India. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(2), e0005391.
- Saporito, L., Giammanco, G. M., De Grazia, S., & Colomba, C. (2013). Visceral leishmaniasis: host-parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 17(8), e572–e576.
- Sasidharan, S., & Saudagar, P. (2021). Leishmaniasis: where are we and where are we heading?. *Parasitology research*, 120(5), 1541–1554.



- Shirzadi, M. R. (2019). Liposomal amphotericin B: A review of its properties, function, and use for treatment of cutaneous leishmaniasis. *Res. Rep. Trop. Med.*, 10, 11–18.
- Singh, K., Garg, G., & Ali, V. (2016). Current Therapeutics, Their Problems and Thiol Metabolism as Potential Drug Targets in Leishmaniasis. *Current drug metabolism*, 17(9), 897–919.
- Singh, O. P., & Sundar, S. (2015). Developments in Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in the Elimination Era. *Journal of parasitology research*, 2015, 239469.
- Singh, O. P., Hasker, E., Sacks, D., Boelaert, M., & Sundar, S. (2014). Asymptomatic Leishmania infection: a new challenge for Leishmania control. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 58(10), 1424–1429.
- Siqueira, C. M., Motta, P. D., Cardoso, T. N., de Paula Coelho, C., Popi, A. F., Couceiro, J. N., Bonamin, L. V., & Holandino, C. (2016). Homeopathic treatments modify inflammation but not behavioral response to influenza antigen challenge in BALB/c mice. *Homeopathy: the journal of the Faculty of Homeopathy*, 105(3), 257–264.
- Sirak, B., Asres, K., Hailu, A., Dube, M., Arnold, N., Häberli, C., Keiser, J., & Imming, P. (2021). In Vitro Antileishmanial and Antischistosomal Activities of Anemonin Isolated from the Fresh Leaves of *Ranunculus multifidus* Forsk. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(24), 7473.
- Socolsky, C., Salamanca, E., Giménez, A., Borkosky, S. A., & Bardón, A. (2016). Prenylated Acylphloroglucinols with Leishmanicidal Activity from the Fern *Elaphoglossum lindbergii*. *Journal of natural products*, 79(1), 98–105.
- Soosaraei, M., Fakhar, M., Hosseini Teshnizi, S., Ziaei Hezarjaribi, H., & Banimostafavi, E. S. (2017). Medicinal plants with promising antileishmanial activity in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Annals of medicine and surgery (2012)*, 21, 63–80.
- Souto, E. B., Dias-Ferreira, J., Craveiro, S. A., Severino, P., Sanchez-Lopez, E., Garcia, M. L., Silva, A. M., Souto, S. B., & Mahant, S. (2019). Therapeutic Interventions for Countering Leishmaniasis and Chagas's Disease: From Traditional Sources to Nanotechnological Systems. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 8(3), 119.

- Souza, M. A., Almeida, T. M., Castro, M. C., Oliveira-Mendes, A. P., Almeida, A. F., Oliveira, B. C., Rocha, L. F., Medeiros, A. C., Brito, M. E., Dessein, A. J., & Pereira, V. R. (2016). American tegumentary leishmaniasis: mRNA expression for Th1 and Treg mediators are predominant in patients with recent active disease. *Immunobiology*, 221(2), 253–259.
- Steverding D. (2017). The history of leishmaniasis. *Parasites & vectors*, 10(1), 82.
- Sunter, J., & Gull, K. (2017). Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open biology*, 7(9), 170165.
- Tanwar, J., Das, S., Fatima, Z., & Hameed, S. (2014). Multidrug resistance: an emerging crisis. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases, 2014*, 541340.
- Thakur, S., Joshi, J., & Kaur, S. (2020). Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. *Journal of parasitic diseases: official organ of the Indian Society for Parasitology*, 44(2), 1–20. Advance online publication. doi:10.1007/s12639-020-01212-w.
- Tiuman, T. S., Ueda-Nakamura, T., Garcia Cortez, D. A., Dias Filho, B. P., Morgado-Díaz, J. A., de Souza, W., & Nakamura, C. V. (2005). Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(1), 176–182.
- Tomiotto-Pellissier, F., Bortoleti, B., Assolini, J. P., Gonçalves, M. D., Carloto, A., Miranda-Sapla, M. M., Conchon-Costa, I., Bordignon, J., & Pavanelli, W. R. (2018). Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. *Frontiers in immunology*, 9, 2529.
- Tournier, A., Klein, S. D., Würtenberger, S., Wolf, U., & Baumgartner, S. (2019). Physicochemical Investigations of Homeopathic Preparations: A Systematic Review and Bibliometric Analysis-Part 2. *Journal of alternative and complementary medicine (New York, N.Y.)*, 25(9), 890–901.
- Tournier, A., Würtenberger, S., Klein, S. D., & Baumgartner, S. (2021). Physicochemical Investigations of Homeopathic Preparations: A Systematic Review and Bibliometric Analysis-Part 3. *Journal of alternative and complementary medicine (New York, N.Y.)*, 27(1), 45–57.
- Upadhyay R. P. (2019). Nanoscience Study of Homeopathic Medicine. *Homeopathy : the journal of the Faculty of Homeopathy*, 108(1), 71–72.

- Vaselek, S., Prudhomme, J., Myskova, J., Lestinova, T., Spitzova, T., Bañuls, A. L., & Volf, P. (2020). Comparative Study of Promastigote- and Amastigote-Initiated Infection of *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) Conducted in Different Biosafety Level Laboratories. *Journal of medical entomology*, 57(2), 601–607.
- Vermelho, A. B., Supuran, C. T., Cardoso, V., Menezes, D., de Andrade Silva, J. R., Ferreira, J. L. P., Amaral, A. C. F., & Rodrigues, I. A. (2013). Leishmaniasis: Possible New Strategies for Treatment. *Intechopen*. doi: 10.5772/57388.
- Votýpka, J., Kasap, O. E., Volf, P., Kodym, P., & Alten, B. (2012). Risk factors for cutaneous leishmaniasis in Cukurova region, Turkey. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 106(3), 186–190.
- Wamai, R. G., Kahn, J., McGloin, J., & Ziaggi, G. (2020). Visceral leishmaniasis: a global overview. *J Glob Health Sci.*, 2(1):e3.
- Wang, P., Lombi, E., Zhao, F. J., & Kopittke, P. M. (2016). Nanotechnology: A New Opportunity in Plant Sciences. *Trends in plant science*, 21(8), 699–712.
- Wheeler, R. J., Gluenz, E., & Gull, K. (2015). Basal body multipotency and axonemal remodelling are two pathways to a 9+0 flagellum. *Nature communications*, 6, 8964.
- WHO (2021). *Leishmaniasis*. Διαθέσιμο στο: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> [τελευταία πρόσβαση 12.11.2021].