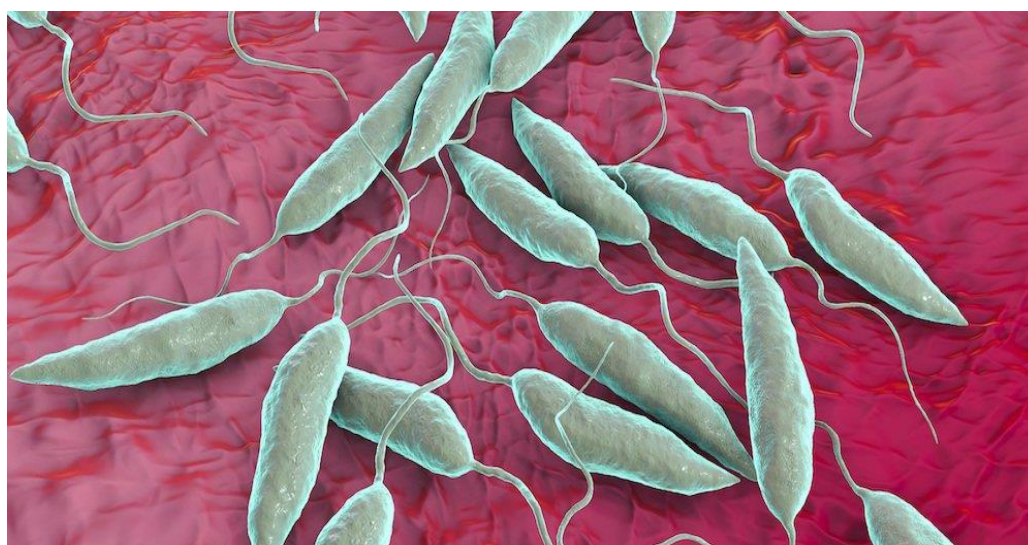




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ  
Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας  
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών  
Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων



Διπλωματική εργασία με θέμα:  
**«*In vitro* δραστηριότητα και αντίσταση αντιλεϊσμανιακών  
φαρμάκων ενάντια σε στελέχη παρασίτων του συμπλέγματος  
*Leishmania donovani*»**



Όνοματεπώνυμο: Ανδριανή Λαγουνάρη

ΑΜ: 18678242

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Χρυσάνθη Βογιατζάκη

Αθήνα, Οκτώβριος, 2023

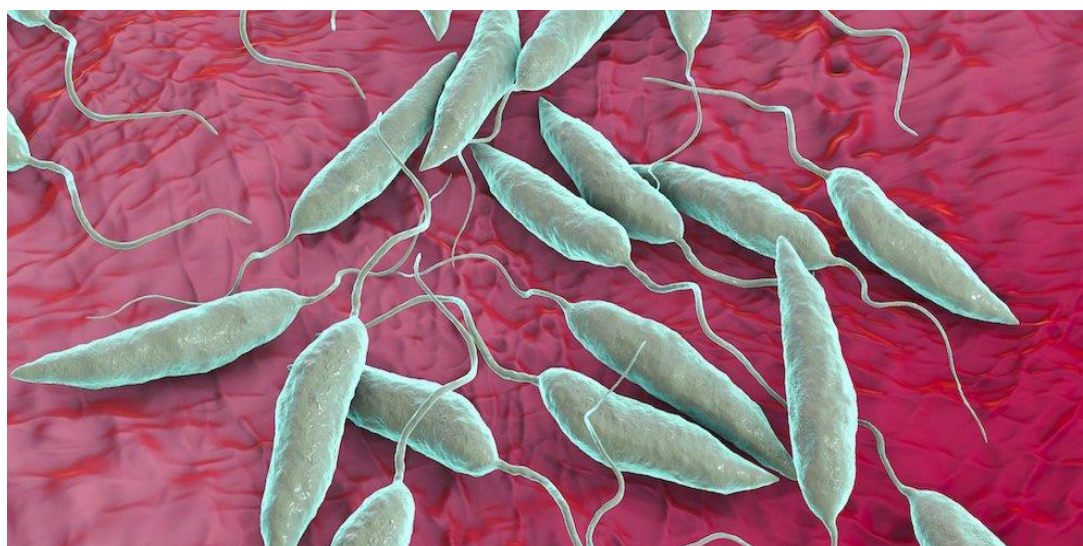


UNIVERSITY OF WEST ATTICA  
Faculty of Sciences of Health and Welfare  
Department of Biomedical Sciences  
Division of Medical Laboratories



Diploma Thesis

**«*In vitro* determination of anti - leishmanial drug activity and  
resistance against *Leishmania donovani* strain complex»**



Full name: Andriani Lagounari

RN: 18678242

Supervisor: Chrysanthi Vogiatzaki

Athens, October, 2023



## **ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

<p><b>Βογιατζάκη Χρυσάνθη</b></p> <p>Επίκουρη καθηγήτρια εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής</p>	
<p><b>Σμυρλή Δέσποινα</b></p> <p>Κύρια ερευνήτρια εργαστηρίου Μοριακής Παρασιτολογίας, Τμήμα Μικροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ</p>	
<p><b>Τσουμάνη Μαρία</b></p> <p>Βιολόγος Msc PhD Ακαδημαϊκός Υπότροφος Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας</p>	

**EXAMINATION COMMITTEE**

<p><b>Vogiatzaki Chrysanthi</b></p> <p>Assistant professor at the Laboratory of Molecular Microbiology and Immunology, University of West Attica</p>	
<p><b>Smyrli Despina</b></p> <p>Principal researcher at the Laboratory of Molecular Parasitology, Microbiology Department, Hellenic Pasteur Institute</p>	
<p><b>Tsoumani Maria</b></p> <p>Biologist Msc PhD Academic Scholar Laboratory of Molecular Microbiology and Immunology</p>	

## **ΔΗΛΩΣΗ ΜΗ ΛΟΓΟΚΛΟΠΗΣ**

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Λαγουνάρη Ανδριανή του Αγγέλου, με αριθμό μητρώου 18678242, φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής 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».

ΥΠΟΓΡΑΦΗ

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παράγραφος αυτή είναι αφιερωμένη σε όλα τα άτομα που συνέβαλαν στην περάτωση της διπλωματικής αυτής εργασίας, η εκπόνηση της οποίας αποδείχθηκε ιδιαίτερη πρόκληση. Η προσωπική μου απειρία σχετικά με διάφορες εργαστηριακές και ερευνητικές πρακτικές σε συνδυασμό με ορισμένα συγκυριακά γεγονότα κατέστησαν την πειραματική διαδικασία χρονοβόρα και, κάποιες φορές, ακόμα και ψυχοφθόρα. Παρόλα αυτά, η εργασία εν τέλει ολοκληρώθηκε μέσω της ανεκτίμητης συμβολής των παρακάτω ατόμων.

Κατ' αρχάς, ευχαριστώ πολύ την κυρία Βογιατζάκη Χρυσάνθη, επίκουρη καθηγήτρια, κτηνίατρο και επιβλέπουσα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου το συγκεκριμένο ερευνητικό θέμα και για την πραγματοποίηση της από καιρού επιθυμίας μου να εκπονήσω την έρευνά μου σε εργαστήριο του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ (ΕΙΠ). Παράλληλα, ευχαριστώ πολύ την κυρία Σμυρλή Δέσποινα, κύρια ερευνήτρια του εργαστηρίου Μοριακής Παρασιτολογίας του τμήματος Μικροβιολογίας του ΕΙΠ, πρώτον για την αμέριστη καθοδήγησή της όσον αφορούσε τα πειραματικά και ερευνητικά ζητήματα, και δεύτερον για την αδιάκοπη υποστήριξή της ακόμα και σε περιόδους δύσκολες γι' αυτήν σε προσωπικό επίπεδο. Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στον Daniel Carrasco, διδακτορικό φοιτητή στο εργαστήριο Μοριακής Παρασιτολογίας, ο οποίος, παρά το βεβαρημένο πρόγραμμα και τις υποχρεώσεις που συνοδεύουν την εκπόνηση μίας διδακτορικής διατριβής, ήταν πάντα πρόθυμος να προσφέρει απαντήσεις σε απορίες, συμβουλές και ψυχολογική υποστήριξη. Όσον αφορά το οικείο περιβάλλον μου, αρχικά ευχαριστώ ιδιαίτερα τον θείο μου, Ζέρβα Μηνά, για τις πολύτιμες συμβουλές που προσέφερε στο συγγραφικό κομμάτι και όλους τους φίλους μου, ιδιαιτέρως όμως τις Ζαχαρένια και Παναγιώτα, για την υπομονή τους όλον αυτόν τον καιρό όπου η περάτωση της εργασίας αποτελούσε προτεραιότητά και μονοπωλούσε τον χρόνο μου. Τέλος, περισσότερο από όλους ευχαριστώ τους γονείς μου, Άγγελο και Κυριακή, τόσο για την υποστήριξή τους κατά την εκπόνηση αυτής της εργασίας, ιδίως όμως για την ανέκαθεν συνεισφορά τους στην εκπαίδευσή μου από την προσχολική ηλικία έως και σήμερα. Η παρούσα διπλωματική εργασία είναι αφιερωμένη σε αυτούς.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γένος *Leishmania* (πρωτόζωο της οικογένειας *Trypanosomatidae*) περιλαμβάνει, μεταξύ άλλων, το κλινικά σημαντικό σύμπλεγμα *L. donovani*, το οποίο διακρίνεται σε 2 είδη, τα *Leishmania (L.) donovani* και *L. infantum/L. chagasi* (Παλαιός και Νέος Κόσμος αντίστοιχα), με το πρώτο να αποτελεί τον αιτιολογικό παράγοντα της VL και το δεύτερο να προκαλεί επιπλέον και την CL. Στην περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου τα κρούσματα εντοπίζονται κυρίως σε σκύλους και δευτερευόντως στον άνθρωπο, ενώ η μετάδοση γίνεται μέσω σκνιπών του γένους *Phlebotomus*. Λόγω απουσίας εμβολίου, η ύπαρξη ποικιλίας θεραπευτικών επιλογών είναι καίριας σημασίας. Για την αντιμετώπιση της λεισμανίασης χρησιμοποιούνται κυρίως σκευάσματα βασισμένα στο πεντασθενές αντιμόνιο και η Αμφοτερικίνη Β, καθώς επίσης και ορισμένα άλλα φάρμακα, μεταξύ αυτών η μιλτεφοσίνη και η παραμομικίνη. Παρόλα αυτά, ανησυχία προκαλεί το ότι έχει αρχίσει να παρατηρείται ανάπτυξη αντοχής, ιδίως σε όσα περιέχουν ενώσεις αντιμονίου. Έτσι, στην παρούσα εργασία αρχικά μελετήθηκε η ευαισθησία ή η αντοχή στο αντιμόνιο στελεχών που απομονώθηκαν από την Ελλάδα και την Τουρκία, μέσω υπολογισμού της τιμής  $IC_{50}$  χρησιμοποιώντας την μέθοδο αναγωγής της ρεσαζουρίνης, με 2 από τα 9 που δοκιμάστηκαν να εμφανίζουν  $IC_{50}$  μεγαλύτερο του ορίου ανθεκτικότητας. Παράλληλα, στα ίδια στελέχη χορηγήθηκε και AmB, άλλο σημαντικό αντιλεισμανιακό φάρμακο έναντι του οποίου δεν έχει καταγραφεί ανάπτυξη αντοχής. Πράγματι, και τα 9 στελέχη χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητα. Πολλοί μηχανισμοί ανάπτυξης αντοχής έχουν ήδη αποσαφηνιστεί και ένας από αυτούς περιλαμβάνει αύξηση της έκφρασης του MRPA μεταφορέα, μόριο που συμβάλλει στην απομάκρυνση του δραστικού αντιμονίου από το κύτταρο και κωδικοποιείται στον γονιδιακό τόπο H-Iocus, (χρωμόσωμα 23). Έτσι, το δεύτερο μέρος της έρευνας περιλαμβάνει την απομόνωση γενετικού υλικού και τον μοριακό έλεγχο 4 εκ των 9 στελεχών μέσω δοκιμασίας RT-PCR που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο. Μέσω αυτής, ελέγχθηκε η έκφραση του κωδικοποιητικού γονιδίου του MRPA μεταφορέα σε σύγκριση με την έκφραση άλλου, σταθερά διπλοειδούς γονιδίου, συγκεκριμένα αυτού που κωδικοποιεί το ένζυμο G3PD και η ποσοτικοποίηση έγινε με την μαθηματική μέθοδο  $\Delta\Delta Ct$ , η οποία εν τέλει επιβεβαίωσε την ύπαρξη διπλάσιας ποσότητας του γονιδίου που κωδικοποιεί τον MRPA μεταφορέα στο ανθεκτικό στο αντιμόνιο στέλεχος συγκριτικά με ένα ευαίσθητο.



**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** Παράσιτο, σύμπλεγμα *Leishmania donovani*, Σπλαχνική λεισμανίαση (VL), Δερματική λεισμανίαση (CL), IC<sub>50</sub>, Ανθεκτικότητα, Ευαισθησία, Τρισθενές Αντιμόνιο (SbIII), Αμφοτερικίνη Β (AmrB), Προμαστιγωτό στάδιο, Ρεσαζουρίνη, RT-PCR, Ανευπλοειδία, MRPA μεταφορέας, H-locus, Χρωμόσωμα 23

## **ABSTRACT**

The genus *Leishmania* (a protozoan of the *Trypanosomatidae* family) includes, among others, the clinically important *L. donovani* complex, which is divided into 2 species, *Leishmania (L.) donovani* and *L. infantum/L. chagasi* (Old and New World respectively), with the former being the causative agent of visceral leishmaniasis and the latter also causing cutaneous leishmaniasis. In the Eastern Mediterranean area, the cases are found mainly in dogs and secondarily in humans, while the transmission is through sand flies of the genus *Phlebotomus*. In the absence of a vaccine, the existence of a variety of treatment options is of great importance. For the treatment of leishmaniasis, formulations based on pentavalent antimony and Amphotericin B are mainly used, as well as some other drugs, among them miltefosine and paramomycin. However, the fact that resistance has begun to develop is concerning, particularly to the drugs which contain antimony compounds. Thus, in the present diploma thesis, the susceptibility or resistance to antimony of strains isolated from Greece and Turkey was initially studied, by calculating the  $IC_{50}$  value using the resazurin reduction method, with 2 of the 9 tested showing  $IC_{50}$  greater than the resistance threshold. In parallel, the same strains were also given AmpB, another important anti-leishmanial drug against which the development of resistance is not very common. Indeed, all 9 strains were classified as susceptible. Many resistance mechanisms have already been elucidated and one of them involves an increase in the expression of the MRPA transporter, a molecule that contributes to the removal of active antimony from the cell and is encoded in the H-locus gene domain (chromosome 23). Thus, the second part of the research includes the isolation of genetic material and the molecular control of 4 of the 9 strains through a RT-PCR test developed in the laboratory. Through this, the expression of the coding gene of the MRPA transporter was compared to the expression of another, permanently diploid gene, the one encoding the G3PD enzyme in specific, and the quantification was done with the use of the mathematical method  $\Delta\Delta Ct$ , which confirmed the existence of a double amount of the gene encoding the MRPA transporter in the antimony-resistant strain compared to a susceptible one.

**KEY WORDS:** Parasite, *Leishmania donovani* complex, Visceral Leishmaniasis (VL), Cutaneous Leishmaniasis (CL), IC<sub>50</sub>, Resistance, Sensibility, Trivalent Antimony (SbIII), Amphotericin B (AmpB), Promastigote stage, Resazourine, RT-PCR, Aneuploidy, MRPA transporter, H-locus, Chromosome 23

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ - ABBREVIATIONS

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ	ΑΓΓΛΙΚΗ ΟΡΟΛΟΓΙΑ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΟΡΟΛΟΓΙΑ
<b>MYA</b>	Million Years Ago	Εκατομμύρια χρόνια πριν
<b>CL</b>	Cutaneous Leishmaniasis	Δερματική Λεισμανίαση
<b>VL</b>	Visceral Leishmaniasis	Σπλαχνική λεισμανίαση
<b>WHO</b>	World Health Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
<b>MCL</b>	Mucocutaneous Leishmaniasis	Βλεννογονοδερματική Λεισμανίαση
<b>DCL</b>	Diffuse Cutaneous Leishmaniasis	Διάχυτη δερματική λεισμανίαση
<b>PKDL</b>	Post-Kala azar Dermal Leishmaniasis	Μετά-καλά αζάρ δερματική λεισμανίαση
<b>gp63</b>	Glycoprotein 63	Γλυκοπρωτεΐνη 63
<b>PSP</b>	Promastigote Surface Protease	Πρωτεάση Επιφανείας προμαστιγώτη
<b>LPG</b>	Lipophosphoglycan	Λιποφοσφογλυκάνη
<b>GIPLs</b>	Glycoinositol phospholipids	Φωσφολιπίδια γλυκοϊνοσιτόλης
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information	Εθνικό Κέντρο Πληροφοριών Βιοτεχνολογίας
<b>LR</b>	Leishmaniasis Recidivans	Υποτροπιάζουσα λεισμανίαση
<b>TLR</b>	Toll-Like Receptor	Υποδοχέας τύπου Toll
<b>DCs</b>	Dendritic Cells	Δενδριτικά κύτταρα
<b>IL</b>	Interleukin	Ιντερλευκίνη
<b>T<sub>c</sub><sub>s</sub></b>	Cytotoxic T-lymphocytes	Κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα
<b>iNOS</b>	inducible Nitric Oxide Synthase	Επαγωγίμη Συνθετάση νιτρικού οξέος
<b>PPGs</b>	Proteophosphoglycans	Πρωτεοφωσφογλυκάνες
<b>KMP-11</b>	Kinetoplastid Membrane Protein 11kDa	Κινητοπλαστιδιακή μεμβρανική πρωτεΐνη 11kDa
<b>APs</b>	Acid Phosphatases	Όξινες Φωσφατάσες
<b>HSPs</b>	Heat Shock Proteins	Πρωτεΐνες θερμικού σοκ
<b>MAC</b>	Membrane Attack Complex	Σύμπλεγμα Επίθεσης στην μεμβράνη
<b>NO</b>	Nitrogen Monoxide	Μονοξείδιο Αζώτου
<b>IFN</b>	Interferon	Ιντερφερόνη
<b>APCs</b>	Antigen-Presenting Cells	Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species	Ενεργές ρίζες οξυγόνου
<b>RNS</b>	Reactive Nitrogen Species	Ενεργές ρίζες αζώτου
<b>NOX2</b>	NADPH Oxidase 2	Οξειδάση NADPH 2
<b>NKs</b>	Natural Killers	Κύτταρα φυσικοί φονείς

<b>NETs</b>	Neutrophil Extracellular Traps	Εξωκυττάρειες παγίδες ουδετερόφιλων
<b>TNF-α</b>	Tumor Necrosis Factor α	Παράγοντας νέκρωσης όγκων α
<b>TGF-β</b>	Transforming Growth Factor b	Μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας β
<b>Ig</b>	Immunoglobulin	Ανοσοσφαιρίνη
<b>ADCC</b>	Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity	Εξαρτώμενη από αντίσωμα κυτταρομεσολαβητική κυτταροτοξικότητα
<b>WBCs</b>	White Blood Cells	Λευκά Αιμοσφαίρια
<b>Th<sub>s</sub></b>	Helper T-lymphocytes	Βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor	
<b>Treg</b>	Regulatory T-lymphocytes	Ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα
<b>H&amp;E</b>	Hematoxylin & Eosin	Αιματοξυλίνη & Εοσίνη
<b>NNN</b>	Novy-McNeal-Nicolle	
<b>RT</b>	Room Temperature	Θερμοκρασία Δωματίου
<b>IDSA</b>	Infectious Disease Society of America	Αμερικανική Κοινότητα Λοιμωδών Νοσημάτων
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	Ενζυμοσυνδεδεμένη Δοκιμασία Ανοσοπροσρόφησης
<b>DAT</b>	Direct Agglutination Test	Δοκιμασία άμεσης συγκόλλησης
<b>FAST</b>	Fast Agglutination Screening Test	Δοκιμασία ελέγχου ταχείας συγκόλλησης
<b>IFAT</b>	Indirect Fluorescent Antibody Test	Δοκιμασία Έμμεσου Ανοσοφθορισμού
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis	Ηλεκτροφόρηση Πολυακρυλαμίδης σε γέλη θειικού-δωδεκύλιο-νατρίου
<b>IHA</b>	Indirect Hemagglutination Assay	Δοκιμασία Έμμεσης Αιμοσυγκόλλησης
<b>RBCs</b>	Red Blood Cells	Ερυθρά Αιμοσφαίρια
<b>IC</b>	Immunochromatography	Ανοσοχρωματογραφία
<b>RDTs</b>	Rapid Diagnostic Tests	Ταχείες Διαγνωστικές Εξετάσεις
<b>KAtex</b>	Kala Azar Latex Agglutination Test	Δοκιμασία συγκόλλησης Kala Azar με σφαιρίδια latex
<b>LST</b>	Leishmanin Skin Test	Δερματική δοκιμασία λεισμανίνης
<b>MST</b>	Montenegro Skin Test	Δερματική δοκιμασία montenegro

<b>NAATs</b>	Nucleic Acid Amplification Technics	Τεχνική Ενίσχυσης Νουκλεϊκού οξέος
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
<b>RT-PCR</b>	Real-time PCR	PCR πραγματικού χρόνου
<b>qPCR</b>	quantitative PCR	Ποσοτική PCR
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism	Ανάλυση πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού
<b>RAPD</b>	Randomly Amplified Polymorphic DNA	Τυχαία Ενισχυμένο Πολυμορφικό DNA
<b>NASBA</b>	Nucleic Acid Sequence-Based Amplification	
<b>RPA</b>	Recombinase Polymerase Amplification	
<b>LAMP</b>	Loop-Mediated Isothermal Amplification	
<b>AFLP</b>	Amplified Fragment Length Polymorphism	
<b>MLST</b>	Multilocus Sequence Typing	
<b>MLMT</b>	Multilocus Microsatellite Typing	
<b>MLEE</b>	Multilocus Enzyme Electrophoresis	
<b>DEET</b>	N,N-Diethyl-meta-toluamide	
<b>HL</b>	Human Leishmaniasis	Λεισμανίαση Ανθρώπου
<b>IDRA</b>	Infectious Disease Research Institute	Ινστιτούτο Ερευνών Λοιμωδών Νοσημάτων
<b>Sabin PDP</b>	Sabin Vaccine Institute Product Development Partnership	
<b>MeLeVaClin</b>	European Multivalent Vaccine for HL	
<b>CanL</b>	Canine Leishmaniasis	Λεισμανίαση Σκύλου
<b>Sb</b>	Antimony	Αντιμόνιο
<b>SSG</b>	Sodium Stibogluconate	Στιβογλυκονικό νάτριο
<b>MA</b>	Meglumine Antimoniate	Αντιμονιακή Μεγλουμίνη
<b>AQP1</b>	Aquaporin 1	Ακουαπορίνη 1
<b>TR</b>	Trypanothione Reductase	Αναγωγή τρυπανοθειόνης
<b>ABCs</b>	ATP-Binding Cassettes	
<b>MDR1</b>	Multidrug Resistance Protein 1	
<b>LAMB</b>	Liposomal Amphotericin B	Λιποσωμική Αμφοτερικίνη Β
<b>PMM</b>	Paramomycin	Παραμομκίνη
<b>MLT/MIL/MT</b>	Miltefosine	Μιλτεφοσίνη
<b>AmpB</b>	Amphotericin B	Αμφοτερικίνη Β
<b>ABLC</b>	AmpB Lipid Complex	
<b>ABCD</b>	AmpB Cholesterol Dispersion	
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration	
<b>LMT</b>	Leishmania Miltefosine Transporter	Μεταφορέας Μιλτεφοσίνης Λεισμανίας

<b>IC<sub>50</sub></b>	50% Inhibitory Concentration	50% Ανασταλτική Συγκέντρωση
<b>FBS</b>	Fetal Bovine Serum	
<b>P/S</b>	Penicillin/Streptomycin	Πενικιλίνη/ Στρεπτομικίνη
<b>PBS</b>	Phosphate-Buffered Saline	
<b>HEPES</b>	N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid	
<b>DMSO</b>	Dimethyl Sulfoxide	
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	Double-distilled water	Δισαπεσταγμένο νερό
<b>BSC</b>	Biosafety Cabinet	Θάλαμος Βιολογικής Ασφάλειας
<b>CO<sub>2</sub></b>	Carbon Dioxide	Διοξείδιο του Άνθρακα
<b>CNVs</b>	Copy Number Variations	Μεταβολές Αριθμού Αντιγράφων
<b>dNTPs</b>	Deoxynucleotide triphosphates	Τριφωσφορικά Δεοξυνουκλεοτίδια
<b>Fw</b>	Forward	Εμπρόσθιος
<b>Rv</b>	Reverse	Ανάστροφος
<b>OD</b>	Optical Density	Οπτική Πυκνότητα
<b>Ct</b>	Threshold Cycle	Κύκλος Κατωφλίου

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>X</b>
<b>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ - ABBREVIATIONS</b>	<b>XII</b>
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ</b>	<b>XVIII</b>
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ</b>	<b>XVIII</b>
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ</b>	<b>XVIII</b>
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ</b>	<b>XIX</b>
<b>1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>1</b>
1.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	1
1.2 ΕΞΕΛΙΞΗ	3
1.3 ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ	4
1.4 ΚΥΡΙΟΙ ΞΕΝΙΣΤΕΣ	7
1.5 ΕΝΔΙΑΜΕΣΟΣ ΞΕΝΙΣΤΗΣ	8
1.6 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ	10
1.7 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ	12
1.7.1 ΣΤΟΝ ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ ΞΕΝΙΣΤΗ	12
1.7.2 ΣΤΟΝ ΚΥΡΙΟ ΞΕΝΙΣΤΗ	13
1.8 ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΟΡΓΑΝΩΣΗ	15
1.9 ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ	16
1.9.1 ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ (Cutaneous Leishmaniasis – CL)	16
1.9.2 ΒΛΕΝΝΟΓΟΝΟΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ (Mucocutaneous Leishmaniasis – MCL)	17
1.9.3 ΣΠΛΑΧΝΙΚΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ (Visceral Leishmaniasis – VL)	17
1.9.4 POST-KALA-AZAR DERMAL LEISHMANIASIS (PKDL)	18
1.10 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ <i>LEISHMANIA SPP</i> - ΚΥΡΙΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ	19
1.10.1 ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΕΣ	19
1.10.2 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΞΕΝΙΣΤΗ	21
1.11 ΔΙΑΓΝΩΣΗ	24



1.11.1	ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ	25
1.11.2	ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	26
1.11.3	ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ (Nuclei Acid Amplification Tests – NAATs)	28
<b>1.12</b>	<b>ΠΡΟΛΗΨΗ – ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ</b>	<b>29</b>
1.12.1	ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	29
1.12.2	ΜΕΤΡΑ ΠΡΟΛΗΨΗΣ	30
1.12.3	ΕΜΒΟΛΙΟ	30
<b>1.13</b>	<b>ΘΕΡΑΠΕΙΑ</b>	<b>32</b>
1.13.1	ΕΝΩΣΕΙΣ ΑΝΤΙΜΟΝΙΟΥ	32
1.13.2	ΑΜΦΟΤΕΡΙΚΙΝΗ Β (AmpB)	36
1.13.3	ΜΙΛΤΕΦΟΣΙΝΗ (MLT/MIL/MT)	38
1.13.4	ΠΑΡΑΜΟΜΥΚΙΝΗ (PMM)	40
<b>2</b>	<b>ΣΚΟΠΟΣ</b>	<b>42</b>
<b>3</b>	<b>ΥΛΙΚΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>ΥΛΙΚΑ</b>	<b>43</b>
3.1.1	Αντιδραστήρια	43
3.1.2	Αναλώσιμα Υλικά	43
3.1.3	Εργαστηριακός Εξοπλισμός	44
3.1.4	Παρασιτικά Στελέχη	44
<b>3.2</b>	<b>ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>45</b>
3.2.1	Απόψυξη παρασιτικών στελεχών	45
3.2.2	Ανάπτυξη σε καλλιέργεια	45
3.2.3	Προσδιορισμός συγκέντρωσης	45
3.2.4	Παρασκευή διαλυμάτων φαρμάκων	46
3.2.5	<i>In vitro</i> υπολογισμός του IC <sub>50</sub> σε προμαστιγώτες με την μέθοδο Alamar Blue	47
3.2.6	Απομόνωση γενετικού υλικού	49
3.2.7	RT-PCR	50
<b>4</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>54</b>
4.1	ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ IC <sub>50</sub>	54
4.2	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ	60
4.3	RT-PCR	60
<b>5</b>	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ</b>	<b>69</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 – Ανατομικές δομές σκνίπας και ανάπτυξη του γένους <i>Leishmania</i> (μαύρο χρώμα) σύμφωνα με τους Lainson & Shaw. Πηγή: (3) .....	2
Εικόνα 2 - Χάρτης παγκόσμιας ενδημικότητας δερματικής λεισμανίασης για το 2020. Πηγή: (8) .....	6
Εικόνα 3 - Χάρτης παγκόσμιας ενδημικότητας σπλαχνικής λεισμανίασης για το 2020. Πηγή: (8) .....	6
Εικόνα 4 – Αναπτυξιακά στάδια σκνίπας. Πηγή: (12).....	9
Εικόνα 5 - Διαίρεση των Τρυπανοσωματιδίων όσων αφορά την θέση του μαστιγίου. Πηγή:(3). .....	11
Εικόνα 6 - Δομή προμαστιγωτής και αμαστιγωτής μορφής. Πηγή: (15). .....	12
Εικόνα 7 - Μορφολογικές παραλλαγές προμαστιγωτής μορφής σε συνάρτηση με τις θέσεις ανάπτυξης μέσα στην σκνίπα. Πηγή: (15). .....	13
Εικόνα 8 – Κύκλος ζωής των <i>Leishmania spp.</i> Πηγή: (6).....	14
Εικόνα 9 - Κλινικές εκδηλώσεις διάφορων μορφών λεισμανίασης. ....	19
Εικόνα 10 - Ορισμένοι από τους μηχανισμούς ανάπτυξης ανοχής έναντι του <i>SbIII</i> που παρατηρούνται στην <i>Leishmania spp.</i> Πηγή: (19). .....	36
Εικόνα 11 - Χημικές δομές των κυριότερων σκευασμάτων έναντι της VL. Πηγή: (55).....	41
Εικόνα 12 - <i>In vitro</i> δοκιμασία υπολογισμού $IC_{50}$ των <i>SbIII</i> και <i>AmpB</i> για το στέλεχος EP184 μετά από επώαση 24h με Alamar Blue .....	59
Εικόνα 13 - <i>In vitro</i> δοκιμασία υπολογισμού $IC_{50}$ των <i>SbIII</i> και <i>AmpB</i> για το στέλεχος GH8 μετά από επώαση 24h με Alamar Blue .....	59

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 - Γεωγραφική κατανομή παθογόνων ειδών του γένους <i>Leishmania</i> και οι νόσοι που προκαλούν. Πηγή: (5).....	6
Πίνακας 2 – Κύριοι ξενιστές της <i>Leishmania spp</i> σε διάφορες περιοχές εντόπισης. Πηγή: (11). ....	8
Πίνακας 3 - Κυριότεροι παράγοντες κινδύνου νόσησης με λεισμανίαση. Πηγή: (8) .....	30
Πίνακας 4 – Παρασιτικά στελέχη του συμπλέγματος <i>L. donovani</i> που χρησιμοποιήθηκαν. ....	45
Πίνακας 5 - Αναπαράσταση κάτοψης πλάκας 96 φρεατίων και ενδεικτικός τρόπος τοποθέτησης των διαφορετικών διαλυμάτων στα φρεάτια. ....	48
Πίνακας 6 - Αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων <i>SbIII</i> και <i>AmpB</i> .....	48
Πίνακας 7 - Οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την RT-PCR για την ενίσχυση των γονιδίων που κωδικοποιούν τον MRPA και την G3PD.....	51
Πίνακας 8 - Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της RT-PCR, αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις αυτών.....	52
Πίνακας 9 - Περιεχόμενα των RT-PCR <i>microtubes</i> ανά θέση/θέσεις στον θερμικό κυκλοποιητή. ....	52
Πίνακας 10 - Προφίλ θερμοκυκλοποίησης κατά την διεξαγωγή της RT-PCR. ....	53
Πίνακας 11 - Συγκεντρώσεις DNA και λόγοι OD260/OD280 και OD260/OD230 ανά στέλεχος. ....	60
Πίνακας 12 - Μέσοι όροι των Ct για κάθε ζεύγος στελέχους-γονιδίου και υπολογισμός της τιμής $\Delta Ct$ . ....	63

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1 - Απόκριση στελέχους GD3 στην χορήγηση <i>SbIII</i> και <i>AmpB</i> . ....	54
Γράφημα 2 - Απόκριση στελέχους GD55 στην χορήγηση <i>SbIII</i> και <i>AmpB</i> . ....	55
Γράφημα 3 - Απόκριση στελέχους GD67 στην χορήγηση <i>SbIII</i> και <i>AmpB</i> . ....	55
Γράφημα 4 - Απόκριση στελέχους GD69 στην χορήγηση <i>SbIII</i> και <i>AmpB</i> . ....	56
Γράφημα 5 - Απόκριση στελέχους GH14 στην χορήγηση <i>SbIII</i> και <i>AmpB</i> . ....	56

Γράφημα 6 - Απόκριση στελέχους Lg13 στην χορήγηση SblII και AmpB.....	57
Γράφημα 7 - Απόκριση στελέχους EP176 στην χορήγηση SblII και AmpB. ....	57
Γράφημα 8 - Απόκριση στελέχους EP184 στην χορήγηση SblII και AmpB. ....	58
Γράφημα 9 – Απόκριση στελέχους GH8 στην χορήγηση SblII και AmpB.....	58
Γράφημα 10 - Συγκεντρωτικό γράφημα σιγμοειδών καμπυλών θερμοκυκλοποίησης.....	61
Γράφημα 11 - Καμπύλες ενίσχυσης της τριπλέτας με DNA του στελέχους GH8 και εκκινητές του γονιδίου MRPA (αριστερά) και G3PD (δεξιά).....	61
Γράφημα 12 - Καμπύλες ενίσχυσης της τριπλέτας με DNA του στελέχους EP184 και εκκινητές του γονιδίου MRPA (αριστερά) και G3PD (δεξιά).....	61
Γράφημα 13 - Καμπύλες ενίσχυσης της τριπλέτας με DNA του στελέχους GD69 και εκκινητές του γονιδίου MRPA (αριστερά) και G3PD (δεξιά).....	62
Γράφημα 14 - Καμπύλες ενίσχυσης της τριπλέτας με DNA του στελέχους GD67 και εκκινητές του γονιδίου MRPA (αριστερά) και D3PD (δεξιά).....	62
Γράφημα 15 - Συγκεντρωτικό γράφημα καμπυλών τήξης των χρησιμοποιούμενων εκκινητών. ....	62

### **ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ**

Διάγραμμα 1 - Ταξινόμια του γένους <i>Leishmania</i> με έμφαση στα κλινικά σημαντικά είδη. ....	3
Διάγραμμα 2 - Σύνοψη των κυριότερων μέτρων πρόληψης της λεισμανίασης. Πηγές: (1,6,8,11,24) .....	30

# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

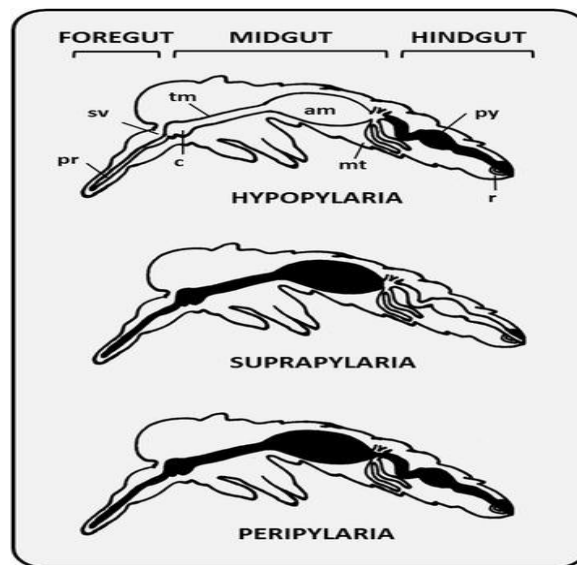
## 1.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Τα παράσιτα του γένους *Leishmania*, το οποίο πήρε το όνομα του από τον παθολόγο W.B. Leishman (1), κατατάσσονται στο Βασίλειο των Πρωτίστων (*Protista*), στην Τάξη των Κινητοπλαστοειδών (*Kinetoplastida*), Υποτάξη Τρυπανοσωματίνες (*Trypanosomatina*) και στην Οικογένεια των Τρυπανοσωματιδών (*Trypanosomatidae*), η οποία περιλαμβάνει 17 γένη. Από αυτά, 11 (*Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Blechnomonas*, *Wallacemonas*, *Jaenimonas*, *Sergeia*) ολοκληρώνουν τον κύκλο ζωής τους παρασιτώντας σε ασπόνδυλο ξενιστή και 3 (*Trypanosoma*, *Phytomonas*, *Leishmania*) απαιτούν υποχρεωτικά δύο ξενιστές, έναν ασπόνδυλο και έναν σπονδυλωτό. Τα υπόλοιπα (*Angomonas*, *Strigomonas* και *Kentomonas*) απαρτίζουν την υποοικογένεια *Strigomonadinae*, η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενδοσυμβιωτικών βακτηρίων (2).

Απ' τα παραπάνω, ιατρικής σημασίας παθογόνα είναι μόνο τα γένη *Trypanosoma* και *Leishmania*, τα οποία προκαλούν σοβαρές νόσους στον άνθρωπο. Συγκεκριμένα, τα *T. brucei gambiense* και *rhodesiense* προκαλούν την ανθρώπινη Αφρικανική Τρυπανοσωμίαση, το *T. cruzi* την νόσο Chagas ενώ τα διάφορα είδη του γένους *Leishmania* αποτελούν τον αιτιολογικό παράγοντα της Λεισμανίασης. Όλα μεταδίδονται μέσω αιματοφάγων εντόμων της οικογένειας της σκνίπας (3), και συγκεκριμένα από τα γένη *Phlebotomus* και *Sergentomyia* στον Παλιό και *Lutzomyia* και *Brumptomyia* στον Νέο Κόσμο (2).

Όσων αφορά τον διαχωρισμό του γένους *Leishmania* σε είδη, αυτός ξεκίνησε το 1908, όταν ο Nicolle διαχώρισε τα είδη *L.infantum* και *L.donovani* βάσει κλινικών χαρακτηριστικών. Το 1964, ο διαχωρισμός αυτός απορρίφθηκε και το 1976 ο Vickerman πρότεινε την αναγνώριση 4 συμπλεγμάτων (*L. donovani*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*). Το 1979, ο Lainson ανακάλυψε ότι η ανάπτυξη των παρασίτων μέσα στο έντομο-φορέα μπορεί να γίνει είτε κυρίως στο οπίσθιο έντερο (*Hydropharynx*), είτε κυρίως στον πυλωρό (*Sutropharynx*) ή και στον πυλωρό και στο οπίσθιο έντερο μαζί (*Peripharynx*). Βασισμένος σε αυτό, σε συνεργασία με τον Shaw, το 1987 διαίρεσαν το γένος σε 2 υπογένη. Τα παράσιτα που αναπτύσσονται στον πυλωρό κατατάχθηκαν στο υπογένος *L.*

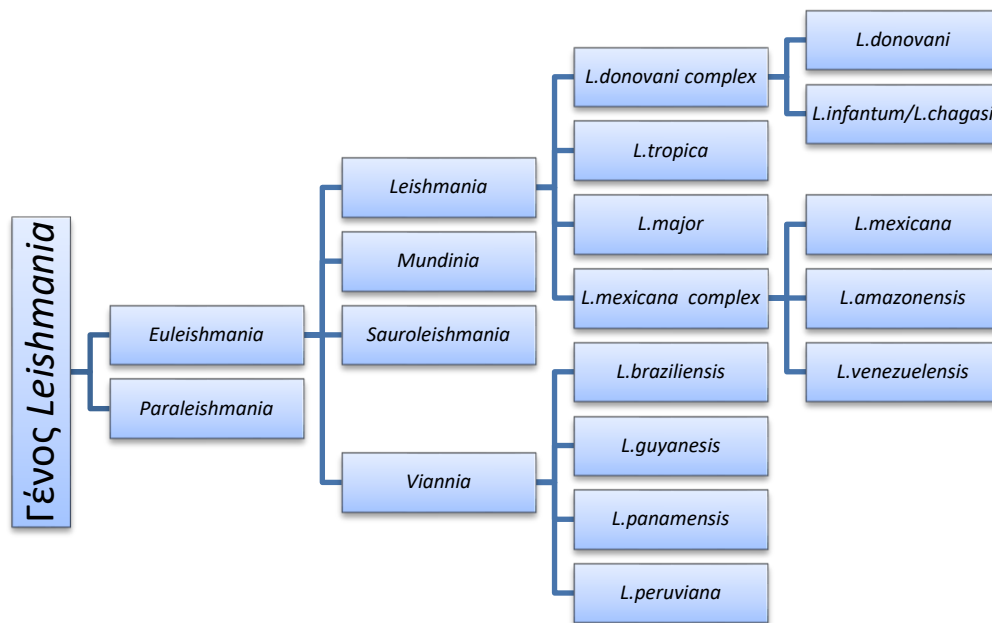
(*Leishmania*) ενώ αυτά που αναπτύσσονται και στον πυλωρό και στο οπίσθιο έντερο μαζί, στο υπογένος *L. (Viannia)*. Παράλληλα, τα παράσιτα που αναπτύσσονται μόνο στο οπίσθιο έντερο κατατάχθηκαν στο νέο γένος *Sauroleishmania*, το οποίο πήρε το όνομα του απ' το γεγονός ότι τα παράσιτα αυτά μολύνουν σαύρες, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα που μολύνουν θηλαστικά (2). Το σύστημα αυτό φαίνεται να αποτελεί καλό ταξονομικό κριτήριο, καθώς πλέον υποστηρίζεται και φυλογενετικά (3). Την δεκαετία του 1970, εντοπίστηκαν διάφορα βιοχημικά, ανοσολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά του παρασίτου και χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη μεθόδων ταυτοποίησης και ταξινόμησης, με κυριότερη την ηλεκτροφόρηση ισοενζύμων, η οποία θεωρούταν για χρόνια η gold standard μέθοδος (2). Μία ομάδα στελεχών που εμφανίζει παρόμοιο ηλεκτροφορητικό προφίλ ισοενζύμων καλείται «ζυμόδεμα» (zymodeme). Ένα είδος μπορεί να περιέχει ένα ή περισσότερα ζυμοδέματα αλλά στελέχη διαφορετικών ειδών δεν μπορούν να ανήκουν στο ίδιο ζυμόδεμα (4).



Εικόνα 1 – Ανατομικές δομές σκνίπας και ανάπτυξη του γένους *Leishmania* (μαύρο χρώμα) σύμφωνα με τους Lainson & Shaw. Φαίνονται οι δομές: προβοσκίδα (pr), οισοφαγική βαλβίδα (sv), καρδιά (c), θωρακικό μέσο έντερο (tm), κοιλιακό μέσο έντερο (am), μαλπιγγιανά σωληνάκια (mt), πυλωρός (py) και οπίσθιο έντερο (r). Πηγή: (3).

Πλέον, η ταξινόμια που κυριαρχεί περιλαμβάνει 2 φυλογενετικούς κλάδους, τους *Euleishmania* και *Paraleishmania*. Ο πρώτος αποτελείται από 4 υπογένη [*Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania*, και σύμπλεγμα *L.enriettii*-πλέον *Mundinia* (5)], ενώ ο δεύτερος περιλαμβάνει όποιο είδος δεν κατατάσσεται στα προηγούμενα. Συνολικά, και οι 2 κλάδοι περιλαμβάνουν 53 είδη, από τα οποία 31 παρασιτούν σε θηλαστικά και 20

προκαλούν νόσο στον άνθρωπο (2). Η πλειοψηφία των παθογόνων κατατάσσεται στα υπογένη *Leishmania* και *Viannia*. Το πρώτο περιέχει 2 συμπλέγματα (*L. donovani* και *L. mexicana*) καθώς και άλλα 2 είδη (*L. tropica* και *L. major*), ενώ το δεύτερο περιέχει 4 κλινικά σημαντικά είδη (*L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*). Το **σύμπλεγμα *L. donovani*** διακρίνεται περαιτέρω στα **είδη *L. donovani* και *L. infantum*** (στον Παλιό Κόσμο) ή *L. chagasi* (στο Νέο Κόσμο), ενώ το σύμπλεγμα *L. mexicana* περιλαμβάνει τα είδη *L. mexicana*, *L. venezuelensis* και *L. amazonensis* (6).



Διάγραμμα 1 - Ταξινόμια του γένους *Leishmania* με έμφαση στα κλινικά σημαντικά είδη.

## 1.2 ΕΞΕΛΙΞΗ

Για να αντιληφθούμε τους λόγους που οδήγησαν στην σημερινή μορφή ταξινόμησης των ειδών του παρασίτου πρέπει να εξετάσουμε την εξελικτική του πορεία ανά τους αιώνες. Το γένος *Leishmania* φαίνεται να έχει τις ρίζες του 252-66 MYA (Μεσοζωική περίοδος) (2), με το πρώτο απολίθωμα να χρονολογείται 100 MYA (Πρώιμη Κρητιδική περίοδος) (7). Η προέλευση όμως των διαφορετικών ειδών δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως ακόμα. Υπάρχουν 3 θεωρίες, η Παλαιοαρκτική (Lysenko, 1971), η Νεοτροπική (Lainson&Shaw, 1987) και η Υπερηπειρωτική (Momen&Cupolilli, 2000), με την τελευταία να συμφωνεί με τα διαθέσιμα μοριακά φυλογενετικά δεδομένα και να επιβεβαιώνεται περαιτέρω μέσω νέων μεθόδων βιοπληροφορικής. Σύμφωνα με αυτήν, καίρια σημεία στην εξελικτική ιστορία τόσο του παρασίτου όσο και των φορέων και ξενιστών του

αποτελεί ο διαχωρισμός της Παγγαίας<sup>1</sup> σε Λαυρασία<sup>2</sup> και Γκοντβάνα<sup>3</sup> κατά την Ιουρασική περίοδο (200-145 ΜΥΑ) και ο διαχωρισμός της Αφρικής και της Νότιας Αμερικής κατά την διάσπαση της Γκοντβάνα (5).

Ο πρώτος ξενιστής του παρασίτου φαίνεται ότι ήταν τα πρώιμα *Diptera*, τα οποία κατά την διάσπαση της Παγγαίας χωρίστηκαν σε 2 γένη, το *Phlebotomus* στην Λαυρασία και το *Lutzomyia* στην Γκοντβάνα. Λαμβάνοντας όμως υπ' όψιν τον σύντομο κύκλο ζωής τους και την μικρή απόσταση που μπορούν να διανύσουν κατά την πτήση, μάλλον δεν έπαιξαν σημαντικό ρόλο στην διασπορά του παρασίτου. Πιθανολογείται ότι έντομα της τάξης *Diptera* μετέφεραν το παράσιτο σε σπονδυλωτούς ξενιστές, κυρίως τρωκτικά και ερπετά, και αυτά με την σειρά τους ευθύνονται για την γεωγραφική διασπορά του.

Αργότερα, 54-25 ΜΥΑ, κατά την διάσπαση της Γκοντβάνα, το γένος *Leishmania* διαιρέθηκε και εξελίχθηκε στο υπογένος *Viannia* στην Νότια Αμερική και στα άλλα 3 υπογένη στην Αφρική (5). Παλαιότερο όλων φαίνεται να είναι το υπογένος *Mundinia* (3). Μοριακές αναλύσεις έχουν δείξει ότι τα είδη *L. donovani* και *L. infantum* διαχωρίστηκαν πριν από περίπου 1 ΜΥΑ, ενώ πριν 500 χρόνια η *L. infantum* μεταφέρθηκε μέσω φορέων στην Νότια Αμερική, όπου και ονομάστηκε *L. chagasi* (2). Επίσης, η παρουσία της *L. donovani* στην Ασία μάλλον συνδέεται με την επέκταση ανθρώπινων πληθυσμών (7).

### 1.3 ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ

Άμεση συνέπεια της εξελικτικής πορείας των διάφορων ειδών του γένους *Leishmania* αποτελεί η σημερινή γεωγραφική κατανομή τους. Στην σημερινή εποχή εμφανίζουν παγκόσμια εξάπλωση, καθώς είναι παρόντα τόσο στο ανατολικό ημισφαίριο (Παλαιός Κόσμος) όσο και στο δυτικό (Νέος Κόσμος) (6), ενώ νέα δεδομένα αναφέρουν την παρουσία τους ακόμα και στην Αυστραλία, απ' την οποία μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν απόντα (2). Μπορούν να ενδημήσουν σε ερήμους και τροπικά δάση αλλά δεν εντοπίζονται στην Ανταρκτική. Η λεισμανίαση είναι συχνότερη σε αγροτικές περιοχές αλλά η κλιματική αλλαγή τείνει να επεκτείνει το εύρος των φορέων, άρα και τις περιοχές

<sup>1</sup> Υπερήπειρος που σχηματίστηκε περίπου 300 ΜΥΑ και περιελάμβανε όλες τις χερσαίες μάζες της Γης. Διασπάστηκε περίπου 200 ΜΥΑ (73).

<sup>2</sup> Χερσαία μάζα που προήλθε από την διάσπαση της Παγγαίας. Βρισκόταν στο Βόρειο ημισφαίριο και περιλάμβανε τις σημερινές ηπείρους Ευρώπη, Ασία (εκτός Ινδικής και Αραβικής χερσονήσου) και Βόρεια Αμερική (73).

<sup>3</sup> Χερσαία μάζα που προήλθε από την διάσπαση της Παγγαίας. Βρισκόταν στο Νότιο ημισφαίριο και περιλάμβανε τις σημερινές Νότια Αμερική, Αφρική, Μαδαγασκάρη, Ινδική και Αραβική χερσόνησο, Αυστραλία και Ανταρκτική (73).

που εντοπίζεται η νόσος (6). Το 2018, πάνω από 90 χώρες θεωρούνταν ενδημικές, με περισσότερους από 1 δισεκατομμύριο ανθρώπους να διατρέχουν κίνδυνο μόλυνσης (8), ενώ παράλληλα υπήρχαν πάνω από 2,5 εκατομμύρια μολυσμένοι σκύλοι μόνο στην λεκάνη της Μεσογείου (2).

Η δερματική λεισμανίαση (CL) είναι η συχνότερη μορφή της νόσου και το 2020 πάνω απ' το 85% των περιστατικών της εντοπίστηκε σε Αφγανιστάν, Ιράκ, Πακιστάν, Αλγερία, Τυνησία, Λιβύη, Συρία, Κολομβία και Περού (8). Στον Παλιό Κόσμο αιτιολογικοί παράγοντες είναι τα είδη *L. tropica*, *L. major* και *L. aethiopia*, ενώ στον Νέο τα είδη του συμπλέγματος *L. mexicana* ή του υπογένους *Viannia*. Οι φορείς στον Παλιό Κόσμο κατατάσσονται στα γένη *Phlebotomus* και *Paraphlebotomus*, ενώ στον Νέο Κόσμο υπεύθυνο για την μετάδοση είναι κυρίως το γένος *Lutzomyia*, καθώς και κάποια άλλα υπογένη (2). Ετησίως καταγράφονται 600.000-1.000.000 κρούσματα CL παγκοσμίως (8).

Σχετικά με την σπλαχνική λεισμανίαση (VL), το 90% των κρουσμάτων το 2020 καταγράφηκε σε Ινδία, Κίνα, Βραζιλία, Κένυα, Αιθιοπία, Σομαλία, Ερυθραία, Υεμένη και Σουδάν (8). Στον Παλιό Κόσμο προκαλείται από τα είδη *L. donovani* και *L. infantum* ενώ στον Νέο Κόσμο από την *L. chagasi* (2). Υπολογίζεται ότι υπάρχουν 50.000-90.000 κρούσματα ετησίως, με μόνο το 25-40% αυτών να αναφέρονται στον WHO (8).

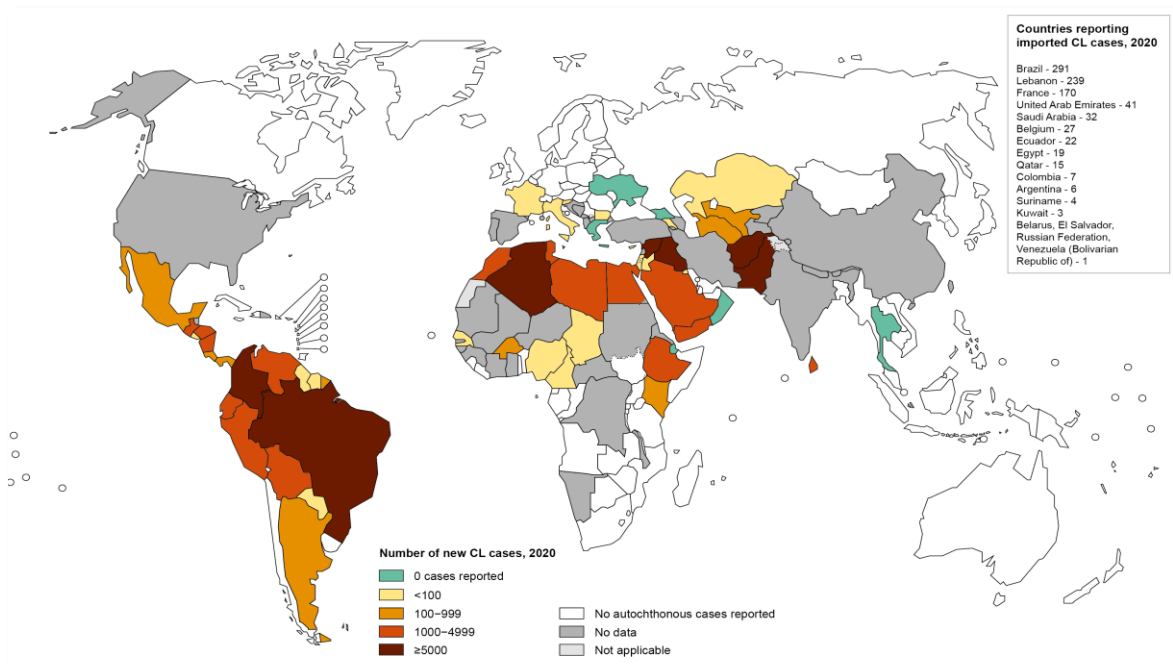
Η βλεννογονοδερματική μορφή (MCL) εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στην Νότια Αμερική και η *L. braziliensis* αποτελεί τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα, ενώ η διάχυτη δερματική λεισμανίαση (DCL), παραλλαγή της δερματικής, έχει αναφερθεί κυρίως στην Κένυα λόγω της *L. aethiopia* (2).

Υπογένος	Είδος	Παλιός/Νέος Κόσμος	Νόσος
<b>Leishmania</b>	<i>donovani</i>	Π	VL, PKDL
	<i>Infantum/chagasi</i>	Π/N	VL, CL
	<i>major</i>	Π	CL
	<i>amazonensis</i>	N	CL,DCL,MCL
	<i>mexicana</i>	N	CL, DCL
	<i>Tropica</i>	Π	CL, VL
	<i>venezuelensis</i>	N	CL
<b>Viannia</b>	<i>braziliensis</i>	N	CL, MCL
	<i>guyanensis</i>	N	CL, MCL
	<i>panamensis</i>	N	CL, MCL

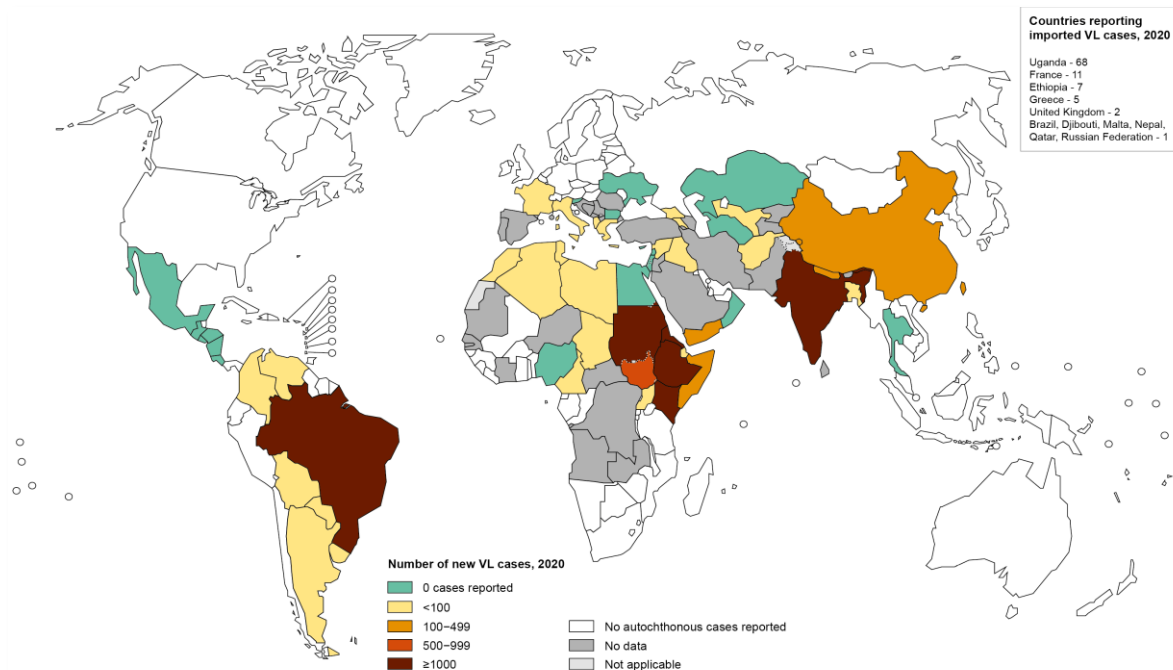


	<i>peruviana</i>	N	CL, MCL
<b>Mundinia</b>	<i>martiniquensis</i>	Π/N	CL, VL

Πίνακας 1 - Γεωγραφική κατανομή παθογόνων ειδών του γένους *Leishmania* και οι νόσοι που προκαλούν. Πηγή: (5).



Εικόνα 2 - Χάρτης παγκόσμιας ενδημικότητας δερματικής λείσμανιάσης για το 2020. Πηγή: (8)



Εικόνα 3 - Χάρτης παγκόσμιας ενδημικότητας σπλαχνικής λείσμανιάσης για το 2020. Πηγή: (8)

#### 1.4 ΚΥΡΙΟΙ ΞΕΝΙΣΤΕΣ

Εκτός του ανθρώπου, υπάρχουν πολλά ακόμα ζωικά είδη που αποτελούν επιβεβαιωμένους ή ύποπτους κύριους ξενιστές – δεξαμενές (reservoirs) της *Leishmania spp.* Ως δεξαμενή (reservoir) θεωρούμε έναν οργανισμό που φιλοξενεί ένα παθογόνο, αλλά δεν υφίσταται αρνητικές επιπτώσεις. Οι δεξαμενές διακρίνονται στους ξενιστές συντήρησης που απλά μολύνονται και διατηρούν την μόλυνση και στους ενισχυτές, οι οποίοι διαθέτουν και κάποιο επιπλέον γνώρισμα που συμβάλλει στην μετάδοση, πχ αυξημένη περίοδο παρασιταϊμίας. Ο διαχωρισμός των 2 κατηγοριών δεν είναι αυστηρός και κάποιος ξενιστής μπορεί να μεταπηδήσει από την μία κατηγορία στην άλλη ανάλογα με την ανοσολογική του κατάσταση, πχ ύπαρξη συλλοίμωσης από άλλο παθογόνο. Επίσης, κάποιιοι για να θεωρήσουν ένα θηλαστικό ως δεξαμενή θέτουν ως προαπαιτούμενο την ασυμπτωματική συνύπαρξή του με το παράσιτο, ως αποτέλεσμα μακράς εξελικτικής αλληλεπίδρασης, όμως αυτή η άποψη δεν είναι η επικρατούσα. Στην περίπτωση που η νόσος εκδηλωθεί σε κάποιο θηλαστικό εκτός του ανθρώπου, δεν ταξινομείται σε δερματική ή σπλαχνική μορφή (9). Ο σκύλος για παράδειγμα, που αποτελεί τη κυριότερη δεξαμενή κατά την ζωνοτική μετάδοση της *L. infantum* (10,11), εμφανίζει συνήθως σπλαχνο-δερματική νόσο ενώ το δέρμα μπορεί να παραμείνει ακόμα και άθικτο (9).

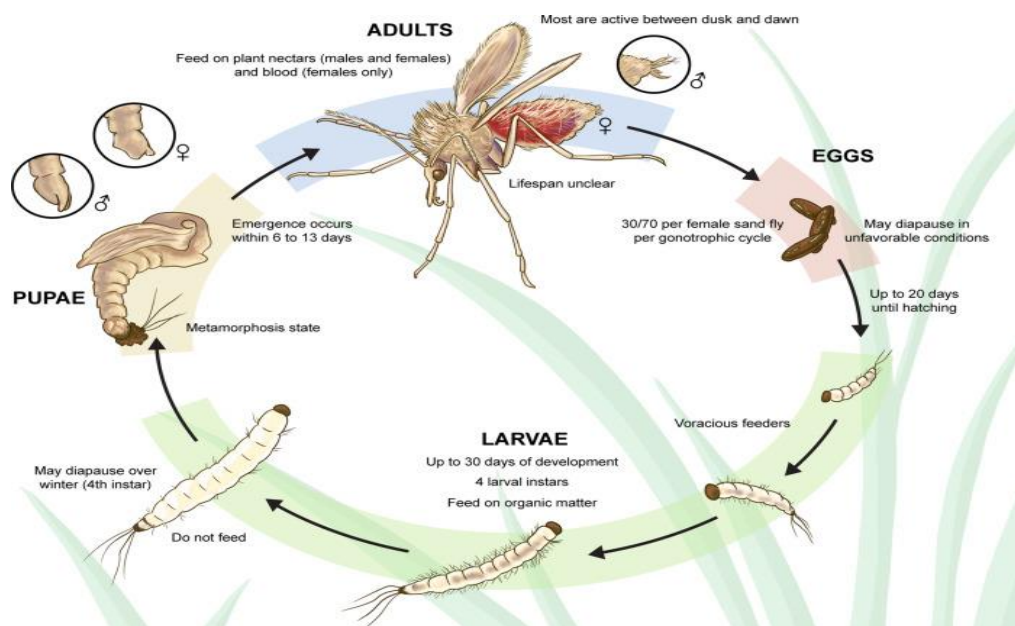
Είδος παρασίτου	Γεωγραφική Περιοχή	Κύριοι Ξενιστές
<i>L. donovani</i>	Ινδία, Αφρική	Άνθρωπος
<i>L. infantum</i>	Ν. Ευρώπη, Β. Αφρική, Ν. Αμερική	Σκύλος
<i>L. tropica</i>	Δ. Ασία, Β. Αφρική, ΝΑ. Ευρώπη (Ελλάδα)	Άνθρωπος
<i>L. major</i>	Κεντρική Ασία	Rhombomys opimus
		Meriones shawi
		Meriones sacramenti
		Gerbillus pyramidum
<i>L. mexicana</i>	Μεξικό	Psammomys obesus
		Ototylomys spp
<i>L. guyanensis</i>	Ν. Αμερική	Choloepus didactylus

### 1.5 ΕΝΔΙΑΜΕΣΟΣ ΞΕΝΙΣΤΗΣ

Ο ενδιάμεσος ξενιστής των παρασίτων του γένους *Leishmania* είναι η **σκνίπα (sandfly)**, η οποία είναι αρθρόποδο έντομο και κατατάσσεται στην τάξη *Diptera*, υποτάξη *Nematocera*, οικογένεια *Psychodidae* και υποοικογένεια *Phlebotominae*. Αυτή διαιρείται σε 6 γένη (*Phlebotomus*, *Sergentomyia*, *Chinius*, *Lutzomyia*, *Brumptomyia*, *Warileya*). Τα πρώτα 3 απαντώνται στον Παλαιό Κόσμο και τα υπόλοιπα στον Νέο Κόσμο, ενώ τον άνθρωπο τσιμπούν κατά κύριο λόγο μόνο τα γένη *Phlebotomus* και *Lutzomyia*, τα οποία κατά συνέπεια είναι αυτά που σχετίζονται με την μετάδοση του παρασίτου (12). Τα είδη του γένους *Phlebotomus* προτιμούν περιοχές σαβάνας ενώ τα είδη του γένους *Lutzomyia* δασώδεις περιοχές (13).

Σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της σκνίπας παίζει η υγρασία και η θερμοκρασία. Συγκεκριμένα, οι σκνίπες εντοπίζονται σε περιοχές με θερμοκρασίες πάνω από 15 °C για τουλάχιστον 3 μήνες τον χρόνο, αυτό όμως αντιστοιχεί στο μεγαλύτερο μέρος του κόσμου. Λαμβάνουν ένα γεύμα αίματος ανά 5-6 μέρες από συνήθως ακίνητο ή κοιμισμένο θύμα, κυρίως από την άνοιξη ως το φθινόπωρο. Κατά την διάρκεια της ημέρας κρύβονται σε σημεία με σκιά και υγρασία και βγαίνουν σε αναζήτηση τροφής το βράδυ, χωρίς να διανύουν μεγάλες αποστάσεις (11,12). Συνήθως απομακρύνονται το πολύ 100 μέτρα από το σημείο που έχουν εναποθέσει τα αυγά τους, οπότε τα τσιμπήματα τους χαρακτηρίζονται γενικά από τοπικό περιορισμό (13).

Ο κύκλος ζωής τους περιλαμβάνει 4 αναπτυξιακά στάδια: αυγό, προνύμφη, νύμφη και ενήλικη σκνίπα. Μία θηλυκή σκνίπα εναποθέτει 30-70 αυγά σε μέρη με άφθονη υγρασία και οργανική ύλη, τα οποία εκκολάπτονται 4-20 μέρες μετά. Ακολουθεί το στάδιο της προνύμφης που διαρκεί 20-30 μέρες, της νύμφης που διαρκεί 6-13 μέρες και τέλος, της ενήλικης σκνίπας (12).



Εικόνα 4 – Αναπτυξιακά στάδια σκνίπας. Πηγή: (12).

Η ενήλικη σκνίπα έχει μέγεθος το πολύ 5mm, κεφάλι με κεραίες, στοματικά μόρια και προσακτρίδες, θώρακα, πτέρυγες, κοιλιακή χώρα και μακριά πόδια, όλα καλυμμένα με τρίχες. Τα στοματικά μόρια είναι μικρά και προσαρμοσμένα για λήψη αίματος, αλλά μόνο τα θηλυκά είναι αιματοφάγα (13). Το έντερο της θηλυκής σκνίπας διαιρείται σε 3 μέρη: πρόσθιο, μέσο και οπίσθιο. Το μέσο έντερο καλύπτεται από επιθηλιακά κύτταρα με μικρολάχνες και χωρίζεται σε άνω/θωρακικό και κάτω/κοιλιακό. Το θωρακικό μέσο έντερο ενώνεται με το πρόσθιο μέσω της οισοφαγικής βαλβίδας, ενώ στο κοιλιακό μέσο έντερο βρίσκεται η περιτροφική μεμβράνη. Αυτή ουσιαστικά δεν αποτελεί μεμβράνη αλλά ένα πλέγμα ινιδίων χιτίνης και (γλυκο)πρωτεϊνών που εκκρίνεται από το επιθήλιο του μέσου εντέρου ως απάντηση σε ένα γεύμα αίματος, το οποίο και αποθηκεύει. Από εκεί ξεκινάει η ανάπτυξη του παρασίτου (4).

Οι σκνίπες είναι τελματοφάγα έντομα (blood-pool feeders), δηλαδή χρησιμοποιούν τις οδοντωτές τους κάτω γνάθους ως ψαλίδι για να τρυπήσουν το δέρμα του θύματος τους. Στο σημείο δημιουργείται εξωαγγειακή λίμνη αίματος, από την οποία τρέφονται. Βασικός είναι ο ρόλος της σιέλου της σκνίπας, η οποία περιέχει περίπου 40 πρωτεΐνες, στις λειτουργίες των οποίων συμπεριλαμβάνονται αγγειοδιαστολή, αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων και αναστολή ενεργοποίησης οδών πήξης και συμπληρώματος (12). Μάλιστα, μελέτες έδειξαν ότι η παράλληλη έγχυση της σιέλου της

σκνίπας ή συστατικών της μαζί με το παράσιτο οδηγεί σε επιδείνωση της CL, δημιουργώντας μεγαλύτερες βλάβες και υψηλότερο παρασιτικό φορτίο (14).

Από τα περίπου 1000 είδη σκνίπας που έχουν περιγραφεί ως τώρα, οι αποδεδειγμένοι φορείς της *Leishmania* αποτελούν ποσοστό μικρότερο του 10%. Ως φορέας θεωρείται ένα είδος όταν πληροί τα παρακάτω κριτήρια, τα οποία έχουν τεθεί από τον WHO: 1) να είναι ανθρωπόφιλο, 2) να μπορεί να τσιμπήσει και άλλα ζώα ώστε να δημιουργηθεί «δεξαμενή» για ζωνοτική μετάδοση, 3) να εντοπίζεται στην φύση μολυσμένο με τα ίδια είδη *Leishmania* που εντοπίζονται και στους ανθρώπους της ίδιας γεωγραφικής περιοχής, 4) να υποστηρίζει την πλήρη ανάπτυξη του παρασίτου και 5) να μπορεί να μεταδώσουν το παράσιτο αυτό κατά την λήψη γεύματος αίματος.

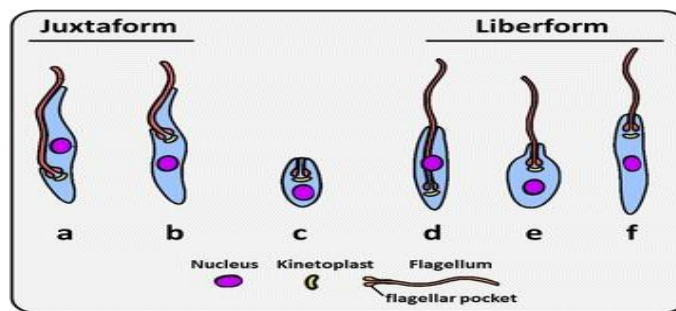
Οι σκνίπες-φορείς διακρίνονται σε 2 κατηγορίες, στους περιοριστικούς και στους επιτρέποντες. Οι πρώτοι επιτρέπουν την ανάπτυξη και την μετάδοση μόνο συγκεκριμένου είδους του παρασίτου, ενώ οι δεύτεροι πολλών ειδών (12). Κάποια από τα κυριότερα είδη σκνίπας με υγειονομική σημασία είναι τα *P. papatasi*, *P. sergenti*, *P. neglectus*, *L. longipalpis* και *L. flaviscutellata* (11).

## 1.6 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Τα παράσιτα *Leishmania spp* ακολουθούν την κλασική δομή ενός ευκαρυωτικού κυττάρου, οπότε σε οποιαδήποτε μορφή του παρασίτου εντοπίζονται ένας οβάλ πυρήνας που περιέχει το κύριο γενετικό υλικό, το κυτταρόπλασμα, μέσα στο οποίο βρίσκονται το αδρό και το λείο ενδοπλασματικό δίκτυο, το σύμπλεγμα Golgi, ένα μιτοχόνδριο και λυσοσώματα, και η κυτταρική μεμβράνη, δομημένη με βάση το μοντέλο της διπλοστιβάδας φωσφολιπιδίων. Βασικά δομικά συστατικά της αποτελούν η γλυκοπρωτεΐνη gp63 (ή promastigote surface protease-PSP), η λιποφωσφογλυκάνη (LPG) και οι γλυκοσουλφωσφατιδυλινοσιτόλες (GIPs). Κάτω από την κυτταρική μεμβράνη και συνδεδεμένοι με αυτήν βρίσκονται μικροσωληνίσκοι, οι οποίοι σχηματίζουν τον κυτταροσκελετό. Εκτός από τα παραπάνω, εντοπίζονται και δομές που δεν περιλαμβάνονται στο κλασικό μοντέλο του ευκαρυωτικού κυττάρου και προσδίδουν στα παράσιτα αυτά τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους. Οι δομές αυτές είναι ο **κινητοπλάστης** (μάζα συμπυκνωμένου μιτοχονδριακού γενετικού υλικού), το **μαστίγιο** (flagellum), το οποίο εκφύεται από το **βασικό σωματίο** (basal body), μία αναδίπλωση της κυτταρικής μεμβράνης που ονομάζεται **μαστιγωτή θήκη** (flagellar pocket) και το **γλυκόσωμα**

(glycosome), οργανίδιο χαρακτηριστικό της τάξης των Κινητοπλαστοειδών που περιέχει γλυκολυτικά ένζυμα. Η μαστιγωτή θήκη αποτελεί την μοναδική θέση ενδοκυττάρωσης και εξωκυττάρωσης και το σύμπλεγμα Golgi εντοπίζεται πάντα δίπλα της. Ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι επιμήκους μαστιγίου, αναγνωρίζουμε **2 μορφές** του παρασίτου, την **μαστιγωτή** και την **αμαστιγωτή** (4,15).

Η οικογένεια των Τρυπανοσωματιδών έχει διαιρεθεί πια σε 2 υπερομάδες ανάλογα με την θέση του μαστιγίου, την Juxtaform και την Liberform. Η πρώτη περιλαμβάνει την επιμαστιγωτή και την τρυπομαστιγωτή μορφή των Τρυπανοσωμάτων με πλευρικά ενσωματωμένο μαστίγιο, ενώ η δεύτερη περιλαμβάνει μία οπισθομαστιγωτή, μία χοανομαστιγωτή και μία προμαστιγωτή μορφή με ελεύθερο μαστίγιο. Η *Leishmania* εμφανίζεται με την προμαστιγωτή μορφή. Η αμαστιγωτή ανήκει και στις 2 υπερομάδες καθώς υιοθετείται τόσο από τα τρυπανοσώματα όσο και από την *Leishmania* (3).



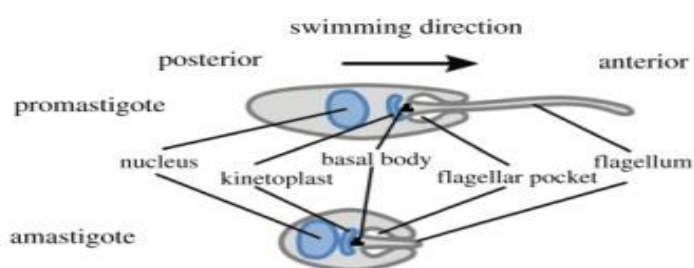
Εικόνα 5 - Διαίρεση των Τρυπανοσωματιδών όσον αφορά την θέση του μαστιγίου. (a) επιμαστιγωτή, (b) τρυπομαστιγωτή, (c) αμαστιγωτή, (d) οπισθομαστιγωτή, (e) χοανομαστιγωτή και (f) προμαστιγωτή μορφή. Πηγή:(3).

Οι προμαστιγώτες εντοπίζονται στο έντομο-ξενιστή και εμφανίζονται με διάφορες παραλλαγές, ανάλογα με την φάση ανάπτυξης τους, το διαμέρισμα στο οποίο βρίσκονται μέσα στον ξενιστή κλπ. Οι παραλλαγές αυτές είναι όλες κινητές λόγω του προεξέχοντος μαστιγίου και χωρίζονται σε 4 κύριες κατηγορίες:

- **Προκυκλικός προμαστιγώτης:** έχει μήκος 6.5-11.5μm και μαστίγιο πιο κοντό από το κυτταρικό σώμα.
- **Νεκτομονάδα:** έχει μήκος μεγαλύτερο από 12μm.
- **Λεπτομονάδα:** όμοια με τον προκυκλικό προμαστιγώτη αλλά με μαστίγιο πιο μακρύ από το κυτταρικό σώμα.
- **Μετακυκλικός προμαστιγώτης:** έχει μήκος μικρότερο από 8μm, πλάτος 1μm και μαστίγιο μακρύτερο από το κυτταρικό σώμα, είναι η μολυσματική μορφή (15).

Πολλοί εντάσσουν και μία 5η κατηγορία, την Απτομονάδα, η οποία προσκολλάται στην οισοφαγική βαλβίδα της σκνίπας μέσω του μαστιγίου της. Το κυτταρικό σώμα είναι πλατύ και έχει μήκος 5-8μm. Αποτελεί την λιγότερο μελετημένη μορφή του παρασίτου.

Η αμαστιγωτή μορφή εντοπίζεται μέσα στα μολυσμένα μακροφάγα του ξενιστή. Ακολουθεί την δομή που περιγράφηκε παραπάνω, έχει σχήμα οβάλ και το μέγεθος του κυττάρου κυμαίνεται από 3-5μm. Μαστίγιο υπάρχει αλλά έχει μικρό μήκος, δεν προεξέχει από την μαστιγωτή θήκη, δεν είναι λειτουργικό και δεν προσδίδει κινητικότητα στο παράσιτο (4).



Εικόνα 6 - Δομή προμαστιγωτής και αμαστιγωτής μορφής. Πηγή: (15).

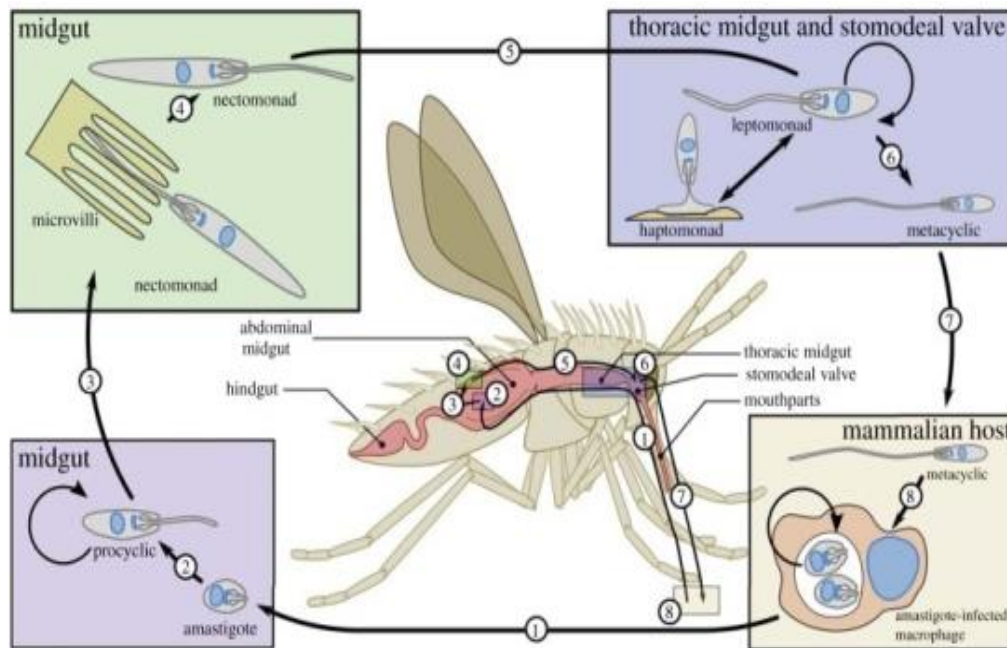
## 1.7 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ

### 1.7.1 ΣΤΟΝ ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ ΞΕΝΙΣΤΗ

Ο κύκλος ζωής του παρασίτου ξεκινάει όταν μία μη μολυσμένη σκνίπα, κατά την λήψη γεύματος αίματος από μολυσμένο θηλαστικό (π.χ. άνθρωπο, σκύλο κλπ), προσλάβει ελεύθερους αμαστιγώτες ή μονοπύρηνα/μακροφάγα μολυσμένα από αυτούς. Αυτοί αποθηκεύονται μαζί με το γεύμα αίματος στην περιτροφική μεμβράνη. Εκεί, μέσα σε διάστημα 2 ημερών, μετατρέπονται σε προκυκλικούς προμαστιγώτες, πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε νεκτομονάδες (4). Για την εδραίωση της μόλυνσης, οι νεκτομονάδες σπάνε την περιτροφική μεμβράνη και διαφεύγουν στο κοιλιακό μέσο έντερο. Από εκεί, οι περισσότερες μεταναστεύουν στο θωρακικό μέσο έντερο όπου και διαφοροποιούνται σε λεπτομονάδες, ενώ ένας πληθυσμός τους παραμένει στο κοιλιακό μέσο έντερο και προσκολλάται στις μικρολάχνες μέσω του μαστιγίου. Ο πληθυσμός αυτός μάλλον λειτουργεί ως «δικλείδα ασφαλείας» για την συνέχιση της μόλυνσης σε περίπτωση που τα υπόλοιπα παράσιτα απομακρυνθούν κατά την αφόδευση της σκνίπας. Οι λεπτομονάδες πολλαπλασιάζονται στο θωρακικό μέσο έντερο και ακολουθεί η μετακυκλογένεση, κατά την οποία προκύπτουν οι μετακυκλικοί προμαστιγώτες. Παράλληλα, μερικές λεπτομονάδες προσκολλώνται στην οισοφαγική



βαλβίδα και διαφοροποιούνται σε απομονάδες. Οι μετακυκλικοί προμαστιγώτες αποικίζουν το πρόσθιο έντερο και είναι αυτοί που θα μολύνουν το θηλαστικό από το οποίο θα λάβει η μολυσμένη σκνίπα το επόμενο γεύμα αίματος (12). Η παραπάνω διαδικασία διαρκεί συνολικά 5-7 μέρες, ή και περισσότερο αν δεν υπάρχουν οι βέλτιστες συνθήκες (4).



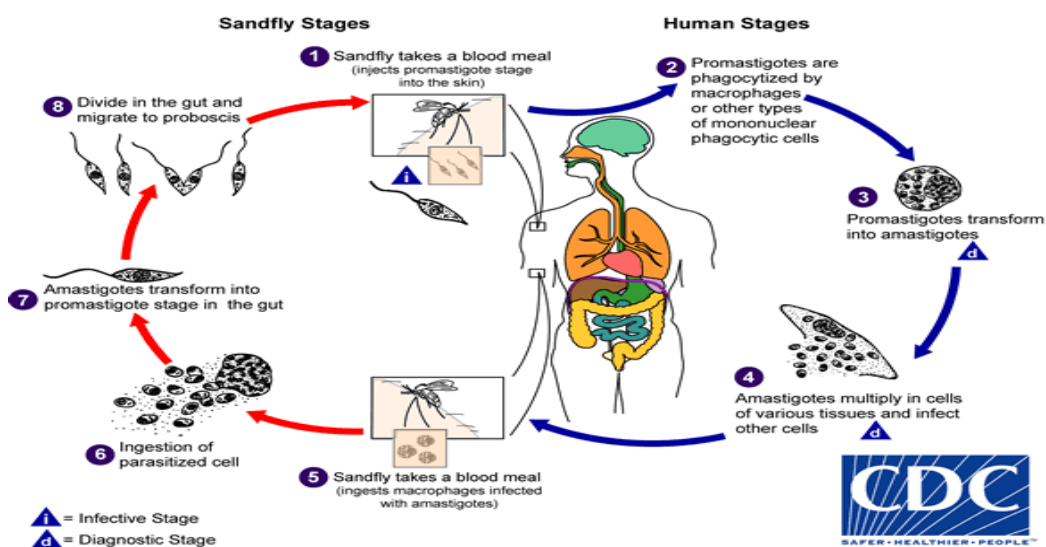
Εικόνα 7 - Μορφολογικές παραλλαγές προμαστιγωτής μορφής σε συνάρτηση με τις θέσεις ανάπτυξης μέσα στην σκνίπα. Πηγή: (15).

### 1.7.2 ΣΤΟΝ ΚΥΡΙΟ ΞΕΝΙΣΤΗ

Κατά το δήγμα μολυσμένης σκνίπας σε θηλαστικό, μεταφέρονται σε αυτό οι μετακυκλικοί προμαστιγώτες, οι οποίοι φαγοκυτταρώνονται από δερματικά μακροφάγα, πιθανώς μέσω της ενεργοποίησης του συμπληρώματος. Το παράσιτο εισέρχεται στο μακροφάγο μέσα σε φαγόσωμα και ακολουθεί η σύζευξή του με λυσοσώματα, που έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία του φαγολυσοσώματος. Παράλληλα συμβαίνει και η μετατροπή στην αμαστιγωτή μορφή, διαδικασία που διαρκεί 12-24 ώρες (4) και χαρακτηρίζεται από βιοχημικές και μορφολογικές αλλαγές. Συγκεκριμένα, η ποσότητα της gr63 μειώνεται, η έκφραση της LPG σταματά, οι GILPs έρχονται στην επιφάνεια και, προφανώς, το μαστίγιο εσωτερικεύεται (16). Φυσιολογικά, τα λυσοσωμικά ένζυμα και το όξινο pH (4,5-5,5) καταστρέφουν τον μικροοργανισμό που έχει φαγοκυτταρωθεί, όχι όμως και την *Leishmania*, η αμαστιγωτή μορφή της οποίας πρώτον είναι οξεόφιλη και δεύτερον διαθέτει συγκεκριμένες δομές στην επιφάνειά της που συμβάλλουν στην



άμυνα έναντι των λυσοσωμικών ενζύμων. Έτσι, αντί να καταστραφεί, πολλαπλασιάζεται με απλή διαίρεση μέσα στο φαγολυσόσωμα, σε μία δομή που ονομάζεται παρασιτοφόρο κυστίδιο. Στα είδη του Παλαιού Κόσμου παρατηρείται ότι κάθε παράσιτο περιβάλλεται από το δικό του μικρό παρασιτοφόρο κυστίδιο, ενώ στα είδη του Νέου Κόσμου τα παρασιτοφόρα κυστίδια συνήθως είναι μεγάλα και περιλαμβάνουν περισσότερα από ένα παράσιτα. Ο πολλαπλασιασμός των παρασίτων συνεχίζεται ώσπου να επέλθει λύση του μακροφάγου. Οι ελεύθεροι αμαστιγώτες είτε φαγοκυτταρώνονται από άλλα μακροφάγα είτε προσλαμβάνονται από θηλυκή σκνίπα κατά την λήψη γεύματος αίματος και μετατρέπονται σε προκυκλικούς προμαστιγώτες κ.ο.κ, ολοκληρώνοντας τον κύκλο (4). Επίσης, κάποιοι ενδοκυττάριοι αμαστιγώτες μπορεί να παραμείνουν στα μακροφάγα σε λανθάνουσα κατάσταση και να ενεργοποιηθούν μελλοντικά, οδηγώντας έτσι σε επανενεργοποίηση της νόσου ακόμα και χρόνια μετά την πρωτογενή λοίμωξη (17). Ανάλογα με το αν τα μολυσμένα μακροφάγα περιορίζονται στο σημείο του δήγματος ή μεταναστεύουν και σε άλλους ιστούς προκύπτουν οι διαφορετικές μορφές της νόσου (11), οι οποίες θα αναλυθούν σε επόμενη παράγραφο. Η μετανάστευση των μακροφάγων εξαρτάται εν μέρει από την αλληλεπίδρασή τους με το χόριο και τα συστατικά του, μέσω μηχανισμών που δεν είναι ακόμα πλήρως αποσαφηνισμένοι, ενώ φαίνεται και ότι η μεταναστευτική τους ικανότητα μπορεί να ρυθμιστεί από το παράσιτο και το παρασιτικό φορτίο (14).



Εικόνα 8 – Κύκλος ζωής των *Leishmania* spp. Πηγή: (6).

## 1.8 ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΟΡΓΑΝΩΣΗ

Το γενετικό υλικό της *Leishmania spp* είναι είτε πυρηνικό που, όπως φανερώνει η ονομασία του, εντοπίζεται στον πυρήνα, είτε μιτοχονδριακό, το οποίο βρίσκεται στον κινητοπλάστη. Το πυρηνικό DNA κατανέμεται σε χρωμοσώματα, τα οποία διαφέρουν σε μέγεθος ανάλογα με το είδος αλλά η οργάνωσή τους γενικά ομοιάζει με άλλων πρωτοζώων. Επίσης, έχουν εντοπιστεί ψευδογονίδια αλλά όχι εσώνια (11). Αντίθετα, το DNA του κινητοπλάστη (kDNA) αποτελείται από χιλιάδες μόρια κυκλικού DNA που ενώνονται μεταξύ τους σαν αλυσίδα και σχηματίζουν ένα πυκνό δίκτυο. Τα κυκλικά αυτά μόρια έχουν μέγεθος 30kb (έως 25-50 μόρια) και 2kb (5.000-10.000 μόρια) (4). Ειδικά για το είδος *L. donovani*, με βάση την αλληλουχία αναφοράς που είναι καταχωρημένη στην βάση δεδομένων του NCBI, γνωρίζουμε ότι το γονιδίωμά του περιέχει 8.123 γονίδια, περίπου το 98% των οποίων κωδικοποιούν πρωτεΐνες (18).

Το γονιδίωμα της *Leishmania* χαρακτηρίζεται από πλαστικότητα, δηλαδή ύπαρξη ποικιλομορφίας ως προς τον αριθμό των αντιγράφων γονιδίων, γονιδιακών τόπων, ή ακόμα και ολόκληρων χρωμοσωμάτων (**Copy Number Variations—CNVs**). Η πλαστικότητα αυτή είναι προσαρμοστική και ευαίσθητη ως προς τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Στην περίπτωση που τα CNVs αφορούν ολόκληρο χρωμόσωμα, τότε αναφερόμαστε σε **ανευπλοειδία**, η οποία επιτρέπει στο παράσιτο να είναι ικανό να ανταπεξέλθει στις αυξημένες ανάγκες της ποσότητας ορισμένων γονιδιακών προϊόντων. Αντίθετα, όταν τα CNVs αφορούν συγκεκριμένη γενωμική περιοχή, τότε αναφερόμαστε είτε σε **επισωμικό** είτε σε **ενδοχρωμοσωμικό πολλαπλασιασμό**. Στον πρώτο, παρατηρούνται γραμμικά ή κυκλικά εξωχρωμοσωμικά ενισχυμένα μόρια DNA και είναι συχνότερος σε στελέχη των οποίων η αντοχή έχει επαχθεί εργαστηριακά, ενώ συνήθως τα επιπλέον μόρια DNA χάνονται αν σταματήσει η πίεση που ασκείται από τη χορηγούμενη φαρμακευτική ουσία. Αντίθετα, στον ενδοχρωμοσωμικό πολλαπλασιασμό, όπως φανερώνει και η ονομασία, παρατηρείται αύξηση των αντιγράφων συγκεκριμένου γονιδιακού τόπου εντός του χρωμοσώματος. Είναι συχνότερος σε φυσικά ανθεκτικά στελέχη και είναι σταθερότερος από τον επισωμικό. Έτσι λοιπόν, είναι δυνατόν κύτταρα του ίδιου στελέχους να βρίσκονται σε διαφορετικές γενωμικές καταστάσεις, ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες υποβάλλονται (19).

Οι παραπάνω μηχανισμοί μπορούν δυνητικά να συσχετιστούν με ανάπτυξη αντοχής έναντι σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Μάλιστα, σε ανθεκτικά στις ενώσεις αντιμονίου στελέχη έχει παρατηρηθεί αύξηση του γενετικού τόπου H-Locus, ο οποίος περιέχει μεταξύ άλλων και το γονίδιο που κωδικοποιεί τον ABC μεταφορέα MRPA (20,21), η συμβολή του οποίου στην ανάπτυξη αντοχής έναντι στο SbIII αναλύεται στην παράγραφο 1.13.1.2. Η ύπαρξη CNVs του H-Locus έχει παρατηρηθεί τόσο σε μορφή επισωμικού (22) και ενδοχρωμοσωμικού πολλαπλασιασμού, όσο και στην μορφή ανευπλοειδίας (19), μέσω αύξησης του αριθμού αντιγράφων του χρωμοσώματος 23, στο οποίο αυτός εδράζεται (21).

## **1.9 ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ**

Το κλινικό φάσμα της λεισμανίασης περιλαμβάνει δερματικές, σπλαχνικές και βλεννογονοδερματικές μορφές, ενώ υπάρχουν παρατηρηθεί και πολλές περιπτώσεις ασυμπτωματικών λοιμώξεων (23).

### **1.9.1 ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ (Cutaneous Leishmaniasis – CL)**

Η CL χαρακτηρίζεται από την παρουσία δερματικής βλάβης ποικίλης μορφολογίας που συνήθως καταλήγει σε μόνιμη, παραμορφωτική ουλή (3), η οποία εντοπίζεται κυρίως στα εκτεθειμένα μέρη του σώματος, πχ άνω και κάτω άκρα, πρόσωπο κλπ, και μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τον στιγματισμό του ατόμου (8). Η πληγή εμφανίζεται εβδομάδες ή μήνες μετά το τσίμπημα μολυσμένης σκνίπας, ανάλογα με τον χρόνο επώασης (6). Στο σημείο του δήγματος παρατηρείται μία ερυθματώδης βλατίδα, διαμέτρου 1-10mm, που είτε είναι ασυμπτωματική είτε προκαλεί κνησμό και συνοδεύεται από οίδημα και τοπική αύξηση της θερμοκρασίας. Δύο μέρες μετά μετατρέπεται σε φλύκταινα, η οποία όταν σπάσει δημιουργεί στρογγυλό έλκος (24) με υπερυψωμένα άκρα, ομοιάζοντας με ηφαίστειο (6). Επίσης, μπορεί να καλύπτεται από κρούστα ή ψευδομεμβράνη. Τέτοιου είδους έλκη δεν είναι επώδυνα, εκτός αν μολυνθούν δευτερογενώς. Η κλινική εικόνα συνήθως συνοδεύεται από τοπική αδενοπάθεια και απουσία πυρετού. Αυτοϊαση επέρχεται μετά από ορισμένο αριθμό μηνών ή χρόνων, ανάλογα με το είδος στο οποίο ανήκει ο αιτιολογικός παράγοντας, και γίνεται από την περιφέρεια προς το κέντρο του έλκους. Εν τέλει, αυτό που μένει είναι μία πλάκα με ανομοιόμορφη μελάγχρωση και τηλεαγγειεκτασία (24).

Σπάνια παραλλαγή της CL αποτελεί η **διάχυτη δερματική λεισμανίαση (DCL)**, με μόνο 100 περίπου καταγεγραμμένα περιστατικά (4). Το πρώτο από αυτά ήταν στην Κένυα το 1969 (2). Σε αυτήν την μορφή, τα παράσιτα παραμένουν στο δέρμα και διασκορπίζονται σε μεγάλη επιφάνεια σχηματίζοντας μεγάλα, επώδυνα οζίδια. Παρατηρείται ανεργία του ανοσοποιητικού συστήματος (4) και μπορεί να συνοδεύεται από λεμφαδενοπάθεια ή/και πυρετό. Αν εμπλέκεται ο βλεννογόνος του φάρυγγα, τα οζίδια μπορεί να αποφράξουν τον αεραγωγό (15). Δεν παρατηρείται αυτοϊαση και η θεραπεία είναι συνήθως αναποτελεσματική, έτσι η νόσος μπορεί να διαρκέσει ισόβια (4).

Επιπρόσθετα, ποσοστό υψηλότερο του 30% των περιστατικών CL υποτροπιάζουν, με την κατάσταση αυτή να χαρακτηρίζεται ως **υποτροπιάζουσα λεισμανίαση (LR)** (24). Σε αυτήν παρατηρούνται μη ελκώδεις βλάβες κυρίως στα άκρα έλκους που έχει ιαθεί, επεκτείνοντας τα όρια της αρχικής ουλής και προκαλώντας περαιτέρω παραμόρφωση. Σχετίζεται με έντονη κυτταρική ανοσολογική απόκριση και έχει αόριστη διάρκεια (4).

### **1.9.2 ΒΛΕΝΝΟΓΟΝΟΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ (Mucocutaneous Leishmaniasis – MCL)**

Η MCL, ή αλλιώς Esprundia, εντοπίζεται στην Νότια Αμερική (2), είναι έντονα παραμορφωτική και το 90% των περιστατικών είχαν νοσήσει και θεραπευτεί από CL μέσα στην τελευταία 5ετία (3). Τα παράσιτα εισβάλλουν και καταστρέφουν σταδιακά τον ρινοφαρυγγικό βλεννογόνο. Η αρχική βλάβη μπορεί να περάσει απαρατήρητη ή να προκαλέσει ήπιο, τοπικό κνησμό και οίδημα. Στην συνέχεια, εξαπλώνονται στον στοματικό, τον φαρυγγικό και τον λαρυγγικό βλεννογόνο αλλά και στο δέρμα των χειλιών και της μύτης. Οι βλάβες προκαλούν από απλή ενόχληση ή ήπιο πόνο έως και καχεξία λόγω δυσφαγίας, σε περίπτωση που έχει πληγεί και ο οισοφάγος. Επίσης, πιθανές βλάβες στον λάρυγγα οδηγούν σε βραχνάδα. Αρχικά, τα έλκη είναι επιφανειακά και αργότερα νεκρωτικά. Τα ούλα, ο ουρανίσκος και οι αμυγδαλές μπορεί να καταστραφούν. Προσβολή της ρινικής κοιλότητας μπορεί να οδηγήσει σε ατροφία των ρινικών κόγχων και ατροφία του διαφράγματος (24). Συνήθως συνοδεύεται από πυρετό και ηπατομεγαλία (3). Οι αλλοιώσεις είναι μη θανατηφόρες αλλά δεν επουλώνονται αυτόματα (25). Επιπλέον, παρατηρείται κοινωνικός αποκλεισμός των πασχόντων (8).

### **1.9.3 ΣΠΛΑΧΝΙΚΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ (Visceral Leishmaniasis – VL)**

Η VL, ή kala-azar (= μαύρος πυρετός) (23), αποτελεί την σοβαρότερη εκδήλωση της νόσου (3) και επηρεάζει τα όργανα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (ΔΕΣ), δηλαδή

το **ήπαρ**, τον **σπλήνα** και τον **μυελό των οστών** (2). Η ασθένεια ακολουθεί χρόνια πορεία (23) και εξελίσσεται μέσα σε μήνες ή και χρόνια από το τσίμπημα της σκνίπας (6). Αν δεν δοθεί θεραπεία, η θνησιμότητα φτάνει έως και το 100% μέσα σε 2 χρόνια (8) και ο θάνατος συνήθως επέρχεται είτε από αιμορραγία είτε από συλλοίμωξη (3). Ο ασθενής μπορεί να είναι ασυμπτωματικός, ολιγοσυμπτωματικός ή εντελώς συμπτωματικός. Στην τελευταία περίπτωση παρατηρείται **λεμφαδενοπάθεια** και **ηπατοσπληνομεγαλία** (24), λόγω του μεγάλου αριθμού μακροφάγων που εντοπίζονται στα όργανα αυτά (23), πυρετός και απώλεια βάρους. Σε προσβολή των μακροφάγων του μυελού των οστών παρατηρούνται αναιμία, λευκοπενία και θρομβοπενία, δηλαδή **πανκυτταροπενία** (6,23). Η αναιμία έχει ως αποτέλεσμα ωχρότητα, η θρομβοπενία αιμορραγίες και η λευκοπενία επιτρέπει την ανάπτυξη παράλληλων λοιμώξεων (23). Επίσης, η κλινική εικόνα περιλαμβάνει ανορεξία, αδυναμία, νυχτερινή εφίδρωση (24) και δερματική μελάγχρωση, η οποία εντοπίζεται τυπικά στην Ινδία (23). Εργαστηριακά, ανιχνεύεται και υπεργαμμασφαιριναιμία. Τα προσβεβλημένα παιδιά εμφανίζουν επιπλέον χρόνια διάρροια και καθυστέρηση ανάπτυξης (24). Τέλος, υπάρχει **έντονη παρασιταϊμία**. Τα ανοσοκατεσταλμένα άτομα εκδηλώνουν την κλασική κλινική μορφή της νόσου με πυρετό, ηπατοσπληνομεγαλία και πανκυτταροπενία, λόγω όμως της ανοσοκαταστολής υπάρχει μεγάλη πιθανότητα υποτροπής (23).

#### **1.9.4 POST-KALA-AZAR DERMAL LEISHMANIASIS (PKDL)**

Η PKDL μορφή είναι επιπλοκή της VL στο 50-60% των ασθενών (11) και εμφανίζεται στην Νοτιοανατολική Ασία, ιδιαίτερα στην Ινδία, και στην Ανατολική Αφρική (8), όπου διακρίνουμε τον Ινδικό και τον Αφρικανικό τύπο αντίστοιχα. Ο πρώτος παρατηρείται 2-3 χρόνια μετά της ίαση της VL στο 10% των περιστατικών στην Ινδία και χαρακτηρίζεται από οζίδια στο πρόσωπο και διάσπαρτες υπόχρωμες κηλίδες στα υπόλοιπα ακάλυπτα μέρη του σώματος. Οι αλλοιώσεις αυτές δεν είναι αυτοϊάσιμες. Ο Αφρικανικός τύπος εμφανίζεται μόνο λίγους μήνες μετά το πέρας της θεραπείας, ή ακόμα και κατά την διάρκεια αυτής, με στικτό, αυτοθεραπευόμενο εξάνθημα, αρχικά γύρω από το στόμα, με επακόλουθη εξάπλωση σε όλο το πρόσωπο. Στα υπόλοιπα μέρη του σώματος εμφανίζεται σπάνια (11). Οι ασθενείς με PKDL στις ενδημικές περιοχές της VL θεωρούνται πιθανά reservoirs που επηρεάζουν την επιδημιολογία της νόσου (25).



Εικόνα 9 - Κλινικές εκδηλώσεις διάφορων μορφών λείσμανίασης. [1] CL, Πηγή: (24), [2] DCL, Πηγή: (26), [3] Ινδικός τύπος PKLD, Πηγή: (27), [4] VL, Πηγή: (6), [5] Αφρικανικός τύπος PKLD, Πηγή: (27).

### 1.10 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ *LEISHMANIA SPP* - ΚΥΡΙΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ

Η μορφή με την οποία θα εκδηλωθεί η λείσμανίαση, και κατ' επέκταση η παθογένεια της και η επακόλουθη ανοσολογική απόκριση του ξενιστή, υιοθετεί πολυπαραγοντικό τρόπο καθορισμού, καθώς εξίσου σημαντικό ρόλο παίζει τόσο το είδος του παρασίτου όσο και η ανοσολογική κατάσταση του ξενιστή (28). Επιπλέον, πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν τόσο η θέση του δήγματος όσο και ο αριθμός των παρασίτων που μεταβιβάστηκαν μέσω αυτού (29), καθώς επίσης και το είδος του ξενιστή, διότι εντοπίζονται σαφείς διαφορές απόκρισης μεταξύ των ανθρώπων και των υπόλοιπων ζωικών ειδών, οι οποίες αποδίδονται κατά κύριο λόγο στην διαφορετική κυτταρική ανοσία (30).

#### 1.10.1 ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΕΣ

Η ικανότητα των διάφορων ειδών *Leishmania* να προκαλούν διαφορετικές μορφές της νόσου έγκειται στα ανοσογόνα τους μόρια, τα κυριότερα εκ των οποίων είναι:

**Λιποφωσφογλυκάνη (LPG):** Ετερογενές μόριο της κυτταρικής επιφάνειας της προμαστιγωτής μορφής. Αποτελείται από δύο τμήματα ενωμένα με φωσφοδιεστερικό δεσμό, η ακριβής δομή τους όμως διαφέρει ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης και το είδος του παρασίτου. Είναι άκρως ανοσογόνα και, μεταξύ άλλων, αλληλεπιδρά με TLRs

και DCs, μειώνει την παραγωγή IL-12, επάγει την παραγωγή IL-4, αναστέλλει το συμπλήρωμα και εμποδίζει τα T<sub>C</sub> να εντοπίσουν μολυσμένα μακροφάγα (28).

**Γλυκοσουλφωσφατιδυλινοσιτόλες (GIPLs):** Η κύρια κατηγορία γλυκολιπιδίων που συντίθενται σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια του παρασίτου, μέσω αυτών προσδένονται στην κυτταρική μεμβράνη η LPG και η Gr63. Αναστέλλουν την λειτουργία του ενζύμου iNOS και της πρωτεϊνικής κινάσης C, συμβάλλοντας στην ενδοκυτταρική επιβίωση (28).

**Πρωτεοφωσφογλυκάνες (PPGs):** Πολυπεπτίδια που απαντώνται σε εκκριτική και μεμβρανοσυνδεόμενη μορφή. Θεωρείται ότι συμμετέχουν στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος, στην διευκόλυνση του αποικισμού στην σκνίπα και στην δημιουργία του παρασιτοφόρου κυστιδίου (28).

**Κινητοπλαστιδιακή Μεμβρανική Πρωτεΐνη 11kDa (KMP-11):** Εντοπίζεται σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια αλλά κυρίως στους μετακυκλικούς προμαστιγώτες. Φαίνεται ότι αυξάνει την παραγωγή IL-10 και επάγει τον πολλαπλασιασμό των T<sub>C</sub> κυττάρων (28).

**Όξινες Φωσφατάσες (APs):** Ομάδα ενζύμων που ανευρίσκεται κυρίως στους προμαστιγώτες. Βοηθούν το παράσιτο να προσαρμοστεί στο όξινο περιβάλλον του φαγολυσοσώματος και αναστέλλουν την παραγωγή μικροβιοκτόνων ελεύθερων ριζών από τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα (28).

**Νουκλεοτιδάσες:** Ομάδα μεμβρανοσυνδεόμενων πρωτεϊνών, χρήσιμες μόνο στους προμαστιγώτες διότι η λειτουργία τους απαιτεί αλκαλικό pH. Διασπούν νουκλεϊκά οξέα σε νουκλεοτίδια και φωσφορικά άλατα, τα οποία χρησιμοποιούνται για θρέψη, μιας και η σύνθεση πουρινών de novo δεν είναι εφικτή (28).

**Πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPs):** Καλά συντηρημένα μόρια που αυξάνονται σε συνθήκες κυτταρικού στρες και βοηθούν στην διατήρηση της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης. Εντοπίζονται σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια και κατέχουν σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση από την προμαστιγωτή στην αμαστιγωτή μορφή και στην επιβίωση στην θερμοκρασία του θηλαστικού-ξενιστή. Επιπλέον, εμπλέκονται στην αντιγονοπαρουσίαση και επάγουν την T-κυτταρική απόκριση (28).

**Πρωτεΐνες Μεταφορείς (Transporters):** Μέσω αυτών διακινούνται ιόντα και θρεπτικά συστατικά προς τα παρασιτικά κύτταρα και διαδραματίζουν καίριο ρόλο στην

ομοιόσταση τους. Η λειτουργία τους μπορεί να επηρεάσει την δράση αντιπαρασιτικών φαρμάκων και κατά συνέπεια την ανάπτυξη ή όχι ανοτοχής σε αυτά (28).

**Πρωτεΐνάσες:** Ένζυμα που υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς και εμπλέκονται σε διάφορες παθογενετικές διαδικασίες (π.χ. προσκόλληση και είσοδος στα μακροφάγα, αναστολή της λειτουργίας του iNOS, διάσπαση του CD4 των T- λεμφοκυττάρων) (28).

**Γλυκοπρωτεΐνη 63 (Gr63):** Πολυμορφική, μεμβρανοσυνδεόμενη γλυκοπρωτεΐνη, κυρίως των προμαστιγώτων, με αντιγονική και πρωτεολυτική δράση. Ενισχύει την προσκόλληση στα μακροφάγα και προστατεύει έναντι του όξινου περιβάλλοντός τους αλλά και έναντι της λύσης μέσω MAC. Επιπλέον, αλληλεπιδρά με την πρωτεϊνική κινάση C και με μεταγραφικούς παράγοντες και έτσι εμπλέκεται στην διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κυττάρων, αλλά και στην ρύθμιση του προφίλ κυτταροκινών. Η αντιγονική της δράση αξιοποιείται στην ανοσοδιάγνωση (28).

#### **1.10.2 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΞΕΝΙΣΤΗ**

Τα μακροφάγα θεωρούνται τα κυριότερα κύτταρα που συμμετέχουν στην μόλυνση από *Leishmania*, όμως στην πραγματικότητα η ανοσολογική απόκριση εναντίων του παρασίτου περιλαμβάνει σχεδόν όλους κυτταρικούς τύπους του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς και μόρια όπως κυτταροκίνες, χημειοκίνες, NO κ.α. (30).

##### **1.10.2.1 ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ**

Τα μακροφάγα αποτελούν τόσο τον κυτταρικό στόχο της *Leishmania* όσο και έναν από τους βασικότερους κυτταρικούς πληθυσμούς που διαθέτει ο οργανισμός για την εξάλειψή της, αξιοποιώντας την φαγοκυτταρική τους ικανότητα. Φαινοτυπικά, διαχωρίζονται σε 2 κατηγορίες, **M1 και M2**, οι οποίες διαφέρουν, μεταξύ άλλων, ως προς τις λειτουργίες τους και ως προς τον τρόπο ενεργοποίησής τους. Ο φαινότυπος M1 είναι προφλεγμονώδης, έχει αντιμικροβιακή δράση και ενεργοποιείται από προϊόντα της Th1 ανοσολογικής απόκρισης, κυρίως IFN- $\gamma$ , ενώ αντίθετα ο φαινότυπος M2 έχει αντιφλεγμονώδη δράση και ενεργοποιείται από προϊόντα της Th2 απόκρισης, πχ IL-4 και IL-10, τα οποία επάγουν βιοχημικά μονοπάτια που ευνοούν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό της *Leishmania* (30). Αντίθετα, η IFN- $\gamma$ , η οποία παράγεται ως αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης μεταξύ των APCs με τα Tc και τα Th λεμφοκύτταρα (31), οδηγεί τον M1 φαινότυπο σε κατάσταση οξειδωτικού στρες μέσω παραγωγής ελεύθερων



ριζών οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS)(30), με σημαντικότερες τα ανιόντα υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ) και το NO αντίστοιχα, ενώ υπεύθυνα για την παραγωγή τους είναι τα ένζυμα NOX2 και iNOS (32). Από αυτά προέρχονται τα υπεροξυνιτρώδη ( $ONOO^-$ ), τα οποία είναι ελεύθερες ρίζες τοξικές για τους ενδοκυτταρικούς παθογόνους μικροοργανισμούς, χωρίς ωστόσο να βλάπτουν τα κύτταρα του οργανισμού (30).

Οι ROS και RNS συνήθως όμως δεν καταφέρνουν να εξαλείψουν εντελώς το παθογόνο, λόγω διάφορων μορίων και μηχανισμών που αυτό έχει αναπτύξει για να προστατευτεί. Ένας σημαντικός μηχανισμός είναι η παραγωγή από το ίδιο το παθογόνο ή η επαγωγή της παραγωγής από το μακροφάγο της ουσίας αργινάση, η οποία αναστέλλει την παραγωγή NO (32) μέσω μεταβολισμού της αργινίνης προς πολυαμίνες (30), ενώ στα προστατευτικά μόρια συγκαταλέγονται η LPG και η gr63. Η πρώτη αξιοποιείται από τους προμαστιγώτες που την διαθέτουν σε μεγάλη ποσότητα και αναστέλλει την παραγωγή  $O_2^-$ , ενώ η δεύτερη δρα ανασταλτικά στην λειτουργία των ενζύμων NOX2 και iNOS (32). Χαρακτηριστικά, πρέπει να αναφερθεί ότι το είδος *L. infantum/chagasi* πλέον θεωρείται ανθεκτικό στην δράση το NO (30).

#### **1.10.2.2 ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (DCs)**

Τα DCs εντοπίζονται κυρίως στο δέρμα και η βασικές τους λειτουργίες περιλαμβάνουν την αναγνώριση και επεξεργασία αντιγόνων και, στην συνέχεια, την παρουσίαση τμημάτων τους σε παρθένα T-λεμφοκύτταρα, διαδικασία γνωστή ως αντιγονοπαρουσίαση. Τα DCs που εντοπίζονται στο δέρμα είναι κατά το μεγαλύτερο μέρος τους ανώριμα, αλλά σε περίπτωση επαφής με αντιγόνο σε περιβάλλον προφλεγμονώδων κυτταροκινών ωριμάζουν και μεταναστεύουν σε λεμφαδένες, όπου παρουσιάζουν το συγκεκριμένο αντιγόνο απευθείας σε T-λεμφοκύτταρα (33). Οι προμαστιγώτες μορφές μπορούν να εισέρχονται και στις 2 μορφές των DCs, η έκβαση όμως διαφέρει. Στα ανώριμα DCs το παράσιτο καταφέρνει να επιβιώσει ενώ στα ώριμα το παρασιτοφόρο κυστίδιο συντήκεται με τα λυσοσώματα και το παράσιτο καταστρέφεται (17). Επίσης, η μόλυνση από την *Leishmania* οδηγεί στην παραγωγή IL-12, η οποία επάγει την Th1 απόκριση και ενεργοποιεί τα κύτταρα NK. Είναι λοιπόν φανερό ότι παίζουν σημαντικό ρόλο ως σύνδεσμος μεταξύ φυσικής και επίκτητης ανοσίας καθώς και ότι επηρεάζουν σημαντικά την εξέλιξη και την κατάληξη της νόσου (30).

### **1.10.2.3 ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ ΠΟΛΥΜΟΡΦΟΠΥΡΗΝΑ**

Εκκρίνουν κυτταροκίνες, ενεργοποιούν άλλα κύτταρα και διαθέτουν δυνατότητα φαγοκυττάρωσης που είτε είναι όμοια με των μακροφάγων, είτε πραγματοποιείται μέσω ενός χαρακτηριστικού σχηματισμού, των εξωκυττάρων παγίδων (NETs) (30). Πρόκειται για δίκτυο ινιδίων DNA που κωδικοποιεί αντιμικροβιακές πρωτεΐνες (32), έναντι των οποίων έχει αναπτυχθεί ένας συντηρημένος αμυντικός μηχανισμός με νουκλεάσες που τα κατακερματίζουν και επιτρέπουν στην *Leishmania* να διαφύγει (14). Γενικά έχει παρατηρηθεί ότι οι NETs εξαλείφουν αποτελεσματικά κάποια είδη (πχ *L. amazonensis*), ενώ άλλα είδη (πχ *L. donovani*, *L. infantum*) όχι (30,32).

### **1.10.2.4 ΗΩΣΙΝΟΦΙΛΑ ΚΑΙ ΜΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ**

Μέχρι πρόσφατα, θεωρούταν ότι δραστηριοποιούνταν μόνο σε ελμινθικές λοιμώξεις και αλλεργικές αντιδράσεις αντίστοιχα, πια όμως γνωρίζουμε ότι ενεργοποιούν άλλα κύτταρα, δρουν ως APCs, κατευθύνουν την ανοσολογική απόκριση προς το Th1 ή Th2 προφίλ και φαγοκυτταρώνουν παθογόνα. Επιπλέον, τα μαστοκύτταρα διαθέτουν κοκκία ισταμίνης, η οποία επιδρά σε κύτταρα που εκφράζουν υποδοχείς H1-H4 και, ανάλογα με το ποιος θα χρησιμοποιηθεί, η ανοσολογική απόκριση κατευθύνεται προς Th1 μέσω του H1 ή προς Th2 μέσω των άλλων. Παράλληλα, δρα χημειοτακτικά στα ουδετερόφιλα (16).

### **1.10.2.5 ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ**

Ομάδα πρωτεϊνών του ορού που συμμετέχει στην άμυνα έναντι των παθογόνων (34). Κατά την μόλυνση από *Leishmania*, ενεργοποιείται αφού εισέλθουν οι προμαστιγώτες στο χόριο και εξαλείφει περίπου το 90% αυτών. Τα είδη που προκαλούν VL είναι κατά κανόνα ανθεκτικότερα στην λύση μέσω συμπληρώματος, όπως και οι αμαστιγώτες (30).

### **1.10.2.6 ΣΠΛΗΝΑΣ**

Προσβάλλεται αποκλειστικά στην VL, σε όλα όμως τα περιστατικά της, και παραμένει προσβεβλημένος καθ' όλη την διάρκεια της νόσου, σε αντίθεση με το ήπαρ, στο οποίο η νόσος υποχωρεί. Ο κεντρικός ρόλος του στην VL φαίνεται από το ότι οι ασθενείς με σπληνεκτομή αναπτύσσουν κατά κανόνα σοβαρότερη έως και θανατηφόρα νόσο (29).

### **1.10.2.7 Β - ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ**

Ο ενδοκυτταρικός κύκλος ζωής προστατεύει την *Leishmania* από την δράση τους (32). Στην CL, η χυμική ανοσία δεν ενεργοποιείται καν (24). Στις άλλες μορφές, τα αντισώματα έχουν κυρίως διαγνωστική αξία, ενώ ίσως μπορεί να επαχθεί και ADCC (35), κατά την

οποία το αντίσωμα δεσμεύεται στο μολυσμένο κύτταρο-στόχο μέσω της Fc περιοχής δρώντας ως υποδοχέας, διευκολύνοντας την αναγνώριση και την καταστροφή του (34).

#### **1.10.2.8 CD8+ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΑ T-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ (T<sub>c</sub>)**

Έχουν διττό ρόλο. Στην VL εμπεριέχονται στα κοκκιώματα και σχετίζονται με ανοσία σε επαναλοίμωξη από *L. infantum*, πληροφορία που ερευνάται με σκοπό την παραγωγή εμβολίου. Αντίθετα, στις PKDL και DCL συμβάλλουν στην διασπορά της νόσου και στην MCL συνδέονται με μεγαλύτερη ιστική καταστροφή (30,32). Η συμβολή τους όμως είναι δεδομένη σε επαναλοίμωξη λόγω διαφοροποίησης ορισμένων σε κύτταρα μνήμης (36).

#### **1.10.2.9 Th1 ΚΑΙ Th2 ΑΠΟΚΡΙΣΗ CD4+ ΒΟΗΘΗΤΙΚΩΝ T-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ (Th<sub>s</sub>)**

Τα Th<sub>s</sub> διακρίνονται σε δύο κύριους υποπληθυσμούς (Th1 και Th2) με τον καθένα να εκκρίνει συγκεκριμένες κυτταροκίνες (πρωτεΐνες - μόρια κυτταρικής σηματοδότησης) κατευθύνοντας την ανοσολογική απόκριση προς το Th1 ή Th2 προφίλ αντίστοιχα (34). Κατά την Th1 απόκριση εντοπίζονται οι IL1, IL3, IL12, IL18, TNF-α, GM-CSF, IFN-γ (30). Μάλιστα, οι IL12 και IFN-γ είναι κυτταροκίνες πόλωσης και οδηγούν τα αδιαφοροποίητα Th κύτταρα προς την Th1 σειρά (37). Αντίθετα, στην Th2 απόκριση απαντώνται οι IL3-6, IL9, IL10, IL13, GM-CSF και TGF-β με τις IL4 και IL10 ως κυτταροκίνες πόλωσης (30).

Οι Th1 κυτταροκίνες ενεργοποιούν μακροφάγα, T<sub>c</sub> και B-λεμφοκύτταρα που παράγουν IgGs με ικανότητα οψωνισμού και ενεργοποίησης συμπληρώματος. Έτσι καταπολεμούνται ενδοκυττάρια βακτήρια και πρωτόζωα (30,34), χωρίς η *Leishmania* να αποτελεί εξαίρεση. Η Th1 απόκριση μετά από μόλυνση από *Leishmania* συνδέεται με καταστολή παρασιτικής ανάπτυξης και χαμηλή παρασιταϊμία (26). Στον αντίποδα, οι Th2 κυτταροκίνες δρουν σε μαστοκύτταρα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα και B-λεμφοκύτταρα που παράγουν IgM, IgE και IgGs που δεν ενεργοποιούν το συμπλήρωμα. Εκκρίνονται έναντι εξωκυττάρων παθογόνων (30,34) ενώ δεν είναι αποτελεσματικές έναντι ενδοκυττάρων. Έτσι, σχετίζονται με αυξημένο παρασιτικό φορτίο και επέκταση της νόσου (24,26,29,35).

### **1.11 ΔΙΑΓΝΩΣΗ**

Η διάγνωση όλων των μορφών λεισμανίασης βασίζεται στην κλινική εικόνα, όμως πρέπει να ακολουθήσουν και εργαστηριακές εξετάσεις που θα επιβεβαιώσουν την ύπαρξη των παρασίτων ώστε να τεθεί η οριστική διάγνωση, διότι η συμπτωματολογία προσομοιάζει σε διάφορες ασθένειες. Συγκεκριμένα, η CL πρέπει να διαφοροδιαγνωστεί από μυκητιάσεις, λέπρα, βασικοκυτταρικό καρκίνωμα και άλλες δερματικές παθήσεις,

ενώ η VL, λόγω πυρετού, ηπατοσπληνομεγαλίας και καχεξίας δύναται να διαγνωστεί λανθασμένα ως HIV ή EBV λοίμωξη, φυματίωση, τυφοειδής πυρετός, σχιστοσωμίαση, ελονοσία, βρουκέλλωση, τρυπανοσωμίαση, ιστοπλάσμωση, ηπατικό απόστημα, κίρρωση ήπατος, θαλασσαιμία, γ-σφαιρινοπάθεια, μυελοειδής λευχαιμία ή λέμφωμα (4,31). Ο εργαστηριακός έλεγχος διακρίνεται σε παρασιτολογικό, ανοσολογικό και μοριακό (10).

#### 1.11.1 ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ

Gold standard μέθοδο διάγνωσης με απόλυτη ειδικότητα αποτελεί η εντόπιση των παρασίτων κατά την **μικροσκόπηση επιχρίσματος** ή κατά την **ιστοπαθολογική εξέταση** δείγματος απόξεσης ή παρακέντησης δερματικής βλάβης για τις (M)CL ή βιοψίας σπλήνα για την VL (99% ειδικότητα). Όμως, η λήψη σπληνικού δείγματος επιφέρει κίνδυνο αιμορραγίας, γι' αυτό προτιμάται δείγμα μυελού των οστών, ήπατος ή διογκωμένου λεμφαδένα, διαδικασίες ασφαλέστερες αλλά λιγότερο ευαίσθητες. Το δείγμα ολικού αίματος δεν είναι διαγνωστικό. Τα επιχρίσματα βάφονται κατά Giemsa και εντοπίζονται ενδοκυττάριοι, στρογγυλοί αμαστιγώτες διαμέτρου 2-5μm με μπλε κυτταρόπλασμα και μωβ πυρήνα και κινητοπλάστη. Στην παθολογοανατομική εξέταση χρησιμοποιείται η χρώση H&E, με κλασικό εύρημα την επιδερμική υπερπλασία ή ατροφία με νεκρωτικές περιοχές και διήθηση μακροφάγων. Μειονέκτημα αποτελεί η μεταβλητή ευαισθησία (εξαρτάται από ποιότητα επιχρίσματος, δειγματοληψία, εμπειρία εξεταστή), η αδυναμία αναγνώρισης γένους και η ανάγκη για εξοπλισμό δυσεύρετο στις αναπτυσσόμενες χώρες, οι οποίες αντιμετωπίζουν το μεγαλύτερο πρόβλημα (10,11,24-26,31,38-41).

Επίσης, μπορεί να γίνει **καλλιέργεια** σε θρεπτικό υλικό NNN, στο οποίο παρατηρείται *in vitro* μετατροπή των αμαστιγωτών του ιστού σε προμαστιγώτες σε 7-21 ημέρες (RT). Σπανιότερα χρησιμοποιούνται τα M199, Evans και Schneider's *Drosophila*. Η ευαισθησία είναι 85% αλλά μεταβάλλεται ανάλογα με το θρεπτικό υλικό, το είδος και το παρασιτικό φορτίο. Επιπλέον, είναι διαδικασία χρονοβόρα, δαπανηρή και με κίνδυνο επιμόλυνσης, γι' αυτό δεν είναι συνηθισμένη διαγνωστική πρακτική. Ως εναλλακτική, έχει αναπτυχθεί η μικροκαλλιέργεια, κατά την οποία το δείγμα εισάγεται σε στείρο τριχοειδές σωληνάριο και η ανάπτυξη προμαστιγωτών παρατηρείται σε 2-3 μέρες. Έχει απόλυτη ειδικότητα, 94% ευαισθησία και, λόγω του μικρού όγκου, είναι οικονομική (10,11,24,26,38-41).

### 1.11.2 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Ανιχνεύουν αντιλειτουργικά αντισώματα ή λεισμανιακό αντιγόνο. Έχουν διαγνωστική αξία στις διάχυτες μορφές, ενώ δεν είναι χρήσιμες στους ανοσοκατεσταλμένους και στις εντοπισμένες μορφές (10,11,24–26,31,38–41). Το IDSA συνιστά να εφαρμόζονται σε αρνητικά ή αβέβαια αποτελέσματα παρασιτολογικών εξετάσεων, συνήθως όμως γίνεται ένας συνδυασμού τους (26). Μερικές επί του παρόντος διαθέσιμες τεχνικές είναι οι εξής:

**ELISA:** Ανιχνεύει αντιγόνο ή αντίσωμα. Έχει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα που εξαρτάται από το χρησιμοποιούμενο αντιγόνο. Εφαρμόζεται και σε δείγμα ούρων. Η απαίτηση τεχνογνωσίας, εξοπλισμού και χρόνου περιορίζουν την χρήση στις ενδημικές περιοχές (10,11,24–26,31,38,40,41).

**DAT:** Ημιοσοτική μέθοδος ανίχνευσης αντισωμάτων σε ορό, πλάσμα, ολικό αίμα ή ούρα, με προσθήκη λυοφιλοποιημένων προμαστιγών. Αν τα αντισώματα υπάρχουν, προκαλούν συγκόλληση. Η ευαισθησία και η ειδικότητα κυμαίνονται από 75% ως 100%. Είναι οικονομική, όμως απαιτεί διαδοχικές αραιώσεις και 18ωρη επώαση, ενώ η χρήση ολόκληρου του παρασίτου ως αντιγόνο προκαλεί ΨΘ αποτελέσματα αν υπάρχει άλλο λοιμώδες νόσημα. Επιπλέον, ο τίτλος αντισωμάτων παραμένει υψηλός ακόμα και για χρόνια, άρα ένα θετικό DAT δεν είναι απόδειξη ενεργής νόσου. Έτσι, δεν εφαρμόζεται σε άτομα με ιστορικό λεισμανίασης (10,11,25,26,38,40,41). Εκδοχή καταλληλότερη για μαζικό έλεγχο πληθυσμού αποτελεί το ποιοτικό **FAST** με 3ωρη επώαση, ευαισθησία 91.1–95.4% και ειδικότητά 70.5%–88.5% (38,40,41).

**IFAT:** Έχει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα (87%–100% και 77%–100%) με προμαστιγώτες ως αντιγόνα. Δεν εφαρμόζεται στην καθημερινή κλινική πράξη λόγω της απαραίτητης χρήσης μικροσκοπίου φθορισμού (10,11,25,38–41).

**Ανοσοαποτύπωση (Western Blot):** Οι προμαστιγώτες καλλιεργούνται και λύονται στην εκθετική φάση. Οι πρωτεΐνες τους διαχωρίζονται σε SDS-PAGE και μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, στην οποία προστίθεται και ο εξεταζόμενος ορός. Το μοτίβο των ζωνών που προκύπτει θέτει την διάγνωση. Η μέθοδος είναι πιο ευαίσθητη και ειδική απ' τις ELISA και IFA (98-100%) και έχει καλά αποτελέσματα σε HIV συλλοίμωξη. Όμως επίσης είναι δαπανηρή, χρονοβόρα και απαιτεί ειδικό εξοπλισμό και τεχνογνωσία, γι' αυτό χρησιμοποιείται κυρίως σε ερευνητικά εργαστήρια (26,38,40,41).

**IHA:** Στις δοκιμασίες αιμοσυγκόλλησης, ευαισθητοποιημένα RBCs συγκολλούνται παρουσία του αντίστοιχου αντισώματος στον εξεταζόμενο ορό. Για την VL, η μέθοδος περιλαμβάνει RBCs προβάτου ευαισθητοποιημένα με λεισμανιακό αντιγόνο και ανάλογα με την παρουσία συγκολλήσεων προσδιορίζεται ο τίτλος αντισωμάτων. Υποδεικνύει την έκθεση στο παράσιτο, η ευαισθησία εξαρτάται από την ανοσολογική κατάσταση του ασθενή και διασταυρούμενες αντιδράσεις θεωρούνται πιθανές (40).

**IC:** Εφαρμόζεται σε ταχείς διαγνωστικές εξετάσεις (RDTs) για πολλές ασθένειες. Πλέον υπάρχουν 3 εμπορικά διαθέσιμα RDTs για την VL (**Kalazar Detect Rapid Test**-InBios International, **IT-LEISH Individual Rapid Test**-BioRad, **OnSite Leishmania Ab Rapid Test**-CTK Biotech), με λωρίδες νιτροκυτταρίνης εμποτισμένες με το αντιγόνο rK39. Η ευαισθησία και η ειδικότητα τους στις ενδημικές περιοχές είναι πολύ υψηλές (Ινδία: 100%, 93-98%, Βραζιλία: 90%, Μεσόγειος: 100%), χωρίς να λείπουν τα μειονεκτήματα των δοκιμασιών ανίχνευσης αντισωμάτων. Παρόλα αυτά, ο απλός εξοπλισμός, η ταχύτητα, το χαμηλό κόστος και η ευκολία διεξαγωγής και την καθιστούν πρώτη επιλογή αποκεντρωμένης διάγνωσης. Επίσης, έχει αναπτυχθεί και RDT ανίχνευσης αντιγόνου για την CL (**CL Detect™ Rapid Test** - InBios International) (10,11,25,26,31,38–40).

**KA<sub>tex</sub>:** Χρησιμοποιούνται σωματίδια latex για ανίχνευση αντιγόνου σε δείγμα ούρων, διακρίνοντας ενεργή νόσο. Εφαρμόζεται στην διάγνωση ανοσοκατεσταλμένων με 85-100% ευαισθησία και 96% ειδικότητα. Συνδυαστικά με το χαμηλό κόστος και την ευκολία διεξαγωγής, θεωρείται καλή μέθοδος αποκεντρωμένης διάγνωσης (10,11,26,38–41).

**Μονοκλωνικά αντισώματα:** Μέθοδος ανίχνευσης αντιγόνου, διαθέσιμη για τα είδη *L. major*, *L. donovani* και *L. tropica*. Εφαρμόζονται σπάνια καθώς απαιτούν πολύ χρόνο και εκπαιδευμένο προσωπικό (40).

**LST/MST:** Ενύονται ενδοδερμικά  $5-10^7$  μονιμοποιημένοι προμαστιγώτες και 48-72h μετά παρατηρείται η δερματική αντίδραση (11), η οποία συγκαταλέγεται στις τύπου IV (επιβραδυνόμενη υπερευαισθησία), χαρακτηρίζεται δηλαδή από εισροή μακροφάγων και σχηματισμό κοκκιώματος, ενώ δεν μεσολαβούν αντισώματα (34). Είναι αντίστοιχη της δοκιμασίας φυματίνης (Mantoux) και ελέγχει την κυτταρική ανοσία. Το αποτέλεσμα είναι θετικό (διάμετρος >5mm) στις εντοπισμένες μορφές, ενώ αρνητικό (<5mm) είναι στις διάχυτες και θετικοποιείται μετά την ίαση. Έχει ευαισθησία 86–100% και ειδικότητα

>90%. Πλέον, χρησιμοποιείται σε επιδημιολογικές μελέτες και ως δείκτης απόκρισης στη θεραπεία της VL (20–22,37,38).

### 1.11.3 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ (Nuclei Acid Amplification Tests – NAATs)

Οι NAATs έχουν ενσωματωθεί πλέον στους διαγνωστικούς αλγόριθμους και είναι ιδιαίτερα χρήσιμες όταν η δυνατότητα εφαρμογής παρασιτολογικών και ορολογικών δοκιμασιών είναι περιορισμένη. Κοινό μειονέκτημα τους είναι ότι απαιτούν εξελιγμένο εξοπλισμό και εκπαιδευμένο προσωπικό, γεγονός που αυξάνει το κόστος (31,41). Η βασικότερη μοριακή διαγνωστική μέθοδος είναι η **PCR**.

**PCR και παραλλαγές:** Η συμβατική PCR στηρίζεται στην ανίχνευση και ενίσχυση μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας-στόχου DNA ή RNA και το αποτέλεσμα αξιολογείται σε πήκτωμα αγαρόζης μέσω ηλεκτροφόρησης (40). Πιο συχνούς στόχους αποτελούν γονίδια που κωδικοποιούν rRNAs και αλληλουχίες του κινητοπλάστη. Έχει 100% ευαισθησία σε δείγματα σπλήνα ή μυελού των οστών και 70-100% σε δείγματα περιφερικού αίματος, το οποίο όμως προτιμάται λόγω του μη επεμβατικού του χαρακτήρα (38). Έχει επίσης δοκιμαστεί σε δείγματα ούρων με 88% ευαισθησία (39). Επίσης, μπορεί να ελεγχθεί η παρουσία υποτροπής και η αποτελεσματικότητα των χορηγούμενων φαρμάκων (10,41), δεν είναι όμως εφικτός ο ποσοτικός προσδιορισμός του παρασιτικού φορτίου (39). Το πλεονέκτημα αυτό μας δίνεται με την PCR πραγματικού χρόνου (**real-time PCR**), η οποία αναφέρεται και ως ποσοτική (quantitative – **qPCR**) (38,39). Η μέθοδος περιλαμβάνει πολλαπλασιασμό της αλληλουχίας-στόχου και παράλληλη ανίχνευση και καταγραφή φθορίζοντων σημάτων που παράγονται κατά τον πολλαπλασιασμό μέσω χρήσης ανιχνευτών (π.χ TaqMan) ή χρώσεων (π.χ SYBR Green) (40,41), από τα οποία εξαρτάται και εν μέρει η ευαισθησία της. Άλλοι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται είναι η αλληλουχία-στόχος, οι εκκινητές, το είδος του δείγματος και ο τρόπος απομόνωσης του γενετικού υλικού από αυτό (39). Η ικανότητα προσδιορισμού του παρασιτικού φορτίου την καθιστά ιδανική μέθοδο για την παρακολούθηση των ασθενών που υποβάλλονται σε θεραπεία (38,40). Σε περιπτώσεις χαμηλής παρασιταιμίας, η υψηλότερη ευαισθησία και ειδικότητα επιτυγχάνεται μέσω της εμφωλευμένης PCR (**nested PCR**), κατά την οποία χρησιμοποιούνται δύο ζεύγη εκκινητών, με τον δεύτερο να πολλαπλασιάζει αλληλουχία-στόχο που περιλαμβάνεται εντός του προϊόντος της πρώτης PCR (39). Η αντίδραση γίνεται σε 2 στάδια και αυτό αυξάνει σημαντικά τις πιθανότητες επιμόλυνσης, έτσι η

nested PCR διενεργείται μόνο σε διαπιστευμένα εργαστήρια (39,41). Αν όμως γίνει σωστά, η ειδικότητα και η ευαισθησία της για την VL φτάνουν το 100% και το 97% αντίστοιχα (39). Άλλη παραλλαγή αποτελεί η πολυπλεκτική PCR (**multiplex PCR**), κατά την οποία πολλαπλασιάζονται πολλές διαφορετικές αλληλουχίες-στόχοι ταυτόχρονα στο ίδιο μείγμα μέσω πολλών διαφορετικών ζευγών εκκινητών με παρόμοιες θερμοκρασίες υβριδισμού. Η ευαισθησία της είναι χαμηλότερη συγκριτικά με την συμβατική PCR και απαιτείται προσεκτικός σχεδιασμός και επιλογή των εκκινητών (41). Εκτός από το διαγνωστικό πλαίσιο, η PCR συνδυάζεται και με άλλες μεθόδους ώστε να βρει εφαρμογή σε επιδημιολογικές μελέτες και στην ταυτοποίηση των ειδών. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν η **γονιδιωματική αλληλούχιση**, η **PCR-RFLP** (24,41) και η τεχνική **RAPD**, που περιλαμβάνει άγνωστη αλληλουχία-στόχο και τυχαίους εκκινητές (39,41).

**Ισοθερμικές παραλλαγές της PCR:** Παραλλαγές της PCR που δεν απαιτούν θερμικό κυκλοποιητή αποτελούν οι μέθοδοι **NASBA**, **RPA** και **LAMP** (31,39,41). Η πρώτη είναι η μόνη με RNA ως αρχικό υλικό, διαθέτει και ποσοτική τροποποίηση (qNASBA), είναι όμως επιρρεπής σε επιμόλυνση από ριβονουκλεάσες (41). Η LAMP περιλαμβάνει ενίσχυση DNA ειδικού για κάθε είδος και συχνά χρησιμοποιείται αντί της συμβατικής PCR γιατί είναι οικονομικότερη, ταχύτερη και απαιτεί απλό εξοπλισμό (39,41). Βασισμένο σε αυτή είναι το μοναδικό ως τώρα εμπορικά διαθέσιμο μοριακό κιτ για την VL (**Loopamp™** Leishmania Detection Kit) με ευαισθησία 97-99% σε δείγμα περιφερικού αίματος (31,39).

**Άλλες μοριακές τεχνικές:** Δεν χρησιμοποιούνται σε διαγνωστικό πλαίσιο αλλά σε φυλογενετικές και γονιδιωματικές αναλύσεις. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι οι μέθοδοι **AFLP**, **MLST**, **MLMT** και **MLEE**, με την τελευταία να αποτελεί, σύμφωνα με τον WHO, την gold standard μέθοδο ταυτοποίησης των ειδών *Leishmania spp* (39–41).

## **1.12 ΠΡΟΛΗΨΗ – ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ**

### **1.12.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ**

Η νόσηση από *Leishmania* είναι συνήθως απόρροια κακής κοινωνικοοικονομικής κατάστασης, η οποία οδηγεί σε αυξημένη έκθεση στις σκνίπες. Παρακάτω συνοψίζονται οι κυριότεροι παράγοντες που καθιστούν κάποιον επιρρεπή στο δήγμα σκνίπας και κατ' επέκταση στην νόσηση.



ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ
Έλλειψη οικιακής υγιεινής (πχ ανοικτή αποχέτευση, λάθος διαχείριση απορριμμάτων)	Μετατροπή της κατοικίας σε πόλο έλξης σκνίπας
Κακές συνθήκες στέγασης – Πολυσύχναστες κατοικίες	
Αποψίλωση δασικών εκτάσεων – Επέκταση αστικών δομών σε αυτές	Είσοδος του ανθρώπου στο φυσικό περιβάλλον της σκνίπας
Κλιματική αλλαγή	Επίδραση στους βιολογικούς κύκλους του παρασίτου και της σκνίπας
Μαζικές πληθυσμιακές μετακινήσεις (πχ λόγω πολέμου, φυσικής καταστροφής)	Πιθανή μεταφορά του παρασίτου από ενδημικές περιοχές σε μη ενδημικές
Υποσιτισμός (έλλειψη πρωτεϊνών, Fe, Zn, βιταμίνης Α)	Ευκολότερη εξέλιξη μόλυνσης σε γενικευμένη νόσο
Επαγγελματική έκθεση	

Πίνακας 3 - Κυριότεροι παράγοντες κινδύνου νόσησης με λείσμανίαση. Πηγή: (8)

### 1.12.2 ΜΕΤΡΑ ΠΡΟΛΗΨΗΣ

Ο έλεγχος της λείσμανίασης απαιτεί συνδυασμό παρεμβάσεων λόγω του σύνθετου συστήματος μετάδοσης της (8). Παρακάτω αναφέρονται τα κυριότερα μέτρα πρόληψης.

#### Αποφυγή δείγματος σκνίπας

- Αποφυγή υπαίθριων δραστηριοτήτων κατά τις βραδινές ώρες
- Κάλυψη του σώματος με μακρυμάνικες μπλούζες, μακριά παντελόνια, κάλτσες κλπ
- Χρήση εντομοαπωθητικών (κυρίως με DEET)
- Κλιματισμός εσωτερικών χώρων
- Κουνοπιέρες, ιδανικά εμποτισμένες με εντομοαπωθητικό

#### Μέτρα εξάλειψης σκνίπας

- Ψεκάσμοι με εντομοκτόνο
- Απομάκρυνση/Αποξήρανση λιμνάζοντος νερού

#### Έλεγχος ζωικών δεξαμενών

- Προστασία των σκύλων με χρήση περιλαμίων εμβαπτισμένων με το εντομοαπωθητικό Deltamethrin (Scalibor® ProtectorBand, Intervet International) και με τοποθέτηση συρμάτων πλεγμάτων στα καταλύματά τους
- Καταστροφή των φωλιών των τρωκτικών *Rhombomys opimus* με καλλιέργεια της γης ή με δεντροφυτεύσεις

#### Επιτήρηση νόσου

- Εγκαιρή διάγνωση
- Ιχνηλάτηση επαφών
- Προληπτικός έλεγχος ζωικών δεξαμενών

Διάγραμμα 2 - Σύνοψη των κυριότερων μέτρων πρόληψης της λείσμανίασης. Πηγές: (1,6,8,11,24)

### 1.12.3 ΕΜΒΟΛΙΟ

Εμβόλιο θεωρείται κάθε προϊόν που επάγει ασφαλή απόκριση έναντι ορισμένου παθογόνου με σκοπό την ανάπτυξη ανοσολογικής μνήμης που θα ενεργοποιηθεί σε μελλοντική έκθεση στο παθογόνο αυτό (42). Γενικότερα, ο εμβολιασμός αποτελεί την αποτελεσματικότερη και οικονομικά πιο συμφέρουσα μέθοδο πρόληψης λοιμωδών νοσημάτων, μεταξύ αυτών και της λείσμανίασης (43), και το ότι οι ασθενείς που έχουν

ιαθεί από CL εμφανίζουν μακροχρόνια ανοσία αποτελεί ένδειξη του ότι η ανάπτυξη εμβολίου είναι θεωρητικά εφικτή (41,44). Αυτό επίσης υποστηρίζεται από την απουσία αντιγονικής μετατροπής και από την ύπαρξη μόνο ενός κύριου κυττάρου – ξενιστή, μόνο μίας παθογενετικής μορφής και παρόμοιων αντιγόνων σε διαφορετικά είδη (43,45). Παρόλα αυτά, η όχι πλήρως αποσαφήνιση της απόκρισης έναντι του παρασίτου (31) σε συνδυασμό με την έλλειψη χρηματοδότησης (29) και εμπορικού ενδιαφέροντος λόγω της φτωχής οικονομίας των περισσότερων πληττόμενων χωρών συμβάλλουν (29,35) στο να μην έχει αναπτυχθεί αποτελεσματικό εμβόλιο κατά της ανθρώπινης λείσμανίασης (HL) (46). Υπολογίζεται ότι στην Νότια Αμερική, 40.000-145.000 κρούσματα CL θα προληφθούν με ένα κατά 70% αποτελεσματικό εμβόλιο 10ετούς προστασίας, ενώ ένα κατά 50% αποτελεσματικό εμβόλιο 5ετούς προστασίας έναντι της VL θα ήταν πιο οικονομικό σε σύγκριση με τις υπάρχουσες θεραπείες (47). Παρόλα αυτά, το 2021 υπήρχαν παγκοσμίως μόνο 9 κλινικές δοκιμές φάσης I, 7 φάσης II και 2 φάσης III (35).

Όσον αφορά την HL, παλιά εφαρμοζόταν η λείσμανιοποίηση, στην οποία εισάγονταν ζωντανά παράσιτα σε μη εκτεθειμένο σημείο του σώματος προς αποφυγή λοίμωξης στο πρόσωπο. Προφανώς, αυτό έχει πλέον εγκαταλειφθεί και η έρευνα για την πρόληψη αρχικά εστίασε στα ανασυνδυασμένα εμβόλια, τα οποία παράγονται εύκολα και σχετικά φθηνά σε μεγάλη κλίμακα (43). Παράλληλα, η έρευνα έχει στραφεί και προς τα DNA εμβόλια (36), τα οποία χαρακτηρίζονται από ευκολία διανομής και αποθήκευσης (δεν απαιτούν χαμηλή θερμοκρασία), σταθερότητα, ευελιξία προσθήκης γονιδίων και χαμηλό κόστος (43), ενώ μάλλον υπερτερούν και έναντι των RNA εμβολίων (44). Συνοδεύονται όμως από ανησυχία για πιθανή ενσωμάτωση του παρασιτικού DNA στο γονιδίωμα του θηλαστικού που ενδεχομένως οδηγεί σε αυτοάνοσο νόσημα ή καρκίνο (41). Έως τώρα, το πιο πολλά υποσχόμενο και μελετημένο DNA εμβόλιο είναι το LACK (44), έχει όμως ασυνεπή αποτελέσματα (29). Το 2021, το IDRI υπέβαλλε σε δοκιμή φάσης I σε υγιή άτομα στις ΗΠΑ το Leish-F3+GLA SE, το οποίο περιέχει ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες των *L. donovani* και *L. infantum*, με ενθαρρυντικά αποτελέσματα (26,31,48,49). Από το Sabin PDP αναπτύσσεται ανασυνδυασμένο εμβόλιο με την πρωτεΐνη NH36 του *L. donovani* και αντιγόνο σιέλου σκνίπας ως ανοσοενισχυτικό (26,49). Παράλληλα, και το MeLeVaClin αναπτύσσει εμβόλια με ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες (26), ενώ σε φάσης I κλινικές

δοκιμές βρίσκεται και το μονοδοσικό εμβόλιο ChAd63-KH (26,44), που χορηγήθηκε σε υγιείς ανθρώπους στο ΗΒ και σε PKLD ασθενείς στο Σουδάν με καλά αποτελέσματα (35).

Στον αντίποδα, για την CanL (λείσμανίαση σκύλων) υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα εμβόλια. Το πρώτο ήταν το **Leishmune** (Zoetis), που αναπτύχθηκε το 2004 στην Βραζιλία και αποσύρθηκε το 2014. Επίσης στην Βραζιλία, το 2007 αναπτύχθηκε το **Leis-Tec** (Ceva Animal Health) και είναι πλέον το μόνο επιτρεπόμενο στην συγκεκριμένη χώρα. Περιέχει την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη A2 αμαστιγώτων *L. donovani* ως ανοσογόνο, χορηγείται υποδόρια, σε 3 δόσεις/21 μέρες, σε σκύλους >4 μηνών και απαιτεί ετήσια αναμνηστική δόση (50,51). Στην Ευρώπη, από το 2011 κυκλοφορεί το **Canileish** (Virbac, Γαλλία). Έχει το ίδιο εμβολιαστικό πρόγραμμα, με την διαφορά ότι χορηγείται σε σκύλους >6 μηνών, ενώ η ανοσογόνος ουσία είναι πρωτεΐνες της *L. infantum* (50). Επιπλέον, το 2016 στην Ευρώπη ξεκίνησε να κυκλοφορεί το **LetiFend** (Leti Laboratories, Ισπανία), αυξάνοντας τον αριθμό των εμπορικά διαθέσιμων εμβολίων σε 3 (52). Περιέχει 5 αντιγονικά τμήματα από 4 πρωτεΐνες *L. infantum*, αποτελεί την μονοδοσική επιλογή για σκύλους >6 μηνών και οι ετήσιες αναμνηστικές δόσεις είναι απαραίτητες. Έρευνες έχουν καταλήξει στο ότι τα παραπάνω εμβόλια αποτρέπουν την κλινική εκδήλωση νόσου κατά 92-95% αλλά προστατεύουν έναντι λοίμωξης μόνο κατά 68-80%, έτσι, παράλληλα με την συμμόρφωση στο εμβολιαστικό πρόγραμμα, συνίσταται η χρήση εντομοαπωθητικών (50).

### **1.13 ΘΕΡΑΠΕΙΑ**

Η VL αν αφεθεί χωρίς θεραπεία είναι θανατηφόρα σε ποσοστό ανώτερο του 90%, κυρίως εξαιτίας αιμορραγικών επιπλοκών ή συνοδών λοιμώξεων, απόρροια του κατασταλαμένου ανοσοποιητικού συστήματος. Τα φαρμακευτικά σκευάσματα που διαθέτουμε στην φαρέτρα μας για την επιτυχή καταπολέμηση της νόσου ουσιαστικά περιορίζονται στις ενώσεις αντιμονίου, στην αμφοτερικίνη Β, στην μιλτεφοσίνη και στην παραμομυκίνη (10).

#### **1.13.1 ΕΝΩΣΕΙΣ ΑΝΤΙΜΟΝΙΟΥ**

##### **1.13.1.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ**

Το Αντιμόνιο (Sb) βρίσκεται στην 5<sup>η</sup> περίοδο και στην 15<sup>η</sup> ομάδα του περιοδικού πίνακα και μαζί με τα στοιχεία Βόριο, Πυρίτιο, Γερμάνιο, Αρσενικό και Τελλούριο αναφέρονται ως μεταλλοειδή διότι διαθέτουν χημικές ιδιότητες τόσο μετάλλων όσο και αμετάλλων. Ποικίλες ενώσεις τους χρησιμοποιούνται σήμερα ως χημειοθεραπευτικά

φάρμακα και έναντι πρωτοζώων, με το Sb ειδικότερα να χρησιμοποιείται στην θεραπεία της λεισμανίασης και παλαιότερα της σχιστοσωμιάσης (53).

Η αντιμονιακή μεγλουμίνη (**Meglumine Antimoniate - MA**) και το σιβογλυκονικό νάτριο (**Sodium Stibogluconate - SSG**) αποτελούν ενώσεις πεντασθενούς αντιμονίου ( $Sb^{5+}$ -**SbV**) που χρησιμοποιούνται για δεκαετίες ως αντιλεισμανιακά φάρμακα πρώτης γραμμής με εμπορικές ονομασίες **Glucantime** και **Pentostam** αντίστοιχα (53,54). Κατά την θεραπεία των (M)CL χορηγούνται απευθείας στην δερματική βλάβη ενώ σε περιστατικά VL η χορήγηση του SSG γίνεται ενδοφλέβια και του MA ενδομυϊκά, σε δοσολογία 20mg/kg ημερησίως για 20-30 ημέρες. Κατά την δερματική χορήγηση έχουν παρατηρηθεί τοπικά οιδήματα και ερυθρήματα που συνοδεύονται από ενόχληση ή πόνο στην περιοχή, ενώ σε ενδοφλέβια ή ενδομυϊκή χορήγηση έχουν καταγραφεί παρενέργειες όπως νεφροτοξικότητα, ηπατοτοξικότητα, παγκρεατίτιδα, καρδιακές αρρυθμίες, μυαλγίες, αρθραλγίες, απώλεια όρεξης, ναυτίες, έμετοι κλπ (41,44).

Το SbV ως δραστική ουσία θεωρείται προ-φάρμακο (pro-drug) διότι ουσιαστικά η παρασιτοκτόνος δράση διενεργείται από την ανηγμένη, τρισθενή μορφή του ( $Sb^{3+}$  - **SbIII**) (55). Μέρος της αναγωγής λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα του προσβεβλημένου μακροφάγου και το παραγόμενο SbIII εισέρχεται στο παρασιτικό κύτταρο μέσω του μεμβρανικού μορίου AQP1 (Aquaporin 1 – Ακουαπορίνη 1), ενώ παράλληλα το SbV εισέρχεται και αυτούσιο στο παράσιτο, μέσω άγνωστου μέχρι τώρα υποδοχέα, και ανάγεται εκεί σε SbIII (19). Αξίζει να σημειωθεί ότι στους προμαστιγώτες δεν παρατηρείται αναγωγή του SbV σε SbIII, καθιστώντας έτσι μόνο τους αμαστιγώτες ευαίσθητους έναντι του SbV (55).

Έχοντας βρεθεί μέσα στο παράσιτο, το SbIII δρα αναστέλλοντας το ένζυμο αναγωγή της τρυπανοθειόνης (TR). Η τρυπανοθειόνη είναι αντιοξειδωτικό μόριο των τρυπανοσωματιδίων, αντίστοιχο της γλουταθειόνης των θηλαστικών, και στην ανηγμένη της μορφή συμβάλλει στην ενδοκυτταρική επιβίωση της *Leishmania* εξουδετερώνοντας τις παραγόμενες από τα μακροφάγα ROS. Έτσι, η παρεμβολή του SbIII στην δράση της TR καθιστά την *Leishmania* ευάλωτη στο επαγόμενο από τις ROS οξειδωτικό στρες (55). Εν τέλει, το SbIII εξέρχεται του παρασίτου διαμέσου μεταφορέων τύπου ABC (ATP-Binding

Cassettes), π.χ. ABCG2 και ABCI4 και το SbV απομακρύνεται από το μακροφάγο μέσω του μεμβρανικού μορίου MDR1 (Multidrug Resistance Protein 1) (19).

### **1.13.1.2 ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΗΣ**

Ως αντίσταση ή αντοχή ορίζεται η μειωμένη απόκριση ενός μικροοργανισμού έναντι σε ορισμένο φαρμακευτικό σκεύασμα και αποτελεί βασική αιτιολογία αποτυχίας της δοσμένης θεραπείας (19). Παρατηρείται τόσο σε προκαρυώτες όσο και σε ευκαρυώτες, στους τελευταίους όμως συνοδεύεται από επιπλέον προκλήσεις οι οποίες σχετίζονται με: 1) την μεγαλύτερη βιοχημική ομοιότητά τους με τον άνθρωπο, 2) την ενδοκυτταρική συνήθως εγκατάστασή τους, η οποία τους προστατεύει εν μέρει από την έκθεση στα φάρμακα 3) τους μηχανισμούς επαγωγής ανοσοκαταστολής που διαθέτει μέρος αυτών, 4) την απουσία αποτελεσματικών εμβολίων έναντι της συντριπτικής πλειοψηφίας των παρασιτώσεων και των μυκητιάσεων και 5) την μεγαλύτερη δυσκολία προσδιορισμού της αντοχής σε αυτούς (54).

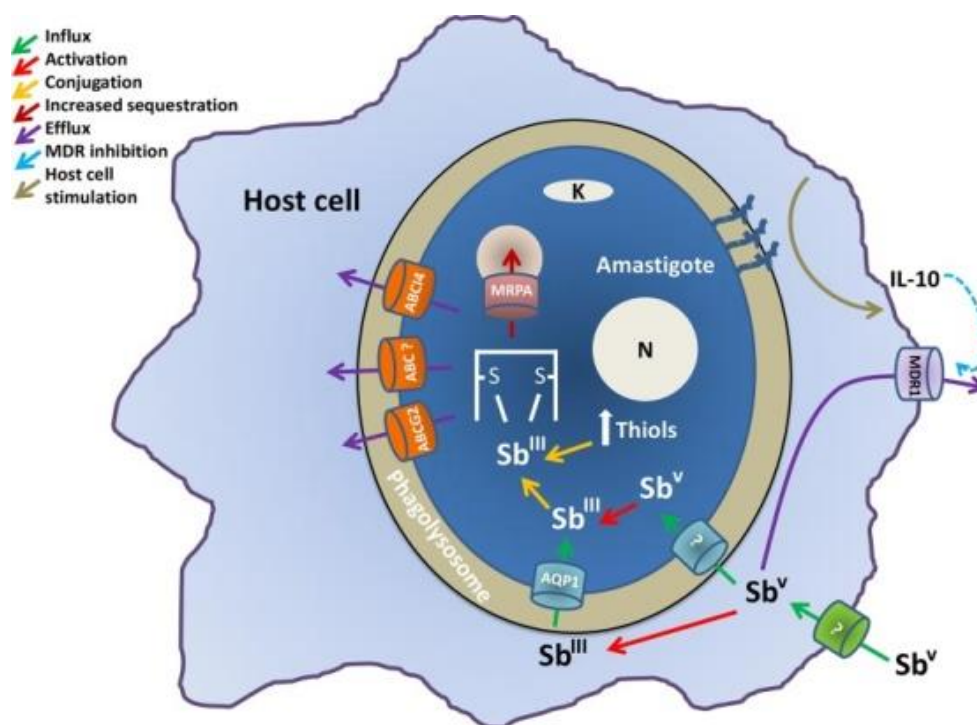
Οι ενώσεις πεντασθενούς αντιμονίου αποτελούσαν παγκόσμια την θεραπεία πρώτης γραμμής κατά της VL για δεκαετίες. Όμως, κατά την δεκαετία του 1990 άρχισαν να εντοπίζονται ανθεκτικά στο SbV στελέχη στην επαρχία Bihar της βόρειας Ινδίας, ενώ ήταν αξιοπερίεργο το γεγονός ότι πολλά από τα στελέχη αυτά δεν είχαν εκτεθεί ποτέ στις προαναφερθείσες ενώσεις. Όπως φαίνεται, υπεύθυνη γι' αυτό ήταν η μόλυνση του πόσιμου νερού της περιοχής με το επίσης βαρύ μέταλλο Αρσενικό (As), με το οποίο το αντιμόνιο μοιράζεται πολλά κοινά χαρακτηριστικά (19). Μάλιστα, έρευνα έδειξε ότι πληθυσμοί που διέμεναν σε περιοχές με συγκέντρωση As στο νερό >10μg/L διέτρεχαν μεγαλύτερο κίνδυνο αποτυχίας της θεραπείας τους σε περίπτωση νόσησης (56). Στην ανάπτυξη αντοχής συμβάλλουν επίσης και η υποδοσολογία ή/και ο ανεπαρκής χρόνος θεραπείας είτε λόγω έλλειψης εξειδίκευσης ή εμπειρίας από την μεριά του θεράποντος ιατρού είτε λόγω μη συμμόρφωσης από την μεριά του ασθενούς (57). Στις μέρες μας, το ποσοστό αποτυχίας θεραπειών που περιλαμβάνουν μόνο SbV στην νότια Ασία αγγίζει το 60% και γι' αυτό τα SSG και MA έχουν πλέον αντικατασταθεί από άλλα φάρμακα στην περιοχή αυτή (54,55). Συγκεκριμένα, επιλέγεται κυρίως η λιποσωμική AmrB (LAMB), είτε μόνη είτε σε συνδυασμό με PMM ή MLT (19,58).

Οι *in vitro* μηχανισμοί που προσδίδουν σε κάποιο παρασιτικό στέλεχος *Leishmania* χαρακτηριστικά τα οποία το καθιστούν ανθεκτικό έναντι στο αντιμόνιο ποικίλουν (55). Σε

ανθεκτικούς αμαστιγώτες έχει παρατηρηθεί μειωμένη αναγωγή του SbV προς SbIII, με αποτέλεσμα την ελάττωση της ποσότητας του ενεργού φαρμάκου, άρα και ελάττωση της δράσης του. Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρείται και μέσω μείωσης της έκφρασης της AQP1, του κυρίου μορίου μέσω του οποίου γίνεται η είσοδος του SbIII στο παράσιτο (19,54). Αντοχή μπορεί επίσης να επιτευχθεί και με αύξηση της αποβολής είτε του SbV είτε του SbIII, ως επακόλουθο υπερέκφρασης του μορίου MDR1, μέσω του οποίου το SbV εξέρχεται από το μακροφάγο και των ABC μεταφορέων (κύρια μόρια εξόδου του SbIII από το παράσιτο) (19,55).

Στους ABC μεταφορείς συγκαταλέγεται και ο **MRPA**, ο οποίος εντοπίζεται σε μεμβρανικά κυστίδια κοντά στην μαστιγωτή θήκη και συμβάλει στην απομόνωση συζευγμάτων τρυπανοθειόνης - SbIII, η υπερέκφραση λοιπόν του εν λόγω μορίου οδηγεί σε αύξηση της διαμερισματοποίησης και κατά συνέπεια στην μείωση της δράσης του SbIII, τόσο σε αμαστιγώτες όσο και σε προμαστιγώτες (19,54). Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον MRPA μεταφορέα εντοπίζεται στον **γονιδιακό τόπο H-locus**, μεγέθους 40kb (59), ο οποίος εδράζεται στο χρωμόσωμα 23 και περιλαμβάνει και άλλα γονίδια, στα οποία συγκαταλέγονται και αυτά που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη αντίστασης στην τερβιναφίνη και την αργινονηλεκτρική συνθετάση (60).

Όπως προαναφέρθηκε, η τρυπανοθειόνη διαθέτει δυνατότητα σύνδεσης με το SbIII και το σύμπλεγμα τους αρχικά απομονώνεται και εν τέλει απομακρύνεται από το παρασιτικό κύτταρο. Έτσι, άνοδος των επιπέδων της τρυπανοθειόνης συνεπάγεται και αύξηση της απέκκρισης του SbIII, άρα και μεγαλύτερη τάση προς την ανθεκτικότητα (19,54,55). Η ίδια κατάληξη παρατηρείται και με αύξηση του ενζύμου υπεροξειδάση της τρυπαρεδοξίνης, το οποίο καταλύει την άνοδο των επιπέδων των θειολών, μέρος των οποίων είναι και η τρυπανοθειόνη (19). Τέλος, αντοχή είναι δυνατόν να επαχθεί και με την αύξηση διάφορων πρωτεϊνών επιδιόρθωσης της κυτταρικής βλάβης (54).



Εικόνα 10 - Ορισμένοι από τους μηχανισμούς ανάπτυξης αντοχής έναντι του SbIII που παρατηρούνται στην *Leishmania spp.* Πηγή: (19).

### 1.13.2 ΑΜΦΟΤΕΡΙΚΙΝΗ Β (AmpB)

Η αμφοτερικίνη Β παράγεται από το βακτήριο *Streptomyces nodusus* με σκοπό την προστασία του έναντι των μυκήτων (57). Η αντιμυκητιακή της ιδιότητα έγκειται, κατά κύριο λόγο, στην μεγάλη ευαισθησία με την οποία συνδέεται με την εργοστερόλη, η οποία είναι η βασική στερόλη της κυτταρικής μεμβράνης των μυκήτων (19). Η σύνδεση αυτή προκαλεί διάνοιξη πόρων στην μεμβράνη και οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο (54,57). Εκμεταλλεόμενοι, πρώτον το ότι τα θηλαστικά διαθέτουν χοληστερόλη (και όχι εργοστερόλη) ως την κύρια μεμβρανική τους στερόλη, με την οποία η AmpB συνδέεται με μικρότερη ευαισθησία, και δεύτερον το ότι τα παράσιτα του γένους *Leishmania* διαθέτουν παρόμοιο προφίλ μεμβρανικών στερολών με τους μύκητες, η AmpB χρησιμοποιείται έναντι συστηματικών μυκητιάσεων για τουλάχιστον 70 χρόνια και ως αντιλεϊσμάνιακό φάρμακο από την δεκαετία του 1960 (19).

Για πολλά χρόνια η μόνη υπάρχουσα μορφή αμφοτερικίνης ήταν η δοεξυχολική (**AmpB deoxycholate**), η χορήγηση της οποίας όμως προκαλούσε σωρεία παρενεργειών, για παράδειγμα νεφροτοξικότητα, υποκαλιαιμία και μυοκαρδίτιδα (58). Με σκοπό την ελαχιστοποίηση των ανεπιθύμητων αυτών αντιδράσεων, η έρευνα στράφηκε προς την

χρήση λιποσωμάτων ως σύστημα χορήγησης. Τα λιποσώματα είναι μικροκυστίδια που περιβάλλουν το εκάστοτε φάρμακο, προστατεύοντάς το από μηχανισμούς που ενδέχεται να το αδρανοποιήσουν ώσπου να φτάσει στον στόχο του και διαφέρουν σε μέγεθος, σχήμα, στοιχεία επιφανείας κλπ ανάλογα με την φαρμακευτική ουσία την οποία έχουν σχεδιαστεί να εγκολπώσουν (61). Έτσι, διαθέτουμε πλέον 3 λιπιδικές μορφές AmpB: 1) την λιποσωμική - **LAMB** (AmBisome, Gilead Sciences), 2) την **ABLCLC** – AmpB Lipid Complex (Abelcet, Enzom Pharmaceuticals) και 3) την **ABCD** – AmpB Cholesterol Dispersion (Amphotec, InterMune Corp). Αυτές, σε αντίθεση με την συμβατική μορφή, συγκεντρώνονται γρήγορα στο ήπαρ και στον σπλήνα και παραμένουν εκεί για μεγάλη χρονική περίοδο, αυξάνοντας έτσι την ανεκτικότητα και μειώνοντας τις παρενέργειες. Παρόλα αυτά, μόνο η πρώτη αποτελεί φαρμακευτικό σκεύασμα εγκεκριμένο από τον FDA (44,58).

Η AmpB αποτελεί το φάρμακο εκλογής έναντι της VL στις υπερενδημικές περιοχές, πχ την επαρχία Bihar της Ινδίας, λόγω της γενικευμένης ύπαρξης ανθεκτικών στελεχών στα σκευάσματα με βάση το αντιμόνιο (55). Η δεοξυχολική μορφή χορηγείται σε 15 ενδοφλέβιες δόσεις του 1mg/kg για 30 ημέρες και η αποτελεσματικότητα της υπερβαίνει το 90%, συνοδευόμενη βέβαια από τις προαναφερθείσες παρενέργειες. Όσον αφορά την LAMB, παρατηρούνται διαφορές στις δοσολογικές απαιτήσεις ανά περιοχή. Συγκεκριμένα, στην ΝΑ Ασία χορηγούνται 1-6 ενδοφλέβιες δόσεις με συνολική ποσότητα φαρμάκου 10mg/kg σε διάστημα 1-10 ημερών και η αποτελεσματικότητα φτάνει το 95%. Αντίθετα, για να επιτευχθεί 90% αποτελεσματικότητα στις υπόλοιπες περιοχές (Μεσόγειος, Νότια Αμερική, Ανατολική Αφρική) συνίσταται ίσος αριθμός δόσεων των 20-30mg/kg. Εκτός των ανεπιθύμητων ενεργειών, άλλο μειονέκτημα της AmpB αποτελεί η ενδοφλέβια χορήγηση, η οποία συνεπάγεται ανάγκη ύπαρξης εξειδικευμένου προσωπικού και παραμονής στο νοσοκομείο. Η LAMB επιπλέον πρέπει να μεταφέρεται και να αποθηκεύεται στους 25°C, συνθήκες δύσκολα επιτεύξιμες στο συνήθως πολύ θερμό κλίμα της ΝΑ Ασίας (61), και έχει αρκετά υψηλό κόστος, γεγονός που έχει αναγκάσει τον WHO να έρθει σε συμφωνία με την Gilead Sciences, κατά την οποία στις ενδημικές χώρες το AmBisome διατίθεται με μειωμένη τιμή (18\$ ανά φιαλίδιο των 50mg) (58).



Φυσικά, το μεγάλο πλεονέκτημα της AmpB είναι ότι παρά τις τόσες δεκαετίες χρήσης της τόσο ως αντιμυκητιακό όσο και ως αντιλεισμανιακό σκεύασμα, τα καταγεγραμμένα περιστατικά αντοχής είναι ελάχιστα (19). Παρόλα αυτά, λόγω του μικρού αριθμού διαθέσιμων αντιλεισμανιακών φαρμάκων, η επιστημονική κοινότητα έχει καταφέρει την επιτυχή επαγωγή ανθεκτικότητας σε παρασιτικά στελέχη *in vitro* ώστε να μελετηθούν πιθανοί τρόποι ανάπτυξης της (55). Ένα από τα συμπεράσματα ήταν ότι αντοχή μπορεί να προκύψει μέσω μεταλλάξεων που οδηγούν σε μεταβολή της δομής ή της ποσότητας της εργοστερόλης, εμποδίζοντας έτσι την σύνδεση της AmpB σε αυτήν (55,57), όπως μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα των βιοσυνθετικών μονοπατιών των στερολών, πχ μεθυλοτρανσφεράση της στερόλης C24 (SMT) (55) και διμεθυλάση της 14α-στερόλης (19).

Εκτός από την πρόσδεση στην εργοστερόλη, η AmpB μπορεί να προκαλέσει κυτταρική βλάβη και μέσω της αυτοοξειδωσής της, η οποία οδηγεί σε παραγωγή ROS, άρα και σε οξειδωτικό στρες (55). Επομένως, η ανάπτυξη ικανότητας χειρισμού αυτού του οξειδωτικού στρες, κυρίως μέσω αναβολισμού στην βιοχημική οδό των θειολών, αποτελεί έναν ακόμα πιθανό μηχανισμό εμφάνισης μελλοντικής ανθεκτικότητας (19,55). Τέλος, όπως και στην περίπτωση του αντιμονίου, ανθεκτικότητα φαίνεται ότι μπορεί να προκύψει με υπερέκφραση του MDR1, που αποτελεί το μόριο από το οποίο εξέρχεται από το κύτταρο και η AmpB (55). Πράγματι, σε έρευνα που χρησιμοποίησε παρασιτικά στελέχη με φυσική αντοχή έναντι στην AmpB παρατηρήθηκαν όλοι οι παραπάνω μηχανισμοί (62).

### **1.13.3 ΜΙΛΤΕΦΟΣΙΝΗ (MLT/MIL/MT)**

Η μιλτεφοσίνη ανήκει στα αλκυλο-γλυκερο-φωσφολιπίδια και από το 2002 αποτελεί το πρώτο αντιλεισμανιακό σκεύασμα που χορηγείται δια του στόματος (*peros*) (19,54), ενώ παράλληλα αποτελεί και το μοναδικό αυτής της κατηγορίας εγκεκριμένο από τον FDA (44). Αρχικά αναπτύχθηκε ως αντικαρκινικό φάρμακο, καθιερώθηκε όμως για την θεραπεία της VL, με τα ποσοστά επιτυχίας να φτάνουν το 94% γενικά (19) και το 93% στην Αφρική, σε περιπτώσεις όμως που δεν υπήρχε συλλοίμωση με τον ιό HIV. Η δόση ανέρχεται στα 2-2,5mg/kg/ημέρα σε θεραπευτικό σχήμα 28 ημερών, απαιτείται όμως εβδομαδιαίος έλεγχος της νεφρικής και της ηπατικής λειτουργίας (63), διότι έχει παρατηρηθεί νεφροτοξικότητα και ηπατοτοξικότητα σε ποσοστό 10-15%. Επίσης,

περίπου το 62% των ασθενών στους οποίους χορηγείται αναφέρει γαστρεντερικές παρενέργειες, όπως διάρροιες και εμετούς. Το βασικότερο όμως είναι η τερατογόνος δράση της, και γι' αυτό η κυοφορία καθ' όλη την διάρκεια της θεραπείας αλλά και έως 3 μήνες μετά το πέρας αυτής πρέπει να αποφεύγεται (44). Αντίστοιχα, σε ήδη μητέρες απαγορεύεται ο θηλασμός για έως και 5 μήνες μετά το πέρας επιτυχούς θεραπείας (6).

Η MIL εισέρχεται στο κύτταρο μέσω της ΑΤΡάσης LMT (Leishmania Miltefosine Transporter), η οποία γενικά ευθύνεται για την μεταφορά των φωσφολιπιδίων από το εξωτερικό στο εσωτερικό του παρασίτου και μοιράζεται αμοιβαία λειτουργική εξάρτηση με την πρωτεΐνη LRos3, με την οποία και συνδέεται. Όσον αφορά τον ακριβή τρόπο δράσης της MIL, αυτός δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Αυτό που γνωρίζουμε σίγουρα είναι ότι παρεμβάλλεται στην βιοσύνθεση και στον μεταβολισμό των φωσφολιπιδίων, ενώ παράλληλα μειώνει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του ATP μέσω επίδρασης στις οξειδάσες του κυτοχρώματος C των μιτοχονδρίων (19). Επίσης, σε προμαστιγώτες έχει παρατηρηθεί ότι μπορεί να επάγει κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης (55).

Η χορήγηση MIL αποτελεί την θεραπεία πρώτης γραμμής στην Ινδία, όπου παρατηρούνται υψηλά ποσοστά αποτυχίας στην θεραπεία με ενώσεις αντιμονίου. Πλέον όμως έχει παρατηρηθεί ελάττωση της αποτελεσματικότητάς της και σε ένα ποσοστό 10-20% η νόσος αναζωπυρώνεται μέσα σε έναν χρόνο από το τέλος της θεραπείας, γεγονός που αποδίδεται κυρίως στον αυξημένο χρόνο ημιζωής της, ο οποίος ανέρχεται στις 120 ώρες περίπου. Αποτέλεσμα αυτού είναι ότι τα εναπομείναντα παρασιτικά κύτταρα δύναται να εκτίθενται σε υποθεραπευτικά επίπεδα του φαρμάκου ως και για βδομάδες μετά το πέρας της θεραπείας και έτσι η πιθανότητα ανάπτυξης αντοχής αυξάνεται, ιδιαίτερα σε περιοχές όπου η χορήγηση γίνεται κατά κόρων.

Ο κύριος μηχανισμός μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η ανάπτυξη αντοχής έναντι της MIL είναι η ύπαρξη ποικίλων αδρανοποιητικών μεταλλάξεων ή η διαγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες LMT ή/και LRos3, που συνεπάγεται μείωση των επιπέδων έκφρασής τους, άρα ελάττωση εσωτερίκευσης και δράσης της MIL. Επιπρόσθετα, μπορεί να αυξηθεί η έκφραση του MDR1, μέσω του οποίου η MIL εξέρχεται του κυττάρου. Άλλοι προτεινόμενοι μηχανισμοί αναφέρουν μείωση των επιπέδων της εργοστερόλης και αλλαγές στο μήκος και στον κορεσμό των λιπαρών

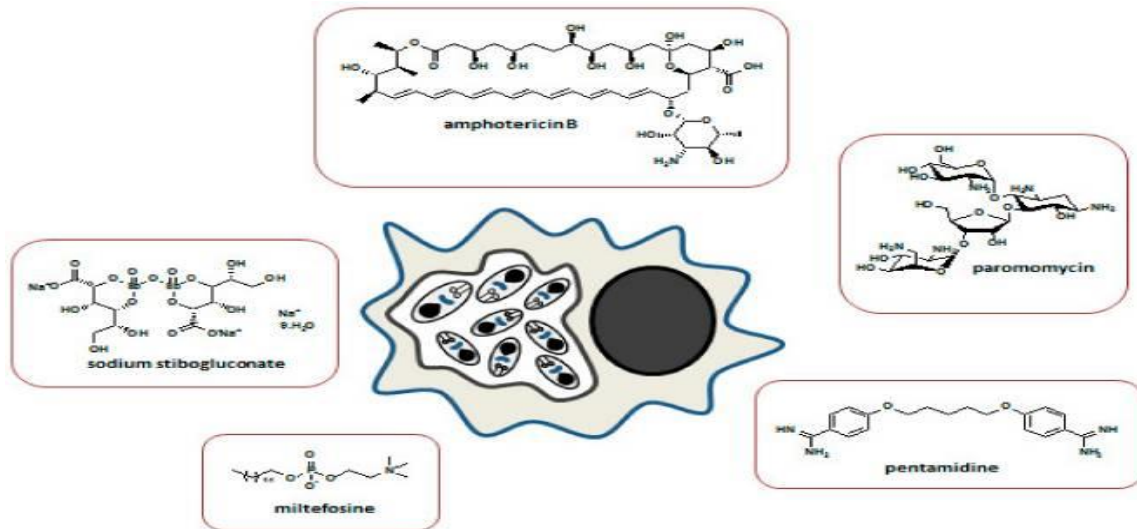
οξέων, αύξηση των κυτταρικών επιδιορθωτικών μηχανισμών και αύξηση της έκφρασης γονιδίων τα προϊόντα των οποίων εμπλέκονται στις μεταβολικές οδούς των θειολών. Τέλος, μέσω αλληλούχισης του γονιδιώματος ανθεκτικών στελεχών *L. donovani* εντοπίστηκαν μεταλλάξεις στο κωδικοποιητικό γονίδιο της πυριδοξαλικής κινάσης καθώς επίσης και σε γονίδια σχετικά με την μεμβρανική δομή και τον μεταβολισμό αμινοξέων και φυλλικού οξέος (19). Όπως και για την AmrB, έτσι και στην περίπτωση της MIL έχει γίνει προσπάθεια για επαγωγή αντοχής εργαστηριακά και πράγματι, τα *in vitro* ανθεκτικά στελέχη διαθέτουν όμοια χαρακτηριστικά με τα απομονωμένα από το πεδίο ανθεκτικά στελέχη (55).

#### **1.13.4 ΠΑΡΑΜΟΜΥΚΙΝΗ (PMM)**

Η παραμομυκίνη αποτελεί αντιβιοτικό ευρέος φάσματος της κατηγορίας των αμινογλυκοσιδών (55,57,58) και παράγεται από το βακτήριο *Streptomyces rimosus*, ενώ παράλληλα εμφανίζει και αντιπαρασιτική δράση (57). Χρησιμοποιείται τόσο σε περιπτώσεις CL, τοπικά ή/και παρεντερικά, όσο και σε περιπτώσεις VL μέσω παρεντερικής χορήγησης (58). Όσον αφορά την VL, ξεκίνησε να χορηγείται στην θεική μορφή της (Paramomycin Sulfate) (57) σε δόσεις 15mg/kg για 21 μέρες και κατέγραψε ποσοστό επιτυχίας 95% στην Ινδία, ενώ παράλληλα εκδηλώνονταν λίγες παρενέργειες, όπως πόνος στο σημείο της ένεσης (55%), αύξηση των ηπατικών ενζύμων (6%) και ωτοτοξικότητα (2%), οι οποίες ήταν όμως αναστρέψιμες (58). Στα πλεονεκτήματά της συγκαταλέγεται επίσης το χαμηλό κόστος της (55,57,58).

Η είσοδος της PMM στο κύτταρο πραγματοποιείται μέσω ενδοκυττάρωσης, η οποία διευκολύνεται από την πρόσδεσή της σε συγκεκριμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες του παρασίτου και, ως αμινογλυκοσίδη, η δράση της έγκειται στην ανατολή της πρωτεϊνοσύνθεσης του μικροοργανισμού μέσω πρόσδεσής της στην 16s υπομονάδα του ριβοσώματος (55). Δυστυχώς, έχει παρατηρηθεί ότι η μονοθεραπεία με PMM ενέχει αυξημένες πιθανότητες ανάπτυξης ανθεκτικότητας (57,58) μέσω μηχανισμών που σχετίζονται με την μείωση της συσσώρευσης του φαρμάκου σε συνδυασμό με μείωση της πρόσδεσής του στις μεμβρανικές πρωτεΐνες. Ενδεικτικά, σε ανθεκτικά στελέχη έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα γλυκολυτικών ενζύμων και των πρωτεϊνών HSP (ιδίως των HSP70) (55). Σε προσπάθεια εύρεσης λύσης στο πρόβλημα αυτό, έχουν αναπτυχθεί νέες μορφές PMM, οι οποίες περιέχουν μικροσφαιρίδια αλβουμίνης ή λιποσώματα ως

φορείς του φαρμάκου (55,57). Επίσης, η μονοθεραπεία με PMM αποφεύγεται και συνίσταται η χορήγησή της σε συνδυαστικό θεραπευτικό σχήμα. Παραδείγματος χάριν, στο Σουδάν προτιμάται ο συνδυασμός PMM+SSG (19).



Εικόνα 11 - Χημικές δομές των κυριότερων σκευασμάτων έναντι της VL. Πηγή: (55)

## 2 ΣΚΟΠΟΣ

Η μικροβιακή ανοχή αποτελεί πλέον μείζον ζήτημα της δημόσιας υγείας και η παγκόσμια επιστημονική κοινότητα κρούει τον κώδωνα του κινδύνου όσον αφορά τις διαστάσεις που φαίνεται να αποκτά. Την προσοχή των ειδικών μονοπωλεί κυρίως η βακτηριακή ανοχή, καθώς τα πολυανθεκτικά στελέχη πληθαίνουν, ενώ παράλληλα ο ρυθμός εμφάνισής τους υπερτερεί του ρυθμού ανάπτυξης αντιβιοτικών νέων γενεών, ικανά να τα αντιμετωπίσουν. Παρόλα αυτά, η ανάπτυξη παρασιτικής ανοχής αποτελεί εξίσου σοβαρό πρόβλημα, η έκταση του οποίου οφείλει να αναγνωριστεί και να διερευνηθεί.

Με την σκέψη αυτή ως αφετηρία, η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως σκοπό την μελέτη της παρασιτικής ανοχής σε επιδημιολογικό και μοριακό επίπεδο, εστιάζοντας σε στελέχη του συμπλέγματος *Leishmania donovani* που έχουν απομονωθεί από χώρες στα ανατολικά της λεκάνης της Μεσογείου (Ελλάδα και Τουρκία). Στην προμαστιγωτή μορφή των στελεχών αυτών αρχικά χορηγήθηκαν *in vitro* αυξανόμενες συγκεντρώσεις δύο ευρέως χρησιμοποιούμενων αντιλεϊσμανιακών σκευασμάτων (συγκεκριμένα ενώσεις τρισθενούς Αντιμονίου και Αμφοτερικίνης Β), στοχεύοντας στον προσδιορισμό της τιμής IC<sub>50</sub> για κάθε ζεύγος στελέχους-φαρμάκου. Η τιμή αυτή αποτελεί ισχυρή ένδειξη του πόσο ευαίσθητο ή ανθεκτικό είναι το εκάστοτε στέλεχος έναντι στην δράση συγκεκριμένου φαρμάκου. Πέρα από την διερεύνηση της ανοχής, στόχος ήταν να ελεγχθεί ο συσχετισμός των αντιγράφων του MRPA μεταφορέα, με αντίσταση σε φάρμακα όπως το αντιμόνιο, μέσω μίας δοκιμασίας real time-PCR, η οποία αναπτύχθηκε στο εργαστήριο. Τα παραπάνω αποτελούν ένδειξη για την ποικιλομορφία της απόκρισης στα φάρμακα παρασίτων της Ανατολικής Μεσογείου και η βάση για περαιτέρω έρευνα για να αντιμετωπιστεί το φαινόμενο αυτό.

### **3 ΥΛΙΚΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **3.1 ΥΛΙΚΑ**

##### **3.1.1 Αντιδραστήρια**

- Αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό RPMI 1640 fully supplemented (Biosera)
- Εμβρυικός Ορός Μόσχου (Fetal Bovine Serum – FBS)
- Αντιβιοτικά (Πενικιλίνη και Στρεπτομυκίνη – P/S)
- Alamar Blue 10X
- Αποστειρωμένο Διάλυμα PBS (Phosphate-buffered saline)
- Διάλυμα HEPES
- Φορμαλδεΰδη (φορμόλη – μεθανάλη)
- DMSO (Dimethyl Sulfoxide)
- Δισαπτεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O)
- Stock διάλυμα Αμφοτερικίνης Β (AmpB), συγκέντρωσης 495μΜ
- Stock διάλυμα Τρισθενούς Αντιμονίου (SbIII), συγκέντρωσης 40μΜ

##### **3.1.2 Αναλώσιμα Υλικά**

- Πλαστικά ακρορύγχια (tips) (Greiner Bio-One)
- Πλαστικά σωληνάρια τύπου erpendorf 1.5mL
- Πλαστικά σωληνάρια τύπου falcon (15 και 50mL - Greiner BioOne, Nerbe Plus, Sarstedt)
- Καλλιεργητικές φλάσκες χωρίς φίλτρο (40ml - Sarstedt)
- Αποστειρωμένες πλαστικές πλάκες 96 φρεατίων (Elisa 96-well plates) (Sarstedt)
- Πλάκα μέτρησης παρασίτων Malassez (Marienfeld Superior)
- Αποστειρωμένες πλαστικές πιπέτες (2.5 και 10mL - Sarstedt)
- Αποστειρωμένες σύριγγες (BD Emerald)
- Αποστειρωμένα φίλτρα για αποστείρωση υγρών διαλυμάτων (Διάμετρος πόρων 0.2μm - Whatman)
- Κιτ απομόνωσης γενετικού υλικού ExtractMe (Swift Analytical)
- Κιτ qPCR Kapa Sybr Fast (Kapa Biosystems)

- RT-PCR Microtubes (0.5ml)

### 3.1.3 Εργαστηριακός Εξοπλισμός

- Θάλαμος Βιολογικής Ασφάλειας (Biosafety Cabinet – BSC) (FluFrance)
- Πιπέτες μεταβλητού όγκου P20 (2-20μL), P200 (20-200μL), P1000 (100-1000μL) (Gilson)
- Επωαστικός κλίβανος 25°C (TechnoLab)
- Επωαστικός κλίβανος 37°C, 5% CO<sub>2</sub> (TechnoLab)
- Μικροσκόπιο (ZEISS)
- Φασματοφωτόμετρο με Elisa Plate Reader (Dynatech Laboratories)
- Φασματοφωτόμετρο τύπου Nanodrop
- Υγρό άζωτο
- Υδατόλουτρο (Julabo)
- Φυγόκεντρος (Thermo Electron Corporation)
- Μικροφυγόκεντρος (Eppendorf Centrifuge 5417r)
- Vortex (Heidolph Instruments - Bioblock Scientific)
- Καταψύκτης
- Πρόγραμμα επεξεργασίας δεδομένων Prism GraphPad (GraphPad Software Inc – πλέον Dotmatics)
- Θερμικός κυκλοποιητής qPCR (SaCycler-96, Sacace Biotechnologies)

### 3.1.4 Παρασιτικά Στελέχη

Για την διεξαγωγή των ακόλουθων πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα εξής παρασιτικά στελέχη του συμπλέγματος *Leishmania donovani*:

ΠΑΡΑΣΙΤΙΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΕΙΔΟΣ	ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ	ΧΩΡΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ
<b>GD3</b>	<i>L. infantum</i>	Σκύλος	Ελλάδα
<b>GD55</b>	<i>L. infantum</i>	Σκύλος	Ελλάδα
<b>GD67</b>	<i>L. infantum</i>	Σκύλος	Ελλάδα
<b>GD69</b>	<i>L. infantum</i>	Σκύλος	Ελλάδα

<b>GH8</b> (MHOM/GR/2001/GH8)	<i>L. infantum</i>	Άνθρωπος	Ελλάδα
<b>GH14</b>	<i>L. infantum</i>	Άνθρωπος	Ελλάδα
<b>Ig13</b>	<i>L. donovani</i>	Άνθρωπος	Αιθιοπία
<b>EP176</b>	<i>L. infantum</i>	Σκύλος	Τουρκία
<b>EP184</b>	<i>L. infantum</i>	Σκύλος	Τουρκία

Πίνακας 4 – Παρασιτικά στελέχη του συμπλέγματος *L. donovani* που χρησιμοποιήθηκαν.

## 3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.2.1 Απόψυξη παρασιτικών στελεχών

Τα επιθυμητά παρασιτικά στελέχη αφαιρούνται από το δοχείο υγρού αζώτου (-196 °C) όπου φυλάσσονται και τοποθετούνται απευθείας σε υδατόλουτρο (37°C). Αφού ξεπαγώσουν, μεταφέρονται μέσω πλαστικής πιπέτας 2mL μίας χρήσης σε σωληνάρια τύπου falcon των 15mL, στα οποία προστίθενται και τουλάχιστον 5mL θρεπτικού υλικού και ακολουθεί φυγοκέντρηση (2300 rpm, 10 min, RT). Το υπερκείμενο, στο οποίο περιέχεται το θρεπτικό υλικό και η κρυσταλλοπροστατευτική ουσία DMSO, απομακρύνεται και το ίζημα, το οποίο περιέχει τα παρασιτικά κύτταρα, επαναδιαλύεται σε 10mL θρεπτικού υλικού RPMI 1640 εμπλουτισμένο με FBS 20%, μεταφέρεται σε καλλιεργητική φλάσκα χωρίς φίλτρο και αφήνεται σε επωαστικό κλίβανο (25 °C). Η παραπάνω διαδικασία εκτελείται σε BSC προς αποφυγή επιμόλυνσης.

### 3.2.2 Ανάπτυξη σε καλλιέργεια

Τα παρασιτικά στελέχη που αποψύχθηκαν διατηρούνται στην προμαστιγωτή μορφή τους σε κυτταροκαλλιέργειες με θρεπτικό υλικό RPMI 1640 fully supplemented (10% FBS, 1% P/S). Όταν μία καλλιέργεια φτάνει στην στατική φάση, ακολουθεί ανακαλλιέργεια αυτής, ώστε να αποφευχθεί η φάση θανάτου.

### 3.2.3 Προσδιορισμός συγκέντρωσης

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του παρασίτου στην καλλιέργεια γίνεται μέσω της μέτρησης του αριθμού του στην πλάκα Malassez. Για την μέτρηση, 100μL της καλλιέργειας μεταφέρονται με πλαστική πιπέτα 2mL μίας χρήσης σε ένα σωληνάριο τύπου erpendorf, στο οποίο προστίθενται επίσης και 900μL αποστειρωμένου PBS 1X (αραίωση 1:10). Στην συνέχεια, στο erpendorf προστίθενται και 1-3 σταγόνες



φορμαλδεΐδης, η οποία μονιμοποιεί τα κύτταρα και καθιστά δυνατή την μέτρησή τους. 20μL του παραπάνω διαλύματος μεταφέρονται στον έναν από τους δύο θαλάμους της πλάκας Malassez, στην οποία έχει προηγουμένως τοποθετηθεί η ειδική καλυπτρίδα της, και αφήνονται για περίπου 5min ώστε η μονιμοποίηση να γίνει σωστά και τα κύτταρα να «κάτσουν» στον πάτο της πλάκας. Τα παραπάνω γίνονται σε BSC. Η πλάκα τοποθετείται στο μικροσκόπιο, μετράται ο αριθμός των παρασίτων σε 5 τετράγωνα και υπολογίζεται ο μέσος όρος, ο οποίος πολλαπλασιάζεται επί  $10^6/\text{mL}$  ( $10^5/\text{mL}$  αν παραλειφθεί η διαδικασία της 1:10 αραιώσης). Για ακριβέστερους υπολογισμούς, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και οι 2 θάλαμοι της πλάκας και να εξαχθεί ο μέσος όρος των 2 μετρήσεων.

### **3.2.4 Παρασκευή διαλυμάτων φαρμάκων**

#### **3.2.4.1 Παρασκευή διαλυμάτων SbIII**

Το SbIII φυλάσσεται στην κατάψυξη, σε υγρή μορφή, με συγκέντρωση 40mM (απόθεμα – διάλυμα stock). Σε σωληνάριο erpendorf 1.5mL μεταφέρονται 150μL του διαλύματος αυτού χωρίς την προσθήκη διαλύτη (διάλυμα A). Σε δεύτερο erpendorf μεταφέρονται 50μL του διαλύματος A, τα οποία αραιώνονται με προσθήκη 150μL PBS (αραιώση 1:4) που έχει προηγουμένως αποστειρωθεί με την χρήση ειδικού φίλτρου. Έτσι προκύπτει διάλυμα SbIII με συγκέντρωση 10mM (διάλυμα B). Οι διαδοχικές αραιώσεις 1:4 συνεχίζονται σε ακόμα 3 erpendorfs και προκύπτουν τα διαλύματα Γ,Δ και Ε με συγκεντρώσεις 2.5mM, 0.625mM και 0.1562mM αντίστοιχα. Τέλος, απορρίπτονται 50μL από το διάλυμα Ε.

#### **3.2.4.2 Παρασκευή διαλυμάτων AmpB**

Η Αμφοτερικίνη Β φυλάσσεται στην κατάψυξη, σε υγρή μορφή, με συγκέντρωση 495μM (απόθεμα – διάλυμα stock). Από αυτό μεταφέρονται 100μL σε σωληνάριο τύπου erpendorf 1.5mL και αραιώνονται με 230μL DMSO. Έτσι προκύπτει διάλυμα AmpB με συγκέντρωση 150μM (διάλυμα A). Από αυτό, 75μL μεταφέρονται σε δεύτερο erpendorf και αραιώνονται με ίσο όγκο DMSO (αραιώση 1:2). Έτσι προκύπτει διάλυμα AmpB συγκέντρωσης 75μM (διάλυμα B). Οι διαδοχικές αραιώσεις 1:2 συνεχίζονται σε ακόμα 3 erpendorfs και προκύπτουν τα διαλύματα Γ,Δ και Ε, με συγκεντρώσεις 37.5μM, 18.75μM και 9.375μM αντίστοιχα. Τέλος, από το διάλυμα Ε απορρίπτονται 75μL διαλύματος.

### 3.2.5 *In vitro* υπολογισμός του IC<sub>50</sub> σε προμαστιγώτες με την μέθοδο Alamar Blue

Ως IC<sub>50</sub> (**50% Inhibitory Concentration**) ορίζεται η τιμή συγκέντρωσης κάποιας ανασταλτικής ουσίας (π.χ. φαρμάκου), στην οποία επιτυγχάνεται *in vitro* μείωση της μικροβιακής ανάπτυξης κατά το ήμισυ και αποτελεί χρήσιμο δείκτη της δραστηριότητας της ουσίας αυτής.

Στην παρούσα εργασία, ο υπολογισμός του συγκεκριμένου δείκτη πραγματοποιείται με την μέθοδο αναγωγής της χρωστικής ουσίας ρεσαζουρίνη, η οποία περιέχεται στο αντιδραστήριο Alamar Blue, σε ρεζορουφίνη. Η ρεσαζουρίνη είναι υδατοδιαλυτή ουσία μωβ χρώματος και διαθέτει την ικανότητα να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες, ενώ παράλληλα δεν είναι τοξική για τα κύτταρα. Σε μεταβολικά ενεργά κύτταρα παίζει ρόλο ενδιάμεσου δέκτη ηλεκτρονίων και ανάγεται από τα μόρια NADPH, FADH, NADH κλπ. Το προϊόν της αναγωγής είναι η ρεζορουφίνη, η οποία είναι ροζ χρώματος και φθορίζουσα. Αντίθετα, σε μεταβολικά ανενεργά κύτταρα η αντίδραση αναγωγής δεν πραγματοποιείται. Έτσι, το αντιδραστήριο Alamar Blue αποτελεί έναν ιδιαίτερα εύχρηστο τρόπο προσδιορισμού της κυτταρικής βιωσιμότητας, είτε ποιοτικά μέσω της οπτικής παρατήρησης της χρωματικής μεταβολής του διαλύματος από μωβ σε ροζ, είτε ποσοτικά μέσω χρωματομετρικής ή φθορισμομετρικής μεθόδου, με την τελευταία να αποτελεί την πιο ευαίσθητη επιλογή (64).

Για την διαδικασία υπολογισμού του IC<sub>50</sub> ενός φαρμάκου σε συγκεκριμένο παρασιτικό στέλεχος απαιτείται η καλλιέργεια του παρασίτου να βρίσκεται στο τέλος της εκθετικής (λογαριθμικής) φάσης ανάπτυξης. Κατά την φάση αυτή γίνεται προσδιορισμός της συγκέντρωσης του παρασίτου, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3.2.3. Η επιθυμητή τελική συγκέντρωση του παρασίτου στα φρεάτια της πλάκας είναι  $2.5 \cdot 10^6$ /mL ( $\Leftrightarrow$   $5 \cdot 10^6$ /φρεάτιο). Αν είναι απαραίτητο, ακολουθεί αραιώση της καλλιέργειας ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση. Η αραιωμένη καλλιέργεια μεταφέρεται στα φρεάτια της πλάκας Elisa (200μL /φρεάτιο), με ενδεικτική τοποθέτηση όπως φαίνεται παρακάτω (Πίνακας 4).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Πίνακας 5 - Αναπαράσταση κάτοψης πλάκας 96 φρεατίων και ενδεικτικός τρόπος τοποθέτησης των διαφορετικών διαλυμάτων στα φρεάτια.

Υπόμνημα: Μπλε: ddH<sub>2</sub>O, Ροζ: 200μL αραιωμένης καλλιέργειας + 2μL διαλύματος SbIII, Μωβ: 200μL αραιωμένης καλλιέργειας + 2μL διαλύματος AmpB, Κίτρινο: 200μL αραιωμένης καλλιέργειας + 2μL αποστειρωμένο PBS (0% συγκέντρωση SbIII), Πορτοκαλί: 200μL αραιωμένης καλλιέργειας + 2μL DMSO (0% συγκέντρωση AmpB), Πράσινο: 200μL θρεπτικού υλικού + 2μL αποστειρωμένο PBS (blank), Καφέ: 200μL θρεπτικού υλικού + 2μL DMSO (blank).

Εν συνεχεία, παρασκευάζονται τα διαλύματα SbIII και AmpB μέσω διαδοχικών αραιώσεων (παράγραφοι 3.2.4.1. και 3.2.4.2. αντίστοιχα). Όταν τα διαλύματα A-E του κάθε φαρμάκου είναι έτοιμα, προστίθενται 2μL από το καθένα σε 3 φρεάτια της πλάκας Elisa (πραγματοποίηση του πειράματος σε τριπλέτες). Η προσθήκη των 2μL του διαλύματος του φαρμάκου στα 200μL της καλλιέργειας, προκαλεί αραιώση του φαρμάκου 1:100. Έτσι, οι τελικές συγκεντρώσεις των φαρμάκων είναι οι εξής:

SbIII		AmpB	
Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση
40mM	400μM (48,7μg/mL)	150μM	1,5μM
10mM	100μM (12,175μg/mL)	75μM	0,75μM
2,5mM	25μM (3,05μg/mL)	37,5μM	0,375μM
0,625mM	6,25μM (0,76μg/mL)	18,75μM	0,1875μM
0,156mM	1,56μM (0,19μg/mL)	9,375μM	0,09μM

Πίνακας 6 - Αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων SbIII και AmpB. Οι συγκεντρώσεις του SbIII εκφράζονται σε μM αλλά και σε μg/mL λόγω της ευρείας χρήσης και των δύο στην βιβλιογραφία.

Σε 2 τριπλέτες προσθέτουμε μόνο 200μL καλλιέργειας και 2μL του διαλύτη του εκάστοτε φαρμάκου (αποστειρωμένο PBS για το SbIII και DMSO για την AmpB – 1 τριπλέτα για το καθένα). Οι τριπλέτες αυτές αποτελούν το control της 100% βιωσιμότητας (συγκέντρωση φαρμάκου = 0).

Επίσης, σε άλλες 2 τριπλέτες προσθέτουμε μόνο 200μL θρεπτικού υλικού RPMI 1640 και 2μL του διαλύτη του εκάστοτε φαρμάκου. Αυτές οι τριπλέτες αποτελούν το «κενό» (blank), και χρησιμεύουν στο να αφαιρεθούν από την μέτρηση οποιεσδήποτε τυχόν παρεμβολές από το θρεπτικό υλικό και τους διαλύτες των φαρμάκων. Εξασφαλίζεται με αυτόν τον τρόπο ότι οι τιμές απορρόφησης που θα ληφθούν από την μέτρηση που

ακολουθεί θα οφείλονται εξ' ολοκλήρου στην αλληλεπίδραση του παρασίτου με την φαρμακευτική ουσία.

Τα ακραία φρεάτια της πλάκας γεμίζονται με 200μL ddH<sub>2</sub>O προς αποφυγή εξάτμισης του περιεχομένου των εσωτερικών φρεατίων. Επιπλέον, με την χρήση μίας πιπέτας P200 γίνεται ανάδευση του περιεχομένου όλων των φρεατίων ώστε οι ουσίες να κατανεμηθούν ομοιόμορφα. Η πλάκα σκεπάζεται με το καπάκι της και τοποθετείται χωρίς parafilm στον επωαστικό κλίβανο, στους 37 °C, με 5% συγκέντρωση CO<sub>2</sub>, για 48 ώρες. Η παρουσία CO<sub>2</sub> στο περιβάλλον φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένη αναγωγή της ρεσαζουρίνης σε ρεζορουφίνη, και κατά συνέπεια με υψηλότερες τιμές φθορισμού κατά την φωτομέτρηση [σύμφωνα με τους Corral, González, Cuquerella και Alunda, (65)].

Μετά το πέρας των 48 ωρών, σε όλα τα φρεάτια προστίθενται 20μL του αντιδραστηρίου Alamar Blue, 10 φορές συμπυκνωμένο (Alamar Blue 10X). Ακολουθεί ανάδευση όμοια με προηγουμένως. Η πλάκα Elisa τοποθετείται πάλι στον επωαστικό κλίβανο κάτω από τις ίδιες συνθήκες για άλλες 24 ώρες.

Μετά και από αυτήν την επώαση, σειρά έχει η διαδικασία της φωτομέτρησης. Για αυτήν χρησιμοποιείται φασματοφωτόμετρο με Elisa Plate Reader. Η ακτινοβολία γίνεται σε 2 μήκη κύματος (570 και 630nm). Με τον τρόπο αυτό μετράται ο φθορισμός κάθε φρεατίου, ο οποίος είναι ανάλογος της βιωσιμότητας των κυττάρων. Οι τιμές φθορισμού επεξεργάζονται αρχικά με το Microsoft Excel και στην συνέχεια εισάγονται στο πρόγραμμα Prism GraphPad, μέσω του οποίου πρώτον, δημιουργούνται γραφήματα του ποσοστού αναστολής της παρασιτικής ανάπτυξης σε συνάρτηση με τον λογάριθμο της συγκέντρωσης κάθε φαρμακευτικής ουσίας και δεύτερον, υπολογίζεται η τιμή IC<sub>50</sub> που αντιστοιχεί σε κάθε ζεύγος παρασιτικού στελέχους-φαρμάκου.

### **3.2.6 Απομόνωση γενετικού υλικού**

Με σκοπό την διερεύνηση σε μοριακό επίπεδο της πιθανής αντοχής κάποιου στελέχους, πραγματοποιήθηκε απομόνωση γενετικού υλικού από τα στελέχη GD55, GD67, GD69, GH8, GH14 και EP184 με την βοήθεια του kit ExtractMe (Swift Analytical). Συγκεκριμένα:

- 1) Φυγοκέντρηση (3000rpm) των καλλιιεργειών (15mL), απόρριψη υπερκειμένου.
- 2) Επαναδιάλυση ιζήματος σε GL Buffer (375μL), vortex (30sec), μεταφορά σε eppendorfs των 2mL.
- 3) Προσθήκη Πρωτεΐνάσης K (25μL), επώαση (55°C) μέχρι να ολοκληρωθεί η πέψη από το ένζυμο.
- 4) Προσθήκη RNAσης A (4μL), επώαση (37 °C, 5min).
- 5) Προσθήκη 400μL GB Buffer, φυγοκέντρηση (21.000rpm, 2min).
- 6) Μεταφορά υπερκειμένου σε στήλη απομόνωσης τοποθετημένη μέσα σε σωληνάριο συλλογής, φυγοκέντρηση (15.000rpm, 1min), μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάριο συλλογής.
- 7) Προσθήκη GW1 Buffer (600μL), φυγοκέντρηση (15.000rpm, 30sec), απόρριψη διηθήματος, φυγοκέντρηση (21.000g, 2min), απόρριψη σωληναρίου συλλογής, μεταφορά της στήλης απομόνωσης σε νέο eppendorf.
- 8) Προσθήκη Elution Buffer (130μL), επώαση (RT, 2min), φυγοκέντρηση (15.000rpm, 1min), απόρριψη στήλης απομόνωσης.

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία, το γενετικό υλικό που απομονώθηκε πρέπει να ποσοτικοποιηθεί και να ελεγχθεί ως προς την καθαρότητά του. Αυτό επιτυγχάνεται με φωτομέτρηση των δειγμάτων σε φωτόμετρο τύπου Nanodrop σε 3 μήκη κύματος (280,260 και 230nm). Η απορρόφηση στα 260nm (**OD260**) είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του DNA στο δείγμα και οι λόγοι (**OD260/OD280**) και (**OD260/OD230**) χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση επιμόλυνσης από RNA ή πρωτεΐνες αντίστοιχα. Λόγοι που κυμαίνονται από 1,8 έως 2 υποδηλώνουν απουσία επιμόλυνσης.

Πριν την φωτομέτρηση, το φωτόμετρο «μηδενίζεται» χρησιμοποιώντας 1-2μL elution buffer ως «τυφλό διάλυμα» (blank). Ακολουθεί προσθήκη 1-2μL του κάθε δείγματος, φωτομέτρηση αυτών και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Τέλος, τα δείγματα DNA που απομονώθηκαν φυλάσσονται στην κατάψυξη (-20 °C) για μελλοντική χρήση.

### **3.2.7 RT-PCR**

Όπως αναφέρεται στην παράγραφο 1.8, σε στελέχη ανθεκτικά στις ενώσεις αντιμονίου έχει παρατηρηθεί αύξηση των αντιγράφων του γενετικού τόπου **H-locus**, ο οποίος περιέχει μεταξύ άλλων και το γονίδιο που κωδικοποιεί τον ABC **μεταφορέα MRPA**. Η παραπάνω παρατήρηση αποτέλεσε το έναυσμα για την ανάλυση του γενετικού

υλικού που απομονώθηκε από 4 παρασιτικά στελέχη στην παράγραφο 3.2.6, με σκοπό τον προσδιορισμό της ποσότητας του γενετικού τόπου H-locus σε καθένα από αυτά. Η μοριακή ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου **Real Time PCR** (RT/q PCR – παράγραφος 1.11.3) με σχετική και όχι απόλυτη ποσοτικοποίηση. Δηλαδή, δεν κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς αλλά η ποσότητα του γονιδίου του MRPA μεταφορέα εκφράστηκε σε σύγκριση με την ποσότητα άλλου, σταθερά διπλοειδούς γονιδίου, συγκεκριμένα αυτού που κωδικοποιεί το ένζυμο **G3PD** (αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης), το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 10. Το γονίδιο της G3PD χρησιμοποιείται παράλληλα και ως θετικός μάρτυρας.

Απαραίτητα για την διεξαγωγή της RT-PCR είναι κατάλληλα ζεύγη εκκινητών (forward και reverse), τα οποία είναι συμπληρωματικά ως προς τα 3' και 5' άκρα των επιθυμητών αμπλικονίων. Τα ζεύγη που επιλέχθηκαν για τα δεδομένα γονίδια παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ (5' → 3')	T <sub>M</sub> (°C)
LINF_230007800 Fw (Χρωμόσωμα 23)	TATCACTTTCGTGGTGGCCC	59,4
LINF_230007800 Rv (Χρωμόσωμα 23)	GCTCCACTTCGTGGGTGTAA	59,4
LINF_100011800 Fw (Χρωμόσωμα 10)	AATGAGAAGCGGAGAACGA	57,3
LINF_100011800 Rv (Χρωμόσωμα 10)	ATCTCAGCACCCCTTGACGC	59,4

Πίνακας 7 - Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την RT-PCR για την ενίσχυση των γονιδίων που κωδικοποιούν τον MRPA και την G3PD.

Η RT-PCR στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του αντίστοιχου κιτ της εταιρείας KAPA BIOSYSTEMS, το οποίο περιλαμβάνει MasterMix (2X) που περιέχει όλα τα απαραίτητα υλικά για την ενίσχυση των επιθυμητών γονιδίων (DNA πολυμεράση, ρυθμιστικό διάλυμα – buffer, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, φθορίζουσα χρωστική SYBR GREEN). Ειδικά για την χρωστική SYBR GREEN, πρέπει να αναφερθεί ότι μέσω αυτής επιτυγχάνεται μη ειδική ανίχνευση, δηλαδή εκπέμπεται φθορισμός όταν αυτή προσδεθεί στην ελάσσων αύλακα δίκλωνου DNA, και δεν είναι εφικτή η ανίχνευση συγκεκριμένης αλληλουχίας.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται αναλυτικά όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διεξαγωγή της RT-PCR, καθώς και οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις τους:

Αντιδραστήριο	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση
Εκκινητής Fw	10μΜ	0,2μΜ
Εκκινητής Rv	10μΜ	0,2μΜ
MasterMix	2X	1X
DNA	GH8: 30ng GD69: 19ng GD67: 23,2ng EP184: 23,6ng	15ng
ddH <sub>2</sub> O		Έως τελικό όγκο 20μL

Πίνακας 8 - Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της RT-PCR, αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις αυτών.

Τα μίγματα των παραπάνω αντιδραστηρίων μεταφέρθηκαν σε RT-PCR microtubes και τοποθετήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή κατά την παρακάτω σειρά:

Θέση/Θέσεις	Περιεχόμενα microtube
1	Εκκινητές MRPA, MasterMix, ddH <sub>2</sub> O
2	Εκκινητές G3PD, MasterMix, ddH <sub>2</sub> O
3-5	DNA (GH8), Εκκινητές MRPA, MasterMix, ddH <sub>2</sub> O
6-8	DNA (GH8), Εκκινητές G3PD, MasterMix, ddH <sub>2</sub> O
9-11	DNA (EP184), Εκκινητές MRPA, MasterMix, ddH <sub>2</sub> O
12-14	DNA (EP184), Εκκινητές G3PD, MasterMix, ddH <sub>2</sub> O
15-17	DNA (GD69), Εκκινητές MRPA, MasterMix, ddH <sub>2</sub> O
18-20	DNA (GD69), Εκκινητές G3PD, MasterMix, ddH <sub>2</sub> O
21-23	DNA (GD67), Εκκινητές MRPA, MasterMix, ddH <sub>2</sub> O
24-26	DNA (GD67), Εκκινητές G3PD, MasterMix, ddH <sub>2</sub> O

Πίνακας 9 - Περιεχόμενα των RT-PCR microtubes ανά θέση/θέσεις στον θερμικό κυκλοποιητή.

Τα διαλύματα στις θέσεις 1 και 2 χρησιμοποιούνται ως αρνητικό control και ταυτόχρονα και ως τυφλό διάλυμα (blank). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο φθορισμός που πρέπει να ληφθεί από τα διαλύματα αυτά ισούται με 0. Αν προκύψει φθορισμός >0,

τότε αυτό υποδηλώνει πιθανή υβριδοποίηση των εκκινητών μεταξύ τους με επακόλουθο σχηματισμό διμερών.

Αφού τα RT-PCR microtubes έχουν τοποθετηθεί στον θερμικό κυκλοποιητή κατά τον τρόπο που παρατίθεται παραπάνω, η αντίδραση μπορεί να ξεκινήσει. Σε περίπτωση που δεν χρησιμοποιείται Hot Star DNA πολυμεράση για την ενίσχυση των μορίων DNA, απαιτείται ένα αρχικό βήμα που επιτρέπει στην χρησιμοποιούμενη DNA πολυμεράση να ενεργοποιηθεί. Το προφίλ θερμοκυκλοποίησης που ακολουθήθηκε αναφέρεται στον ακόλουθο πίνακα:

ΣΤΑΔΙΟ	ΦΟΡΕΣ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ
Ενεργοποίηση DNA pol	X1	95°C	3min
Αποδιάταξη dsDNA	X35	94°C	30sec
Υβριδισμός ssDNA-εκκινητών	X35	54°C (5-8°C < T <sub>M</sub> )	30sec
Επιμήκυνση	X35	72°C	45sec
Φωτομέτρηση (450nm)			
Καμπύλης τήξης	X100	45°C (+0,5°C ανά κύκλο)	15sec
Αποθήκευση		4°C	

Πίνακας 10 - Προφίλ θερμοκυκλοποίησης κατά την διεξαγωγή της RT-PCR.

Η δημιουργία καμπύλης τήξης γίνεται ώστε να ελεγχθεί η παρουσία παραπροϊόντων λόγω της μη ειδικής ανίχνευσης της SYBR GREEN. Τα ζεύγη εκκινητών διαθέτουν συγκεκριμένα σημεία τήξης. Έτσι, καμπύλη με μία κορυφή υποδηλώνει την ύπαρξη μόνο ειδικών αμπλικονίων, αποκλείοντας ψευδώς θετικό αποτέλεσμα. Αντίθετα, η ύπαρξη >1 κορυφών φανερώνει ευρύ φάσμα σημείων τήξης, άρα και την ύπαρξη μη ειδικών αμπλικονίων. Όπως φαίνεται στην επόμενη ενότητα (Γράφημα 15), οι καμπύλες τήξης που προέκυψαν στην προκειμένη περίπτωση είχαν μόνο μία κορυφή.



## 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

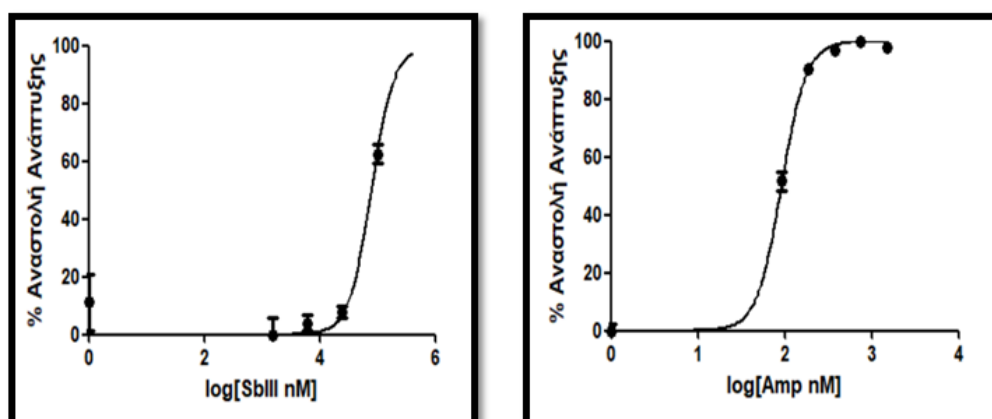
### 4.1 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ IC<sub>50</sub>

Για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 9 στελέχη του συμπλέγματος *Leishmania donovani*, στην προμαστιγωτή μορφή των οποίων χορηγήθηκαν 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις των πολύ συχνά χρησιμοποιούμενων αντιλειτουργικών φαρμάκων SbIII και AmpB, με απώτερο σκοπό τον υπολογισμό του IC<sub>50</sub> του κάθε φαρμάκου ανά στέλεχος και κατ' επέκταση την εκτίμηση της δραστηριότητας τους ή/και την διαπίστωση ύπαρξης παρασιτικής ανοχής έναντι αυτών. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα που εξήχθηκαν ανά στέλεχος.

- Στέλεχος GD3

$$IC_{50} (\text{SbIII}) = 78.7\mu\text{M}, R^2 = 0.9484$$

$$IC_{50} (\text{AmpB}) = 0.09\mu\text{M}, R^2 = 0.9938$$

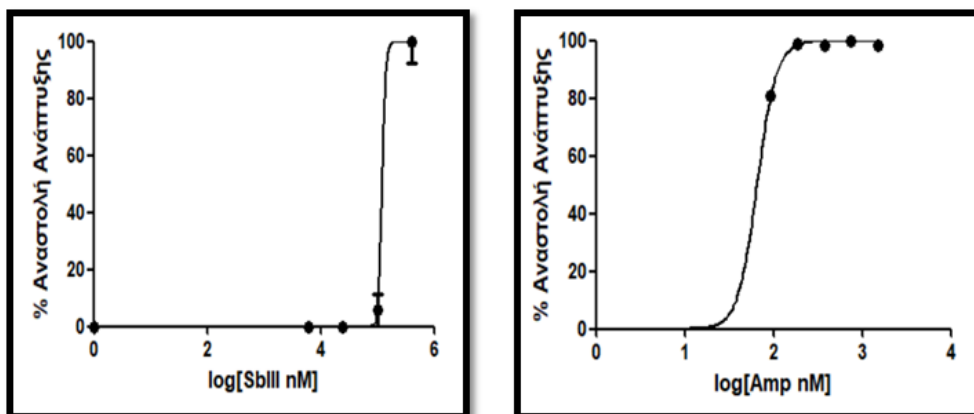


Γράφημα 1 - Απόκριση στελέχους GD3 στην χορήγηση SbIII και AmpB.

- Στέλεχος GD55:

$$IC_{50} (\text{SbIII}) = 122\mu\text{M}, R^2 = 0.9767$$

$$IC_{50} (\text{AmpB}) = 0.07\mu\text{M}, R^2 = 0.9943$$

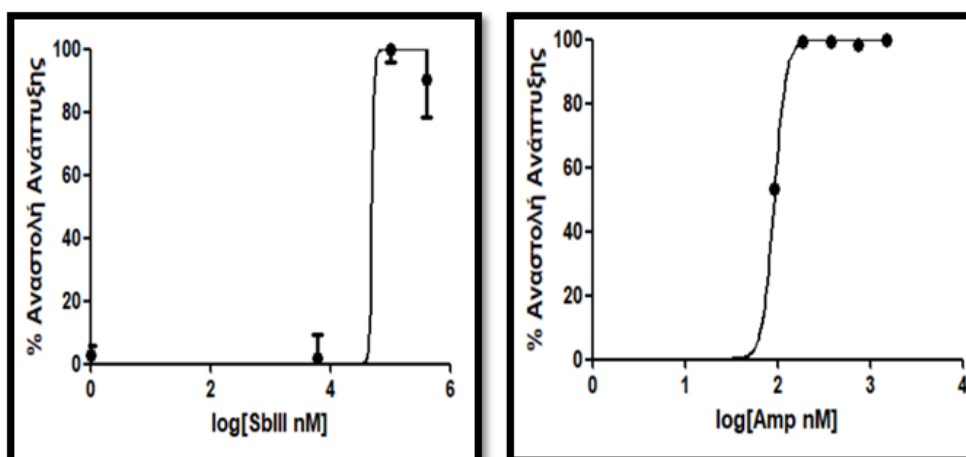


Γράφημα 2 - Απόκριση στελέχους GD55 στην χορήγηση SbIII και AmpB.

- Στέλεχος GD67:

$$IC_{50} (SbIII) = 50\mu M, R^2 = 0.9472$$

$$IC_{50} (AmpB) = 0.09\mu M, R^2 = 0.9973$$

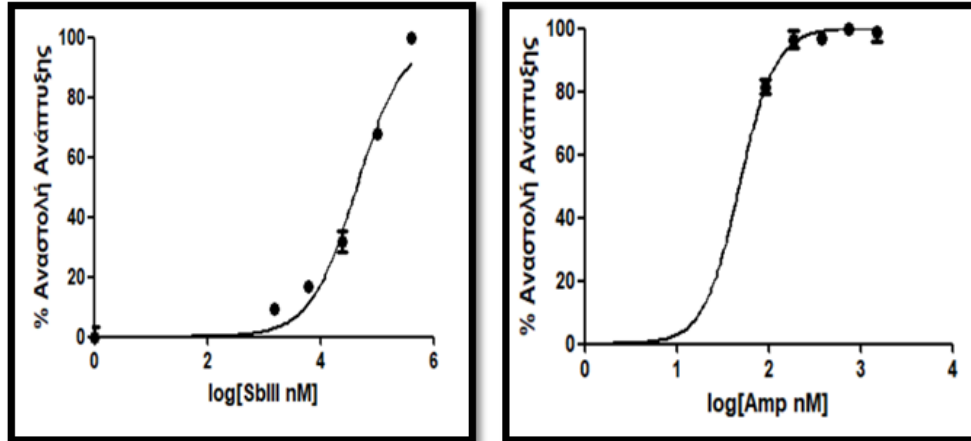


Γράφημα 3 - Απόκριση στελέχους GD67 στην χορήγηση SbIII και AmpB.

- Στέλεχος GD69:

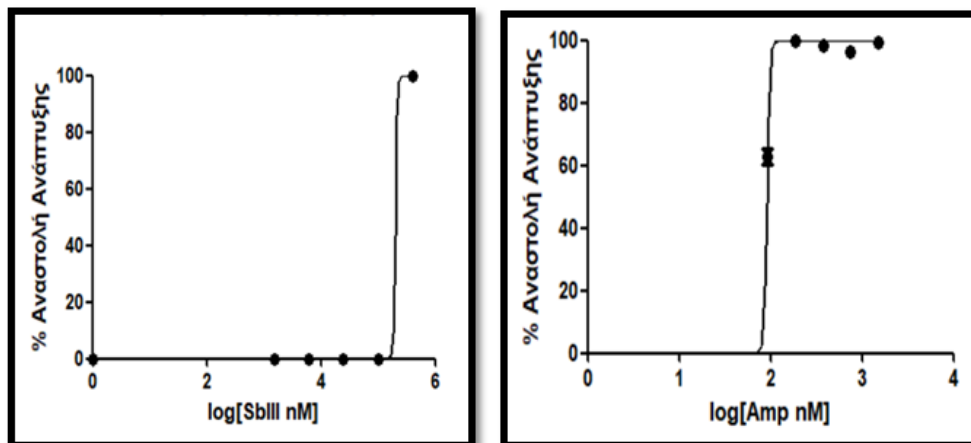
$$IC_{50} (SbIII) = 43.9\mu M, R^2 = 0.9709$$

$$IC_{50} (AmpB) = 0.05\mu M, R^2 = 0.9825$$



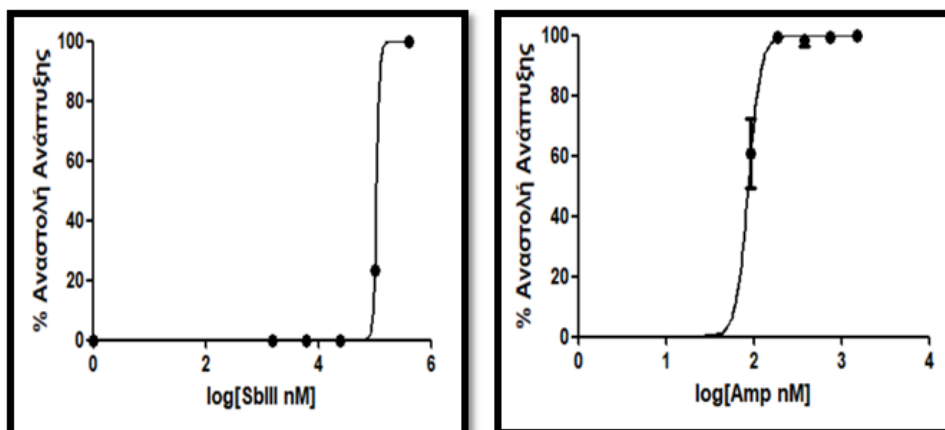
Γράφημα 4 - Απόκριση στελέχους GD69 στην χορήγηση SbIII και AmpB.

- Στέλεχος GH14:  
 $IC_{50} (SbIII) = 202.3\mu M, R^2 = 0.9994$   
 $IC_{50} (AmpB) = 0.09\mu M, R^2 = 0.9809$



Γράφημα 5 - Απόκριση στελέχους GH14 στην χορήγηση SbIII και AmpB.

- Στέλεχος Lg13:  
 $IC_{50} (SbIII) = 108.4\mu M, R^2 = 0.9996$   
 $IC_{50} (AmpB) = 0.09\mu M, R^2 = 0.9649$

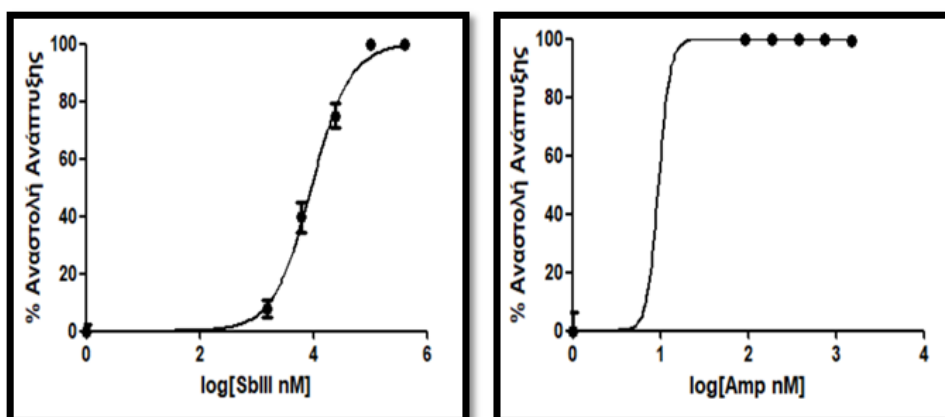


Γράφημα 6 - Απόκριση στελέχους Lg13 στην χορήγηση SbIII και AmpB.

- Στέλεχος EP176:

$IC_{50}$  (SbIII) = 9.3 $\mu$ M,  $R^2$  = 0.9844

$IC_{50}$  (AmpB) = 0.01 $\mu$ M,  $R^2$  = 0.9911

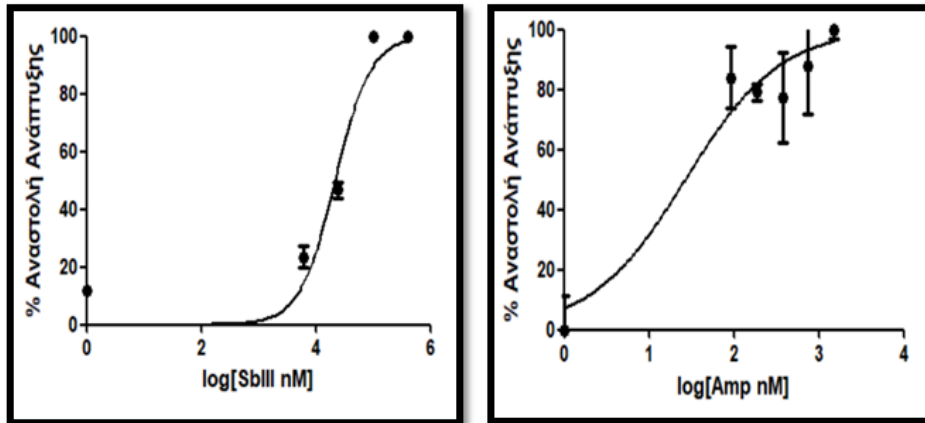


Γράφημα 7 - Απόκριση στελέχους EP176 στην χορήγηση SbIII και AmpB.

- Στέλεχος EP184:

$IC_{50}$  (SbIII) = 21.8 $\mu$ M,  $R^2$  = 0.9472

$IC_{50}$  (AmpB) = 0.03 $\mu$ M,  $R^2$  = 0.7706

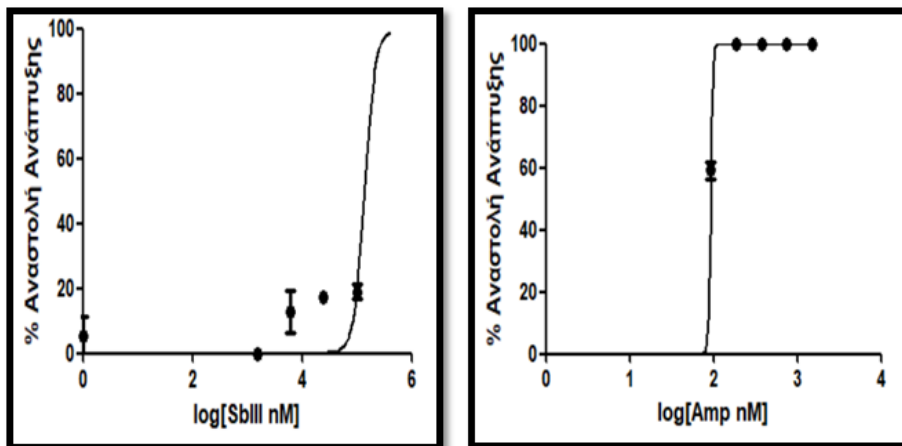


Γράφημα 8 - Απόκριση στελέχους EP184 στην χορήγηση SbIII και AmpB.

- Στέλεχος GH8:

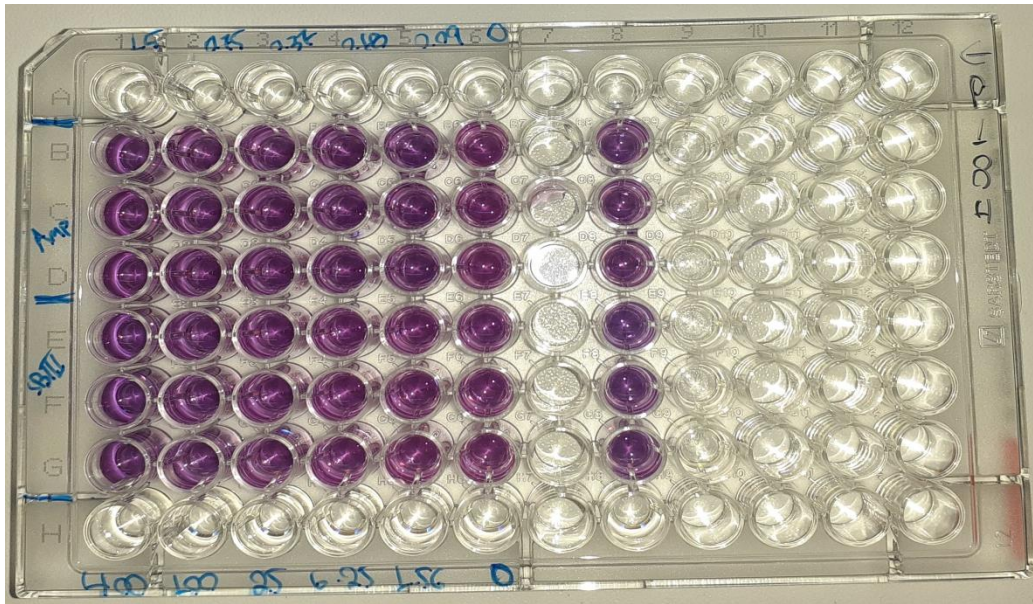
$IC_{50}$  (SbIII) = 139 $\mu$ M,  $R^2$ = 0.8996

$IC_{50}$  (AmpB) = 0.09 $\mu$ M,  $R^2$ = 0.9959



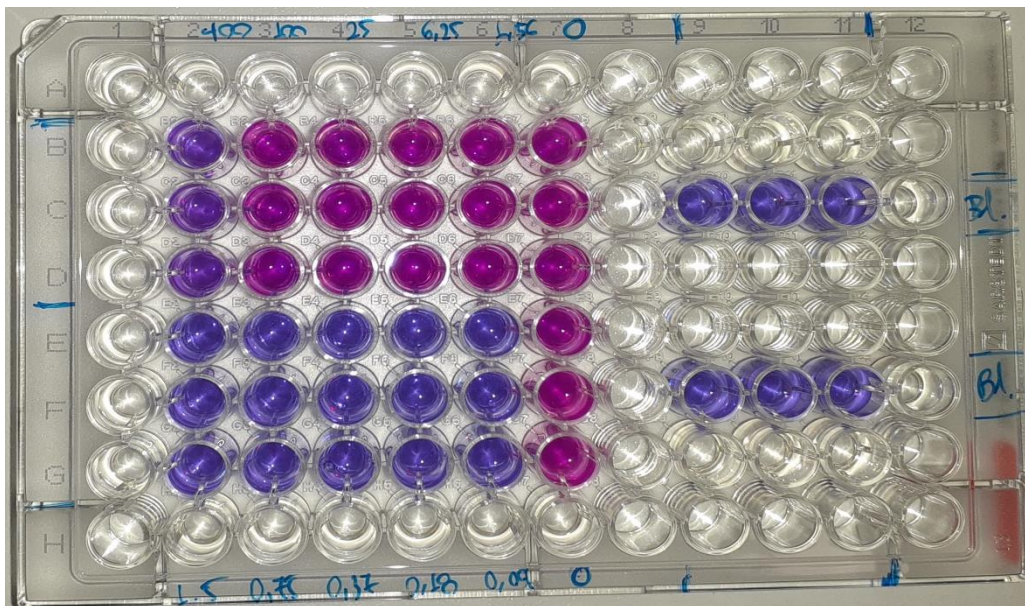
Γράφημα 9 – Απόκριση στελέχους GH8 στην χορήγηση SbIII και AmpB.

- Αποτελέσματα μέσω οπτικής παρατήρησης ορισμένων στελεχών κατά την *in vitro* δοκιμασία υπολογισμού  $IC_{50}$ .



Εικόνα 12 - *In vitro* δοκιμασία υπολογισμού  $IC_{50}$  των SbIII και AmrB για το στέλεχος EP184 μετά από επώαση 24h με Alamar Blue. Γραμμές B-D: AmrB, Γραμμές E-G: SbIII, Στήλη 6: 100% βιωσιμότητα (Συγκέντρωση φαρμάκου=0), Στήλη 8: Blank.

Η μη μεταβολή του χρώματος του διαλύματος από σκούρο μοβ σε ροζ είναι ενδεικτική της ευαισθησίας του στελέχους EP184 όσον αφορά και τα 2 φάρμακα.



Εικόνα 13 - *In vitro* δοκιμασία υπολογισμού  $IC_{50}$  των SbIII και AmrB για το στέλεχος GH8 μετά από επώαση 24h με Alamar Blue. Γραμμές B-D: SbIII, Γραμμές E-G: AmrB, Στήλη 7: 100% βιωσιμότητα (Συγκέντρωση φαρμάκου=0), Στήλες 9-11: Blank

Η μη μεταβολή του χρώματος του διαλύματος από σκούρο μοβ σε ροζ στα φρεάτια E2-E6, F2-F6 και G2-G6 είναι ενδεικτική της ευαισθησίας του στελέχους GH8 στην AmrB. Αντίθετα, η μεταβολή του χρώματος στα φρεάτια B3-B6, C3-C6 και D3-D6



φανερώνει την ανθεκτικότητα του στελέχους GH8 στο SbIII ως την συγκέντρωση 100μM.

#### 4.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Κατά την διαδικασία φωτομέτρησης για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης και την αξιολόγηση της καθαρότητας του γενετικού υλικού που απομονώθηκε από το καθένα από τα 6 στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, εξήχθηκαν τα αποτελέσματα που παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα:

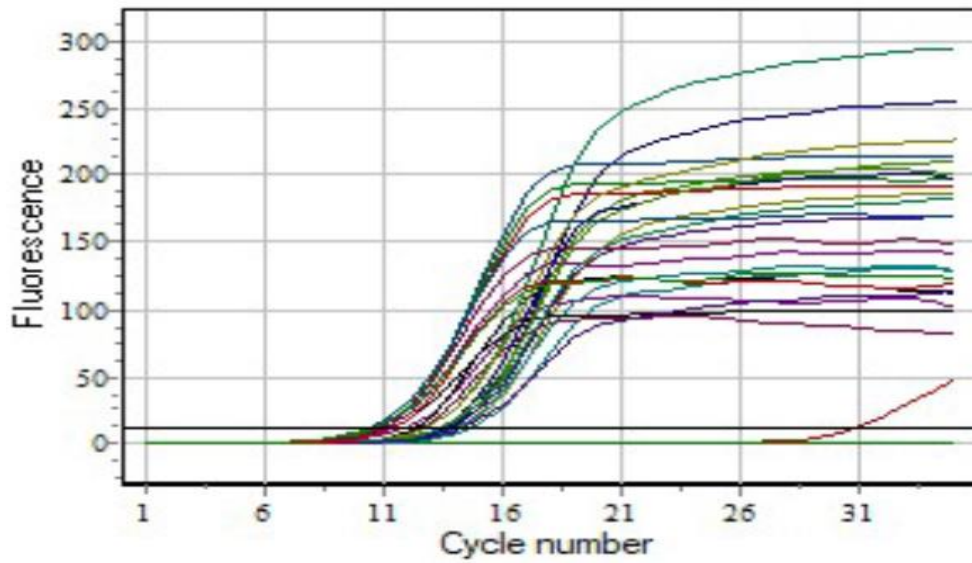
Στέλεχος	Συγκέντρωση (ng/μL)	OD260/OD280	OD260/OD230
GD55	5,6	1,57	0,35
GD67	23,2	1,87	1,44
GD69	19	1,9	1,95
GH8	30	1,95	1,82
GH14	1,9	1,85	0,3
EP184	23,6	1,94	1,75

Πίνακας 11 - Συγκεντρώσεις DNA και λόγοι OD260/OD280 και OD260/OD230 ανά στέλεχος.

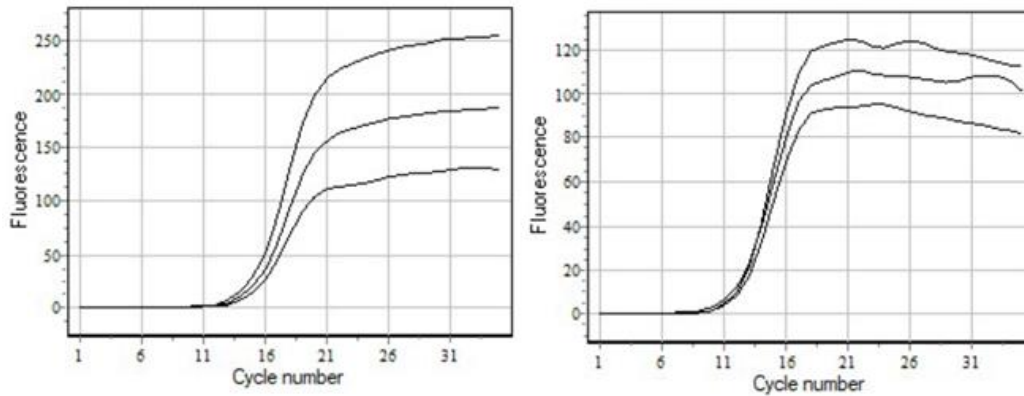
Από τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται φανερό ότι από τα στελέχη GD55 και GH14 απομονώθηκε μικρή ποσότητα DNA, το οποίο μάλιστα περιέχει σε μεγάλο ποσοστό RNA ή/και πρωτεΐνες. Για τον λόγο αυτό, το DNA των στελεχών αυτών απορρίφθηκε και στην RT-PCR που ακολούθησε χρησιμοποιήθηκε μόνο το DNA των 4 εναπομείναντων στελεχών.

#### 4.3 RT-PCR

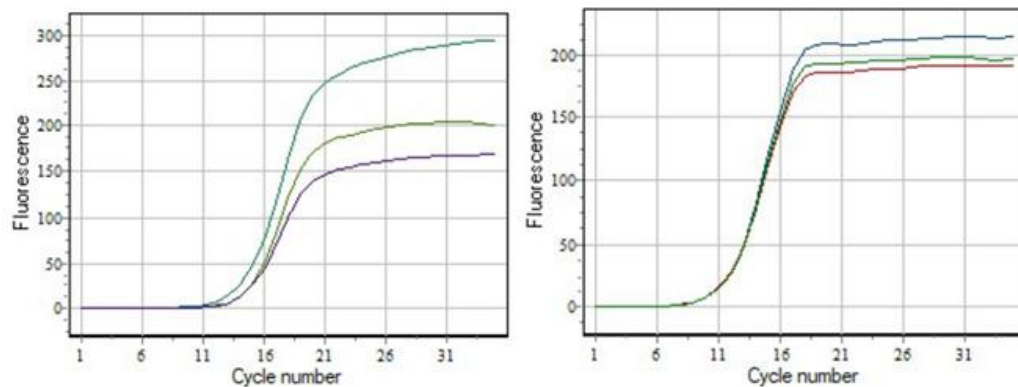
Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την RT-PCR ήταν 8 σιγμοειδής καμπύλες ενίσχυσης (24 αν υπολογίσουμε ότι η διαδικασία διεξήχθη σε τριπλέτες), οι οποίες προέκυψαν από την διαφορά των φθορίζοντων σημάτων που λάμβανε ο θερμικός κυκλοποιητής από την χρωστική στο τέλος κάθε κύκλου. Βασικό σημείο σε κάθε καμπύλη αποτελεί ο **κύκλος κατωφλίου** (threshold cycle – **Ct**) και ορίζεται ως ο κύκλος κατά τον οποίο το σήμα που λαμβάνεται ξεπερνά τον φθορισμό που αντιστοιχεί στον «θόρυβο». Όσο μεγαλύτερη αρχική ποσότητα εξεταζόμενου μορίου DNA υπάρχει στο δείγμα, τόσο γρηγορότερα θα ξεπεραστεί το «κατώφλι» και αντίστροφα, άρα χαμηλή τιμή Ct συνεπάγεται μεγαλύτερη ποσότητα αντιγράφων. Οι καμπύλες ενίσχυσης που λήφθηκαν μετά το πέρας της θερμοκυκλοποίησης παρουσιάζονται παρακάτω, τόσο σε συγκεντρωτικό γράφημα όσο και σε ξεχωριστά γραφήματα ανά τριπλέτα.



Γράφημα 10 - Συγκεντρωτικό γράφημα σιγμοειδών καμπυλών θερμοκυκλοποίησης.

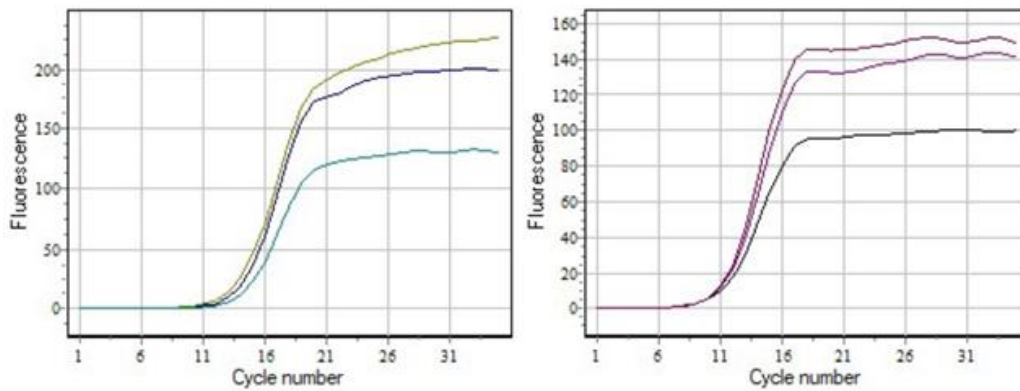


Γράφημα 11 - Καμπύλες ενίσχυσης της τριπλέτας με DNA του στελέχους GH8 και εκκινητές του γονιδίου MRPA (αριστερά) και G3PD (δεξιά).

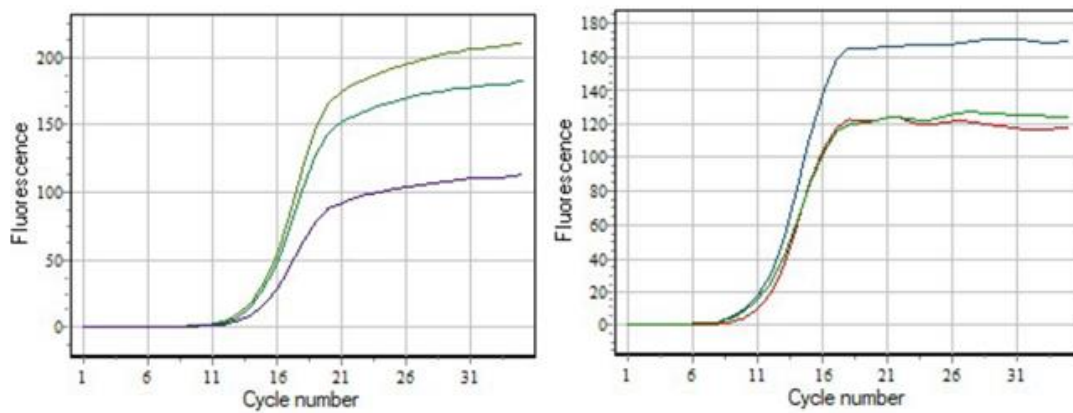


Γράφημα 12 - Καμπύλες ενίσχυσης της τριπλέτας με DNA του στελέχους EP184 και εκκινητές του γονιδίου MRPA (αριστερά) και G3PD (δεξιά).

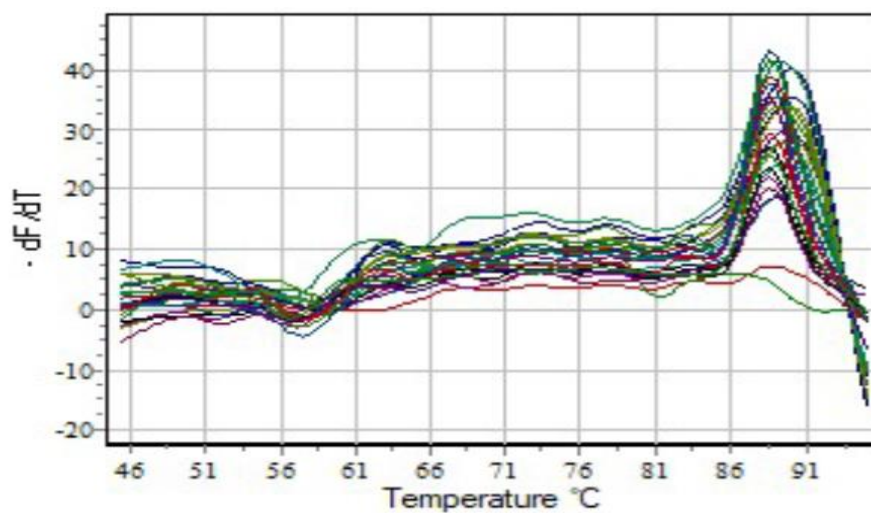




Γράφημα 13 - Καμπύλες ενίσχυσης της τριπλέτας με DNA του στελέχους GD69 και εκκινητές του γονιδίου MRPA (αριστερά) και G3PD (δεξιά).



Γράφημα 14 - Καμπύλες ενίσχυσης της τριπλέτας με DNA του στελέχους GD67 και εκκινητές του γονιδίου MRPA (αριστερά) και D3PD (δεξιά).



Γράφημα 15 - Συγκεντρωτικό γράφημα καμπυλών τήξης των χρησιμοποιούμενων εκκινητών.

Σκοπός της RT-PCR ήταν η διερεύνηση και ο εντοπισμός της ύπαρξης διαφοράς στην έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί τον MRPA μεταφορέα μεταξύ των 4 στελεχών, των οποίων το γενετικό υλικό απομονώθηκε στην προηγούμενη παράγραφο. Η ανάλυση έγινε με την χρήση της μαθηματικής μεθόδου  $\Delta\Delta Ct$ . Σύμφωνα με αυτή, αρχικά υπολογίζεται το  $\Delta Ct$  για κάθε στέλεχος, δηλαδή η διαφορά του μέσου όρου των Ct μεταξύ του γονιδίου MRPA και του G3PD (γονίδιο - μάρτυρας). Το στέλεχος με την υψηλότερη τιμή  $\Delta Ct$ , άρα και την μικρότερη έκφραση του γονιδίου MRPA, ορίζεται ως το στέλεχος αναφοράς και με βάση αυτό θα υπολογιστεί η έκφραση του MRPA στα άλλα 3 στελέχη.

Θέση/Θέσεις	Στέλεχος-Γονίδιο	Μέσος Όρος Ct	$\Delta Ct$
1	(-) control	0	
2	(-) control	0	
3-5	GH8 - MRPA	13,97	1,94
6-8	GH8 - G3PD	12,03	
9-11	EP184 - MRPA	13,3	2,87
12-14	EP184 - G3PD	10,43	
15-17	GD69 - MRPA	13,23	2,36
18-20	GD69 - G3PD	10,87	
21-23	GD67 - MRPA	13,5	2,9
24-26	GD67 - G3PD	10,6	

Πίνακας 12 - Μέσοι όροι των Ct για κάθε ζεύγος στελέχους-γονιδίου και υπολογισμός της τιμής  $\Delta Ct$ .

Με βάση τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα, ως **στέλεχος αναφοράς επιλέγεται το GD67** ( $\Delta Ct=2,9$ ). Ακολουθεί πρώτον, ο υπολογισμός του  $\Delta\Delta Ct$ , δηλαδή της διαφοράς μεταξύ των  $\Delta Ct$  κάθε στελέχους και του στελέχους αναφοράς και δεύτερον, του αριθμού  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  για κάθε στέλεχος.

- $\Delta\Delta Ct(GD67) = \Delta Ct(GD67) - \Delta Ct(GD67) = 2,9 - 2,9 = 0 \Rightarrow 2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$
- $\Delta\Delta Ct(GH8) = \Delta Ct(GH8) - \Delta Ct(GD67) = 1,94 - 2,9 = -0,96 \Rightarrow 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2$
- $\Delta\Delta Ct(GD69) = \Delta Ct(GD69) - \Delta Ct(GD67) = 2,36 - 2,9 = -0,54 \Rightarrow 2^{-\Delta\Delta Ct} = 1,5$
- $\Delta\Delta Ct(EP184) = \Delta Ct(EP184) - \Delta Ct(GD67) = 2,87 - 2,9 = -0,03 \Rightarrow 2^{-\Delta\Delta Ct} = 1,02$

Συμπερασματικά, το στέλεχος GH8 εκφράζει περίπου 1 φορά παραπάνω το γονίδιο MRPA σε σχέση με το στέλεχος αναφοράς, ενώ το στέλεχος GD69 μισή φορά παραπάνω. Τέλος, μεταξύ του στελέχους EP184 και του στελέχους αναφοράς παρατηρείται ουσιαστικά ισόποση έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου.

## 5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία, η έρευνα εστίασε κυρίως στην μελέτη της παρασιτικής αντοχής στην περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου, αφού χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 9 παρασιτικά στελέχη του συμπλέγματος *Leishmania donovani*, τα 6 εκ των οποίων (GD3, GD55, GD67, GD69, GH8, GH14) είχαν απομονωθεί από τον ελλαδικό χώρο και τα 2 (EP176, EP184) από την Τουρκία, ενώ χρησιμοποιήθηκε και ένα στέλεχος (Lg13) αιθιοπικής προέλευσης. Στην Ανατολική Μεσόγειο, η λείσμανίαση εμφανίζεται πρωτίστως ως ζωνόσος με κύριο ξενιστή τον σκύλο, χωρίς όμως να λείπουν και περιστατικά ανθρώπινης πρόσβλησης. Έτσι, τα 6 από τα 9 στελέχη που επιλέχθηκαν (GD3, GD55, GD67, GD69, EP176, EP184) προέρχονται από σκύλο και τα 3 (GH8, GH14, Lg13) από ανθρώπινο δείγμα.

Πρώτο μέλημα της έρευνας αποτέλεσε ο *in vitro* υπολογισμός των τιμών IC<sub>50</sub> του SbIII και της AmrB, μέσω των οποίων προσδιορίζεται ποσοτικά η απόκριση των παρασίτων στα φάρμακα αυτά και γίνεται ένας αδρός χαρακτηρισμός του προφίλ ευαισθησίας ή αντοχής τους. Οι συγκεντρώσεις των φαρμάκων που επιλέχθηκαν στις παραπάνω δοκιμασίες υπολογισμού των IC<sub>50</sub> συμβαδίζουν με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν σε ανάλογα πειράματα της βιβλιογραφίας, ενώ και οι τιμές IC<sub>50</sub> που προέκυψαν είναι σε γενικές γραμμές παρόμοιες, παρόλο που αναφορικά με το SbIII φαίνεται να υπάρχει διακύμανση μεταξύ των αποτελεσμάτων των διάφορων ερευνών. Ενδεικτικά, οι Ollías-Molero *et. al.* χρησιμοποίησαν το SbIII σε συγκεντρώσεις 3.75, 7.5, 15, 30, 60, 120, 240 και 480μM και την AmrB σε συγκεντρώσεις 0.0078, 0.0156, 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 και 1μM. Για το SbIII, η τιμές IC<sub>50</sub> κυμαίνονταν μεταξύ 80 και 90μM, ενώ για την AmrB το IC<sub>50</sub> υπολογίστηκε στα 0.06μM και για τα 2 στελέχη στα οποία την χορήγησαν (66). Επιπλέον, σε έρευνα που διεξήχθη στην Αλγερία από τους Eddaikra *et. al.* σχετικά με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο αντιμόνιο, χορηγήθηκαν σε στελέχη απομονωμένα από κρούσματα VL οι συγκεντρώσεις 2.45, 4.9, 9.8, 19.6, 39.2, 78.4, 156.8, 313.6 και 627.2 μM, με την τιμή 131.5μM να χρησιμοποιείται ως όριο για την διάκριση μεταξύ ευαισθησίας και ανθεκτικότητας (67). Παρόμοιο όριο (123.2μM) χρησιμοποίησαν και οι Hendrickx *et. al.* ενώ οι τιμές IC<sub>50</sub> που υπολόγισαν για το SbIII το οποίο χορήγησαν σε προμαστιγώτες στελεχών *L. donovani* και *L. infantum* ήταν ιδιαίτερα υψηλές (περίπου

400μM). Αντίστοιχα, για την AmpB το IC<sub>50</sub> των στελεχών υπολογίστηκε μεταξύ 0.1 και 0.3μM (68). Επίσης, σχετικά με την AmpB, οι Vermeersch *et. al.* την χορήγησαν σε προμαστιγώτες *L. donovani* κατά την λογαριθμική φάση ανάπτυξής τους και υπολόγισαν ακόμα υψηλότερες τιμές IC<sub>50</sub> (0.5-0.9μM) (69). Τέλος, η μεγάλη διακύμανση της απόκρισης των προμαστιγωτών έναντι στο SbIII φαίνεται χαρακτηριστικά συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των ερευνών των Eghros *et. al.* και W.L. Roberts *et. al.* Η έρευνα των πρώτων κατέληξε σε IC<sub>50s</sub> γύρω στα 100μM (70) ενώ τα IC<sub>50s</sub> των δεύτερων ήταν μόλις 25μM (71).

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα πειραματικά δεδομένα που συλλέχθηκαν κατά την πραγματοποίηση των *in vitro* δοκιμασιών υπολογισμού των τιμών IC<sub>50</sub> στην παρούσα έρευνα και συγκρίνοντας τα με τα παραπάνω βιβλιογραφικά δεδομένα, μπορεί να θεωρηθεί ότι τα στελέχη **GH8 και GH14**, τα οποία απομονώθηκαν από ελληνικά περιστατικά ανθρώπινης λείσμανίασης, παρουσιάζουν ένα **προφίλ ανθεκτικότητας** έναντι στην δράση του SbIII, ενώ αντίθετα τα στελέχη **GD3, GD67, GD69, EP176 και EP184** είναι **ευαίσθητα**. Τα στελέχη **GD55 και Lg13** φαίνεται να έχουν μία ενδιάμεση απόκριση, γεγονός που οδηγεί στον χαρακτηρισμό τους ως **μετρίως ευαίσθητα**. Όσον αφορά την απόκριση έναντι στην δράση της AmpB, όλα τα στελέχη μπορούν να χαρακτηριστούν ως ευαίσθητα, γεγονός που δεν προκαλεί έκπληξη, αφού δεν έχουν καταγραφεί περιπτώσεις ανάπτυξης αντοχής έναντι στο συγκεκριμένο φαρμακευτικό σκεύασμα. Μάλιστα, οι τιμές IC<sub>50</sub> που υπολογίστηκαν είναι χαμηλότερες σε σύγκριση με αυτές που αναφέρονται στην βιβλιογραφία, μιας και το IC<sub>50</sub> κανενός στελέχους δεν ξεπερνά τα 0.09μM. Μπορούμε λοιπόν να συμπεράνουμε ότι τα περισσότερα στελέχη που δοκιμάστηκαν αποκρίνονται με τον ίδιο τρόπο στο SbIII και στην AmpB και είναι ευαίσθητα σε αυτά. Εξάιρεση αποτελούν τα στελέχη GH8 και GH14, τα οποία είναι ανθεκτικά στην δράση του SbIII αλλά ευαίσθητα στην δράση της AmpB, δηλαδή τα προφίλ ευαισθησίας/ανθεκτικότητας τους έναντι των 2 φαρμάκων δεν συμπίπτουν.

Όσον αφορά τον μοριακό έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί τον MRPA μεταφορέα μέσω δοκιμασίας RT-PCR, η συντριπτική πλειοψηφία της βιβλιογραφίας αναφέρει ότι η αυξημένη έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου συσχετίζεται ισχυρά με την ανθεκτικότητα έναντι στα σκευάσματα που βασίζονται σε ενώσεις αντιμονίου. Αναλυτικότερα, υπερέκφραση του MRPA μεταφορέα σε ανθεκτικά

στο αντιμόνιο στελέχη *L. donovani* και *L. infantum* έχουν παρατηρήσει, μεταξύ άλλων, οι Leprohon *et. al.* (21), Moreira *et. al.* (22) και Mukherjee *et. al.* Οι τελευταίοι μάλιστα διεξήγαγαν την RT-PCR και στα 2 μορφολογικά στάδια του παρασίτου και κατέληξαν στο ότι τα ανθεκτικά στελέχη υπερεκφράζουν τον MRPA μεταφορέα τόσο ως προμαστιγώτες όσο και ως αμαστιγώτες (20). Υπάρχουν λοιπόν άφθονες θετικές ενδείξεις για το ότι ο προσδιορισμός της ποσότητας των αντιγράφων του γονιδιακού τόπου H-locus μπορεί ενδεχομένως να αποτελέσει αξιόπιστο μοριακό δείκτη πρόβλεψης της απόκρισης έναντι στο αντιμόνιο, και κατ' επέκταση της θεραπευτικής έκβασης (72).

Από την δοκιμασία RT-PCR που διεξήχθη κατά την εκπόνηση αυτής της εργασίας, μπορούμε να συμπεράνουμε την ύπαρξη **μερικής συσχέτισης** μεταξύ της έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί τον MRPA μεταφορέα και του προφίλ ευαισθησίας ή ανθεκτικότητας των 4 στελεχών που ελέγχθηκαν. Συγκεκριμένα, το στέλεχος GH8 που έχει χαρακτηριστεί ως ανθεκτικό στην δράση του SbIII, όντως εκφράζει τον MRPA μεταφορέα σε διπλάσια ποσότητα συγκριτικά με το στέλεχος αναφοράς. Η αύξηση αυτή μπορεί να είναι αποτέλεσμα είτε ανευπλοειδίας του χρωμοσώματος 23 είτε ύπαρξης περισσότερων αντιγράφων του γονιδίου που κωδικοποιεί τον MRPA μεταφορέα επισωματικά ή ενδοχρωμοσωμικά (παράγραφος 3.2.7). Το παράδοξο είναι το ίδιο το στέλεχος αναφοράς (GD67), το οποίο με βάση τις τιμές  $IC_{50}$  που υπολογίστηκαν, θα περίμενε κανείς να είναι το EP184, δηλαδή ένα από τα 2 πιο ευαίσθητα στελέχη έναντι στο SbIII που δοκιμάστηκαν. Παρόλα αυτά, το EP184 εκφράζει τον MRPA μεταφορέα 1 φορά παραπάνω σε σχέση με το στέλεχος GD67, το οποίο είναι μεν ευαίσθητο αλλά με σχεδόν διπλάσια τιμή  $IC_{50}$ . Τέλος, το GD67 έχει παρόμοια τιμή  $IC_{50}$  με το στέλεχος GD69, το τελευταίο όμως επίσης εκφράζει τον MRPA μεταφορέα 1 φορά παραπάνω.

Οι παρατηρούμενες ασυμφωνίες μεταξύ των τιμών  $IC_{50}$  και της ποσότητας των αντιγράφων του MRPA μεταφορέα είναι πιθανό να οφείλονται σε διάφορους βιολογικούς παράγοντες, όπως πχ στην υπερέκφραση άλλων γονιδίων ABC μεταφορέων. Επίσης, όπως αναφέρουν και οι Ponte-Sucre *et. al.*, η καλλιέργεια *in vitro* ενδέχεται να οδηγήσει σε ανάπτυξη ανευπλοειδίας ώστε να αυξηθεί η προσαρμοστικότητα και κατά συνέπεια οι πιθανότητες επιβίωσης του παρασίτου (19). Μάλιστα, η παρατήρηση αυτή συνδυαστικά με την αύξηση του μεγέθους του δείγματος θα μπορούσε να αποτελέσει το επόμενο βήμα της παρούσας έρευνας. Η επανάληψη λοιπόν τόσο της δοκιμασίας

υπολογισμού  $IC_{50}$  όσο και της RT-PCR σε μεγαλύτερο πλήθος στελεχών στην προμαστιγωτή αλλά και στην αμαστιγωτή τους μορφή σίγουρα θα προσφέρει πολύτιμα δεδομένα στην διερεύνηση της επίδρασης των αντιλεισμνιακών φαρμάκων και στα δύο αναπτυξιακά στάδια και στην πρόβλεψη της απόκρισης σε αυτά.

**Εν κατακλείδι, φαίνεται ότι ορισμένοι ελληνικοί πληθυσμοί παρασίτων του συμπλέγματος *L. donovani* είναι ανθεκτικοί έναντι στην δράση του SbIII, γεγονός που εν μέρει σχετίζεται με την παρουσία αυξημένου αριθμού αντιγράφων του γενετικού τόπου H-locus.** Η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών προκαλεί ανησυχία πρώτον λόγω της σοβαρότητας της νόσου, δεύτερον λόγω των λίγων διαθέσιμων φαρμακευτικών επιλογών και τρίτων λόγω της έλλειψης αποτελεσματικών μέσων πρόληψης, ταυτόχρονα όμως αποτελεί ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον εύρημα, το οποίο είναι σίγουρο ότι χρίζει περαιτέρω μελέτης και έρευνας.

## 6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Βακάλης Νικόλαος. Ιατρική Παρασιτολογία. Ιατρικές Εκδόσεις Ζήτα. 2003. 404 p.
2. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. Bañuls A-L, editor. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2016 Mar 3;10(3):e0004349. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
3. Kaufer A, Ellis J, Stark D, Barratt J. The evolution of trypanosomatid taxonomy. Parasit Vectors [Internet]. 2017 Dec 8;10(1):287. Available from: <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2204-7>
4. Collier L, Balows A, Sussman M. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections - Parasitology. 9th ed. Cox F, Kreier J, Wakelin D, editors. 1998. 701 p.
5. Steverding D. The history of leishmaniasis. Parasit Vectors [Internet]. 2017 Dec 15;10(1):82. Available from: <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2028-5>
6. CDC [Internet]. Available from: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>
7. Tuon FF, Amato Neto V, Sabbaga Amato V. Leishmania : origin, evolution and future since the Precambrian. FEMS Immunol Med Microbiol [Internet]. 2008 Nov;54(2):158–66. Available from: <https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.2008.00455.x>
8. WHO [Internet]. Available from: [https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1)
9. Roque ALR, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of Leishmania species in the Americas. Int J Parasitol Parasites Wildl [Internet]. 2014 Dec;3(3):251–62. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213224414000273>
10. Georgiadou SP, Makaritsis KP, Dalekos GN. Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. J Transl Intern Med [Internet]. 2015 Jun 30;3(2):43–50. Available from: <https://www.sciendo.com/article/10.1515/jtim-2015-0002>
11. Χαράλαμπος Χ, Χαράλαμπος C. Γονοτυπικός προσδιορισμός ειδών και υποειδών του παρασίτου Leishmania [Internet]. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ), Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, Τομέας Κλινικοεργαστηριακός, Εργαστήριο Μικροβιολογίας; 2007. Available from: <http://didaktorika.gr/eadd/handle/10442/19121>
12. Cecílio P, Cordeiro-da-Silva A, Oliveira F. Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with Leishmania parasites. Commun Biol [Internet]. 2022 Dec 4;5(1):305. Available from: <https://www.nature.com/articles/s42003-022-03240-z>
13. Mike Service. Medical Entomology for Students. 5th ed. Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου; 2012. 280 p.
14. de Menezes JP, Saraiva EM, da Rocha-Azevedo B. The site of the bite: Leishmania interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. Parasit Vectors [Internet]. 2016 Dec 4;9(1):264. Available from:



- <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-016-1540-3>
15. Sunter J, Gull K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biol* [Internet]. 2017 Sep 13;7(9):170165. Available from: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsob.170165>
  16. Rodríguez NE, Wilson ME. Eosinophils and mast cells in leishmaniasis. *Immunol Res* [Internet]. 2014 Aug 17;59(1–3):129–41. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12026-014-8536-x>
  17. Liévin-Le Moal V, Loiseau PM. Leishmania hijacking of the macrophage intracellular compartments. *FEBS J* [Internet]. 2016 Feb;283(4):598–607. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/febs.13601>
  18. *Leishmania donovani* - NCBI - NIH [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/taxonomy/5661/>
  19. Ponte-Sucré A, Gamarro F, Dujardin J-C, Barrett MP, López-Vélez R, García-Hernández R, et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. Maes L, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2017 Dec 14;11(12):e0006052. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0006052>
  20. Mukherjee A, Padmanabhan PK, Singh S, Roy G, Girard I, Chatterjee M, et al. Role of ABC transporter MRPA, -glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2006 Nov 13;59(2):204–11. Available from: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkl494>
  21. Leprohon P, Legare D, Raymond F, Madore E, Hardiman G, Corbeil J, et al. Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2009 Jan 9;37(5):1387–99. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkn1069>
  22. Moreira DS, Monte Neto RL, Andrade JM, Santi AMM, Reis PG, Frézard F, et al. Molecular characterization of the MRPA transporter and antimony uptake in four New World *Leishmania* spp. susceptible and resistant to antimony. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* [Internet]. 2013 Dec;3:143–53. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211320713000146>
  23. Saporito L, Giammanco GM, De Grazia S, Colomba C. Visceral leishmaniasis: host–parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2013 Aug;17(8):e572–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971213000350>
  24. Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. *F1000Research* [Internet]. 2017 May 26;6:750. Available from: <https://f1000research.com/articles/6-750/v1>
  25. Παπαδάκη Α, Papadaki A. Μελέτη μοριακών μηχανισμών επιβίωσης του παρασίτου *Leishmania* spp. στα φαγοκύτταρα του τελικού ξενιστή [Internet]. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, Τομέας Λειτουργικός - Κλινικοεργαστηριακός, Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας; 2015. Available from: <http://didaktorika.gr/eadd/handle/10442/39638>

26. Mann S, Frasca K, Scherrer S, Henao-Martínez AF, Newman S, Ramanan P, et al. A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. *Curr Trop Med Reports* [Internet]. 2021 Jun 17;8(2):121–32. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s40475-021-00232-7>
27. Zijlstra EE. The immunology of post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). *Parasit Vectors* [Internet]. 2016 Dec 23;9(1):464. Available from: <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-016-1721-0>
28. Elmahallawy EK, Alkhaldi AAM. Insights into Leishmania Molecules and Their Potential Contribution to the Virulence of the Parasite. *Vet Sci* [Internet]. 2021 Feb 20;8(2):33. Available from: <https://www.mdpi.com/2306-7381/8/2/33>
29. Srivastava S, Shankar P, Mishra J, Singh S. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. *Parasit Vectors* [Internet]. 2016 Dec 12;9(1):277. Available from: <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-016-1553-y>
30. Elmahallawy EK, Alkhaldi AAM, Saleh AA. Host immune response against leishmaniasis and parasite persistence strategies: A review and assessment of recent research. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2021 Jul;139:111671. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332221004534>
31. Kaye PM, Cruz I, Picado A, Van Bocxlaer K, Croft SL. Leishmaniasis immunopathology—impact on design and use of vaccines, diagnostics and drugs. *Semin Immunopathol* [Internet]. 2020 Jun 9;42(3):247–64. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00281-020-00788-y>
32. Rossi M, Fasel N. How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions! *Int Immunol* [Internet]. 2018 Mar 10;30(3):103–11. Available from: <https://academic.oup.com/intimm/article/30/3/103/4774287>
33. Ng LG, Hsu A, Mandell MA, Roediger B, Hoeller C, Mrass P, et al. Migratory Dermal Dendritic Cells Act as Rapid Sensors of Protozoan Parasites. Engwerda CR, editor. *PLoS Pathog* [Internet]. 2008 Nov 28;4(11):e1000222. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000222>
34. Kindt T, Goldsby R, Osborne B. Kuby Ανοσολογία. 2η. BROKEN HILL PUBLISHERS LTD; 2013. 804 p.
35. Kaye PM, Mohan S, Mantel C, Malhame M, Revill P, Le Rutte E, et al. Overcoming roadblocks in the development of vaccines for leishmaniasis. *Expert Rev Vaccines* [Internet]. 2021 Nov 2;20(11):1419–30. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14760584.2021.1990043>
36. Joshi S, Rawat K, Yadav NK, Kumar V, Siddiqi MI, Dube A. Visceral Leishmaniasis: Advancements in Vaccine Development via Classical and Molecular Approaches. *Front Immunol* [Internet]. 2014 Aug 22;5. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00380/abstract>
37. Punt J, Stranford S, Jones P, Owen J. Kuby Ανοσολογία. 3η. BROKEN HILL PUBLISHERS LTD; 2021. 964 p.
38. Elmahallawy EK, Sampedro Martinez A, Rodriguez-Granger J, Hoyos-Mallecot Y, Agil A, Navarro Mari JM, et al. Diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries* [Internet]. 2014 Aug

- 13;8(08):961–72. Available from:  
<https://jdc.org/index.php/journal/article/view/25116660>
39. Sundar S, Singh OP. Molecular Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Mol Diagn Ther* [Internet]. 2018 Aug 19;22(4):443–57. Available from:  
<http://link.springer.com/10.1007/s40291-018-0343-y>
  40. Reimão JQ, Coser EM, Lee MR, Coelho AC. Laboratory Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis: Current and Future Methods. *Microorganisms* [Internet]. 2020 Oct 22;8(11):1632. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/11/1632>
  41. Thakur S, Joshi J, Kaur S. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. *J Parasit Dis* [Internet]. 2020 Jun 16;44(2):253–72. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12639-020-01212-w>
  42. Pollard AJ, Bijker EM. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2021 Feb 22;21(2):83–100. Available from:  
<https://www.nature.com/articles/s41577-020-00479-7>
  43. Ghorbani M, Farhoudi R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? *Drug Des Devel Ther* [Internet]. 2017 Dec;Volume 12:25–40. Available from:  
<https://www.dovepress.com/leishmaniasis-in-humans-drug-or-vaccine-therapy-peer-reviewed-article-DDDT>
  44. Garza-Tovar TF, Sacriste-Hernández MI, Juárez-Durán ER, Arenas R. An overview of the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Fac Rev* [Internet]. 2020 Dec 22;9. Available from:  
<https://facultyopinions.com/prime/reports/b/9/28/>
  45. Reed S, Coler R, Mondal D, Kamhawi S, Valenzuela J. Leishmania vaccine development: exploiting the host–vector–parasite interface. *Expert Rev Vaccines* [Internet]. 2016 Jan 2;15(1):81–90. Available from:  
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14760584.2016.1105135>
  46. Teixeira C, Gomes R. Experimental models in vaccine research: malaria and leishmaniasis. *Brazilian J Med Biol Res* [Internet]. 2013 Feb;46(2):109–16. Available from:  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-879X2013000200109&lng=en&tIng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2013000200109&lng=en&tIng=en)
  47. Gillespie PM, Beaumier CM, Strych U, Hayward T, Hotez PJ, Bottazzi ME. Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. *Vaccine* [Internet]. 2016 Jun;34(26):2992–5. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X16002899>
  48. Berbert TRN, Mello TFP de, Wolf Nassif P, Mota CA, Silveira AV, Duarte GC, et al. Pentavalent Antimonials Combined with Other Therapeutic Alternatives for the Treatment of Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review. *Dermatol Res Pract* [Internet]. 2018 Dec 24;2018:1–21. Available from:  
<https://www.hindawi.com/journals/drpr/2018/9014726/>
  49. Luna EJ de A, Campos SR de SL da C. O desenvolvimento de vacinas contra as doenças tropicais negligenciadas. *Cad Saude Publica* [Internet]. 2020;36(suppl 2). Available from:  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-311X2020001402005&tIng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2020001402005&tIng=pt)
  50. Velez R, Gallego M. Commercially approved vaccines for canine leishmaniasis. *Trop Med*

- Int Heal. 2020;25(5):540–57.
51. Foroughi-Parvar F, Hatam G. Vaccines for Canine Leishmaniasis. *Adv Prev Med* [Internet]. 2014;2014:1–9. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/apm/2014/569193/>
  52. Toepp AJ, Petersen CA. The balancing act: Immunology of leishmaniosis. *Res Vet Sci* [Internet]. 2020 Jun;130:19–25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528818303345>
  53. Sekhon BS. Metalloid compounds as drugs. *Res Pharm Sci* [Internet]. 2013 Jul;8(3):145–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24019824>
  54. Fairlamb AH, Gow NAR, Matthews KR, Waters AP. Drug resistance in eukaryotic microorganisms. *Nat Microbiol* [Internet]. 2016 Jun 24;1(7):16092. Available from: <https://www.nature.com/articles/nmicrobiol201692>
  55. Capela, Moreira, Lopes. An Overview of Drug Resistance in Protozoal Diseases. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Nov 15;20(22):5748. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/22/5748>
  56. Perry MR, Prajapati VK, Menten J, Raab A, Feldmann J, Chakraborti D, et al. Arsenic Exposure and Outcomes of Antimonial Treatment in Visceral Leishmaniasis Patients in Bihar, India: A Retrospective Cohort Study. Büscher P, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2015 Mar 2;9(3):e0003518. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003518>
  57. Mohapatra S. Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments. *Trop Parasitol* [Internet]. 2014;4(1):4. Available from: <http://www.tropicalparasitology.org/text.asp?2014/4/1/4/129142>
  58. Sundar S, Chakravarty J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother* [Internet]. 2015 Jan 22;16(2):237–52. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14656566.2015.973850>
  59. Ouellette M, Papadopoulou B. Mechanisms of drug resistance in *Leishmania*. *Parasitol Today* [Internet]. 1993 May;9(5):150–3. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0169475893901353>
  60. Samarasinghe SR, Samaranayake N, Kariyawasam UL, Siriwardana YD, Imamura H, Karunaweera ND. Genomic insights into virulence mechanisms of *Leishmania donovani*: evidence from an atypical strain. *BMC Genomics* [Internet]. 2018 Dec 28;19(1):843. Available from: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-018-5271-z>
  61. Balasegaram M, Ritmeijer K, Lima MA, Burza S, Ortiz Genovese G, Milani B, et al. Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. *Expert Opin Emerg Drugs* [Internet]. 2012 Dec 20;17(4):493–510. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14728214.2012.748036>
  62. Purkait B, Kumar A, Nandi N, Sardar AH, Das S, Kumar S, et al. Mechanism of Amphotericin B Resistance in Clinical Isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2012 Feb;56(2):1031–41. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00030-11>
  63. van Griensven J, Diro E. Visceral Leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am* [Internet]. 2019

Mar;33(1):79–99. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891552018300928>

64. Rampersad SN. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors* [Internet]. 2012 Sep 10;12(9):12347–60. Available from: <http://www.mdpi.com/1424-8220/12/9/12347>
65. Corral MJ, González E, Cuquerella M, Alunda JM. Improvement of 96-well microplate assay for estimation of cell growth and inhibition of *Leishmania* with Alamar Blue. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2013 Aug;94(2):111–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701213001632>
66. Olías-Molero A, Jiménez-Antón M, Biedermann D, Corral M, Alunda J. In-Vitro Activity of Silybin and Related Flavonolignans against *Leishmania infantum* and *L. donovani*. *Molecules* [Internet]. 2018 Jun 27;23(7):1560. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/7/1560>
67. Eddaikra N, Ait-Oudhia K, Kherrachi I, Oury B, Moulti-Mati F, Benikhlef R, et al. Antimony susceptibility of *Leishmania* isolates collected over a 30-year period in Algeria. Al-Salem WS, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2018 Mar 21;12(3):e0006310. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0006310>
68. HENDRICKX S, GUERIN P, CALJON G, CROFT S, MAES L. Evaluating drug resistance in visceral leishmaniasis: the challenges. *Parasitology* [Internet]. 2018 Apr 21;145(4):453–63. Available from: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182016002031/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182016002031/type/journal_article)
69. Vermeersch M, da Luz RI, Toté K, Timmermans J-P, Cos P, Maes L. In Vitro Susceptibilities of *Leishmania donovani* Promastigote and Amastigote Stages to Antileishmanial Reference Drugs: Practical Relevance of Stage-Specific Differences. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2009 Sep;53(9):3855–9. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00548-09>
70. Ephros M, Bitnun A, Shaked P, Waldman E, Zilberstein D. Stage-Specific Activity of Pentavalent Antimony against *Leishmania donovani* Axenic Amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1999 Feb;43(2):278–82. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.43.2.278>
71. Roberts WL, Berman JD, Rainey PM. In vitro antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1995 Jun;39(6):1234–9. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.39.6.1234>
72. Laffitte M-CN, Leprohon P, Papadopoulou B, Ouellette M. Plasticity of the *Leishmania* genome leading to gene copy number variations and drug resistance. *F1000Research* [Internet]. 2016 Sep 20;5:2350. Available from: <https://f1000research.com/articles/5-2350/v1>
73. No Title. In: *Britannica* [Internet]. Available from: <https://www.britannica.com/place/Pangea>

Πηγή εικόνας εξωφύλλου: <https://www.med-technews.com/news/Medtech-Diagnostics-news/gadx-acquires-rights-for-visceral-leishmaniasis-test-from-bi/>