



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας  
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Χαρακτηρισμός μοριακής αντίστασης παρασίτων  
του συμπλέγματος *Leishmania donovani*  
σε αντιλεϊσμανιακά φάρμακα**

**ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/ΤΡΙΑΣ: ΚΑΡΑΝΙΚΑΣ ΓΙΩΡΓΟΣ**  
**Αριθμός Μητρώου: 18678081**

**ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/ΤΡΙΑΣ: ΧΡΥΣΑΝΘΗ ΒΟΓΙΑΤΖΑΚΗ**

ΑΙΓΑΛΕΩ 2023



Faculty of Health and Caring Sciences  
Department of Biomedical Sciences



UNDERGRADUATE THESIS

**Molecular characterization of antileishmanial drug  
resistance in *Leishmania donovani* complex**

**NAME OF STUDENTS:** KARANIKAS GEORGIOS  
**Registration Number:** 18678081

**SUPERVISOR:** CHRYSANTHI VOGIATZAKI

AIGALEO 2023

**Η διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι εξεταστική επιτροπή:**

<b>A/A</b>	<b>ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ</b>	<b>ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ</b>	<b>ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ</b>
<b>1.</b>	Χρυσάνθη Βογιατζάκη	Επίκουρη καθηγήτρια Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας	
<b>2.</b>	Δέσποινα Σμυρλή	Κύρια ερευνήτρια στο εργαστήριο Μοριακής Παρασιτολογίας του Μικροβιολογικού τμήματος, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ	
<b>3.</b>	Τσουμάνη Μαρία	Βιολόγος Msc PhD Ακαδημαϊκός Υπότροφος Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας	

**The graduate thesis was successfully examined by the following examination committee:**

<b>A/A</b>	<b>FULL NAME</b>	<b>ACADEMIC DEGREE/ STATUS</b>	<b>DIGITAL SUGNATURE</b>
<b>1.</b>	Chrysanthi Vogiatzaki	Assistant professor of Laboratory of Molecular Microbiology and Immunology	
<b>2.</b>	Despina Smyrli	Principal researcher Molecular Parasitology laboratory of the Microbiology department, Hellenic Pasteur Institute	
<b>3.</b>	Maria Tsoumani	Biologist Msc PhD Academic Scholar Laboratory of Molecular Microbiology and Immunology	

## **Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής εργασίας**

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Γεώργιος Καρανίκας του Θεοδώρου, με αριθμό μητρώου 18678081, φοιτητής του Προπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της 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».

Ο Δηλών

### **Ευχαριστίες**

Θα ήθελα, σε αυτό το σημείο, να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου Χρυσάνθη Βογιατζάκη, επίκουρος καθηγήτρια και κτηνίατρος, για την καθοδήγηση και την ευκαιρία που μου πρόσφερε ώστε να ασχοληθώ με την παρούσα ερευνητική εργασία. Στο ίδιο πλαίσιο ευγνωμοσύνης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δέσποινα Σμυρλή, κύρια ερευνήτρια του τμήματος μοριακής παρασιτολογίας του μικροβιολογικού εργαστηρίου του Ινστιτούτου Pasteur, για τον χρόνο που διέθεσε δίνοντας μου χρήσιμες συμβουλές και οδηγίες για την διεξαγωγή των πειραμάτων και την διόρθωση της πτυχιακής μου εργασίας. Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Daniel Carrasco, διδακτορικό φοιτητή, που συνέβαλε πρακτικά και ψυχικά στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Συνοπτομογραφίες.....	1
Περίληψη.....	2
Abstract.....	3
1.Εισαγωγή.....	4
1.1 <i>Leishmania spp.</i> .....	4
1.1.1 Μορφολογία του παρασίτου.....	4
1.1.2 Κύκλος ζωής του παρασίτου.....	6
1.1.3 Ενδιάμεσος ξενιστής και δεξαμενή του παρασίτου.....	7
1.2 Κλινικές μορφές λεισμανίασης.....	8
1.3 Διάγνωση λεισμανιάσεων.....	11
1.3.1 Σπλαχνική λεισμανίαση.....	11
1.3.2 Δερματική λεισμανίαση.....	12
1.3.3 Βλεννογονοδερματική λεισμανίαση.....	12
1.4 Θεραπεία λεισμανίασης.....	12
1.4.1 Πεντασθενείς ενώσεις αντιμονίου.....	14
1.4.2 Μιλτεφοσίνη.....	15
1.4.3 Παρομομυκίνη.....	16
1.4.4 Αμφοτερικίνη Β.....	16
1.5 Αποτυχία θεραπείας και φαρμακοεπαγόμενη αντίσταση.....	18
1.5.1 Μηχανισμοί αντίστασης στο αντιμόνιο.....	19
1.5.2 Μηχανισμοί αντίστασης στη μιλτεφοσίνη.....	23
2.Σκοπός.....	27
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	28
3.1 Υλικά.....	28

3.2 Μέθοδοι.....	31
3.2.1 Ποσοτικοποίηση DNA με την χρήση του nanodrop.....	31
3.2.2 Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης PCR.....	31
3.2.3 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης 1%.....	34
3.2.4 Ανάπτυξη δοκιμασίας qRT-PCR για την ανίχνευση αύξησης του CNV στο γονίδιο του MRPA μεταφορέα.....	35
3.2.5 In vitro δοκιμασία φαρμάκου σε προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου με την χρήση ρεσαζουρίνης.....	37
4. Αποτελέσματα.....	40
4.1 Έλεγχος απουσίας του γονιδίου του υποδοχέα μιλτεφοσίνης με PCR σε στελέχη παρασίτων του <i>Leishmania donovani complex</i> από την Ανατολική Μεσόγειο.....	40
4.2 Έλεγχος απουσίας του γονιδιακού τύπου MSL σε στελέχη παρασίτων του <i>Leishmania donovani complex</i> από την Ανατολική Μεσόγειο .....	44
4.3 Αποτελέσματα της in vitro δοκιμασίας φαρμάκου σε προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου με την χρήση της ρεσαζουρίνης.....	50
4.4 Αποτελέσματα qRT-PCR στα στελέχη CH33 και CH34 στο γονίδιο του MRPA μεταφορέα.....	54
5. Συμπεράσματα.....	55
5.1 Μοριακός έλεγχος απουσίας δυο γονιδίων σε στελέχη της Ανατολικής Μεσογείου με την χρήση PCR.....	55
5.2 Ανάπτυξη μεθόδου qRT-PCR για την εκτίμηση του CNV στο γονίδιο του MRPA μεταφορέα.....	56
6. Βιβλιογραφία.....	61





Πίνακας 1: Πίνακας συντομογραφιών

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΟΡΟΛΟΓΙΑ	ENGLISH TERMINOLOGY
ΣΛ	Σπλαχνική λεισμανίαση	Visceral leishmaniasis, VL
ΔΛ	Δερματική λεισμανίαση	Cutaneous leishmaniasis, CL
ΒΔΛ	Βλενογοννοδερματική λεισμανίαση	Mucocutaneous leishmaniasis, MCL
CNV	Ενδοχρωμοσωμική γονιδιακή ενίσχυση	Copy number variations
AQP1	Ακουαπορίνη 1	Aquaporin 1
ABC	ΑΤΡεξαρτώμενος μεταφορέας	ATP binding cassette
MRPA	Πρωτεΐνη που σχετίζεται με αντοχή σε πολλά φάρμακα	Multi-drug resistance related protein A
IC <sub>50</sub>	Μισή μέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση ενός φαρμάκου	Half maximal inhibitory concentration of a drug
ED <sub>50</sub>	Μισή μέγιστη αποτελεσματική δόσης ενός φαρμάκου	Median effective dose of a drug
LMT	Υποδοχέας της μιλτεφοσίνης	Leishmania miltefosine transporter
MSL	Γονιδιακός τόπος ευαισθησίας στη μιλτεφοσίνη	Miltefosine sensitivity locus
MDR1	Πρωτεΐνη που σχετίζεται με αντοχή σε πολλά φάρμακα	Multi-drug resistance protein 1
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	Polymerase chain reaction
qRT-PCR	Ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο	Quantitative real time PCR

## Περίληψη

Η *Leishmania* είναι ένα πρωτόζωο που περνάει ένα μέρος του βιολογικού του κύκλου του σε σκνίπες και ένα μέρος του βιολογικού του κύκλου σε διάφορα θηλαστικά όπως οι σκύλοι, τα τρωκτικά και ο άνθρωπος. Το παράσιτο αυτό προκαλεί σοβαρές λοιμώξεις, τις λεισμανιάσεις, που διαφέρουν ανάλογα με την γεωγραφική περιοχή, το είδος του παρασίτου και το είδος της σκνίπας που εντοπίζεται σε κάθε περιοχή. Στην Ελλάδα η λεισμανίαση είναι ενδημική με συχνότερη εμφάνιση στους σκύλους. Η θεραπεία των λεισμανιάσεων αποτελεί μια πρόκληση στις μέρες μας, καθώς το παράσιτο αναπτύσσει μηχανισμούς αντίστασης σε φάρμακα που προηγουμένως θέραπευαν επιτυχώς τις ασθένειες αυτές. Κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετήθηκε σε μοριακό επίπεδο η συχνότητα εμφάνισης του γονιδιακού τύπου MSL και του γονιδίου του υποδοχέα της μιλτεφοσίνης (LMT) σε στελέχη παρασίτων του *Leishmania donovani complex* που απομονώθηκαν από χώρες της Ανατολικής Μεσογείου, καθώς η απουσία τους από το γονιδίωμα του παρασίτου σχετίζεται με αντίσταση στη μιλτεφοσίνη. Επίσης, αναπτύχθηκε δοκιμασία ποσοτικής real time PCR με σκοπό την μελέτη της ενδοχρωμοσωμικής γονιδιακής ενίσχυσης του MRPA μεταφορέα που φαίνεται να προσδίδει ανθεκτικότητα στο παράσιτο σε αντιλεισμανιακά φάρμακα, μεταξύ άλλων και των στις πεντασθενείς ενώσεις του αντιμονίου. Συνοψίζοντας, κάποιες μεταλλάξεις που έχουν εντοπισθεί στο γονιδίωμα στελεχών του παρασίτου *L. infantum* της Βραζιλίας, οι οποίες προσδίδουν ανθεκτικότητα στη μιλτεφοσίνη, εμφανίζονται και στα στελέχη του *Leishmania donovani complex* της Ανατολικής Μεσογείου. Παρόλα αυτά, η αντίσταση στην μιλτεφοσίνη φαίνεται να είναι πολυπαραγοντική. Τέλος, με την μέθοδο της qRT-PCR ανιχνεύτηκε η σχετική διαφορά αντιγράφων του γονιδίου το MRPA μεταφορέα σε δύο στελέχη. Η εφαρμογή της, μελλοντικά, σε προγνωστικό επίπεδο θα μπορούσε να δώσει σημαντικές πληροφορίες για την πιθανή αντίσταση ενός στελέχους στα αντιλεισμανιακά φάρμακα. Ωστόσο, απαιτείται εφαρμογή αυτής της μεθόδου σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων ώστε να πιστοποιηθεί η ακρίβεια και η ευαισθησίας της.

**Λέξεις κλειδιά:** *Leishmania donovani complex*, αποτυχία θεραπείας, γονιδιακός τύπος MSL, υποδοχέας μιλτεφοσίνης, μεταφορέας MRPA, αντιλεισμανιακά φάρμακα, μοριακός έλεγχος

## Abstract

Leishmania is a parasitic protozoan that has a digenetic life cycle involving both mammalian hosts and an insect vector. The parasite is transmitted through sand flies and infects various mammals such as dogs, rodents and humans. It's responsible for the disease leishmaniasis, a serious infection which vary depending on the geographical area, the type of parasite and the type of sand flies that thrive in each area. In Greece, leishmaniasis is endemic with more frequent occurrence in dogs. Nowadays the treatment of leishmaniasis is challenging, as the parasite develops resistance mechanisms to drugs that previously were treating successfully the disease. This undergraduate thesis investigates the incidence of the MSL locus and the miltefosine transporter gene (LMT) in the genome of Leishmania donovani complex strains which were isolated from Eastern Mediterranean regions. Their absence from parasite's genome is associated with miltefosine resistance. Furthermore, a quantitative real-time PCR assay is being developed in order to study the intrachromosomal amplification of the MRPA transporter gene that appears to confer parasite resistance to antileishmanial drugs, including pentavalent antimonials. To conclude, some mutations that have been identified in the genome of *L.infantum* parasites isolated in Brazil, which confer resistance to miltefosin, also occur in Eastern Mediterranean strains of *Leishmania donovani complex*. However, resistance to miltefosin seems to be multi-factorial. Lastly, the in-house qRT-PCR detected successfully the quantitative differences of the MRPA transporter gene in two strains. Knowledge on the number of copies of this gene in *Leishmania* prior to treatment will help to establish better therapeutic strategies, giving more information about the parasite resistance. Nevertheless, this assay needs further application in order to estimate its sensitivity and accuracy.

**Key words:** Leishmania donovani complex, treatment failure, MLS, LMT, MRPA transporter, antileishmanial drugs, molecular characterization

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 *Leishmania* spp.

### 1.1.1 Μορφολογία του παρασίτου

Η λεισμανίαση είναι μια σοβαρή νόσος, που προκαλείται από τα είδη των ενδοκυτταρικών πρωτοζώων παρασίτων του γένους *Leishmania*. Το όνομα «Λεισμάνια» δόθηκε στο παράσιτο προς τιμή του Βρετανού παθολόγου William Boog Leishman, ο οποίος περιέγραψε πρώτος το ομώνυμο παράσιτο το 1903.<sup>[3]</sup> Ανήκει στην οικογένεια των τρυπανοσωματίδων και μοιράζεται κάποια χαρακτηριστικά με άλλα πρωτόζωα αυτής της οικογένειας, όπως η εναλλαγή σπονδυλωτών και ασπόνδυλων ξενιστών με σκοπό την ολοκλήρωση του κύκλου ζωής του. Το παράσιτο απομονώνεται σε δύο μορφές: την προμαστιγωτή μορφή που αναπτύσσεται και πολλαπλασιάζεται στο εντερικό επιθήλιο ασπόνδυλου ξενιστή (σκνίπα) και την αμαστιγωτή μορφή που βρίσκεται στο εσωτερικό των μακροφάγων και μονοπύρηνων του τελικού ξενιστή (άνθρωπος, θηλαστικά).<sup>[3]</sup>

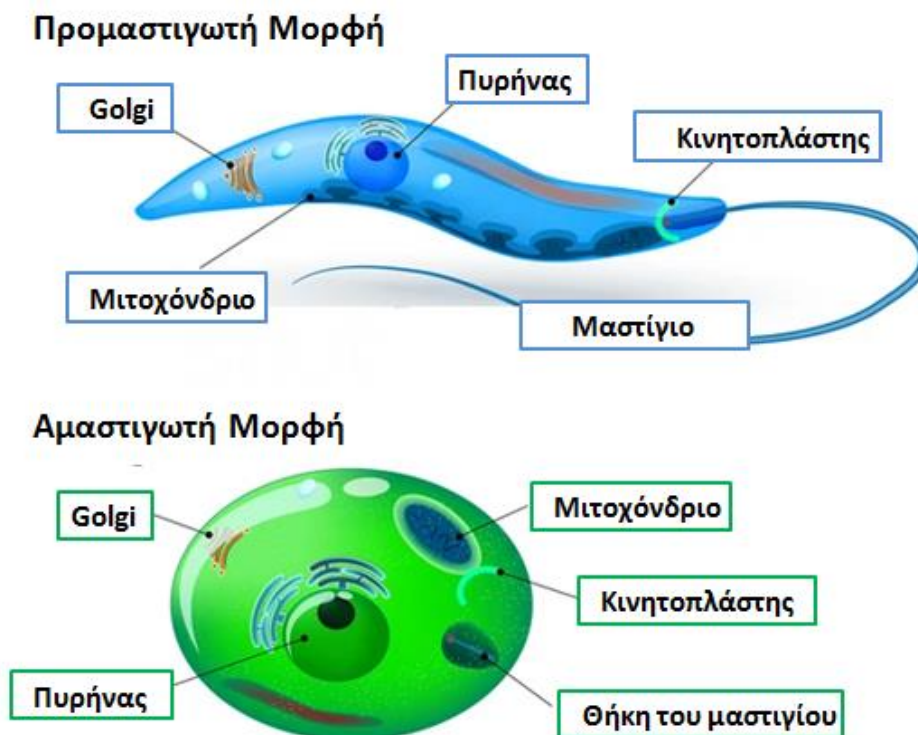
Η **προμαστιγωτή μορφή** εμφανίζεται σε νωπά παρασκευάσματα από περιεχόμενο εντέρου μολυσμένων εντόμων ή σε καλλιέργειες του παρασίτου. Το μέγεθος του είναι περίπου 10-12 μm x 2-4 μm. Φέρει στρόγγυλο και αρκετά μεγάλο πυρήνα ο οποίος βρίσκεται κατά κανόνα στο κέντρο. Το συγκεκριμένο πρωτόζωο έχει ένα μοναδικό μιτοχόνδριο το οποίο είναι διακλαδισμένο και μεγαλύτερο σε μέγεθος σε σχέση με τα αντίστοιχα σε άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Μπροστά από τον πυρήνα βρίσκεται μια δομή σε σχήμα ράβδου που ονομάζεται κινητοπλάστης και αποτελεί τμήμα του μιτοχονδρίου. Σε έγχρωμο παρασκεύασμα ο κινητοπλάστης βάφεται εντονότερα του πυρήνα και αυτό συμβαίνει καθώς εκεί στεγάζεται το μιτοχονδριακό DNA (Εικόνα 3). Ο κινητοπλάστης έρχεται άμεσα σε επαφή με την βάση του μαστιγίου. Σε αυτή την μορφή, το παράσιτο εμφανίζει ζωηρή κίνηση καθώς φέρει μαστίγιο, το μήκος του οποίου φτάνει το μήκος του σώματος ή είναι μεγαλύτερο.<sup>[3]</sup>

Το παράσιτο σε προμαστιγωτή μορφή που βρίσκεται στο έντερο της σκνίπας πολλαπλασιάζεται και αλλάζει μορφή (**μετακυκλική προμαστιγωτή**). Αυτό το στάδιο είναι υποχρεωτικό ώστε να επιτευχθεί η εκ νέου μόλυνση ενός ξενιστή καθώς η μετακυκλική προμαστιγωτή μορφή του παρασίτου είναι η πιο μολυσματική. Μορφολογικά δεν διαφέρει ιδιαίτερα από την προμαστιγωτή μορφή (μικρότερο μέγεθος).<sup>[1][3]</sup>

Στον τελικό ξενιστή (άνθρωπος, ζώα) το παράσιτο βρίσκεται εντός των μακροφάγων/μονοπύρηνων στην **αμαστιγωτή μορφή**. Σε αυτήν την μορφή έχει μικρότερο μέγεθος, περίπου 2-5 μm x 1,5-2,5 μm, και ωοειδές σχήμα. Ο πυρήνας είναι στρογγυλός και μαζί με τον κινητοπλάστη καταλαμβάνουν τον μεγαλύτερο μέρος του κυττάρου. Τα δύο τελευταία οργανίδια είναι ευδιάκριτα στα έγχρωμα παρασκευάσματα. Η αμαστιγωτή μορφή είναι ακίνητη καθώς δεν φέρει μαστίγιο, αν και ενδοκυττάρια ανευρίσκεται ένα μικρό τμήμα αυτού.<sup>[2] [3]</sup> Στην βάση του παρατηρείται μια εγκόλπωση της κυτταρικής μεμβράνης που σχηματίζει την θήκη του μαστιγίου. Η συγκεκριμένη περιοχή αποτελεί την μόνη δίοδο ενδοκύτωσης και εξωκύτωσης του παρασίτου στην αμαστιγωτή μορφή.<sup>[2] [3]</sup>

Λέγεται πως υπάρχουν και άλλες προμαστιγωτές μορφές (προκυκλική, νεκτομονάδες, μετακυκλική) παρόλα αυτά οι μορφολογικές διαφορές μεταξύ τους είναι ελάχιστες και γι' αυτό έχει επικρατήσει ο απλουστευμένος διαχωρισμός του παρασίτου στις δύο κύριες του μορφές (αμαστιγωτή μορφή, προμαστιγωτή μορφή).<sup>[3]</sup>

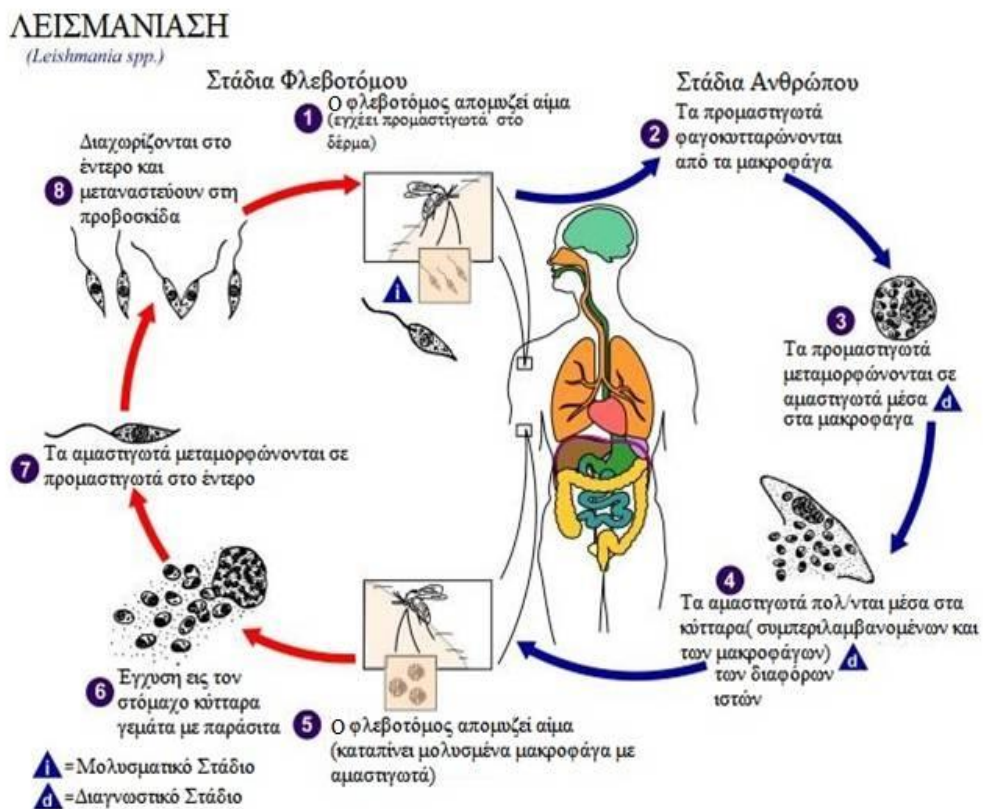
## Leishmania



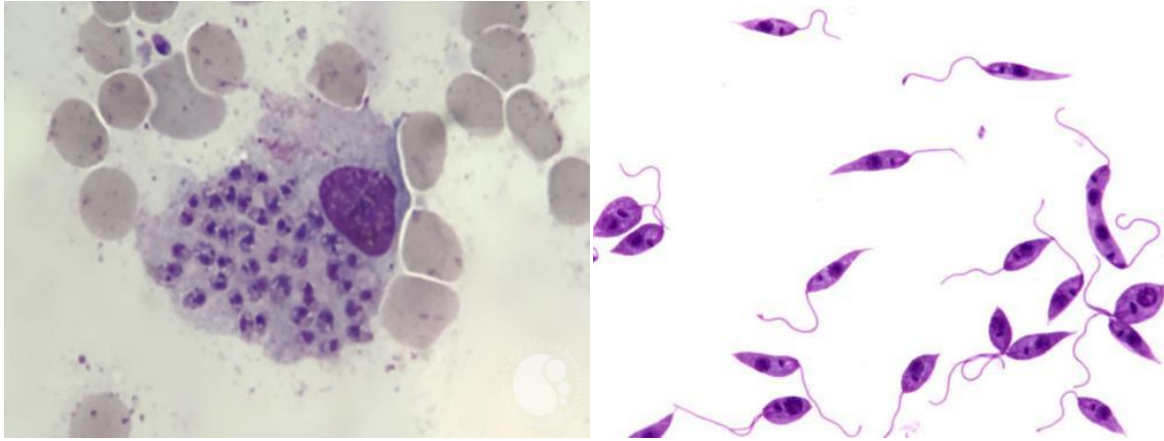
Εικόνα 1: Μορφολογία του παρασίτου *Leishmania* στις δύο κύριες μορφές του, (Πηγή: <https://thumbs.dreamstime.com/z/structure-leishmania-changes-cell-shape-life-cycle-amastigote-promastigote-leptomonad-form-54254041.jpg>)

### 1.1.2 Κύκλος ζωής του παρασίτου

Το παράσιτο σε προμαστιγωτή μορφή ενοφθαλμίζεται στον άνθρωπο κατά το τσίμπημα τις σκνίπας. Στο σημείο αυτό το παράσιτο φαγοκυτταρώνεται από τα τοπικά μακροφάγα και εντός του κυττάρου αλλάζει μορφή (αμαστιγωτή μορφή) και πολλαπλασιάζεται. Όταν ο ενδοκυττάριος αριθμός τους αυξηθεί τότε το μακροφάγο λύεται και οι θυγατρικές αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου μολύνουν νέα κύτταρα <sup>[2]</sup> (Εικόνα 3). Η εκ νέου μόλυνση και καταστροφή των κυττάρων συμβαίνει περίπου κάθε 12-24 ώρες.<sup>[3]</sup> Ο κύκλος ολοκληρώνεται όταν μια σκνίπα απομυζείται αίμα αρρώστου και μολύνεται με το παράσιτο καθώς προσλαμβάνει μολυσμένα μακροφάγα/μονοπύρρηνα από το αίμα ή το υγρό των ιστών. Στο έντερο του εντόμου το μακρογάφο λύεται και το παράσιτο αλλάζει πάλι μορφή, αποκτάει μαστίγιο και κατά συνέπεια κινητικότητα (προμαστιγωτή μορφή). Στην συνέχεια, πολλαπλασιάζεται με απλή διχοτόμηση και κατευθύνεται προς τον οισοφάγο και την προβοσκίδα του εντόμου. Εκεί συμβαίνει και η ωρίμανση των παρασίτων στην πιο μολυσματική τους μορφή, την μετακυκλική προμαστιγωτή μορφή. Έτσι, μετά από 3 -5 μέρες η σκνίπα είναι ικανή να μολύνει έναν υγιή ξενιστή.<sup>[1]</sup>



Εικόνα 2:Κύκλος ζωής του παρασίτου, (Πηγή: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>)



Εικόνα 3: **Αριστερά:** Έγχρωμο παρασκεύασμα μυελού των οστών. Απεικονίζεται ένα μακροφάγο μολυσμένο με αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *Leishmania spp.*, (Πηγή: <https://imagebank.hematology.org/image/63657/leishmania-amastigote-in-bone-marrow-macrophage/>)// **Δεξιά:** Έγχρωμο παρασκεύασμα καλλιέργειας. Απεικονίζονται προμαστιγωτές μορφές του *L.donovani*. Διακρίνονται καθαρά δύο δομές στο εσωτερικό των παρασίτων, ο πυρήνας και ο κινητοπλάστης, (Πηγή: [https://twitter.com/explora\\_ciencia/status/1357818839073972231](https://twitter.com/explora_ciencia/status/1357818839073972231))

### 1.1.3 Ενδιάμεσος ξενιστής και δεξαμενή του παρασίτου

Υπάρχουν πάνω από 800 είδη σκνίπας, παρόλα αυτά περίπου 80 από αυτές είναι ικανά να μεταδώσουν το παράσιτο *Leishmania*. Η κατανομή των σκνιπών εξαρτάται από τις τοπικές γεωγραφικές συνθήκες και του κλιματικούς παράγοντες. Έτσι, στην Ευρώπη, την Ασία και την Αφρική ο κύριος μεταδότης του παρασίτου είναι οι σκνίπες του γένους *Phlebotomous* (Εικόνα 4), ενώ στην Αμερική του γένους *Lutzomyia* (Εικόνα 5). Στις Μεσογειακές χώρες βρέθηκαν 19 είδη σκνιπών και στην Ελλάδα 12.<sup>[1]</sup> Ορισμένες από αυτές απομυζούν αίμα αποκλειστικά από ζώα (ζωόφιλες), άλλες μόνο από ανθρώπους (ανθρωπόφιλες) και άλλες και από τα δύο (ζωοανθρωπόφιλες). Στην χώρα μας η αναλογία λειψμανίασης στον άνθρωπο σε σχέση με τα ζώα και ιδιαίτερα τον σκύλο είναι 1:2000 έως και 1:5000 ανάλογα την περιοχή. Μπορούμε να συμπεράνουμε λοιπόν πως η μετάδοση από τον σκύλο στον άνθρωπο είναι αρκετά δύσκολη.<sup>[1]</sup> Η κύρια αιτία μόλυνσης του ανθρώπου στην χώρα μας φαίνεται να είναι δυο αυτόχθονα είδη, *L.infantum* και *L.tropica*, που εντοπίζονται σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας προκαλώντας περιστασιακές μολύνσεις σε παιδιά και ανοσοκατασταλμένους.<sup>[17]</sup> Ένας ακόμη πιθανός τρόπος μετάδοσης της νόσου αποτελεί η είσοδος νοσούντων μεταναστών από χώρες τις κεντρικής Ασίας, Μέσης Ανατολής, Ανατολικής και Κεντρικής Αφρική. Σε αυτήν την περίπτωση η μόλυνση επιτυγχάνεται διαμέσου ανθρωπόφιλων σκνιπών.<sup>[1]</sup> Η σκνίπα αποτελεί υποχρεωτικό ενδιάμεσο ξενιστή ώστε να καταστεί η εκ



νέου μόλυνση καθώς μόνο εντός αυτής το παράσιτο μπορεί να ωριμάσει στην μολυσματική του μορφή.<sup>[1]</sup> Τέλος, να σημειωθεί πως τα βιολογικά χαρακτηριστικά κάθε ενδιάμεσου ξενιστή έχουν άμεση συσχέτιση όχι μόνο με την επιδημιολογία του παρασίτου αλλά και την μορφή λεισμανίασης που προκαλούν.<sup>[3]</sup>

Την δεξαμενή του παρασίτου αποτελούν ανάλογα με την γεωγραφική εξάπλωση της σκνίπας, διάφορα θηλαστικά όπως σκύλοι, γάτες, λύκοι, αλεπούδες, νυχτερίδες, τρωκτικά. Διάφορες μορφές λεισμανίασης είναι ενδημικές σε 98 χώρες <sup>[18]</sup> και κάθε χρόνο, κατά προσέγγιση, καταγράφονται 700.000 με 1.000.000 νέα κρούσματα λεισμανίασης σε όλον τον κόσμο.<sup>[16]</sup> Παρόλα αυτά πάνω από το 90% των κρουσμάτων σπλαχνικής λεισμανίασης καταγράφονται σε 5 χώρες: Μπαγκλαντές, Βραζιλία, Ινδία, Νεπάλ, Σουδάν. Σποραδικά κρούσματα παρατηρούνται και στο Μεξικό, την κεντρική και νότια Αμερική, μέση Ανατολή και Αφρική. Στην Ελλάδα, τα κρούσματα λεισμανίασης στους ανθρώπους είναι σπάνια με τα περισσότερα να παρατηρούνται στην περιοχή της Κρήτης.<sup>[23]</sup> Αντίθετα, στους σκύλους η λεισμανίαση θεωρείται ένα από τα συχνά λοιμώδη νοσήματα στην Ελλάδα.<sup>[1]</sup>



Εικόνα 4: Σκνίπα γένους *Phlebotomus*,  
(Πηγή: <https://en.wikipedia.org/wiki/Phlebotominae>)



Εικόνα 5: Σκνίπα γένους *Lutzomyia*, Wikipedia  
(Πηγή: <https://en.wikipedia.org/wiki/Lutzomyia>)

## 1.2 Κλινικές μορφές λεισμανίασης

Το γένος *Leishmania* είναι υπεύθυνο για την νόσο λεισμανίαση που στον άνθρωπο εκδηλώνεται με 3 διαφορετικές κλινικές μορφές. Έτσι έχουμε την **σπλαχνική λεισμανίαση** ή Δονοβάνειος (ή νόσος Kala-azar στην Ινδία), την **δερματική λεισμανίαση** (ή Χανιώτικο σπυρί στην Ελλάδα) με δερματικές εκδηλώσεις και τέλος την **βλεννογονοδερματική λεισμανίαση** (ή Espundia) με εντοπίσεις στους βλεννογόνους του

ρινοφάρυγγα.<sup>[2]</sup> Ο λόγος ύπαρξης αυτής της ποικιλίας διαφορετικών κλινικών εκδηλώσεων φαίνεται να οφείλεται όχι μόνο στα διαφορετικά στελέχη του παρασίτου αλλά και στην ανοσολογική απάντηση του ασθενούς.<sup>[3]</sup>

Η **σπλαχνική λεισμανίαση** (ΣΛ) προκαλείται κυρίως από τα στελέχη του συμπλέγματος *L. donovani* (*L. infantum*, *L. donovani*). Κατά το τσίμπημα της σκνίπας, τα παράσιτα σε μετακυκλική προμαστιγωτή μορφή παρασύρονται και ενοφθαλμίζονται στο σημείο νύξης. Εκεί προκαλούν φλεγμονή προσελκύοντας τα τοπικά μακροφάγα. Τα μακροφάγα φαγοκυτταρώνουν τα παράσιτα. Τα παράσιτα εντός του φαγολυσοσώματος που σχηματίζεται, πρώτα αλλάζουν μορφή χάνοντας το μαστίγιο τους (αμαστιγωτή μορφή) και ύστερα πολλαπλασιάζονται. Τα μολυσμένα μακροφάγα μεταφέρονται στον υποδόριο ιστό ενώ τα παράσιτα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται εντός του φαγολυσοσώματος. Εκεί το μακροφάγο λύεται και απελευθερώνονται αρκετές αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου έτοιμες να μολύνουν υγιή κύτταρα. Τα θυγατρικά αυτά παράσιτα μολύνουν κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (ΔΕΣ), μονοκύτταρα του αίματος και σπανιότερα πολυμορφοκύτταρα ουδετερόφιλα. Εντός αυτών των κυττάρων τα παράσιτα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται και μέσω της λέμφου ή της αιματικής κυκλοφορίας διασπείρονται στα σπλάχνα. Τα κύρια όργανα στα οποία εντοπίζεται το παράσιτο είναι οι λεμφαδένες, ο σπλήνας, το ήπαρ, ο μυελός των οστών, ο πνεύμονας και τέλος το έντερο. Στους ασθενείς εμφανίζεται διαλείπων ή κυματοειδής πυρετός κατά την εγκατάσταση της νόσου, αναιμία, αδυνάτισμα και καχεξία, διόγκωση του ήπατος και του σπλήνα. Αν ο άρρωστος δεν λάβει φαρμακευτική αγωγή πεθαίνει σε 8 μήνες έως και 2 έτη από πολυοργανική ανεπάρκεια. Το ποσοστό θνησιμότητας είναι αρκετά υψηλό ( 90%).<sup>[2]</sup> <sup>[4]</sup>



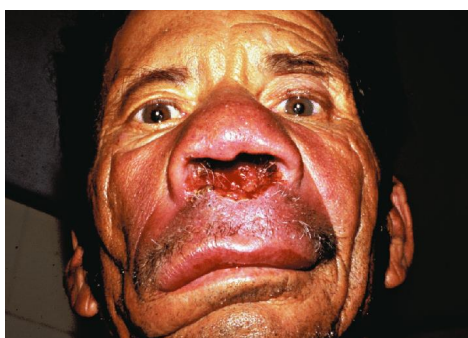
Εικόνα 6: Σπλαχνική λεισμανίαση. Απεικονίζεται ασθενής στον οποίο παρατηρείται διόγκωση του σπλήνα. (Πηγή: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/disease.html>)

Η **δερματική λεισμανίαση** εμφανίζεται κυρίως στις χώρες της Άπω και Μέσης Ανατολής, της Κεντρικής Αμερικής και της λεκάνης της Μεσογείου. Το παράσιτο εντοπίζεται στο ΔΕΣ του δέρματος και ο ασθενής εμφανίζει δερματικές εξελκώσεις και βλατίδες στο σημείο του τσιμπήματος. Η Λεισμάνια πολλαπλασιάζεται εντός των κυττάρων με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε στη σπλαχνική μορφή. Παρόλα αυτά, για άγνωστους λόγους η εξέλιξη του παρασίτου και η λοιμογόνος δράση του εντοπίζεται σε μικρή περιοχή δέρματος. Πιθανότατα σχετίζεται με το υποείδος του παρασίτου. Η επώαση κατά κανόνα διαρκεί 5-6 μήνες. Ο ασθενής εμφανίζει φαγούρα στο σημείο του τσιμπήματος και αργότερα σχηματίζεται μια ελκώδης αλλοίωση. Διακρίνουμε δύο μορφές έλκους, το ξηρό και το υγρό. Τα έλκη αυτά εντοπίζονται συνήθως σε ακάλυπτα σημεία του σώματος. Η νόσος εμφανίζει ήπια εξέλιξη χωρίς έντονα συμπτώματα, έχει τάση αυτοϊασης και αφήνει ανοσία. Τελικά, σχηματίζεται μια ουλώδης παραμόρφωση στο σημείο της ελκώδους αλλοίωσης (Εικόνα 7). Τέλος, να σημειωθεί ότι η μετάδοση επιτυγχάνεται μόνο αν η σκνίπα τραφεί πάνω στις δερματικές εστίες του πάσχοντα, καθώς μόνο εκεί ανευρίσκεται το παράσιτο.<sup>[2] [4]</sup>



Εικόνα 7: Δερματική λεισμανίαση. Παρατηρείται η πορεία βελτίωσης της αρχικής βλατίδας (Α) με την χρήση τοπικών φαρμακευτικώνσκευασμάτων. Επίσης, παρατηρείται η ουλώδη παραμόρφωση (Ε) που αφήνει η δερματική βλάβη όταν ιαθεί πλήρως, (Πηγή: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S168411822030164X>)

Η **βλεννογονοδερματική λεισμανίαση** συναντάται κυρίως στις χώρες της Νότιας Αμερικής. Το παράσιτο εντοπίζεται στο ΔΕΣ των βλεννογόνων του στόματος, του ρινοφάρυγγα και του λάρυγγα, προκαλώντας ελκωτικές βλάβες σε αυτούς. Προσβάλλονται επίσης τα μαλακά μόρια της μύτης, του στόματος και των χειλιών και συχνά εμφανίζονται παραμορφωτικές βλάβες. Αρκετές φορές συνυπάρχει φλεγμονή στους τραχηλικούς αδένες.<sup>[2] [4]</sup>



Εικόνα 8: Βλεννογονοδερματική λεισμανίαση. Ασθενής από την Ονδούρα στον οποίο παρατηρείται παραμόρφωση του προσώπου λόγω οιδήματος του βλεννογόνου, (Πηγή: [https://www.researchgate.net/figure/Mucocutaneous-leishmaniasis-in-Honduran-patient-Note-crusted-vegetative-and-heavily\\_fig16\\_235170856](https://www.researchgate.net/figure/Mucocutaneous-leishmaniasis-in-Honduran-patient-Note-crusted-vegetative-and-heavily_fig16_235170856))

## 1.3 Διάγνωση λεισμανιάσεων

### 1.3.1 Σπλαχνική λεισμανίαση

Η διάγνωση της σπλαχνικής λεισμανίασης γίνεται με τους παρακάτω τρόπους: κλινική εξέταση, παρασιτολογική εξέταση, ορολογικές δοκιμασίες και μοριακός έλεγχος. Κατά την **κλινική εξέταση** εκτιμώνται τα συμπτώματα της ΣΛ όπως η σπληνομεγαλία, η ηπατομεγαλία και ο υψηλός κυματοειδής πυρετός. Ωστόσο, τα στοιχεία αυτά δεν αρκούν για την πλήρη διαφοροδιάγνωση της νόσου.<sup>[2]</sup>

Η οριστική διάγνωση γίνεται με την **παρασιτολογική εξέταση**, δηλαδή την αναζήτηση του παρασίτου στους ιστούς. Για τον σκοπό αυτό γίνεται βιοψία (ήπαρ, λεμφαδένες, μυελός των οστών, σπλήνα).<sup>[2]</sup> Η αναζήτηση του παρασίτου σε αυτά τα δείγματα ιστού είναι μία από τις ακριβότερες μεθόδους διάγνωσης αυτών των λοιμώξεων. Χρησιμοποιείται βελόνα μικρής διαμέτρου για να αποφθεχθούν, όσο το δυνατόν, οι επιπλοκές της παρακέντησης. Ένα μέρος του παρασκευάσματος χρησιμοποιείται για μικροσκοπική εξέταση (άμεσο παρασκεύασμα) και το υπόλοιπο καλλιεργείται. Το υλικό από την βιοψία ήπατος έχει λιγότερες πιθανότητες να μας αποκαλύψει παράσιτα σε άμεση εξέταση ή σε καλλιέργεια. Όμως μια ιστολογική εξέταση θα δείξει αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου εντός των μακροφάγων Kupffer του πυλαίου συστήματος. Παρόλο το υψηλό κόστος, τα παρασκευάσματα ήπατος και σπλήνα είναι πολύ χρήσιμα και αξιόπιστα καθώς το 90% των ασθενών με ενεργή λοίμωξη εμφανίζουν παράσιτα σε αυτά. Άλλα δείγματα ιστού που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αυτόν τον σκοπό είναι ο μυελός των οστών (80% θετικό αποτέλεσμα σε καλλιέργεια), διογκωμένα λεμφαγγεία (60% θετικό αποτέλεσμα) και το περιφερικό αίμα (λίγες περιπτώσεις).<sup>[2]</sup>

Οι **ορολογικές δοκιμασίες** βασίζονται στην παρουσία ειδικών αντισωμάτων στον ορό του ασθενούς στις περιπτώσεις της ΣΛ. Υπάρχουν μη **ειδικές ορολογικές δοκιμασίες** που βασίζονται στην αυξημένη τιμή των ανοσοσφαιρινών και την αντιστροφή της σχέσης αλβουμίνης/σφαιρινών (δοκιμασία ζελατινοποίησης φορμόλης, ηλεκτροφόρηση, και δοκιμασία αποσταγμένου ύδατος) και **ειδικές δοκιμασίες** που ανιχνεύουν συγκεκριμένα αντισώματα έναντι αντιγόνων του παρασίτου (Άμεση και έμμεση Αιμοσυγκόλυση, Έμμεσος Ανοσοφθορισμός, ELISA και Δερματοαντίδραση Montenegro). Οι ορολογικές δοκιμασίες είναι οικονομικές, παρόλα αυτά φέρουν ένα σημαντικό μειονέκτημα.<sup>[2]</sup>

Δεν είναι αρκετά αξιόπιστες καθώς υπάρχουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλους μικροοργανισμούς και για αυτό συνήθως χρησιμοποιούνται επικουρικά ή για την παρακολούθηση της νόσου.<sup>[2]</sup>

Τέλος, ο **μοριακός έλεγχος** βασίζεται στην μέθοδο της PCR (polymerase chain reaction). Για διαγνωστικούς αλλά και για επιδημιολογικούς σκοπούς χρησιμοποιούνται εναρκτήρια μόρια που ενισχύουν αλληλουχίες kinetoplast DNA (kDNA) και ριβοσωμικό RNA (rRNA) που έχουν μεγαλύτερη ακρίβεια και ειδικότητα καθώς οι αλληλουχίες αυτές είναι συγκεκριμένες για κάθε είδος ή σύμπλεγμα *Leishmania*.<sup>[2]</sup>

### 1.3.2 Δερματική Λεισμανίαση

Η διάγνωση της δερματικής λεισμανίασης γίνεται με την αναζήτηση του παρασίτου σε έγχρωμα παρασκευάσματα υλικού που λαμβάνεται από τις δερματικές εστίες. Αν και μπορεί να υπάρχουν αντισώματα στον ορό των ασθενών, συνήθως ο τίτλος τους είναι χαμηλός και δεν έχουν μεγάλη διαγνωστική αξία. Εάν υπάρχουν εξελκώσεις τότε γίνονται επιστρώσεις (ξηρό παρασκεύασμα) από υλικό που συλλέγεται κατά τον σκαρφισμό των δερματικών εστιών. Σε περίπτωση έλκους παίρνουμε υλικό με κρίκο ή καλύτερα με παρακέντηση και το βάφουμε με χρώση Giemsa ή Leishman.<sup>[2]</sup>

### 1.3.3 Βλεννογονοδερματική Λεισμανίαση

Η βλεννογονοδερματική λεισμανίαση προκαλείται κυρίως από το στέλεχος *L. braziliensis*. Ο αριθμός των παρασίτων στο άμεσο παρασκεύασμα μπορεί να μικρός και το συγκεκριμένο στέλεχος του παρασίτου καλλιεργείται δύσκολα. Στην περίπτωση αυτή, η διάγνωση βασίζεται εκτός από τα κλινικά ευρήματα, στην θετική αντίδραση Montenegro (>80% θετικό αποτέλεσμα) και στην παρουσία αντισωμάτων (Έμμεσος ανοσοφθορισμός με αντιγόνο αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου, 96% θετικό αποτέλεσμα).<sup>[2]</sup>

## **1.4 Θεραπεία Λεισμανίασης**

Η θεραπεία της λεισμανίασης αποτελεί πρόκληση καθώς i) υπάρχουν λίγα διαθέσιμα φάρμακα που είναι ακριβά και αρκετά τοξικά για τον άνθρωπο, ii) αρκετοί ασθενείς δεν έχουν πρόσβαση σε αυτά (διαμονή σε απομακρυσμένες περιοχές, έλλειψη

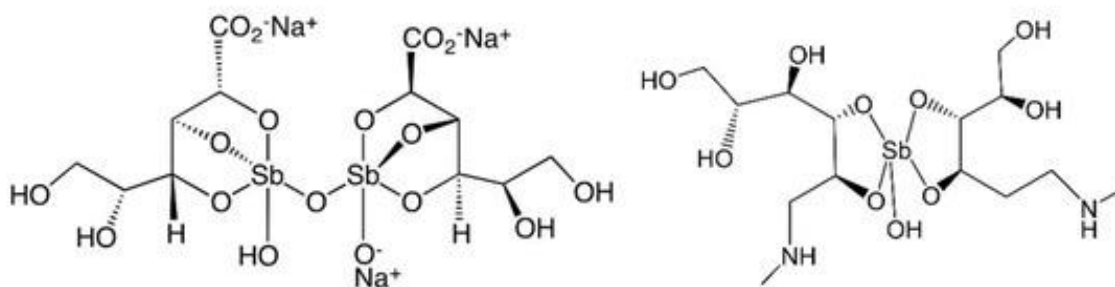
νοσοκομειακών δομών κ.α) και iii) η διάρκεια της αγωγής είναι αρκετά μεγάλη (μήνες έως και 2 έτη) έχοντας μεγάλη επίπτωση στην οικονομική κατάσταση της οικογένειας. [3]

Οι **πεντασθενείς ενώσεις του αντιμονίου** σε μορφή διάφορων σκευασμάτων αποτελούσε πρώτης γραμμής αντιμετώπιση της ΣΛ στην Ινδία. Δυστυχώς, την τελευταία 20ετία εμφανίζονται ολοένα και περισσότερα ανθεκτικά στελέχη στα φάρμακα του αντιμονίου. Στην Ινδία έχουν παρατηρηθεί τα περισσότερα ανθεκτικά στελέχη στην συγκεκριμένη κατηγορία φαρμάκων. Για αυτό τον λόγο το ενδιαφέρον στράφηκε σε άλλες ουσίες με σκοπό την αποφυγή της αντίστασης. Η πρώτη ανακάλυψη ήταν η από του στόματος **μιλτεφοσίνη** (κατοχυρώθηκε το 2002, Ινδία), ακολουθούμενη από την ενέσιμη **παρομομυκίνη** (κατοχυρώθηκε το 2006, Ινδία), διάφορα συνδυαστικά φαρμακευτικά σχήματα και τέλος η **λιποσωμική αμφοτερικίνη Β**. [3] [4]

Φάρμακο	Δοσολογία φαρμακευτικού σχήματος	Εμπορικό όνομα	Ανεπιθύμητες ενέργειες
<b>Πεντασθενές αντιμόνιο</b>	20 mg/kg για 20 – 30 μέρες (ανάλογα το είδος του παρασίτου και τις λοιμώξεις), ενδοφλέβια χορήγηση	Pentostam (Glaxo Smith Kline) Stibanate (GLuconate Ltd, India) Generic sodium stibogluconate (Albert David Ltd, India) Glycantime (Aventis Pharma)	Καρδιοτοξικότητα, αύξηση δεικτών ηπατικής ή και παγκρεατικής λειτουργίας, μυαλγία, αρθραλγία, κοιλιακός πόνος, καρδιοτοξικότητα
<b>Αμφοτερικίνη Β</b>	10–20 mg/kg συνολικής δόσης (χορηγούνται σε διαιρεμένες δόσεις) εντός 10–20 ημερών, ενδοφλέβια χορήγηση	Fungizone (Bristol-Myers-Squibb, USA)	Πυρετό, ρίγος, υπόταση, κεφαλαλγία, αναιμία, νεφροτοξικότητα
<b>Λιποσωμική αμφοτερικίνη Β</b>	Ίδια ή μικρότερη ποσότητα συνολικής δόσης (χορηγείται σε διαιρεμένες δόσεις), ενδοφλέβια χορήγηση	Ambisome (Gilead NeXsrar και Fujisawa Healthcare USA, Inc)	Η συμπτωματολογία των παρενεργειών δεν διαφέρει τόσο ποιοτικά όσο στην ένταση και στην συχνότητα εμφάνισης τους
<b>Παρομομυκίνη</b>	Παρεντερική (ΣΛ, 14 mg/kg για 20 μέρες) ή τοπική (ΔΛ) χορήγηση. Συνήθως χορηγείται σε συνδιασμό με άλλες φαρμακευτικές ουσίες	- (TDR)	Ωτοτοξικότητα
<b>Μιλτεφοσίνη</b>	Από του στόματος, 2,5 mg/kg ημερησίως (2 διαιρεμένες δόσεις) για 28 ημέρες	Impavido (Zentaris)	Ναυτία, εμετός διάρροια,

Πίνακας 2: Συνοπτικός πίνακας με κάποιες από τις φαρμακευτικές αγωγές που χορηγούνται για την αντιμετώπιση των λειψομανιάσεων [3]

### 1.4.1 Πεντασθενείς ενώσεις αντιμονίου

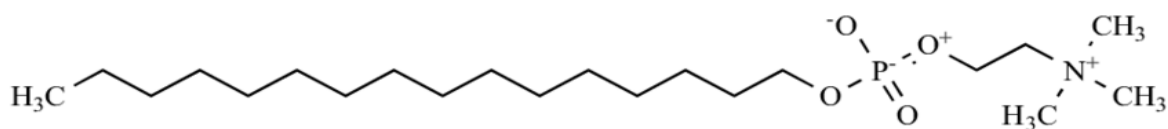


Εικόνα 9: Πεντασθενείς ενώσεις αντιμονίου, Στιβογλυκονικό Νάτριο (αριστερά) και μεγλουμίνη αντιμονίου (δεξιά), (Πηγή: [https://en.wikipedia.org/wiki/Sodium\\_stibogluconate](https://en.wikipedia.org/wiki/Sodium_stibogluconate))

Οι ενώσεις αυτής της κατηγορίας όπως το στιβογλυκονικό νάτριο και η μεγλουμίνη αντιμονίου θεωρούνται γενικά φάρμακα πρώτης γραμμής για την θεραπεία της δερματικής και σπλαχνικής λεισμανίασης.<sup>[5]</sup> Τα πεντασθενή αντιμονιακά είναι σχετικά μη τοξικά και αποτελούν προφάρμακο. Κατά τον μεταβολισμό τους ανάγονται στην πιο τοξική τους μορφή Sb(III) που σκοτώνει αποτελεσματικά τις αμαστιγωτές μορφές μέσα στα φαγολυσοσώματα των μακροφάγων. Η ανηγμένη αυτή μορφή φαίνεται να εμπλέκεται με το οξειδο-αναγωγικό σύστημα της τρυπανοθειόνης. Το σύστημα αυτό αποτελεί τον κύριο μηχανισμό θειολικής αναγωγής του παρασίτου. Το Sb(III) φαίνεται να προκαλεί ταχεία εκροή της τρυπανοθειόνης και της γλυταθειόνης από το παράσιτο καθώς και αναστέλλει την αναγωγή της τρυπανοθειόνης. Έτσι συσσωρεύονται ελεύθερες ρίζες εντός του παρασίτου και προκαλούνται οξειδωτικές βλάβες στις πρωτεΐνες, στην κυτταρική μεμβράνη αλλά και στο DNA, με αποτέλεσμα τα παράσιτα να πεθαίνουν.<sup>[5]</sup> <sup>[7]</sup>

Τα φάρμακα χορηγούνται παρεντερικά (είτε με ενδομυϊκή ένεση, είτε με ενδοφλέβια έγχυση) και απορροφούνται ταχέως. Απομακρύνονται σε δύο φάσης, με βραχεία (περίπου 2 ώρες μετά την χορήγηση) και πολύ μακρύτερη (>24 ώρες) ημιζωή.<sup>[6]</sup> Η καθιερωμένη αγωγή είναι η εφάπαξ ημερήσια δόση 20 mg/kg για διάστημα 21 ημερών για την θεραπεία της δερματικής λεισμανίασης και 28 ημερών για την σπλαχνική μορφή. Κάποια μειονεκτήματα αυτού του σχήματος είναι ο πόνος κατά την ενδομυϊκή χορήγηση αλλά και η καρδιοτοξικότητα του φαρμάκου. Οι τοξικές αντιδράσεις είναι συνήθως αναστρέψιμες και υποχωρούν παρά την συνέχιση της θεραπείας.<sup>[5]</sup> Στην Ινδία το στιβογλυκονικό νάτριο είναι πρακτικά μη-αποτελεσματική θεραπεία και δεν συνιστάται λόγος της φαρμακευτικής αντοχής που έχει αναπτύξει το παράσιτο.<sup>[6]</sup>

### 1.4.2 Μιλτεφοσίνη

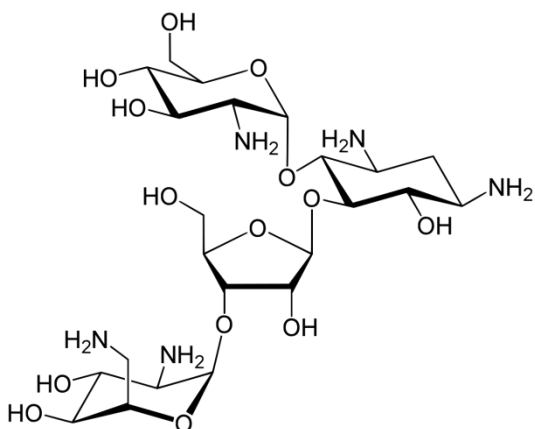


Εικόνα 10: Μοριακή δομή της μιλτεφοσίνης, (Πηγή: [https://www.researchgate.net/figure/Fig-12a-Chemical-Structure-of-Miltefosine\\_fig10\\_259658054](https://www.researchgate.net/figure/Fig-12a-Chemical-Structure-of-Miltefosine_fig10_259658054))

Η μιλτεφοσίνη αποτελεί ανάλογο της αλκυλοφωσφοχολίνης. Αρχικά αναπτύχθηκε ως αντικαρκινικό φάρμακο. Ο μηχανισμός δράσης του φαρμάκου δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός. Φαίνεται να παρεμβαίνει στην βιοσύνθεση των λιπιδίων τροποποιώντας έτσι το λιπιδικό προφίλ του παρασίτου, εμποδίζοντας παράλληλα την κυτταρική σηματοδότηση.<sup>[5]</sup> Συγκεκριμένα δρα στην φωσφολπάση C και την πρωτεϊνική κινάση C του παρασίτου, δύο ένζυμα που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του μεταβολισμού και στον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης του παρασίτου.<sup>[19]</sup> Επιπλέον, εμποδίζει το σύμπλεγμα του κυτοχρώματος εντός του μιτοχονδρίου του παρασίτου με αποτέλεσμα την μείωση ενδοκυττάριου ATP και την επαγωγή απόπτωσης.<sup>[6]</sup> Η μιλτεφοσίνη είναι αρκετά ανεκτή και πολύ αποτελεσματική στην θεραπεία της ΣΛ καθώς και των δερματικών μορφών της νόσου. Χορηγείται αποκλειστικά από του στόματος καθώς η ενδοφλέβια χορήγηση έχει αιμολυτική δράση. Στις ΗΠΑ η προτεινόμενη δόση για την θεραπεία τόσο της ΣΛ όσο και της ΔΛ είναι 2,5 mg/kg ημερησίως σε 2 διαιρεμένες δόσεις ή για 28 ημέρες. Απορροφάται καλά από το γαστρεντερικό σύστημα και κατανέμεται σε ολόκληρο το σώμα. Ο μεταβολισμός της δεν έχει μελετηθεί εκτενώς, παρόλα αυτά το συγκριμένο φάρμακο έχει μεγάλο χρόνο ημιζωής ( $t_{1/2}$ = 1 έως 4 βδομάδες) και οι συγκεντρώσεις του στο πλάσμα είναι ανάλογες της αρχικής δόσης. Κάποιες από τις συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες αποτελούν ο εμετός και η διάρροια. Αναφέρονται επίσης αύξηση των ηπατικών ενζύμων στον ορό. Αυτές οι αντιδράσεις είναι τυπικά ήπιες και αναστρέψιμες. Παρόλα αυτά η μιλτεφοσίνη έχει ένα κύριο μειονέκτημα. Έχει τερατογόνο δράση γι αυτό και πρέπει να αποφεύγεται κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης. Η μιλτεφοσίνη εγκρίθηκε στην Ινδία και αποτελεί πλέον θεραπεία εκλογής της ΣΛ, καθώς οι πεντασθενείς ενώσεις του αντιμονίου παρουσιάζουν μειονεκτήματα όπως η παρεντερική χορήγηση, η τοξικότητα και η θεραπευτική αποτυχία. Δυστυχώς και στη μιλτεφοσίνη άρχισε να εμφανίζεται αντίσταση.<sup>[5]</sup>



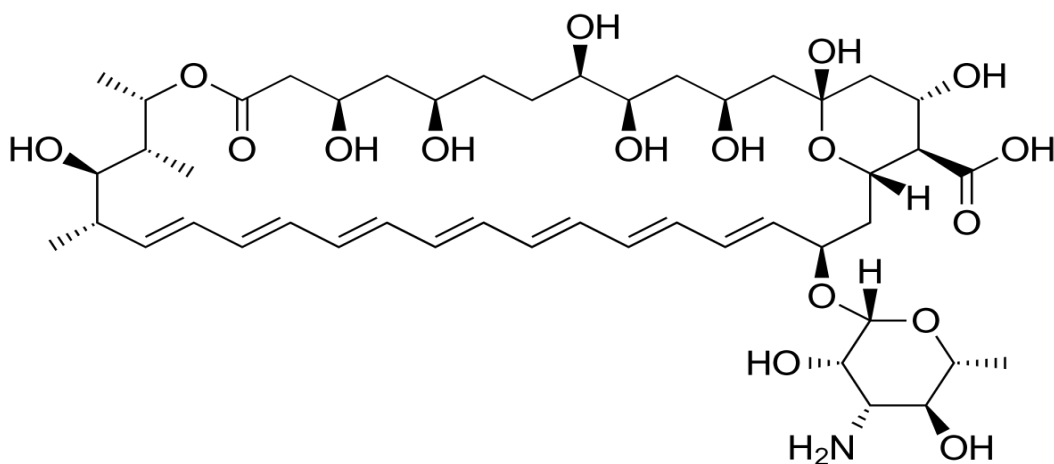
### 1.4.3 Παρομομυκίνη



Εικόνα 11: Μοριακή δομή της παρομομυκίνης, (Πηγή: <https://en.wikipedia.org/wiki/Paromomycin>)

Η παρομομυκίνη ανήκει στην κατηγορία των αμινογλυκοσιδικών αντιβιοτικών.<sup>[5]</sup> Έχει τον ίδιο μηχανισμό δράσης με την νεομυκίνη και καναμυκίνη, ουσιαστικά μπλοκάρει την 30S υπομονάδα του ριβοσώματος του παρασίτου. Έτσι, η πρωτεϊνσύνθεση αναστέλλεται και το παράσιτο σταματάει να πολλαπλασιάζεται εντός του μακροφάγου. Το συγκεκριμένο φάρμακο δεν απορροφάται από το γαστρεντερικό σύστημα και γι αυτό χορηγείται παρεντερικά μεμονωμένα (14 mg/kg για 20 μέρες) είτε σε συνδυασμό με το αντιμόνιο για την θεραπεία της σπλαχνική λεισμανίαση. Είναι επίσης αποτελεσματική στην αντιμετώπιση της δερματικής λεισμανίασης. Για τον σκοπό αυτό χορηγούνται τοπικά σκευάσματα (15% παρομομυκίνη με 12% χλωριούχο μεθυλοβενζόλιο) στην πάσχουσα περιοχή.<sup>[5]</sup> [6]

### 1.4.4 Αμφότερικίνη Β



Εικόνα 12: Μοριακή δομή της αμφότερικίνης Β. Διακρίνονται ξεκάθαρα η πολυενική πλευρά και η πλούσια σε υδροξύλια πλευρά του μορίου, (Πηγή: [https://en.wikipedia.org/wiki/Amphotericin\\_B](https://en.wikipedia.org/wiki/Amphotericin_B))

Η αμφότερικίνη Β είναι μια αμφότερική πολυενική μακρολίδη, σχεδόν αδιάλυτη στο νερό. Χορηγείται ενδοφλεβίως σε μορφή κολλοειδούς εναιωρήματος και είναι υψηλά αποτελεσματική στις περιπτώσεις ΣΛ (>90%).<sup>[5]</sup> Στις ανεπτυγμένες χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης και Η.Π.Α η αμφότερικίνη Β αποτελεί το πρώτο φάρμακο επιλογής για την

αντιμετώπιση της ΣΛ. Επιπλέον, είναι δεύτερης γραμμής φάρμακο στην ΔΛ και ΒΔΛ. Έχει, επίσης, επιλεκτική δράση έναντι των μυκήτων και του Τρυπανοσώματος (*T. cruzi*).<sup>[6]</sup> Η επιλεκτικότητα αυτή οφείλεται στην υψηλότερη συγγένεια του φαρμάκου προς την εργοστερόλη, την κυρίαρχη στερόλη αυτών των οργανισμών, παρά προς την χοληστερόλη του κυττάρου ξενιστή των θηλαστικών. Η ευαισθησία των οργανισμών στην αμφοτερικίνη Β ποικίλει καθώς η ποσότητα και η ποιότητα των στερολών διαφέρουν ανάλογα το είδος. Πιο συγκεκριμένα η αμφοτερικίνη Β συνδέεται με μεγαλύτερη συγγένεια στην εργοστερόλη της κυτταρικής μεμβράνης του παρασίτου διαμέσου της πλούσιας σε διπλούς δεσμούς πλευράς της δομής της. Συνδέεται επίσης με μόρια νερού μέσω της πλούσιας σε υδροξύλια πλευράς της. Αυτή η αμφίπλευρη σύνδεση τροποποιεί την διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης και τελικά, μέσω πολλαπλών μορίων αμφοτερικίνης Β, σχηματίζονται πόροι. Οι πόροι αυτοί επιτρέπουν την διαφυγή ενδοκυττάρων ιόντων καθώς και μακρομορίων, οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο. Αναπόφευκτα, το φάρμακο συνδέεται σε κάποιο βαθμό και στις ανθρώπινες στερόλες, κάτι που δικαιολογεί την τοξικότητα που παρουσιάζει. Οι σχετιζόμενες με την έγχυση παρενέργειες είναι γενικευμένες και αφορούν τον πυρετό, ρίγος, υπόταση, κεφαλαλγία και μπορούν να μετριαστούν με την επιβράδυνση του ρυθμού χορήγησης και την μείωση της δόσης. Η κυριότερη ανεπιθύμητη ενέργεια είναι η νεφροτοξικότητα. Η νεφρική βλάβη απαντάται σχεδόν σε όλους τους ασθενείς που θεραπεύονται με κλινικές δόσεις αμφοτερικίνης Β. Το τυπικό σχήματα αποτελείται από ενδοφλέβια σκευάσματα 10-20 mg/kg συνολικής δόσης, που χορηγούνται σε διαιρεμένες δόσεις, εντός 10-20 ημερών.<sup>[5]</sup>

Η θεραπεία με αμφοτερικίνη Β συχνά περιορίζεται λόγω της τοξικότητας με κύρια την φαρμακοεπαγόμενη νεφρική ανεπάρκεια. Αυτό οδήγησε στην σύνθεση της λιποσωμικής αμφοτερικίνης Β. Το λιπιδικά σκευάσματα περιέχουν την αμφοτερικίνη Β συνδεδεμένη σε λιπιδικούς φορείς διανομής. Το μόριο της αμφοτερικίνης Β συνδέεται με τα λιπίδια του μεταφορέα με μια συγγένεια μεταξύ εκείνης για την εργοστερόλη και εκείνης για την ανθρώπινη χοληστερόλη. Αυτός ο λιπιδικός μεταφορέας χρησιμεύει σαν απόθεμα αμφοτερικίνης, ελαττώνοντας ταυτόχρονα την μη ειδική σύνδεση της με τις ανθρώπινες κυτταρικές μεμβράνες. Έτσι επιτυγχάνεται μείωση της τοξικότητας, ακόμη και σε μεγαλύτερες δόσεις, χωρίς να επηρεάζεται η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. Παρόλα αυτά, η χρήση της λιποσωμικής αμφοτερικίνης Β είναι περιορισμένη στις αναπτυσσόμενες χώρες λόγω δυσκολιών στην χορήγηση και του κόστους παραγωγής.<sup>[6]</sup>

Πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι μια δόση 5 mg/kg ακολουθούμενη από 7-14 μέρες θεραπεία με μιλτεφοσίνη από το στόμα, είναι αποτελεσματική στην θεραπεία της ΣΛ, αν και αυτό το δασολογικό σχήμα απαιτεί περισσότερη μελέτη.<sup>[5]</sup>

## 1.5 Αποτυχία θεραπείας και φαρμακοεπαγόμενη αντίσταση.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι πεντασθενείς ενώσεις του αντιμονίου αποτελούσαν για μεγάλο χρονικό διάστημα τη θεραπεία πρώτης γραμμής έναντι της λείσμανίασης. Παρόλα αυτά η χρησιμοποίησή τους στην αντιμετώπιση του νοσήματος σταμάτησε το 2005 σε κάποιες περιοχές (κυρίως στην Ινδία) καθώς αποτύχαινε η θεραπεία των ασθενών.<sup>[8]</sup> Αυτό συνέβη διότι το παράσιτο ανέπτυξε μηχανισμούς αντίστασης έναντι των ενώσεων του αντιμονίου. Η μιλτεφοσίνη εγκρίθηκε για πρώτη φορά στην Ινδία το 2002 για την θεραπεία της ΣΛ και αργότερα το 2005 στην Λατινική Αμερική για την αντιμετώπιση της ΔΛ. Στην Ελλάδα χορηγείται μόνο σε σκύλους. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν μείωση της αποτελεσματικότητας της μιλτεφοσίνης στην Ινδία και στο Νεπάλ. Σε αυτές τις περιοχές, το η μιλτεφοσίνη αντικαταστάθηκε από την λιποσωμική αμφοτερικίνη Β για την θεραπεία της ΣΛ.<sup>[8]</sup> Για να κατανοήσουμε περαιτέρω τους μηχανισμούς αντίστασης του παρασίτου θα πρέπει πρώτα να περιγράψουμε εν συντομία κάποιους βασικούς μηχανισμούς αναδιαμόρφωσης του γονιδιώματος του παρασίτου.

Το παράσιτο *Leishmania* φέρει πολλαπλές ομόλογες αλληλουχίες στο γονιδίωμα του.<sup>[9]</sup> Αυτές οι αλληλουχίες αποτελούν έναν από τους κύριους μηχανισμούς γονιδιακής αναδιαμόρφωσης για εξελικτικούς και προσαρμοστικούς σκοπούς. Για παράδειγμα, το παράσιτο μπορεί να αυξήσει την ποσότητα αντιγράφων συγκεκριμένων γονιδίων με σκοπό την αύξηση μεταγραφής και κατ'επέκταση έκφρασης ορισμένων πρωτεϊνών. Αυτό αποτελεί μια καλή λύση για το συγκεκριμένο παράσιτο που στερείται παραγόντων ρύθμισης της έναρξης της μεταγραφής. Ένας βασικός μηχανισμός προσαρμογής είναι η **επισωμική ενίσχυση γονιδίων**. Πειραματικά η επισωμική ενίσχυση εμφανίζεται γρήγορα, αλλά εξαφανίζεται επίσης γρήγορα όταν σταματήσει η πίεση του φαρμάκου. Σε απομονωμένα ανθεκτικά στελέχη παρατηρούνται **ενδοχρωμοσωμικές γονιδιακές ενισχύσεις**, δηλαδή αύξηση των αντιγράφων ενός γονιδίου σε ένα χρωμόσωμα, πιθανώς γιατί μια αλλαγή εντός του χρωμοσώματος είναι πιο σταθερή και μεταβιβάσιμη.<sup>[9]</sup>

Μια δεύτερη στρατηγική που εκμεταλλεύεται το παράσιτο για να αλλάξει τον αριθμό αντιγράφων ενός γονιδίου είναι η αύξηση του αριθμού αντιγράφων ολόκληρου του χρωμοσώματος που φέρει το συγκεκριμένο γονίδιο, δημιουργώντας **ανευπλοειδία**. Η ανευπλοειδία επιτρέπει την αύξηση ή μείωση της ποσότητας ενός γονιδίου ανάλογα τις ανάγκες αυτού. Να σημειωθεί ότι η ανευπλοειδία είναι προσαρμοστική και ευαίσθητη στις περιβαλλοντικές συνθήκες. Επίσης, δεν είναι ίδια μεταξύ των μεμονωμένων κυττάρων που αποτελούν ένα στέλεχος. Αυτός ο «μωσαϊκισμός» επιτρέπει στον πληθυσμό να έχει κύτταρα σε διαφορετικές γονιδιακές καταστάσεις, όπου τελικά αναπτύσσονται εκείνα που ανταποκρίνονται καλύτερα στις συνθήκες του περιβάλλοντος.<sup>[9]</sup>

Τέλος, οι **σημειακές νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις**, οι **εισαγωγές** μικρών αλληλουχιών ή και ολόκληρων γονιδίων και η **διαγραφή γονιδίων** αποτελούν μερικούς ακόμη μηχανισμούς.<sup>[9]</sup>

Παρακάτω αναλύονται λεπτομερώς κάποιοι από τους μηχανισμούς αντίστασης του παρασίτου σε δύο φάρμακα ενδιαφέροντος αυτής της διπλωματικής εργασίας, την μιλτεφοσίνη και τις πεντασθενείς ενώσεις του αντιμονίου.

### 1.5.1 Μηχανισμοί αντίστασης στο αντιμόνιο

Για πάνω από 60 χρόνια οι πεντασθενείς ενώσεις του αντιμονίου (Sb(V)) χρησιμοποιήθηκαν για την θεραπεία της ΣΛ και ΔΛ με ελάχιστες ενδείξεις αντίστασης. Όμως τα τελευταία 15 περίπου χρόνια η αντίσταση που παρατηρείται είναι απειλητική. Όπως σε αρκετά φάρμακα έτσι και σε αυτά έχει παρατηρηθεί μια μεταβολή στην κλινική ανταπόκριση ασθενών με ΣΛ, ΔΛ και ΒΛ. Μια εξήγηση στο φαινόμενο αυτό είναι η εγγενής διαφορά στην ευαισθησία των ειδών σε αυτά τα φάρμακα. Πιο συγκεκριμένα, μελέτες που χρησιμοποιούν το μοντέλο αμαστιγωτών-μακροφάγων αποδεικνύουν ότι το *L. donovani* και *L. brasiliensis* είναι 3 έως 5 φορές πιο ευαίσθητο στο στιβογλυκονικό νάτριο σε σχέση με το *L. tropica*, *L. major* και *L. mexicana*.<sup>[7]</sup> Στα περισσότερα μέρη του κόσμου πάνω από το 95% ασθενών με ΣΛ, που δεν είχαν υποβληθεί σε προηγούμενη θεραπεία, ανταποκρίνονται στις πεντασθενείς ενώσεις του αντιμονίου. Ωστόσο το Βόρειο Μπιχάρ της Ινδίας, όπου η ΣΛ είναι ενδημική, αποτελεί τη μοναδική περιοχή στον κόσμο που έχει αναφερθεί εκτεταμένη πρωτογενής αποτυχία στο Sb(V). Υπάρχουν ενδείξεις πως η αντίσταση εξαπλώνεται και σε άλλες περιοχές (Νεπάλ). Αυτή η

αντίσταση είναι μοναδική μέχρι στιγμής για το είδος *L. donovani* και ο λόγος εμφάνισης της πιστεύεται πως είναι η κατάχρηση και η λανθασμένη χορήγηση του φαρμάκου.<sup>[7]</sup> Το σπιβογλυκονικό νάτριο είναι ελεύθερα διαθέσιμο και εύκολα προσβάσιμο στην Ινδία. Μία έρευνα που διεξήχθη εκεί έδειξε ότι το 73% των ασθενών συμβουλευτήκαν ανειδίκευτους γιατρούς, οι οποίοι πρότειναν λήψη μικρότερων δόσεων του φαρμάκου αρχικά και σταδιακή αύξηση της δόσης για να αποφθεχθεί η νεφροτοξικότητα. Το υπόλοιπο 26% αντιμετωπίστηκε με το προβλεπόμενο φαρμακευτικό σχήμα αν και αρκετοί από αυτούς δεν το τήρησαν ή δεν το ολοκλήρωσαν πιθανώς λόγω των ανεπιθύμητων παρενεργειών.<sup>[7]</sup> Θεωρείται, λοιπόν, πως με αυτόν τον τρόπο το παράσιτο ανέπτυξε σταδιακά αντοχή στο φάρμακο αυτό. Μια ακόμη θεωρία υποστηρίζει πως η μόλυνση των υδάτων με αρσενικό σε εκείνες τις περιοχές συνέβαλε στην ανάπτυξη αντοχής του παρασίτου στις ενώσεις του αντιμονίου καθώς παρατηρείται χημική συγγένεια αυτών των δύο μετάλλων.<sup>[7]</sup>

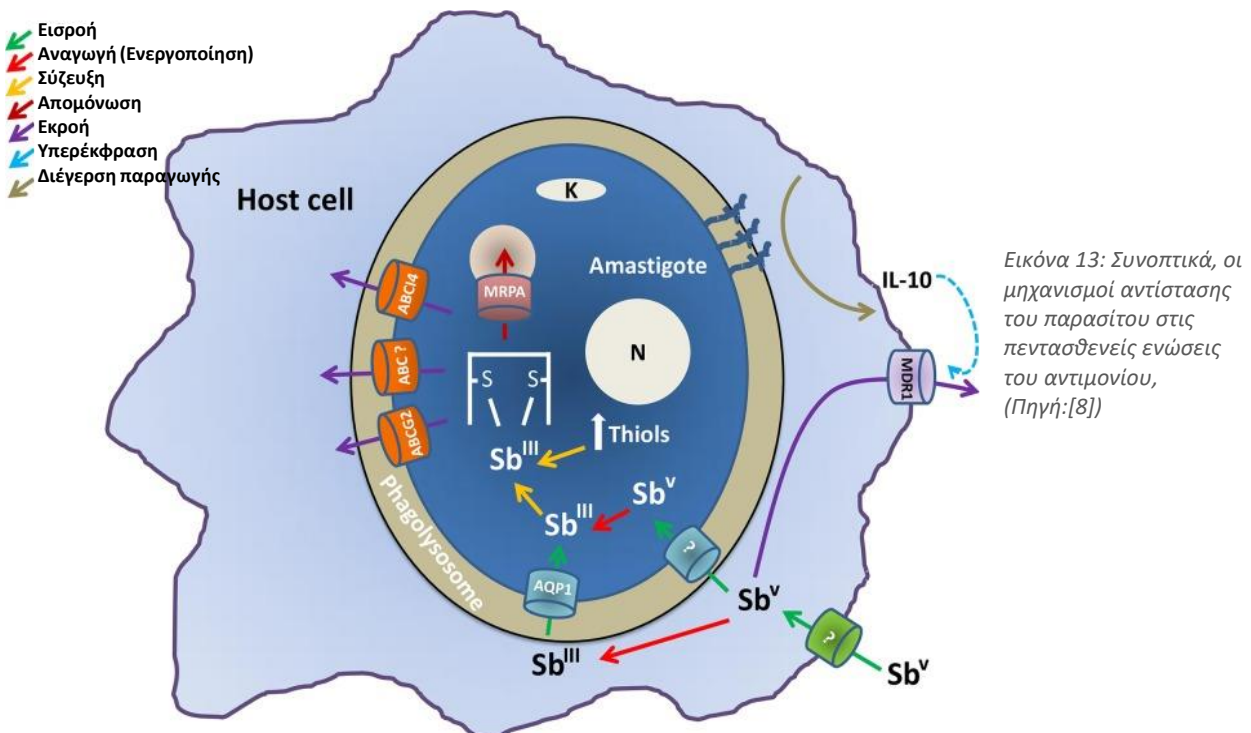
Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι πεντασθενείς ενώσεις του αντιμονίου Sb(V) πρέπει να αναχθούν στην τρισθενή τους μορφή Sb(III) για να ασκήσουν την φαρμακολογική τους δράση. Μια ποσότητα του φαρμάκου ανάγεται εντός των μακροφάγων του ξενιστή και εισέρχεται εντός του παρασίτου μέσω του **μεμβρανικού μεταφορέα AQP1**. Επίσης, το Sb(V) μπορεί να εισέλθει εντός του παρασίτου μέσω ενός άλλου μεταφορέα (δεν έχει χαρακτηριστεί ακόμη) και να αναχθεί σε Sb(III) στο εσωτερικό του. Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση αυτών των φαρμάκων είναι μικρότερη στα ανθεκτικά παράσιτα συγκριτικά με τα ευαίσθητα.<sup>[8]</sup> Έτσι λοιπόν, η υπερέκφραση του AQP1 καθιστά το παράσιτο ευαίσθητο στο Sb(III) ενώ η μείωση έκφρασης του γονιδίου αυτού ή και η ολοκληρωτική διαγραφή του οδηγεί στην αντίσταση. Στα ανθεκτικά στελέχη παρατηρείται μείωση του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου αλλά και μείωση της πλοειδίας του χρωμοσώματος που το φέρει. Επιπλέον, παρατηρούνται σημειακές μεταλλάξεις και εισαγωγές βάσεων στο γονίδιο οι οποίες το καθιστούν ανενεργό. Αυτό το φαινόμενο σχετίζεται και με το υψηλό επίπεδο αντοχής στο αντιμόνιο στην Ινδία.<sup>[7] [8]</sup>

Αντιθέτως μια άλλη γονιδιακή υπερέκφραση, εκείνη των **μεταφορέων ABC** που εμπλέκονται στην ATP-εξαρτώμενη μεταφορά μιας ποικιλίας μορίων εκτός της κυτταρικής μεμβράνης, έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει την εκροή του φαρμάκου και παίζει σημαντικό ρόλο στην αντίσταση του παρασίτου *Leishmania* στο αντιμόνιο. Υπάρχουν διάφοροι τύποι ABC μεταφορέων (ABC14, ABCG2, PRP1 κ.α) που συμβάλλουν

στην εκροή του φαρμάκου.<sup>[8]</sup> Ο **MPRA** είναι ένας ιδιαίτερος ABC μεταφορέας που εντοπίζεται κοντά στην θήκη του μαστιγίου. Παρατηρήθηκε πως το φάρμακο, συζευγμένο με θειόλες, απομονώνεται στη θήκη του μαστιγίου και σε ενδοκυττάρια κυστίδια και ύστερα πιθανώς αποβάλλεται από το εσωτερικό του παρασίτου μέσω εξωκύτωσης.<sup>[8]</sup> Το **γονίδιο** LINF\_230007800 του **MPRA μεταφορέα** καθώς και τρία ακόμη γονίδια LINF\_230007700, LINF\_230007900, LINF\_230008000 (εκφράζουν την YIP1, PTR1 και το ένζυμο αργινονηλεκτρική συνθετάση) βρίσκονται σε έναν αρκετά μελετημένο γονιδιακό τόπο, τον **γονιδιακό τόπο H** που εδράζει στο χρωμόσωμα 23.<sup>[10]</sup> Είναι γνωστό αρκετά χρόνια ότι η ενίσχυση του γονιδιακού τόπου H σχετίζεται με την αντίσταση του παρασίτου σε διάφορα φάρμακα μεταξύ και των ενώσεων αντιμονίου. Μία έρευνα που διεξήχθη σε 151 στελέχη του συμπλέγματος *L.donovani* που εμπλέκονται σε αντίσταση ή αποτυχία θεραπείας έπειτα από χορήγηση ενώσεων αντιμονίου και μιλεφοσίνης αποκάλυψε μια ενδιαφέρουσα γονιδιακή διακύμανση.<sup>[10]</sup> Το 30% των στελεχών εμφάνισε αυξημένη CNV ολόκληρου του γονιδιακού τόπου H (+1 έως +44 αντίγραφα) και μόνο το 9% μειωμένη CNV (-1 αντίγραφο). Επίσης, το 36% του συνόλου εμφάνισε γονιδιακές εισαγωγές, ποικίλου βαθμού, με πανομοιότυπα όρια εντός των οποίων βρισκόταν τουλάχιστον 3 γονίδια του γονιδιακού τόπου (πάντα όμως τα γονίδια YP1, MPRA και αργινονηλεκτρική συνθετάση). Τέλος, 4 ακόμη στελέχη εμφάνισαν CNV για μόνο δύο από τα γονίδια του γονιδιακού τόπου με διαφορετικά όρια εισαγωγής, περιέχοντας πάντα το γονίδιο του MPRA μεταφορέα. Αυτές οι ενισχύσεις παρατηρήθηκαν κυρίως στα στελέχη που απομονώθηκαν από περιοχές τις Ινδίας.<sup>[10]</sup> Τα αποτελέσματα συμπίπτουν με την θεωρία πως τα συγκεκριμένα παράσιτα έχουν δεχτεί την υψηλότερη πίεση στα αντιμονιακά φάρμακα στο παρελθόν και είναι αναμενόμενο να ανέπτυξαν προσαρμοστικούς μηχανισμούς έναντι αυτών. Για αυτό τον λόγο εμφανίζουν μεγαλύτερο επιπολασμό και ποσοστό γονιδιακής ενίσχυσης. Το αμέσως μεγαλύτερο ποσοστό CNV έχουν τα απομονωμένα στελέχη από περιοχές του Σουδάν και της Αιθιοπίας. Από τα παραπάνω στοιχεία, το γονίδιο PTR1 φαίνεται να μην παίζει σημαντικό ρόλο στην αντίσταση στα φάρμακα αφού παρουσιάζει το μικρότερο ποσοστό CNV σε σχέση με τα άλλα 3 γονίδια του γονιδιακού τόπου H.<sup>[10]</sup> Αντίθετα το γονίδιο MPRA είναι πάντα παρόν σε όλες τις γονιδιακές ενισχύσεις, είτε μόνο του είτε σε συνδυασμό με τα υπόλοιπα 3 γονίδια. Η υπερέκφρασή του, λοιπόν, σχετίζεται ισχυρά με αντοχή στο αντιμόνιο τόσο σε αμαστιγώτες όσο και σε προμαστιγώτες.<sup>[10]</sup>

Η μειωμένη ενδογενής μετατροπή του **Sb(V)** σε **Sb(III)** καθώς και η **αύξηση των επιπέδων τρυπανοθειόνης**, έχουν επίσης συσχετισθεί με την αντίσταση.<sup>[8]</sup> Η τρυπανοθειόνη αποτελεί την κύριο μόριο θειολικής αναγωγής του παρασίτου. Το **Sb(III)** συνδέεται με την τρυπανοθειόνη και το σύζευγμα που προκύπτει απομονώνεται σε ενδοκυττάρια κυστίδια μέσω του MRPA ή εξωθείται από το κύτταρο μέσω άλλων ABC μεταφορέων. Ως γνωστόν, το **Sb(III)** προκαλεί οξειδωτικές βλάβες εντός του κυττάρου. Άρα μια αυξημένη ικανότητα αντιμετώπισης αυτών των οξειδωτικών βλαβών, όπως για παράδειγμα η υπερέκφραση βασικών ενζύμων για την σύνθεση της τρυπανοθειόνης σε συνδυασμό με την υπερέκφραση του MRPA μέσω πολυπλοειδίας, αποτελεί έναν ακόμη μηχανισμό αντίστασης στις πεντασθενείς ενώσεις αντιμονίου.<sup>[8]</sup>

Τέλος να σημειωθεί ότι ορισμένες **αλλαγές στην φυσιολογία του κυττάρου** μπορούν να συμβάλλουν περαιτέρω στην αντίσταση. Ανθεκτικά στο **Sb(III)** παράσιτα εμφανίζουν σύνθετες γλυκάνες στην επιφάνεια της κυτταρικής τους μεμβράνης. Αυτές, μέσω ενός καταρράκτη κυτταρικών σηματοδοτήσεων, οδηγούν στην ανοδική ρύθμιση της αντιφλεγμονώδους ιντερλευκίνης 10 (IL-10) που εκκρίνεται από τα μολυσμένα μακροφάγα του ξενιστή. Αυτή με την σειρά της προκαλεί υπερέκφραση κάποιων μεμβρανικών πρωτεϊνών στα μακροφάγα, όπως ο **MDR1** που εξωθεί το **Sb(V)** από το μακροφάγο, μειώνοντας έτσι την συνολική ποσότητα του αντιμονίου που φτάνει στο παράσιτο.<sup>[8]</sup>



### 1.5.2 Μηχανισμοί αντίστασης στην μιλτεφοσίνη

Υπάρχουν διακυμάνσεις στην ευαισθησία τόσο των αμαστιγωτών όσο και των προμαστιγωτών μορφών ανάμεσα στα διάφορα στελέχη του παρασίτου. Σε όλες τις *in vitro* δοκιμασίες του φαρμάκου το είδος *L. donovani* είναι το πιο ευαίσθητο ( $ED_{50} = 0,12-1,32 \mu M$ , προμαστιγώτες/ $ED_{50} = 1,2-4,6 \mu M$ , αμαστιγώτες). Αντίθετα, το είδος *L. major* φαίνεται να είναι πιο ανθεκτικό ( $ED_{50} = 4,8-13,1 \mu M$ , προμαστιγώτες / $ED_{50} = 7,5-37,1 \mu M$ , αμαστιγώτες).<sup>[7]</sup> Πριν ακόμη από την εισαγωγή της μιλτεφοσίνης στην αγορά, δεδομένα από μια δοκιμή φάσης IV του φαρμάκου στην Ινδία, που περιλάμβανε κατ' οίκον θεραπεία με μιλτεφοσίνη υπό εβδομαδιαία επίβλεψη, έδειξε διπλασιασμό του ποσοστού υποτροπής των ασθενών. Εκτός Ινδίας, έχουν επίσης αναφερθεί λίγες περιπτώσεις υποτροπής ΣΛ και ΔΛ που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με μιλτεφοσίνη. Το γεγονός αυτό εγείρει υποψίες πως το παράσιτο αναπτύσσει αντοχή γρηγορότερα στο συγκεκριμένο φάρμακο.<sup>[7]</sup> Το κύριο αίτιο πιθανολογείται πως είναι ο μεγάλος χρόνος ημιζωής του φαρμάκου ( $t_{1/2} = 1$  έως 4 βδομάδες). Το φάρμακο παραμένει στον οργανισμό σε υποθεραπευτικά επίπεδα για μερικές εβδομάδες μετά την χορήγηση του θεραπευτικού σχήματος. Έτσι η αντίσταση στην μιλτεφοσίνη αναμένεται να αναπτυχθεί πιο γρήγορα σε περιοχές που χρησιμοποιείται εκτενώς. Δεδομένα μετά από 10 χρόνια χορήγησης της μιλτεφοσίνης δείχνουν μείωση της αποτελεσματικότητας της με ποσοστό υποτροπής 10% στην Ινδία και 20% στο Νεπάλ μετά από 12μηνη παρακολούθηση.<sup>[8]</sup>

### Μεταφορέας LMT, ABC και λοιποί μηχανισμοί

Η πρόσληψη της μιλτεφοσίνης και άλλων αλκυλο-γλυκεροφωσφολιπιδίων στο παράσιτο *Leishmania* απαιτεί έναν μεταφορέα που περιλαμβάνει μία ΑΤΡάση τύπου P και ονομάζεται **Leishmania Miltefosine Transporter**.<sup>[8]</sup> Το γονίδιο του LMT, LINF\_130020800, εδράζει στο χρωμόσωμα 13. Ο LMT είναι υπεύθυνος για την μεταφορά των φωσφολιπιδίων από το εξωκυττάριο υγρό εντός της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του παρασίτου. Η λειτουργία του εν λόγω μεταφορέα βασίζεται στην σύνδεση του με μία  **$\beta$ -υποομάδα** που ονομάζεται **LRos3**. Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες εμφανίζουν αμοιβαία αλληλεπίδραση για την λειτουργία τους και την εντόπιση τους στην πλασματική μεμβράνη του παρασίτου και είναι απαραίτητες για να εισέλθει η μιλετοφσίνη στο εσωτερικό του.<sup>[8]</sup> Ο κύριος μηχανισμός αντοχής στα πειραματικά στελέχη σχετίζεται με τη μειωμένη συγκέντρωση του φαρμάκου εντός του παρασίτου λόγω της μειωμένης



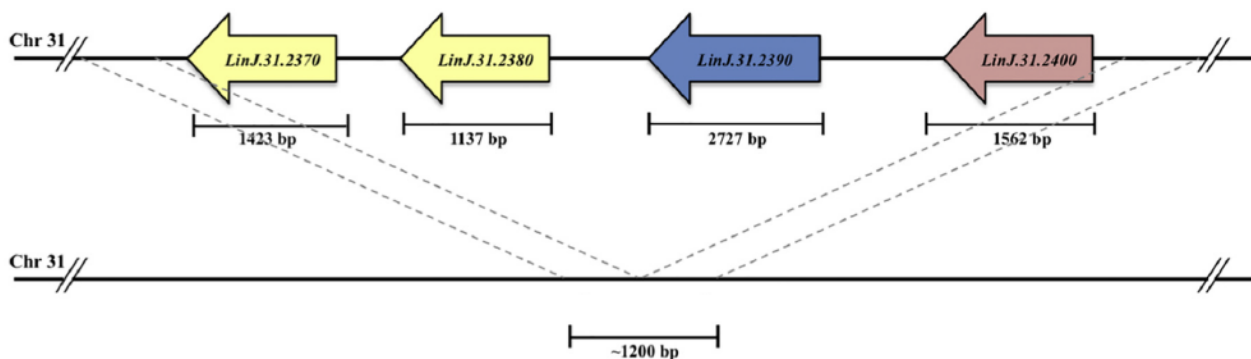
πρόσληψης ή της αυξημένης αποβολής του. Η παρουσία μεταλλάξεων που αδρανοποιούν τα γονίδια του LMT και LRos3 ή η ολοκληρωτική διαγραφή τους από το γονιδίωμα του *L.donovani* αποδείχθηκε ότι αυξάνει δραστικά την αντίσταση του στη μιτεφοσίνη τόσο in vitro όσο και in vivo. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε και σε απομονωμένα στελέχη κλινικών δειγμάτων που σχετίζονται με αποτυχία θεραπείας με μιτεφοσίνη. Ένας ακόμη παράγοντας αντίστασης στη μιτεφοσίνη αποτελεί η **υπερέκφραση των ABC μεταφορέων** ABCB4(MDR1), ABCG4 και ABCG6. Η αυξημένη έκφραση τους έχει συσχετιστεί με μειωμένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση του φαρμάκου λόγω αυξημένης εκροής του από τους μεταφορείς αυτούς.<sup>[8]</sup>

Τέλος, μερικές ακόμη ενδοκυττάρια μεταβολές δείχνουν να προσδίδουν ανθεκτικότητα στο παράσιτο. Οι αλλαγές του λιπιδικού προφίλ της κυτταρικής μεμβράνης, η μείωση της συγκέντρωσης της εργοστερόλης, αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται με τον μεταβολισμό της θειόλης και την υψηλότερη αντοχή του παρασίτου στο στρες και τις ρίζες οξυγόνου είναι μερικές από αυτές. Παρόλο που δεν είναι απολύτως κατανοητός ο ρόλος τους στον τρόπο δράσης ή στο μηχανισμό αντίστασης στο φάρμακο, μπορούμε να πούμε ότι η αντίσταση στην μιτεφοσίνη είναι μια πολυπαραγοντική διαδικασία.<sup>[8]</sup>

#### Γονιδιακός τρόπος αντίστασης στη μιτεφοσίνη

Προηγουμένως περιγράφηκαν μοριακοί μηχανισμοί σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης σε ανθεκτικά στελέχη που δημιουργήθηκαν in vitro για τον σκοπό αυτό. Κλινικές δοκιμές που διεξήχθησαν στην Βραζιλία απέδειξαν ότι το 40% των ασθενών με λοίμωξη από *L. infantum* υποτροπίασαν μετά τη θεραπεία με μιτεφοσίνη.<sup>[11]</sup> Αυτό το ύποπτα υψηλό ποσοστό οδήγησε στην διεξαγωγή μια έρευνας σε απομονωμένους φυσικούς πληθυσμούς του παρασίτου για την περαιτέρω κατανόηση των μηχανισμών αντίστασης και την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και τοξικότητας της μιτεφοσίνης στην θεραπεία της ΣΛ στην Βραζιλία.<sup>[11]</sup> Το γονιδίωμα 26 απομονωμένων στελεχών *L. infantum* από περιοχές της χώρας αλληλουχήθηκε με σκοπό την εύρεση κάποιου γονιδιακού τόπου που συσχετίζεται με την ανθεκτικότητα. Τα στελέχη αυτά απομονώθηκαν από 14 άτομα που θεραπεύτηκαν επιτυχώς με μιτεφοσίνη και 12 άτομα που υποτροπίασαν μετά από την θεραπεία. Οι ασθενείς λάμβαναν 2,5 mg/kg/ημέρα για χρονικό διάστημα 28-42 ημερών και βρισκόταν υπό ιατρική παρακολούθηση περίπου έναν χρόνο. Οι

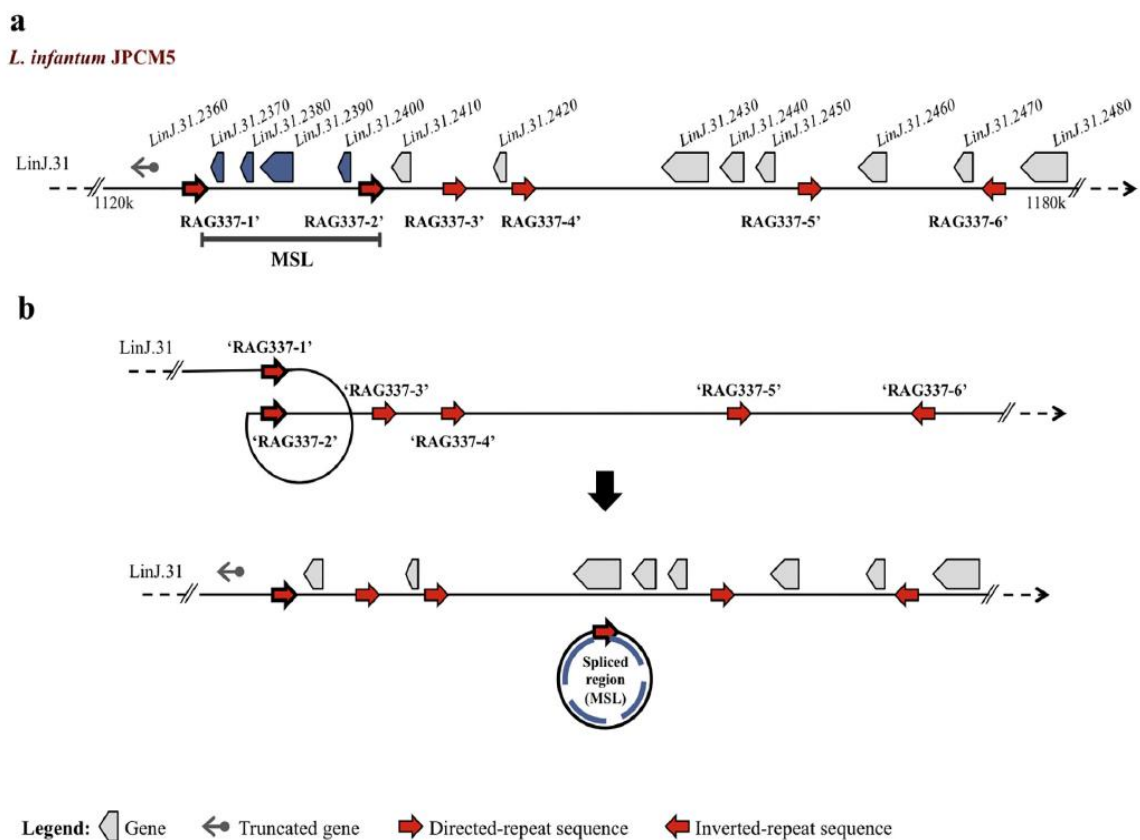
ασθενείς θεωρούνταν θεραπευμένοι αν δεν εμφάνιζαν κάποιο σύμπτωμα της λοίμωξης την περίοδο της επανεξέτασης. Αντιθέτως, ως υποτροπιάζων ασθενής ορίστηκε το άτομο που θεωρήθηκε θεραπευμένο εξαρχής αλλά στην επανεξέταση εμφάνισε συμπτώματα της λοίμωξης και θετική παρασιτολογική εξέταση. Τα αποτελέσματα της γονιδιακής αλληλούχισης αποκάλυψαν διάφορους πολυμορφισμούς (SNPs), διαφορές στα αντίγραφα γονιδίων (CNVs) αλλά και στην ποσότητα κάποιων χρωμοσωμάτων (ανευπλοειδία) και την διαγραφή ενός γονιδιακού τόπου. Οι ερευνητές επικεντρώθηκαν στην διαγραφή αυτού του γονιδιακού τόπου στο χρωμόσωμα 31 που παρατηρήθηκε μόνο στα ανθεκτικά στελέχη. Ο γονιδιακός τόπος ονομάστηκε **Miltefosine Sensitivity Locus**. Ο MSL έχει μήκους περίπου 1,2 kb και περιέχει 4 γονίδια. Το **LinJ.31.2370** και **LinJ.31.2380** (κωδικοποιούν μία υποτιθέμενη 3'-νουκλεοτιδάση/νουκλεάση), το **LinJ.31.2390** (κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με παρόμοια δράση ελικάσης) και το **LinJ.31.2400** (κωδικοποιεί μια υποτιθέμενη 3,2-τρανς-ενύλο-CoA ισομεράση).<sup>[11]</sup>



Εικόνα 14: Γονιδιακός τόπος MSL στο χρωμόσωμα 31 του παρασίτου *Leishmania*. (Πηγή: [11])

Η παρουσία του MSL ελέγχθηκε με PCR στα 26 στελέχη *L. infantum* που αλληλουχήθηκαν και σε άλλα 131 στελέχη *L. infantum* από διάφορες περιοχές της Βραζιλίας.<sup>[11]</sup> Το χρωμόσωμα 31 του παρασίτου είναι συνήθως τετραπλοειδές. Η PCR έδειξε ισχυρή συσχέτιση ( $p=0,0005$ ) μεταξύ της παρουσίας του MSL (MSL+) και της επιτυχημένης θεραπείας ασθενών με τη μιλτεφοσίνη, με πιθανότητα 95% αποτυχημένης θεραπείας όταν το στέλεχος του παρασίτου είχε πλήρη διαγραφή του MSL (MSL -). Κάποια στελέχη εμφάνιζαν ετερογένεια (MSL +/-) καθώς και ένα χαμηλής έντασης τελικό προϊόν μήκους 1,2 kb. Αυτό το προϊόν απομονώθηκε και αλληλουχήθηκε και βρέθηκε πως ήταν το διαγραμμένο αντίγραφο του MSL.<sup>[11]</sup> Ο μηχανισμός διαγραφής

διερευνήθηκε και παρατηρήθηκε πως συμβαίνει πάντα στο ίδιο σημείο. Η αλληλούχιση του χρωμοσώματος 31 έδειξε την παρουσία αρκετών επαναλαμβανόμενων ομόλογων αλληλουχιών (RAG337) που πλαισιώνουν τον γονιδιακό τόπο MSL. Το γονιδίωμα του παρασίτου αναδιατάσσεται συνεχώς μέσω αυτών των αλληλουχιών με σκοπό την ενίσχυση ή διαγραφή γονιδιακών τμημάτων. Στην συγκεκριμένη περίπτωση η απουσία ενός ή όλων των αντιγράφων του MSL προσδίδει ανθεκτικότητα στις αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου έναντι της μλτεφοσίνης.<sup>[11]</sup>



Εικόνα 15: α) Θέσεις ομόλογων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στο χρωμόσωμα 31, β) ομόλογος ανασυνδυασμός μεταξύ δύο επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών που πλαισιώνουν το MSL (RAG337-1' και RAG337-2'), οδηγώντας σε σχηματισμό κυκλικού "εξωχρωσωμικού στοιχείου", (Πηγή: [11])

## 2. Σκοπός

Η αντίσταση στα φάρμακα είναι ένα κοινό φαινόμενο που παρατηρείται σε όλους τους μικροοργανισμούς. Η πίεση που ασκούν τα φάρμακα σε αυτούς οδηγεί σε βιοχημικές και γονιδιακές αλλαγές ώστε να επιτευχθεί η προσαρμογή και εξέλιξη. Έξαλλου, ο τελικός σκοπός κάθε μικροοργανισμού είναι η διαίωνιση του είδους. Αυτή η διπλωματική εργασία εστιάζει στο παράσιτο *Leishmania*. Πιο συγκεκριμένα μελετάται η συχνότητα εμφάνισης του γονιδιακού τόπου MSL και του γονιδίου του μεταφορέα LMT σε στελέχη παρασίτων του *Leishmania donovani complex* της Ανατολικής Μεσογείου, καθώς έχει δειχθεί ότι η απουσία τους από το γονιδίωμα του παρασίτου σχετίζεται με αντίσταση στη μιλτεφοσίνη. Επίσης, αναπτύσσεται δοκιμασία ποσοτικής real time PCR με σκοπό την διερεύνηση αύξησης του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου του MRPA μεταφορέα στο χρωμόσωμα 23 του παρασίτου, που εμπλέκεται στην αντίσταση του σε αντιλεϊσμανιακά φάρμακα μεταξύ άλλων και στις πεντασθενείς ενώσεις του αντιμονίου.

## 3.Υλικά και Μέθοδοι

### 3.1 Υλικά

#### Αντιδραστήρια

- DNA δείκτες (Ladder) 100bp και 1kb, Biolabs
- Εναρκτήρια μόρια για την PCR (primers)
- TaqDNA polymerase Kit
- Διάλυμα φόρτωσης, Biolabs
- Απομονωμένο DNA στελεχών του εργαστηρίου
- KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) Kit, Kapa Biosystems
- Καλλιερρητικό υλικό M199
- TBE διάλυμα 10%
- PBS διάλυμα
- Διάλυμα ρεσαζουρίνης 10%
- Βρωμιούχο αιθίδιο

#### Αναλώσιμα υλικά

- Αποστειρωμένα tips, Greiner
- Πλαστικά σωληνάρια erendorf 1,5 ml, Greiner
- Πλαστικά σωληνάρια PCR 0,2 ml, Greiner
- Ογκομετρικοί σωλήνες
- Κωνικές φιάλες
- Αποστειρωμένες πλάκες ELISA 96 πηγαδάκια με καπάκι, Biolabs
- Γυάλινες αποστειρωμένες πιπέτες μίας χρήσης
- Σπάτουλες

#### Εξοπλισμός Εργαστηρίου

- Θερμικός κυκλοποιητής PTC-200, MJ Research
- Φυγόκεντρος
- Vortex
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης και Power Pack

- Μηχάνημα Εμφάνισης
- Φασματοφωτόμετρο
- Πιπέτες μεταβλητού όγκου (P2, P20, P200)

Πίνακας στελεχών του παρασίτου *Leishmania*

ΣΤΕΛΕΧΗ GD	ΣΤΕΧΕΧΗ ΕΡ	ΣΤΕΛΕΧΗ CD	ΣΤΕΛΕΧΗ CH
GD3 <i>Κρήτη</i>	ΕΡ16 <i>Μανίασα</i>	CD1 <i>Λεμεσός</i>	CH32 <i>Πάφος</i>
GD5 <i>Κρήτη</i>	ΕΡ17 -	CD13 <i>Λεμεσός</i>	CH33 <i>Πάφος</i>
GD8 <i>Κρήτη</i>	ΕΡ31 -	CD21 <i>Πάφος</i>	CH34 <i>Πάφος</i>
GD14 <i>Κρήτη</i>	ΕΡ43 <i>Αϊδίνιο</i>	CD22 <i>Λεμεσός</i>	CH35 <i>Πάφος</i>
GD16 <i>Αλβανία</i>	ΕΡ44 <i>Αϊδίνιο</i>	CD34 <i>Λεμεσός</i>	CH36 <i>Λεμεσός</i>
GD26 <i>Κρήτη</i>	ΕΡ49 <i>Αϊδίνιο</i>	CD37 <i>Πάφος</i>	
GD27 -	ΕΡ50 <i>Αϊδίνιο</i>	CD39 -	
GD28 <i>Κρήτη</i>	ΕΡ53 <i>Αϊδίνιο</i>	CD40 <i>Πάφος</i>	
GD36 <i>Κρήτη</i>	ΕΡ55 <i>Αϊδίνιο</i>	CD42 -	
GD38 -	ΕΡ56 <i>Μπιλέτσικ</i>	CD43 <i>Πάφος</i>	
GD41 -	ΕΡ57 <i>Μούγκλα</i>	CD44 <i>Λεμεσός</i>	
GD55 -	ΕΡ58 <i>Μούγκλα</i>	CD45 -	
GD64 -	ΕΡ59 -	CD48 <i>Λεμεσός</i>	
GD67 -	ΕΡ68 <i>Αϊδίνιο</i>	CD49 -	
GD98 -	ΕΡ88 <i>Τσορούμ</i>	CD50 -	
GD99 -	ΕΡ89 <i>Μανίασα</i>	CD54 <i>Πάφος</i>	
GD100 -	ΕΡ126 <i>Μούγκλα</i>	CD57 <i>Λευκωσία</i>	
GD102 <i>Αττική</i>	ΕΡ134 <i>Αντιόχεια</i>	CD58 -	
GD103 -	ΕΡ163 -	CD59 -	

GD104 <i>Κρήτη</i>	EP173 -	CD60 <i>Λεμεσός</i>	
GD117 -	EP174 -	CD61 -	
GD127 -	EP176 -	CD62 <i>Πάφος</i>	
GD167 <i>Τρίκαλα</i>	EP179 -	CD63 <i>Λεμεσός</i>	
GD211 <i>Αργολίδα</i>	EP180 -	CD66 <i>Λευκωσία</i>	
	EP182 -	CD68 <i>Πάφος</i>	
	EP183 -	CD74 <i>Αμμόχωστος</i>	
	EP184 -	CD76 -	
	EP185 -	CD77 -	
	EP186 -	CD78 -	
	EP187 -	CD80 -	
	EP188 -	CD83 -	
	EP189 -	CD87 <i>Πάφος</i>	
		CD88 <i>Πάφος</i>	
		CD90 <i>Πάφος</i>	
		CD91 <i>Πάφος</i>	
		CD92 -	
		CD94 -	
		CD95 -	
		CD106 -	
		CD108 <i>Λάρνακα</i>	
		CD110 -	

Πίνακας 3: Συνοπτικός πίνακας με τα στελέχη της Ανατολικής Μεσογείου που εξετάστηκαν.

## 3.2 Μέθοδοι

### 3.2.1 Ποσοτικοποίηση DNA με τη χρήση του nanodrop.

Για την διεξαγωγή των PCR αυτής της ερευνητικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δείγματα απομονωμένου DNA από 102 διαφορετικά στελέχη που βρίσκονται σε υγρό άζωτο. Προηγήθηκε η μέτρηση της συγκέντρωσης αλλά και αξιολόγηση της καθαρότητας του DNA σε κάθε δείγμα ξεχωριστά. Οι παραπάνω μετρήσεις έγιναν στο Nanodrop (Thermofisher). Το συγκεκριμένο μηχάνημα υπολογίζει την συγκέντρωση γενωμικού υλικού και πρωτεϊνών σε ένα δείγμα με την μέθοδο της φασματοφωτομετρίας με το πλεονέκτημα ότι απαιτεί ελάχιστο όγκο δείγματος. Αρχικά, 2 μl νερού τοποθετούνται στην ειδική υποδοχή και γίνεται ο μηδενισμός του μηχανήματος. Ύστερα τοποθετούμε 2 μl δείγματος και καταγράφουμε την μέτρηση. Για μεγαλύτερη ακρίβεια μετράμε 3 φορές την συγκέντρωση του DNA κάθε δείγματος και υπολογίζουμε το μέσο όρο αυτών. Το DNA απορροφάει στο μέγιστο σε μήκος κύματος  $\lambda_{max} = 260$  nm. Για τον έλεγχο της καθαρότητας το δείγμα φωτομετρείται ταυτόχρονα και σε μήκος κύματος  $\lambda_{max} = 280$  nm, το οποίο και αποτελεί μέγιστο για τις πρωτεΐνες. Υπολογίζεται ο λόγος A260/A280 ή Optical Density (OD) ο οποίος έχει ένα αποδεκτό εύρος τιμών 1,8 – 2,0. Δείγματα με OD εκτός του αποδεκτού εύρους απορρίπτονται καθώς αυτά περιέχουν προσμίξεις (πρωτεΐνες ή κατάλοιπα αντιδραστηρίων κατά την απομόνωση) οι οποίες επηρεάζουν την ποσοτικοποίηση του DNA αλλά ίσως και την διαδικασία της PCR.

### 3.2.2 Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης PCR

Η μελέτη απουσίας των γονιδίων ενδιαφέροντος LINF\_130020800 (γονίδιο του LMT) και LinJ.31.2370 (γονίδιο του γονιδιακού τόπου MSL) έγινε με την μέθοδο της PCR. Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών στο DNA του παρασίτου οι οποίες οριοθετούνται από δύο εκκινήτες. Τα κύρια στάδια της PCR είναι τρία: αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, υβριδισμός των εκκινήτων και επιμήκυνση.<sup>[12]</sup> Παρακάτω αναγράφονται (Πίνακας 4 και 6) τα απαραίτητα αντιδραστήρια καθώς και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις τους στο τελικό mastermix. Να σημειωθεί ότι σε κάθε PCR τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με δύο δείγματα control, ένα αρνητικό και ένα θετικό. Το αρνητικό περιέχει την ίδια ποσότητα mastermix αλλά αντί για δείγμα DNA περιέχει αποσταγμένο νερό. Ο σκοπός του είναι η αξιολόγηση της καθαρότητας του mastermix



καθώς και η ανίχνευση επιμολύνσεων. Το θετικό control περιέχει τους εκκινητές του γονιδίου της τουμπουλίνης, ίδια ποσότητα mastermix και δείγμα DNA. Η τουμπουλίνη αποτελεί δομική πρωτεΐνη του παρασίτου, είναι συντηρημένη και παρούσα σε όλα τα παράσιτα. Επίσης το γονίδιο της τουμπουλίνης υπάρχει πολλές φορές στο γονιδίωμα του παρασίτου. Το «θετικό» αποτέλεσμα του θετικού control υποδηλώνει την λειτουργία της πολυμεράσης. Οι PCR με μη-λειτουργικά control απορρίφθηκαν και επαναλήφθηκαν με καινούργιο mastermix. Ο τελικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 25  $\mu$ l.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
H <sub>2</sub> O	Υπόλοιπος όγκος
Buffer (10x)	1x
dNTPs (20mM)	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2,5 mM
Forward primer (10 $\mu$ M)	0,8 $\mu$ M
Reverse primer (10 $\mu$ M)	0,8 $\mu$ M
TaqPol 50 U/ $\mu$ l	0,025 U/ $\mu$ l
DNA	$\approx$ 30 ng

Πίνακας 4: Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων για την PCR στο γονίδιο του υποδοχέα της μιλετοσίνης (LMT)

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
1	94 °C	3 λεπτά
2	94 °C	30 δευτερόλεπτα
3	62 °C	45 δευτερόλεπτα
4	72 °C	45 δευτερόλεπτα
5	72 °C	10 λεπτά
6	4 °C	Πάντα

Πίνακας 5: Προφίλ θερμοκυκλοποίησης για το γονίδιο του υποδοχέας της μιλετοσίνης (LMT)

Για την διερεύνηση απουσίας του γονιδιακού τύπου MSL σχεδιάστηκε PCR για ένα από τα 4 γονίδια που εμπεριέχονται εντός αυτού. Ολόκληρος ο γονιδιακός τύπος έχει μήκος περίπου 14.000 ζεύγη βάσεων και η ολική ενίσχυση του απαιτεί εξειδικευμένα ένζυμα. Έτσι, λοιπόν, σχεδιάστηκε PCR για το γονίδιο LinJ.31.2370 η απουσία του οποίου μεταφράζεται σε απουσία ολόκληρου του γονιδιακού τύπου MSL σύμφωνα με το μοτίβο των ομόλογων αλληλουχιών.<sup>[11]</sup> Σε αυτήν την PCR χρησιμοποιήθηκε σαν θετικό control το γονίδιο του LMT στο στέλεχος CD1 που στην προηγούμενη PCR εμφάνισε θετικό αποτέλεσμα και όχι το γονίδιο της τουμπουλίνης

(μικρότερη διαφορά  $T_M$  μεταξύ εκκινητών του γονιδίου LMT και των εκκινητών του γονιδιακού τύπου MSL).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
H <sub>2</sub> O	Υπόλοιπος όγκος
Buffer (10x)	1x
dNTPs (20mM)	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2 mM
Forward primer (10 μM)	0,8 μM
Reverse primer (10 μM)	0,8 μM
TaqPol 50 U/μl	0,025 U/μl
DMSO	3% (v/v)
DNA	≈30 ng

Πίνακας 6: Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων για την PCR στο γονίδιο του MSL

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
1	94 °C	3 λεπτά
2	94 °C	30 δευτερόλεπτα
3	58 °C	45 δευτερόλεπτα
4	72 °C	1,5 λεπτό
5	72 °C	10 λεπτά
6	4 °C	∞

Πίνακας 7: Προφίλ θερμοκυκλοποίησης για το γονίδιο του MSL

A/A	ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ (5' → 3')	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ	$T_M$ (°C)
1	<b>Τουμπουλίνη Forward</b>	AGCTGTCCGTCGCGGACATCACGAACTCGGTGTTT	176 ζεύγη βάσεων	74,2
2	<b>Τουμπουλίνη Reverse</b>	CGAACTGAATTGTGCGCTTCGTCTTGATCGTCGCAAT		71,7
3	<b>LINF_130020800 Forward</b>	CAAGTGCCTTTCCACCAGAATC	222 ζεύγη βάσεων	60,3
4	<b>LINF_130020800 Reverse</b>	CTCACCTTTTTGAACTCCAACAGG		61,0
5	<b>LinJ.31.2370 Forward</b>	ATCTAGATTATAAATCCAGTGCGATCG	1423 ζεύγη βάσεων	60,4
6	<b>LinJ.31.2370 Reverse</b>	TATAAGCTTCTGTCATCACTCTTGTTAATGCG		64,4

Πίνακας 8: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και για τις δύο PCR

### 3.2.3 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή αгарόζης 1%

Μετά το πέρας όλων των κύκλων της PCR τα δείγματα ηλεκτροφορούνται με σκοπό των διαχωρισμό των προϊόντων με βάση το μέγεθος τους. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε πηκτή αγαρόζης 1% στην οποία εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού. Πιο συγκεκριμένα, ζυγίζεται η επιθυμητή ποσότητα αγαρόζης και τοποθετείται σε μία κωνική φιάλη. Ύστερα διαλύεται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος TBE 1x με σκοπό να επιτευχθεί η συγκέντρωση 1%. Η ογκομετρική φιάλη θερμαίνεται έως ότου διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη. Το διάλυμα αυτό εγχέεται στο πλαστικό σκεύος στήριξης. Αμέσως μετά προστίθεται το βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0,5 µg/ml. Ο χειρισμός της συγκεκριμένης ουσίας γίνεται με διαφορετικά γάντια και με συγκεκριμένη πιπέτα διότι έχει μεταλαξιογόνο δράση. Τέλος τοποθετούμε την κτένα στην υποδοχή της και αφήνουμε το διάλυμα να πήξει για περίπου μισή ώρα.<sup>[12]</sup>

Όταν το διάλυμα έχει πήξει ικανοποιητικά τότε η κτένα αφαιρείται και η πηκτή μεταφέρεται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Τοποθετείτε μαζί με το σκεύος στήριξης σε σωστή διάταξη μέσα στην συσκευή (λουτρό ηλεκτροφόρησης). Έπειτα, γεμίζουμε την συσκευή με διάλυμα TBE 1x μέχρι την ένδειξη. Είναι σημαντικό να ελέγξουμε εάν όλα τα πηγαδάκια στην πηκτή βρίσκονται κάτω από την επιφάνεια του υγρού. Ύστερα φορτώνονται τα δείγματα. Στο κάθε δείγμα έχει προστεθεί προηγουμένως μια ποσότητα διαλύματος φόρτωσης. Το διάλυμα φόρτωσης αδρανοποιεί την πολυμεράση στο mastermix και περιέχει χρωστική η οποία κινείται με παρόμοια ταχύτητα με το DNA. Έτσι καθίσταται εφικτή η παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Κάθε δείγμα τοποθετείται προσεκτικά σε ξεχωριστό πηγαδάκι. Στην πηκτή φορτώνεται επίσης ο θετικός και αρνητικός μάρτυρας καθώς και ο δείκτης μοριακού βάρους (DNA ladder). Τα 3 τελευταία δείγματα είναι απαραίτητα για την ορθή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Τέλος, συναρμολογείται η συσκευή ηλεκτροφόρησης και εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού τάσης 100V για περίπου 35-40 λεπτά. Το DNA έχει αρνητικό φορτίο λόγω των φωσφορικών ομάδων που βρίσκονται στο εξωτερικό του μορίου. Έτσι, λοιπόν, κινείται προς την άνοδο (+). Όταν τελειώσει η ηλεκτροφόρηση, η πηκτή παραλαμβάνεται και μεταφέρεται στην συσκευή εμφάνισης. Το βρωμιούχο αιθίδιο συνδέεται με το DNA και το σύμπλοκο που προκύπτει εκπέμπει ακτινοβολίας μήκους κύματος 605 nm όταν εκτεθεί σε υπεριώδες ακτινοβολία. Έτσι καθίστανται ορατά τα μόρια DNA τα οποία έχουν διαχωριστεί κατά μήκος της πηκτής ανάλογα με το μοριακό μέγεθος.<sup>[12]</sup>

### 3.2.4 Ανάπτυξη δοκιμασίας qRT-PCR για την ανίχνευση αύξησης του CNV στο γονίδιο του MRPA μεταφορέα

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qRT-PCR ή qPCR) αποτελεί μια από της παραλλαγές της τυπικής PCR η οποία επιτρέπει την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μέσω μέτρησης του φθορισμού σημασμένων προϊόντων της PCR. Πιο αναλυτικά, qPCR βασίζεται στην χρήση διάφορων χρωστικών που συνδέονται επιλεκτικά στον δίκλωνο DNA. Μετά το πέρας κάθε κύκλου της PCR τα δίκλινα προϊόντα ενίσχυσης συσσωρεύονται και το σήμα φθορισμού αυξάνεται, αφού όλο και περισσότερα μόρια χρωστικής συνδέονται σε αυτά. Ο θερμικός κυκλοποιητής καταγράφει το σήμα στο τέλος κάθε κύκλου της PCR και υπολογίζει την διαφορά στην ένταση του σήματος ανά κύκλο. Το τελικό αποτέλεσμα είναι μία σιγμοειδής καμπύλη ενίσχυσης. Για τον υπολογισμό της σχετικής έκφρασης ενός γονιδίου χρησιμοποιείται ο κύκλος κατωφλίου (Ct), που αποτελεί την τομή μεταξύ μιας καμπύλης ενίσχυσης και μιας γραμμής κατωφλίου. Είναι ένα σχετικό μέτρο της συγκέντρωσης του γονιδίου στόχου στην αντίδραση PCR. Στη συγκεκριμένη δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε το σχετικό Ct, δηλαδή ο κύκλος κατωφλίου του γονιδίου στόχου μείον τον κύκλο κατωφλίου του γονιδίου μάρτυρα. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία έγινε χρήση ενός κιτ στο οποίο εμπεριέχεται η χρωστική sybr green. Παρακάτω ακολουθεί ο πίνακας με τις συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων που προστέθηκαν σε κάθε δείγμα (Πίνακας 9). Ο τελικός όγκος αντίδρασης ήταν 20 μl. Όπως σε όλες τις PCR έτσι και σε αυτή η καθαρότητα των αντιδραστηρίων αλλά και η ενεργότητα της πολυμεράσης ελέγχθηκαν μέσω δειγμάτων control. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο LINF\_100011800 ως θετικό control. Το γονίδιο αυτό εδράζει στο χρωμόσωμα 10 και κωδικοποιεί ένα ένζυμο, την δευδρογονάση της 3-φωσφογλυκερόλης (G3P-D), απαραίτητο για την μεταβολική δραστηριότητα του παρασίτου.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
H <sub>2</sub> O	Υπόλοιπος όγκος (έως 20 μl)
Buffer (2x)	1x
Forward primer (10 μM)	0,2 μM
Reverse primer (10 μM)	0,2 μM
DNA	15ng

Πίνακας 9: Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων για την qRT-PCR στο γονίδιο του MRPA

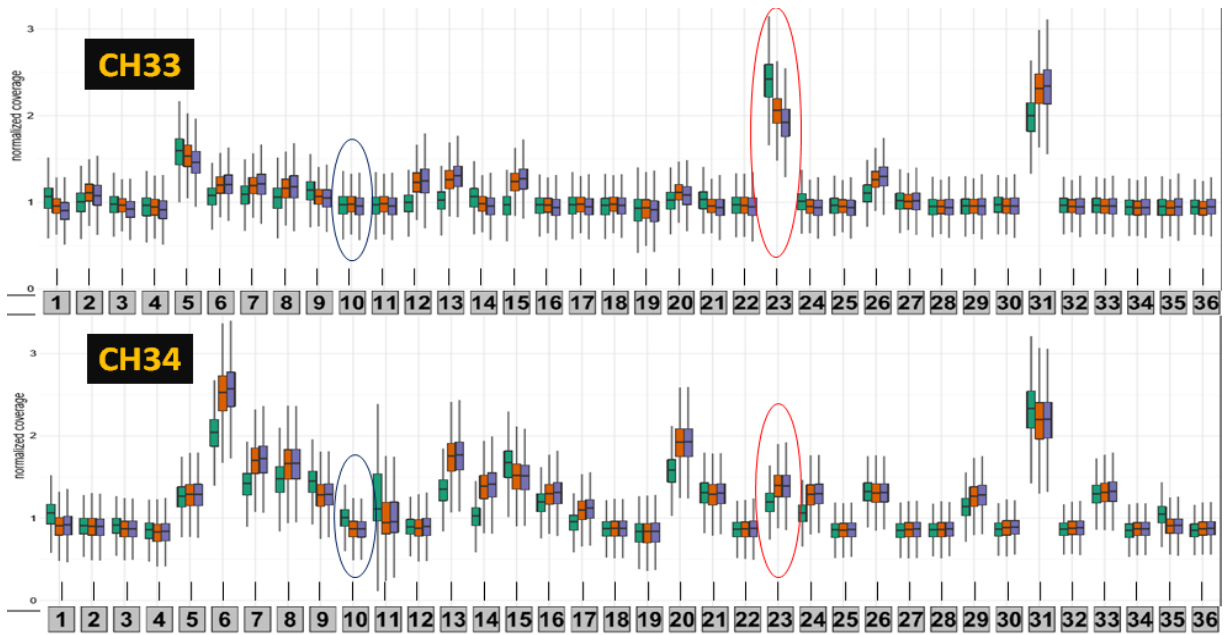
Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
1	94 °C	3 λεπτά
2	x35 φορές	94 °C
3		54 °C
4		72 °C
5	x 100 φορές	45 °C (+ 0,5 °C σε κάθε κύκλο)
6		4 °C
		∞

Πίνακας 10: Προφίλ θερμοκυκλοποίησης της qRT-PCR. Στο τέλος του σταδίου 4 κάθε φορά προγραμματίστηκε φωτομέτρηση στα 450 nm. Το στάδιο 5 αποτελεί την ανάλυση του σημείου τήξης. Οι καμπύλες τήξης δεν παραθέτονται.

A/A	ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ (5' → 3')	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ	T <sub>m</sub> (°C)
1	<b>LINF_230007800 Forward</b>	TATCACTTTCGTGGTGGCCC	203 ζεύγη βάσεων	59,4
2	<b>LINF_230007800 Reverse</b>	GCTCCACTTCGTGGGTGTAA		59,4
3	<b>LINF_100011800 Forward</b>	AATGAGAAGCGCGAGAACGA	101 ζεύγη βάσεων	57,3
4	<b>LINF_100011800 Reverse</b>	ATCTCAGCACCTTGTACGC		59,4

Πίνακας 11: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και για την qRT-PCR στο γονίδιο MRPA

Η qRT-PCR σχεδιάστηκε για την ποιοτική (αρχικά) αξιολόγηση της σχετικής διαφοράς της ποσότητας του γονιδίου LINF\_230007800 (MRPA μεταφορέας) του χρωμοσώματος 23 σε δύο στελέχη, CH33 και CH34 γνωστής καρυοτυπικής πολυπλοειδίας. Ως γνωστόν το γονιδίωμα του παρασίτου *Leishmania* μεταβάλλεται ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Έγινε, λοιπόν, χρωμοσωμική αλληλούχηση στο γονιδίωμα των παρασίτων αυτών σε 3 διαδοχικές ανακαλλιέργειες (in vitro serial passage) για να αξιολογηθεί η σταθερότητα της πλοειδίας. Φαίνεται πως το στέλεχος CH33 εμφανίζει 4πλοειδία στο χρωμόσωμα 23 ενώ το στέλεχος CH34 εμφανίζει 3πλοειδία. Αντιθέτως και τα δύο στελέχη είναι διπλοειδή στο χρωμόσωμα 10 στο οποίο εδράζει το γονίδιο του ενζύμου G3P-D (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Καρυότυπος σε 3 διαδοχικές ανακαλλιέργειες στα στελέχη CH33 και CH34. Κάθε μια μονάδα ισούται με διπλοειδία στο συγκεκριμένο γράφημα, Γκουζέλου και Σμυρλή.

Με το σχεδιασμό εκκινητών ειδικών για το γονίδιο στόχο (MRPA μεταφορέας) και με την επιλογή του κατάλληλου γονιδίου αναφοράς (G3P-D), που μετά από αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος των στελεχών παρατηρήθηκε πως βρίσκεται μόνο σε 1 αντίγραφο και σε ένα χρωμόσωμα που σπάνια αλλάζει πλοειδία (χρωμόσωμα 10), θέλαμε να δείξουμε ότι οι συνθήκες qRT-PCR είναι ευαίσθητες και ικανές για να αναδείξουν τις διαφορές στα αντίγραφα του γονιδίου του MRPA μεταφορέα που υπάρχουν στα συγκεκριμένα στελέχη. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Είναι ένας μαθηματικός τύπος που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της σχετικής διαφοράς αντιγράφων DNA (DNA ανάλυση) ή γονιδιακής έκφρασης (αντιγράφων cDNA), κατά την εκτέλεση μιας qPCR.

### 3.2.5 In vitro δοκιμασία φαρμάκου σε προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου με την χρήση ρεσαζουρίνης

Τον σκοπό του συγκεκριμένου πειράματος αποτέλεσε ο προσδιορισμός του  $IC_{50}$  της μλτεφοσίνης σε διάφορα στελέχη του παρασίτου *Leishmania*. Το  $IC_{50}$  υποδεικνύει την συγκέντρωση του φαρμάκου που απαιτείται ώστε να ανασταλεί το 50% της ανάπτυξης των παρασίτων. Είναι λογικό ότι κάθε φάρμακο έχει διαφορετικό  $IC_{50}$  αλλά και κάθε

στέλεχος του παρασίτου ανταποκρίνεται διαφορετικά στο ίδιο φάρμακο. Το πείραμα βασίζεται στην αναγωγή της ρεσαζουρίνης (μπλέ χρώμα) σε ρεσοφουρίνη (ροζ χρώμα) λόγω της μεταβολικής δραστηριότητας των παρασίτων.<sup>[13]</sup> Η ρεσαζουρίνη δεν είναι τοξική για τα κύτταρα, διαπερνάει εύκολα την κυτταρική μεμβράνη και είναι ευαίσθητη στην οξειδοαναγωγή. Παρουσία NADH εντός του κυττάρου ανάγεται σε ρεσοφουρίνη. Είναι λοιπόν κατανοητό ότι όσο μειώνεται ο αριθμός των προμαστιγωτών λόγω αυξανόμενης συγκέντρωσης του φαρμάκου (έκπτωση μεταβολικής δραστηριότητας και θάνατος) τόσο μειώνεται και η αναγωγή της ρεσαζουρίνης.<sup>[13]</sup> Αρχικά υπολογίζεται ο αριθμός των παρασίτων σε κάθε καλλιέργεια ξεχωριστά. Για τον σκοπό αυτό, λαμβάνεται μια μικρή ποσότητα ( $\approx 200$   $\mu\text{l}$ ) καλλιέργειας με την βοήθεια αποστειρωμένης πιπέτας μιας χρήσης και τοποθετείται σε ένα erendorf. Ύστερα λαμβάνονται 100  $\mu\text{l}$  καλλιέργειας από το erendorf, με την χρήση πιπέτας, και μεταφέρονται σε ένα καινούργιο erendorf. Στο τελευταίο τοποθετούνται 900  $\mu\text{l}$  PBS (αραίωση 1/10) και 2-3 σταγόνες φορμόλης. Η φορμόλη μονιμοποιεί τα παράσιτα και έτσι διευκολύνεται η διαδικασία καταμέτρησης τους. Η καταμέτρηση γίνεται σε πλάκα Malassez. Περίπου 20  $\mu\text{l}$  τελικού δείγματος τοποθετούνται σε κάθε θέση εξέτασης και η πλάκα μεταφέρεται στο μικροσκόπιο. Υπολογίζεται ο αριθμός των παρασίτων σε τουλάχιστον 5 τετράγωνα σε κάθε θέση εξέτασης και εξάγεται ο μέσος όρος αυτών. Το πείραμα απαιτεί η καλλιέργεια των παρασίτων να βρίσκεται σε λογαριθμική φάση. Αφού υπολογιστεί ο συνολικός αριθμός παρασίτων στην καλλιέργεια τότε γίνεται αραίωση αυτής σε αποστειρωμένο καλλιεργητικό υλικό (M199) σε τελική συγκέντρωση  $4 \times 10^6$  παράσιτα/ml.

Ύστερα παρασκευάζονται 700  $\mu\text{l}$  φαρμάκου διαλυμένο σε M199 διπλάσιας συγκέντρωσης της υψηλότερης επιθυμητής. Στην συγκεκριμένη περίπτωση η μέγιστη συγκέντρωση φαρμάκου ήταν 100  $\mu\text{M}$ . Παρασκευάστηκαν, λοιπόν, 700  $\mu\text{l}$  διαλύματος με συγκέντρωση μιλτεφοσίνης 200  $\mu\text{M}$ . Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις επιτυγχάνονται με διαδοχικές αραιώσεις αυτού του διαλύματος. Σε μια πλάκα elisa τοποθετούνται 200  $\mu\text{l}$  του παραπάνω διαλύματος στην θέση 2B. Στα επόμενα 7 πηγαδάκια της ίδιας σειράς τοποθετούνται 100  $\mu\text{l}$  καθαρού M199. Με μια πιπέτα P200 λαμβάνονται 100  $\mu\text{l}$  από το πηγαδάκι 2B και μεταφέρονται στο επόμενο (3B). Γίνεται ανακίνηση και αμέσως μετά 100  $\mu\text{l}$  αναρροφούνται και μεταφέρονται στο επόμενο πηγαδάκι (4B). Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι και το τελευταίο πηγαδάκι. Στο τέλος των διαδοχικών αραιώσεων απορρίπτονται 100  $\mu\text{l}$ . Το κάθε στέλεχος παρασίτου ελέγχεται 3 φορές σε

κάθε επιθυμητή συγκέντρωση. Για αυτό η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες δυο φορές στις επόμενες σειρές. Ύστερα προστίθεται σε κάθε πηγαδάκι 100 μl της αραιωμένης καλλιέργειας. Επίσης τοποθετούνται 200 μl αραιωμένης καλλιέργειας σε τρία άδεια πηγαδάκια. Αυτή η τριπλέτα αποτελεί το control, δηλαδή το 100% βιωσιμότητας των παρασίτων καθώς η συγκέντρωση του φαρμάκου σε αυτά τα πηγαδάκια είναι μηδενική. Τέλος, τοποθετούνται 200 μl καθαρό M199 σε 3 άδεια πηγαδάκια. Αυτή η τελευταία τριπλέτα αποτελεί το blank, δηλαδή τον «θόρυβο» που προκαλούν πιθανώς τα συστατικά του καλλιεργητικού υλικού κατά την διαδικασία της μέτρησης.

Προστίθεται PBS στα άδεια πηγαδάκια γύρω από την περιοχή του πειράματος και η πλάκα σκεπάζεται με το πλαστικό καπάκι. Χωρίς να σφραγιστεί αεροστεγώς μεταφέρεται στον επωαστικό κλίβανο σε συνθήκες 26°C και 5% CO<sub>2</sub>. Η παρουσία του διοξειδίου του άνθρακα βοηθάει στην αναγωγή της ρεσαζουρίνης, αυξάνοντας έτσι το σήμα αλλά και την ευαισθησία του πειράματος.<sup>[14]</sup> Μετά από 48 ώρες προστίθενται 25 μl ρεσαζουρίνης σε κάθε πηγαδάκι και στις 72 ώρες εξάγονται τα αποτελέσματα. Η πλάκα ακτινοβολείται σε μήκος κύματος 570 nm ( $\lambda_{max}$  ρεσοφουρίνης) και η μέτρηση γίνεται στα 590 nm. Τα αποτελέσματα επεξεργάζονται σε κατάλληλο λογισμικό και ορίζεται το IC<sub>50</sub> για κάθε στέλεχος ξεχωριστά.



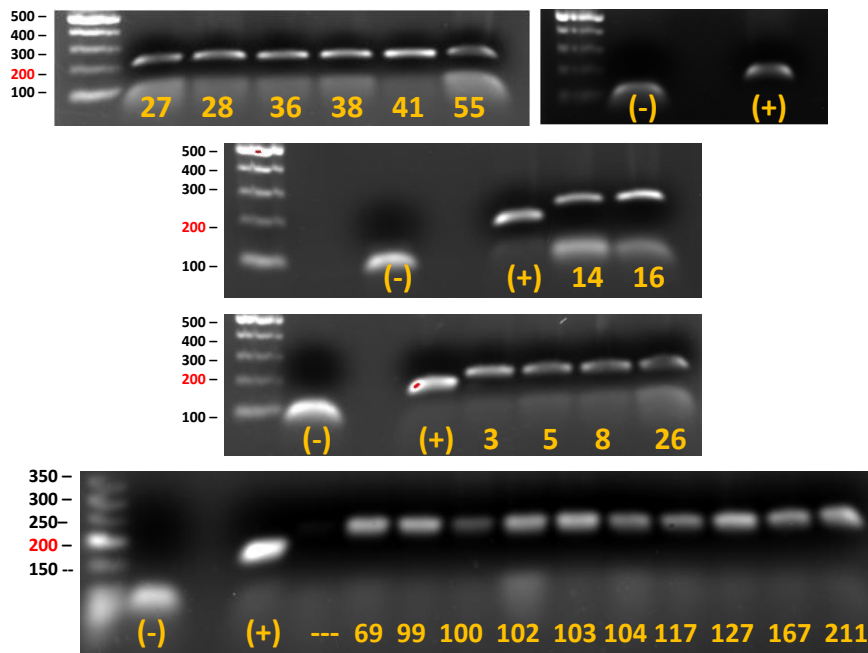
## 4. Αποτελέσματα

### 4.1 Έλεγχος απουσίας του γονιδίου του υποδοχέα μιλτεφοσίνης με PCR σε στελέχη παρασίτων του *Leishmania donovani complex* από την Ανατολική Μεσόγειο

Παρακάτω παρατίθενται οι εικόνες με τα στελέχη στα οποία έγινε ποιοτικός έλεγχος απουσίας του γονιδίου LINF\_130020800 το οποίο εκφράζει τον υποδοχέα της μιλτεφοσίνης (LMT). Για την εντόπιση του επιθυμητού προϊόντος στην πηκτή χρησιμοποιήθηκαν DNA μάρτυρες αναφοράς (μέγεθος σε ζεύγη βάσεων). Τα μεγέθη αναγράφονται στα αριστερά κάθε ηλεκτροφόρησης. Το γονίδιο LINF\_130020800 έχει μέγεθος 222 ζεύγη βάσεων και η ζώνη που αντιστοιχεί σε αυτό αναμένεται να εμφανιστεί λίγο πιο πάνω από εκείνη του DNA δείκτη στα 200 ζεύγη βάσεων. Με κόκκινο σημειώθηκε το μοριακό μέγεθος της ζώνης του μάρτυρα, κοντά στην οποία βρίσκεται το γονίδιο στόχος. Επίσης, τα δείγματα control, θετικό και αρνητικό, συμβολίζονται με (+) και (-) αντίστοιχα. Το θετικό δείγμα control, όπως αναφέρθηκε, περιέχει την ίδια ποσότητα mastermix και DNA με τα υπόλοιπα δείγματα με την μόνη διαφορά ότι περιέχει τους εκκινητές για το γονίδιο της τουμπουλίνης. Το μέγεθος του γονιδίου αυτού είναι 176 ζεύγη βάσεων και η ζώνη του στην πηκτή αγαρόζης αναμένεται να εμφανιστεί κάτω από εκείνη του DNA μάρτυρα στα 200 ζεύγη βάσεων (σημασμένη με κόκκινο).

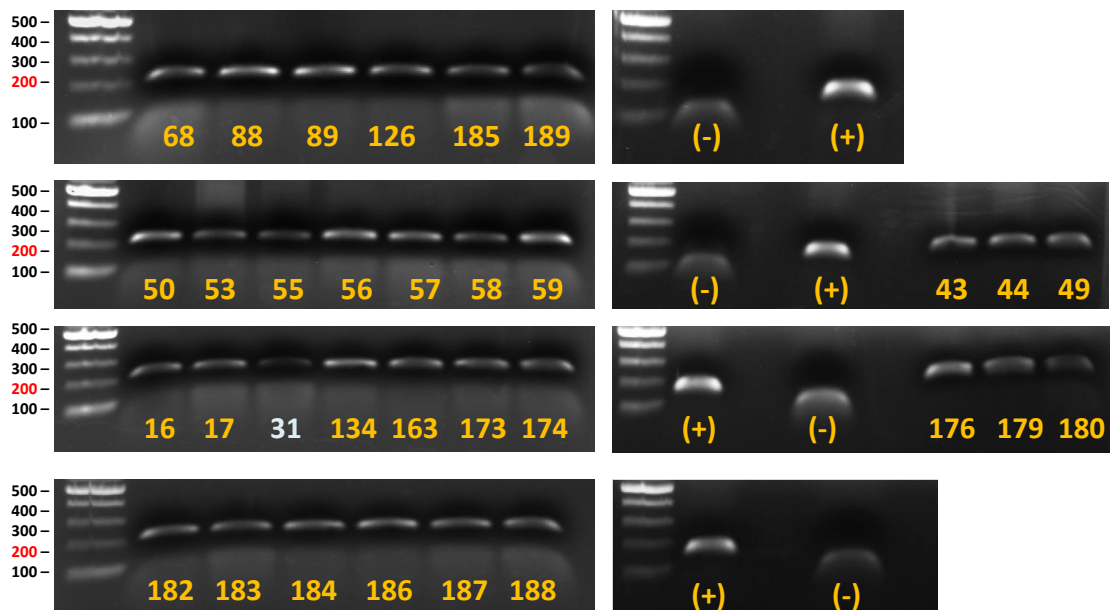
Όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν ανήκουν στο σύμπλεγμα *L. donovani* (αποτελείται από τα είδη *L. infantum* και *L. donovani*) και έχουν απομονωθεί από περιοχές της Ανατολικής Μεσογείου (Πίνακας 3). Πιο συγκεκριμένα, τα στελέχη GD (*L. infantum*) απομονώθηκαν από μολυσμένους σκύλους σε διάφορες περιοχές τις Ελλάδας και τα στελέχη CD, εξίσου από σκύλους, σε περιοχές της Κύπρου. Τα στελέχη EP απομονώθηκαν από περιοχές της Τουρκίας. Τέλος, τα στελέχη CH αποτελούν ένα ιδιαίτερο μονοφυλετικό γκρούπ υβριδίων (*L. donovani/infantum*) και έχουν απομονωθεί από μολυσμένους ανθρώπους στην Κύπρο.<sup>[20] [21] [22]</sup>

## Στελέχη GD



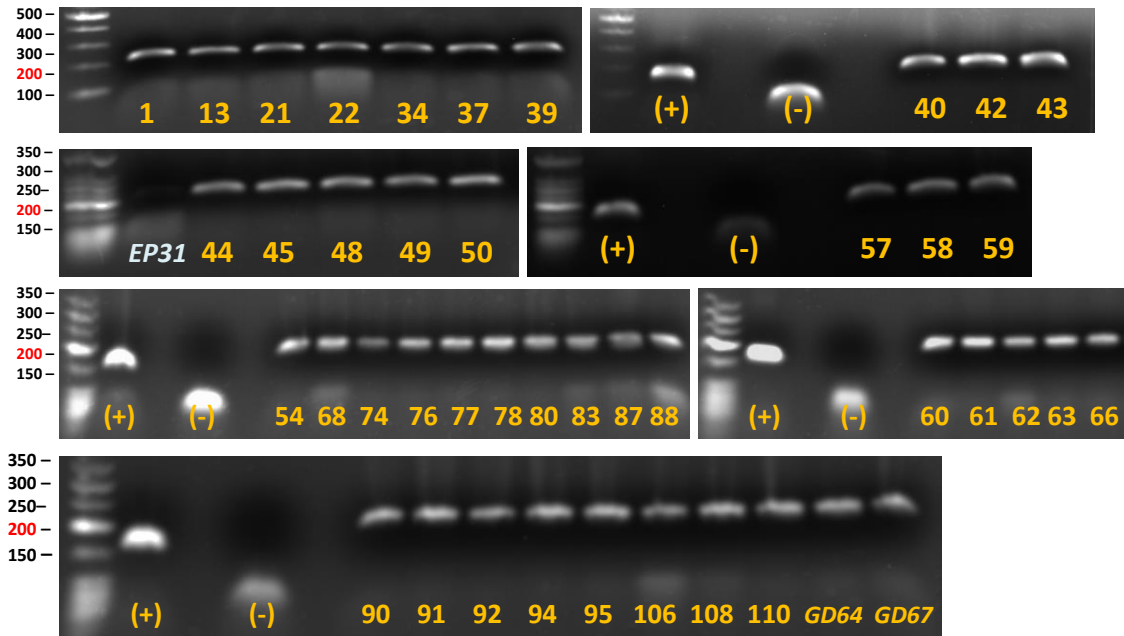
Εικόνα 17: PCR σε 22 στελέχη GD

## Στελέχη ΕΡ



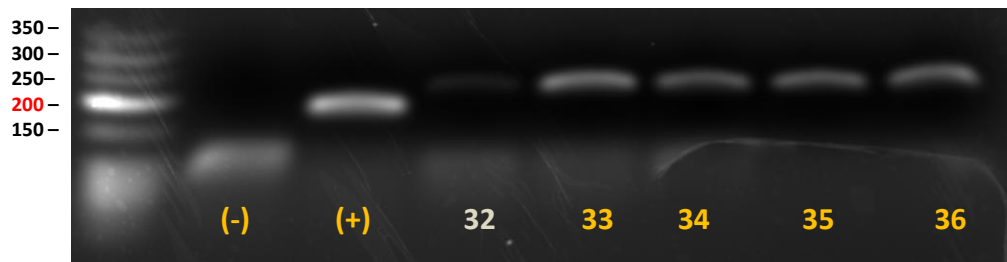
Εικόνα 18: PCR σε 32 στελέχη ΕΡ. Το ΕΡ31 εμφανίζει ζώνη ενίσχυσης μειωμένης έντασης.

## Στελέχη CD



Εικόνα 19: PCR σε 41 στελέχη CD. Το EP31 επανελέγχεται. Ελέγχονται, επίσης, το GD64 και το GD67 (κάτω δεξιά)

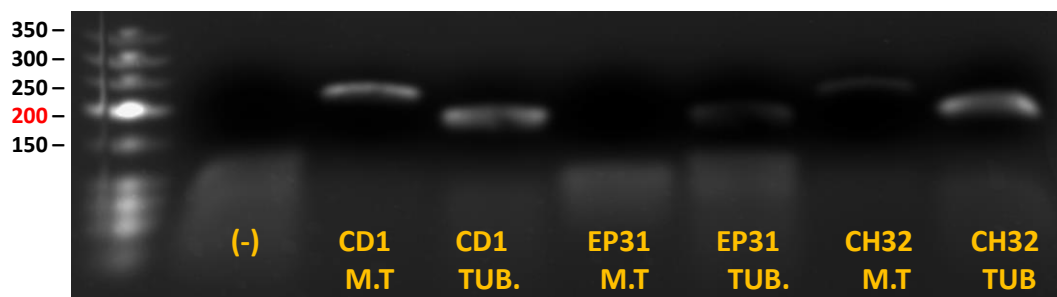
## Στελέχη CH



Εικόνα 20: PCR σε 5 στελέχη CH. Το CH32 εμφανίζει αχνή μπάντα.

Συνολικά 102 δείγματα εξετάσθηκαν, εκ των οποίων κανένα δεν εμφάνισε αρνητικό αποτέλεσμα. Δύο δείγματα DNA, του EP31 και του CH32, εμφάνισαν συγκριτικά διαφορετικό αποτέλεσμα σε σχέση με τα άλλα δείγματα παρόλο που ήταν θετικά στο γονίδιο LINF\_130020800. Θεωρήθηκε, λοιπόν, πως η διαφορά της έντασης του προϊόντος θα μπορούσε να οφείλεται στην μικρότερη ποσότητα του γονιδίου στο DNA των στελεχών αυτών. Για την επαλήθευση αυτής της θεωρίας τα παραπάνω δείγματα εξετάσθηκαν ξανά, όχι μόνο στο γονίδιο αυτό αλλά και στο γονίδιο της τουμπουλίνης. Πραγματοποιήθηκαν δύο παράλληλες PCR με τις βέλτιστες συνθήκες για το κάθε γονίδιο. Παρόλα αυτά το mastermix ήταν κοινό και οι τελικές συγκεντρώσεις του DNA και των εκκινήτων σε κάθε δείγμα ήταν ίδιες. Έτσι μπορεί να γίνει μία κατά προσέγγιση ποσοτική σύγκριση των γονιδίων.

## Έλεγχος CH32 και EP31 με τους εκκινήτες του γονίδιο της τουμπουλίνης



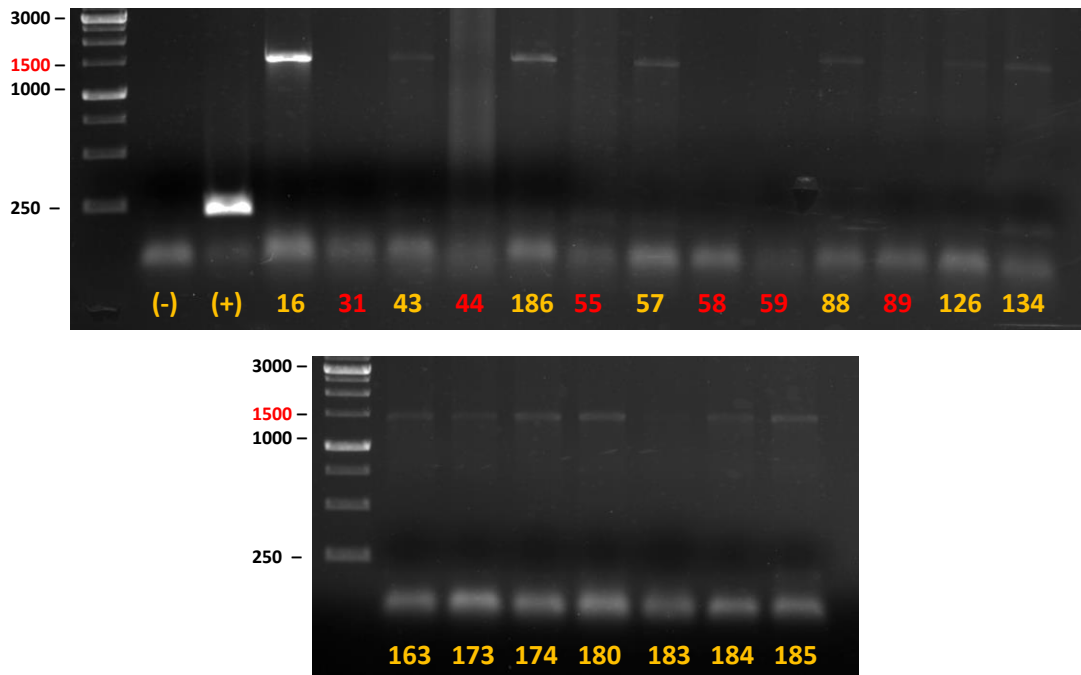
Εικόνα 21: Έλεγχος EP31 και CH32, M.T = miltefosine transporter, TUB = τουμπουλίνη

Στην *Εικόνα 21* το προϊόν της αντίδρασης Μ.Τ για το στέλεχος EP31 φαίνεται να είναι πιο χαμηλά από το όριο ανίχνευσης. Την ίδια στιγμή που το προϊόν της αντίδρασης τουμπουλίνης στο ίδιο στέλεχος έχει σημαντικά χαμηλότερη ένταση σε σχέση με εκείνο του CD1 (δείγμα control). Έτσι λοιπόν είναι πιθανό, για το στέλεχος EP31, η έλλειψη του προϊόντος του Μ.Τ να οφείλεται σε τεχνικό σφάλμα (π.χ κακή ποιότητα απομονωμένου DNA). Η παρουσία τοξικών ουσιών, αντιδραστηρίων από την διαδικασία απομόνωσης του DNA είτε κάποιας άλλης ένωσης (πρωτεΐνες, ένζυμα, κ.α) μπορεί να παρεμποδίσει την σύνδεση των εκκινητών στο DNA εκμαγείο ή και την ενεργότητα του ενζύμου. Τα αποτελέσματα είναι ψευδώς αρνητικά και για αυτόν το λόγο το δείγμα απορρίφτηκε. Αντίθετα το δείγμα CH32 δεν εμφανίζει μεγάλη διαφορά στην ένταση του προϊόντος της τουμπουλίνης με το δείγμα control. Το εν λόγω στέλεχος είναι πιθανό να φέρει λιγότερα αντίγραφα αυτού του γονιδίου, αν και χρειάζονται επιπλέον πειράματα (qPCR) για να επιβεβαιωθεί αυτή η υπόθεση.

## **4.2 Έλεγχος απουσίας του γονιδιακού τύπου MSL με PCR σε στελέχη παρασίτων του *Leishmania donovani complex* από την Ανατολική Μεσόγειο**

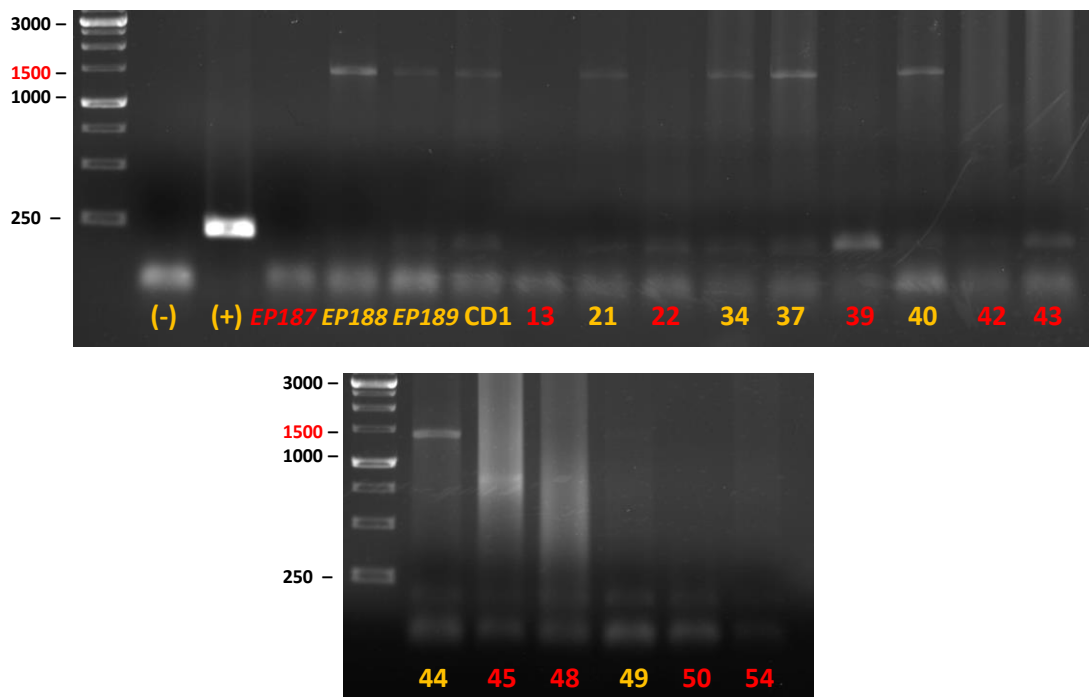
Παρακάτω παρατίθενται οι εικόνες με τα στελέχη στα οποία έγινε ποιοτικός έλεγχος απουσίας ενός από τα 4 γονίδια που ανευρίσκονται στον γονιδιακό τύπο MSL. Η απουσία του γονιδίου LinJ.31.2370 συσχετίστηκε με την απουσία ολόκληρου του γονιδιακού τύπου σύμφωνα με το μοντέλο του ομόλογου ανασυνδιασμού (*Εικόνα 15*). Και σε αυτήν την PCR χρησιμοποιήθηκαν δείγματα control και DNA μάρτυρες μοριακού μέγεθος (σε ζεύγη βάσεων) για την εντόπιση του επιθυμητού προϊόντος στην πηκτή. Τα μεγέθη αναγράφονται στα αριστερά κάθε ηλεκτροφόρησης. Με κόκκινο σημειώθηκε το μοριακό μέγεθος του δείκτη (1500 ζεύγη βάσεων), κοντά στο οποίο βρίσκεται το προϊόν του γονιδίου LinJ.31.2370 μεγέθους 1423 ζευγών βάσεων. Το μέγεθος του θετικού control είναι 222 ζεύγη βάσεων (γονίδιο LINJ\_130020800).

## Στελέχη ΕΡ



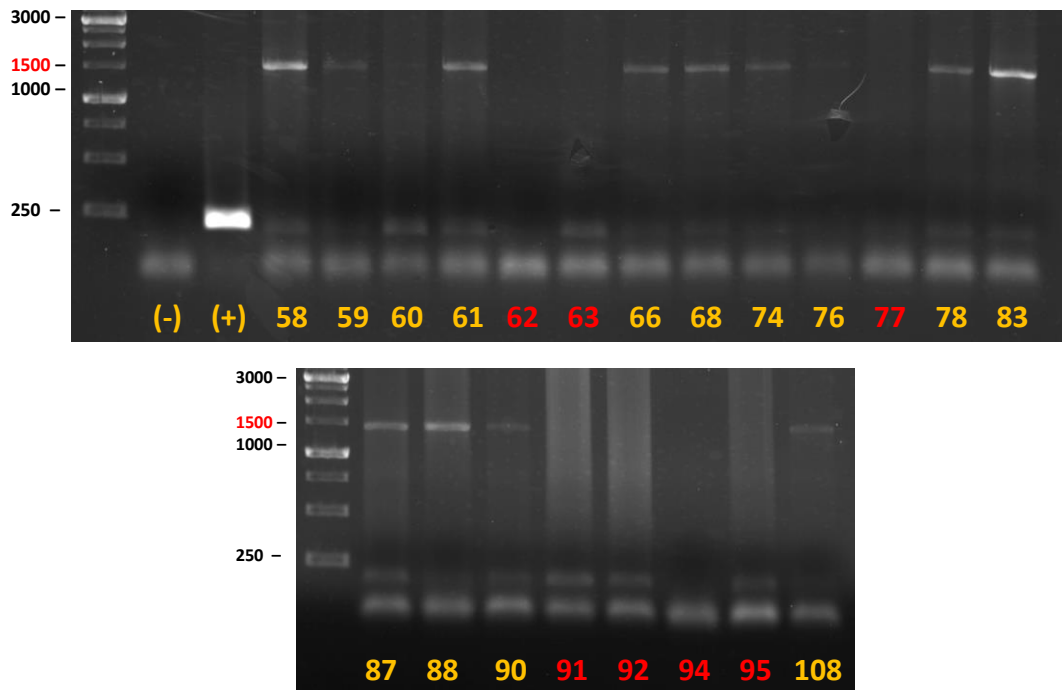
Εικόνα 22: PCR σε 20 στελέχη ΕΡ.

## Στελέχη CD



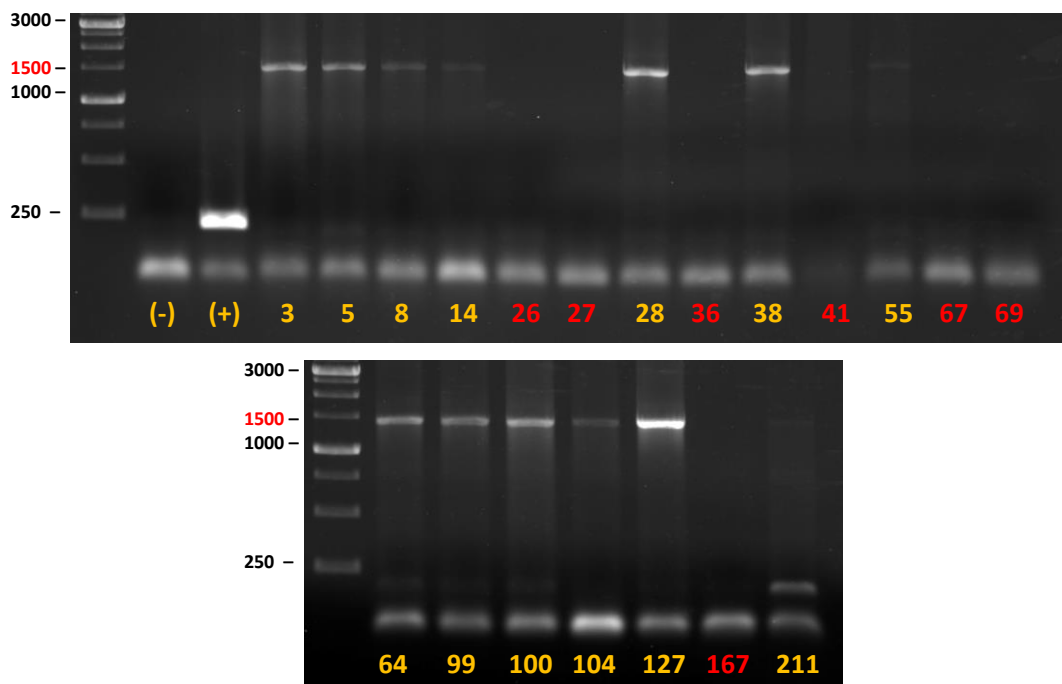
Εικόνα 23: PCR σε 16 στελέχη CD. Το EP187, EP188, EP189 ελέγχονται σε αυτήν την πηκτή.

## Στελέχη CD



Εικόνα 24: PCR σε 21 στελέχη CD.

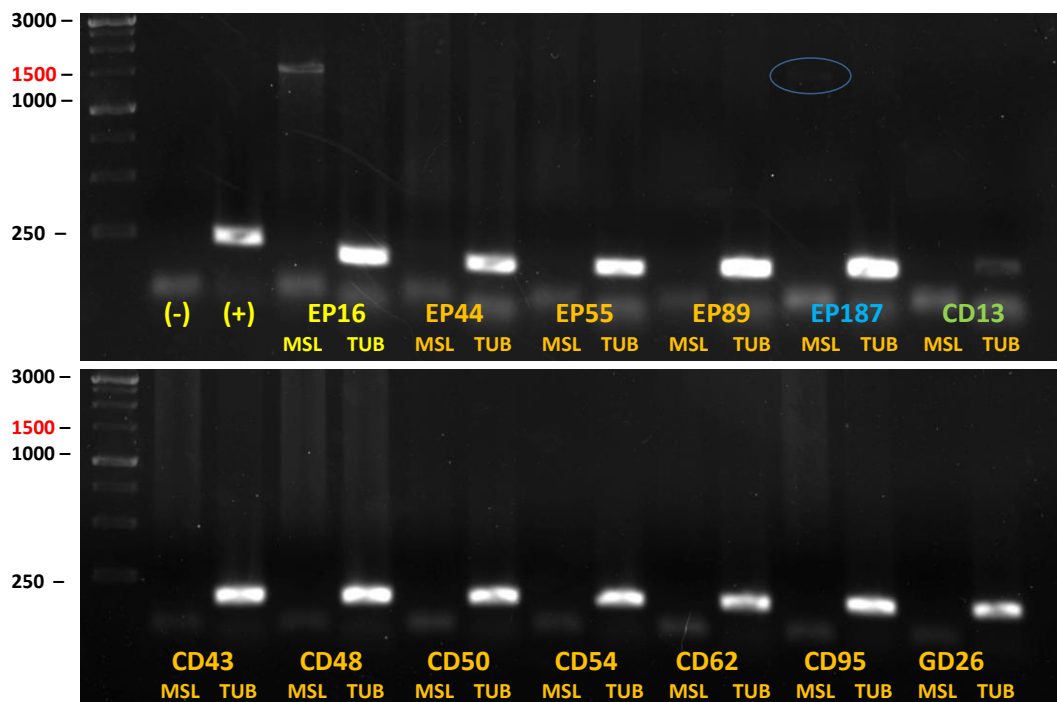
## Στελέχη GD



Εικόνα 25: PCR σε 20 στελέχη GD.

Συνολικά 80 δείγματα εξετάσθηκαν. Από αυτά, 30 στελέχη βρέθηκαν αρνητικά (σημειώνονται με κόκκινο χρώμα). Ακολούθησε ο έλεγχος της ποιότητας του απομονωμένου DNA με τους εκκινητές που ενισχύουν το γονίδιο της τουμπουλίνης όπως και στην προηγούμενη PCR.

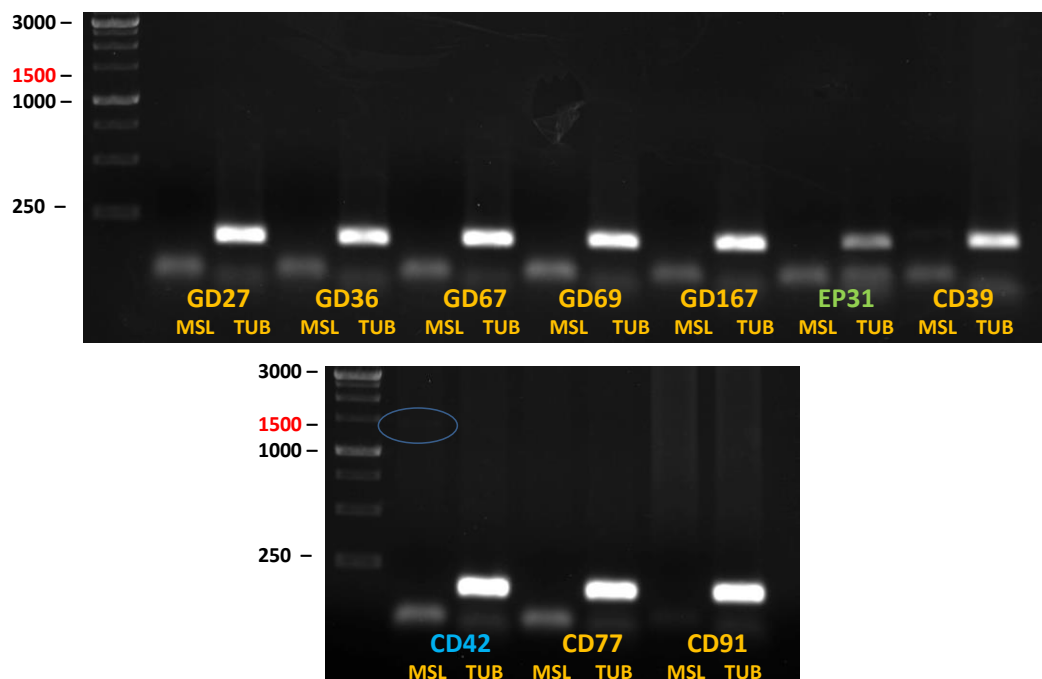
## Έλεγχος στελεχών με αρνητικό προϊόν αντίδρασης



Εικόνα 26: Παράλληλες PCR με τις βέλτιστες συνθήκες και για την ενίσχυση και των δύο γονιδίων. MSL = το γονίδιο *LinJ31.2370* του γονιδιακού τύπου MSL, TUB = τουμπουλίνη.



## Έλεγχος στελεχών με αρνητικό προϊόν αντίδρασης

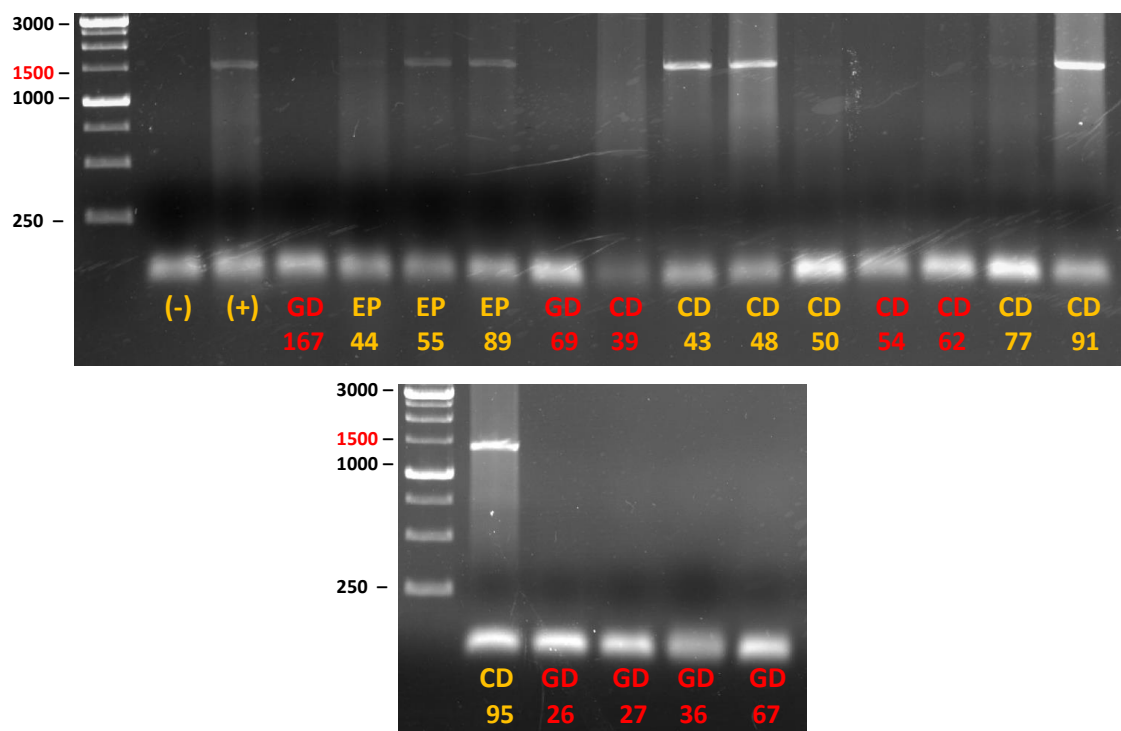


Εικόνα 27: MSL = το γονίδιο *LinJ31.2370* του γονιδιακού τόπου MSL, TUB = τουμπουλίνη.

Το στέλεχος EP16 χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο δείγμα για τις ανάγκες αυτού του πειράματος. Στις Εικόνες 26-27 το στέλεχος EP187 και CD42 εμφανίζει αχνό θετικό αποτέλεσμα. Εφόσον τα δείγματα control του συγκεκριμένου πειράματος είναι σωστά τότε απορρίπτεται το ενδεχόμενο της επιμόλυνσης και το στέλεχος αυτό καταχωρείται σαν θετικό στον γονιδιακό τόπο MSL. Τα στελέχη CD13 και EP31 εμφανίζουν προϊόν χαμηλής έντασης στο γονίδιο της τουμπουλίνης σε σχέση με εκείνο του προτύπου και γι αυτό απορρίπτονται.

Με σκοπό την βελτίωση των συνθηκών της PCR και κατ' επέκταση της εικόνας κάποιων δειγμάτων (παρουσία νεφελώματος στην πηκτή) αλλά και την επιβεβαίωση της «αρνητικότητας» των δειγμάτων (δύο δείγματα, EP187 και CD42, εμφανίστηκαν ελαφρώς θετικά ενώ προηγουμένως το προϊόν της αντίδρασης ήταν πιο χαμηλά από το όριο ανίχνευσης) πραγματοποιήθηκε μια τελευταία PCR. Οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων σε κάθε δείγμα παρέμειναν ίδιες. Βελτιώθηκε μόνο ο χρόνος υβριδισμού και επιμήκυνσης των εκκινήτων.

## Αύξηση χρόνου επιμήκυνσης και υβριδισμού



Εικόνα 28: Επανάλεγχος αρνητικών στελεχών με τις βελτιωμένες συνθήκες.

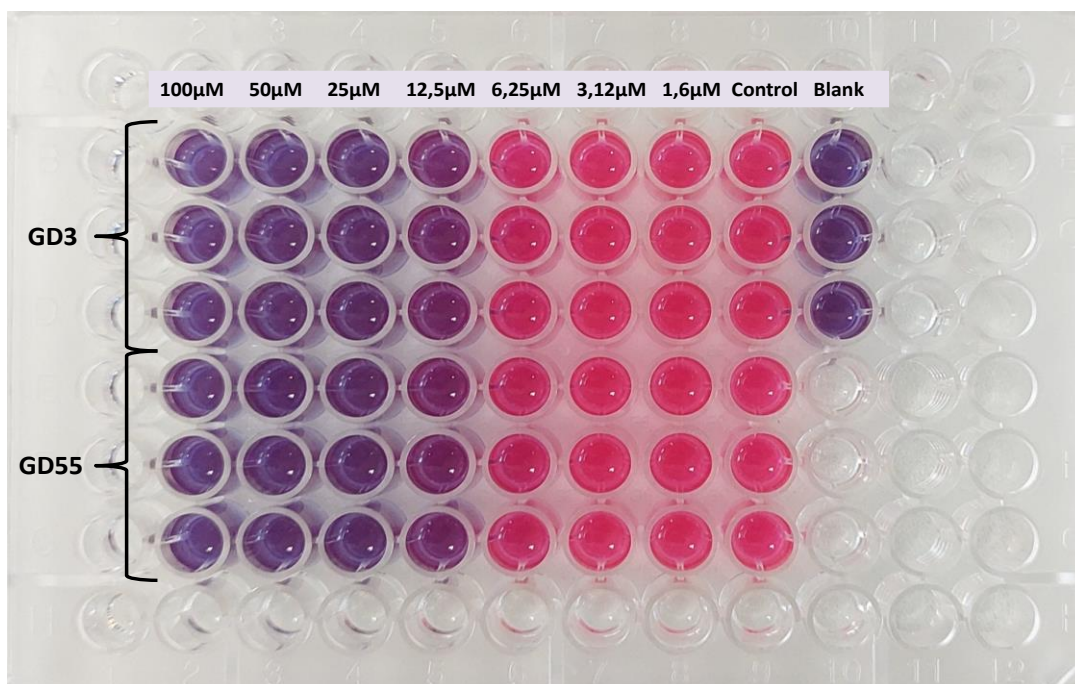
Ύστερα από την βελτιστοποίηση των συνθηκών του πειράματος, αυξήθηκε το προϊόν ενίσχυσης σε κάποια στελέχη. Τα στελέχη αυτά καταχωρήθηκαν σαν θετικά στο γονίδιο LinJ.31.2370 και κατ' επέκταση στον γονιδιακό τόπο MSL. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το τελικό προϊόν μερικών στελεχών με τις προηγούμενες συνθήκες μπορεί να ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης. Τα υπόλοιπα 9 στελέχη (CD39, CD54, CD62, GD26, GD27, GD36, GD67, GD69, GD167) είναι αρνητικά.

### **4.3 Αποτελέσματα της in vitro δοκιμασίας φαρμάκου σε προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου με την χρήση ρεσαζουρίνης.**

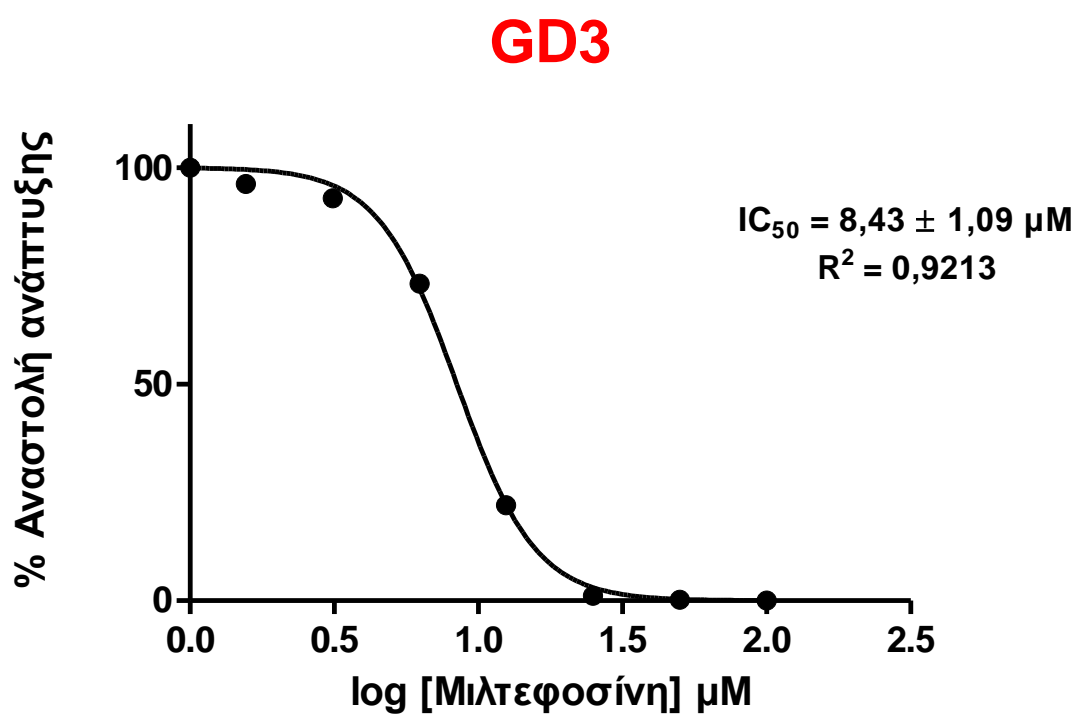
Σε αυτήν την ενότητα παρατίθενται τα αποτελέσματα της in vitro δοκιμασία εκτίμησης της αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης του παρασίτου *Leishmania* παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων μιλτεφοσίνης. Στο παρόν πείραμα ελέγχθηκε η συσχέτιση του IC<sub>50</sub> 4 στελεχών με το αντίστοιχο αποτέλεσμα της PCR. Τα αποτελέσματα της in vitro δοκιμασίας δεν συμφωνούν με εκείνα της PCR. Παρόλο που υπάρχουν γενετικές διαφορές μεταξύ των στελεχών, φαίνεται να μην σχετίζονται άμεσα με την in vitro αντίσταση στην μιλτεφοσίνη. Ίσως και άλλοι παράγοντες να παίζουν ρόλο ύστερα από την μόλυνση με το παράσιτο. Εν πάση περιπτώσει, η ύπαρξη αυτών των μεταλλάξεων και στα στελέχη της Ανατολικής Μεσογείου θα πρέπει να μας κρατάει σε εγρήγορση.

Η in vitro δοκιμασία διεξήχθη σε 4 στελέχη, 2 θετικά (GD3, GD55) στο γονιδιακό τόπο MSL και 2 αρνητικά (GD67, GD69). Υπολογίστηκε το IC<sub>50</sub> κάθε στελέχους με την χρήση κατάλληλων λογισμικών (Prism – Graphpad) και έγινε σύγκριση μεταξύ τους. Για την κατασκευή των γραφικών παραστάσεων χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές του φθορισμού της ρεσοφουρίνης στα 590nm (λεκτομπίης ρεσοφουρίνης) ύστερα από διέγερση και όχι το φάσμα ατομικής απορρόφησης, καθώς παρατηρήθηκε ότι έτσι το πείραμα έχει μεγαλύτερη ακρίβεια.<sup>[14]</sup>

Σύμφωνα με την έρευνα των Juliana B. T. Carnielli et al <sup>[15]</sup>, δείχτηκε ότι το in vitro προφίλ ευαισθησίας στην μιλτεφοσίνη απομονωμένων ενδοκυττάρων αμαστιγωτών μορφών από θεραπευμένους και υποτροπιάζοντες ασθενείς έδειξε θετική συσχέτιση με την κλινική έκβαση. Πιο συγκεκριμένα το IC<sub>50</sub> > 8,0 μM στα μοντέλα αμαστιγωτών μορφών προβλέπει αποτυχία θεραπείας ή υποτροπή με ευαισθησία 82% και ειδικότητα 100% . Ακόμη, επισημαίνεται ξανά η ισχυρή συσχέτιση απουσίας του γονιδιακού τόπου MSL με αποτυχία θεραπείας με μιλτεφοσίνη (92% ευαισθησία και 78% ειδικότητα).<sup>[15]</sup> Σύμφωνα με το παραπάνω δεδομένο έγινε αξιολόγηση της ευαισθησίας στα 4 στελέχη που ελέγχθηκαν.

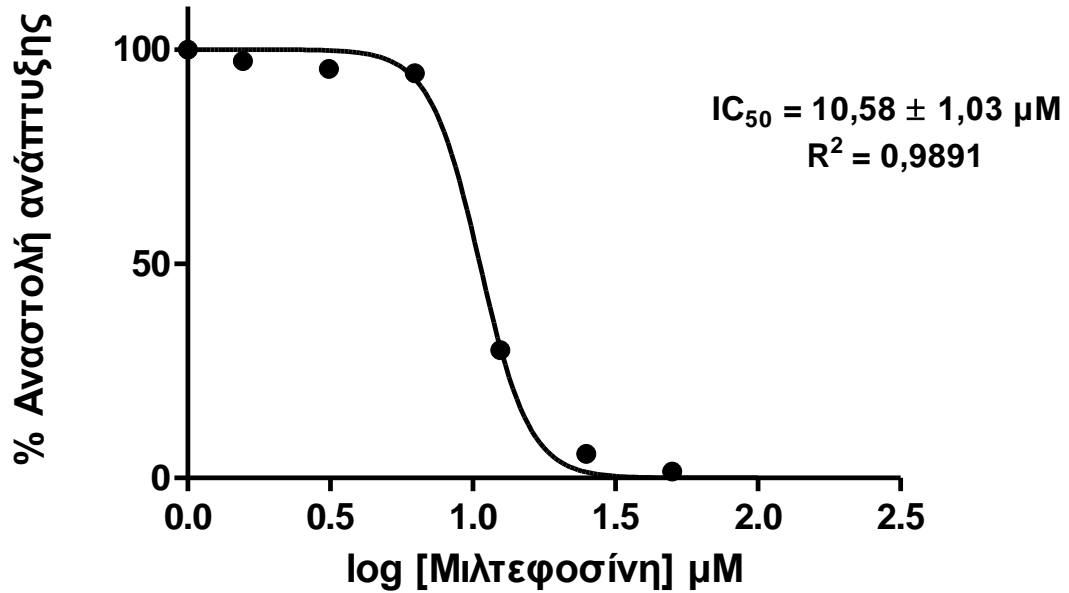


Εικόνα 29: Τελικό αποτέλεσμα δοκιμασίας φαρμάκου για τα στελέχη GD3 και GD55

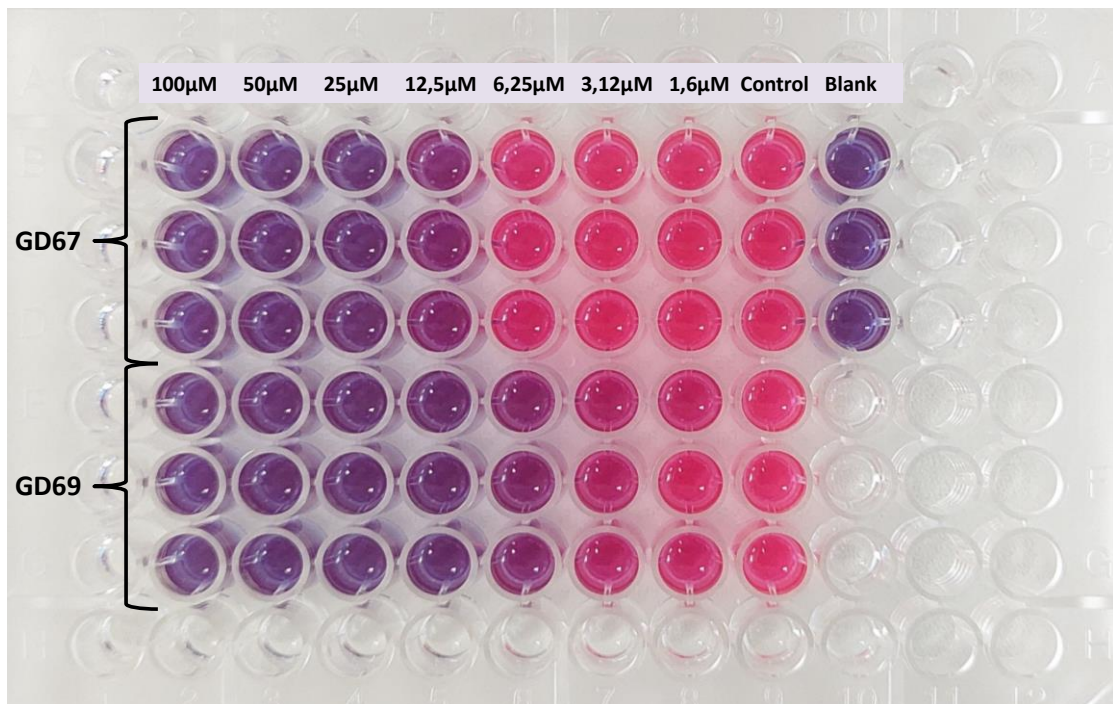


Εικόνα 30: Αποτελέσματα μέτρησης του φθορισμού της ρεσοφουρίνης ύστερα από διέγερση στα 560 nm, στο στέλεχος GD3 (72 ώρες)

## GD55

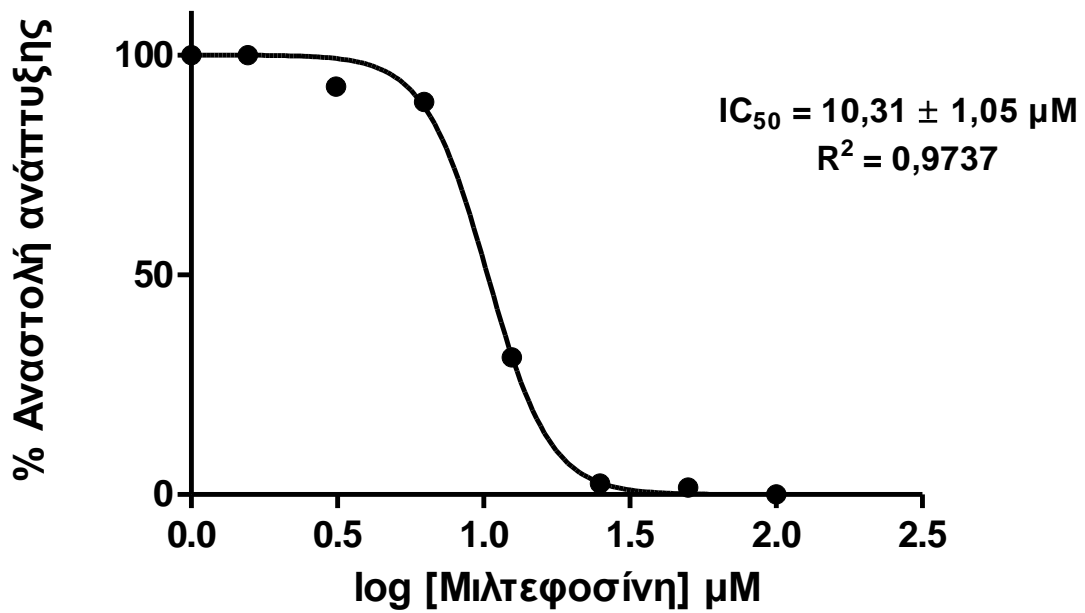


Εικόνα 31: Αποτελέσματα μέτρησης του φθορισμού της ρεσοφουρίνης ύστερα από διέγερση στα 560 nm, στο στέλεχος GD55 (72 ώρες)



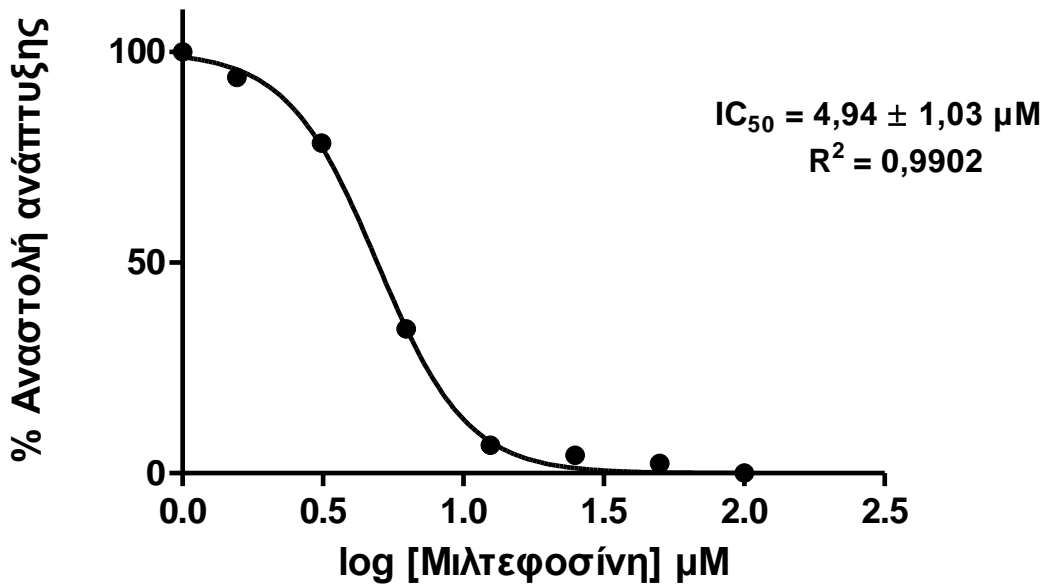
Εικόνα 32: Τελικό αποτέλεσμα δοκιμασίας φαρμάκου για τα στελέχη GD67 και GD69

## GD67



Εικόνα 33: Αποτελέσματα μέτρησης του φθορισμού της ρεσοφουρίνης ύστερα από διέγερση στα 560 nm, στο στέλεχος GD67 (72 ώρες)

## GD69



Εικόνα 34: Αποτελέσματα μέτρησης του φθορισμού της ρεσοφουρίνης ύστερα από διέγερση στα 560 nm, στο στέλεχος GD69 (72 ώρες)

#### 4.4 Αποτελέσματα qRT-PCR στα στελέχη CH33 και CH34 στο γονίδιο του MRPA μεταφορέα.

Σε αυτό το κεφάλαιο παρατίθενται τα αποτελέσματα της qRT-PCR. Αρχικά εξετάσθηκε η ειδικότητα των εκκινητών με μια συμβατική PCR και στα δυο αυτά στελέχη. Το αποτέλεσμα της PCR ήταν ένα μοναδικό προϊόν ειδικής ενίσχυσης και επιθυμητού μοριακού βάρους (δεν παρατίθεται εικόνα). Ύστερα διεξήχθη η qRT-PCR και υπολογίστηκε το  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  και στα δύο στελέχη ώστε να γίνει σύγκριση της σχετικής ποσότητας του γονιδίου LINF\_230007800 που εκφράζει τον MRPA μεταφορέα.

Στέλεχος	C <sub>T</sub> MRPA	C <sub>T</sub> G3P-D	$\Delta C_T$ (M.O C <sub>T</sub> MRPA – M.O C <sub>T</sub> G3P-D)	$\Delta\Delta C_T$ ( $\Delta C_T - \Delta C_T$ CH34)	$2^{\Delta\Delta C_T}$ (Κανονικοποίηση της ποσότητας του γονιδίου του MRPA σε σχέση με το στέλεχος CH34)
CH34	21,4 21,7	19,4 19,4	2,15	0	1
M.O	21,55	19,4			
CH33	18,7 18,5	16,8 18,1	1,15	-1	2
M.O	18,6	17,45			

Πίνακας 12: Σύγκριση της σχετικής ποσότητας του γονιδίου του MRPA μεταφορέα στο γονιδίωμα δύο στελεχών.

## 5. Συζήτηση – Συμπεράσματα

### 5.1 Μοριακός έλεγχος απουσίας δύο γονιδίων σε στελέχη της Ανατολικής Μεσογείου με την χρήση PCR.

Στη διπλωματική αυτή εργασία έγινε μοριακός έλεγχος για την ανίχνευση πιθανή έλλειψης ενός γονιδίου και ενός γονιδιακού τόπου στο γονιδίωμα στελεχών του συμπλέγματος *Leishmania donovani*, της Ανατολικής Μεσογείου. Η απουσία τους έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με αντίσταση στη μιλτεφοσίνη. Πιο συγκεκριμένα ελέγχθηκαν 102 στελέχη της Ελλάδας, Κύπρου και Τουρκίας που απομονώθηκαν από μολυσμένους ανθρώπους και σκύλους. Τα αποτελέσματα των δοκιμασιών PCR στα δύο γονίδια συνοψίζονται συγκεντρωτικά στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 13).

Αρχικά, δεν παρατηρήθηκε απουσία του γονιδίου LINF\_130020800 (LMT μεταφορέας) σε κανένα από τα δείγματα που εξετάστηκαν. Πιθανώς η μετάλλαξη αυτή, αν υπάρχει στα στελέχη της Ανατολικής Μεσογείου, έχει χαμηλή συχνότητα εμφάνισης. Η έλλειψη του από το γονιδίωμα της *Leishmania* αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς αντίστασης στο συγκεκριμένο φάρμακο. Βέβαια, η μιλτεφοσίνη δεν χορηγείται σε περίπτωσης λεισμανίασης σε ανθρώπους στη Ανατολική Μεσόγειο αλλά μόνο σαν κτηνιατρική αγωγή σε σκύλους. Επιπλέον, τα στελέχη τα οποία εξετάστηκαν έχουν απομονωθεί πριν το 2006, πιο πριν δηλαδή από την κτηνιατρική εφαρμογή του εν λόγω φαρμάκου στην Ανατολική Μεσόγειο. Έτσι, λοιπόν, η παρουσία του γονιδίου αυτού και στα 102 δείγματα δεν προκαλεί ιδιαίτερη εντύπωση. Το στέλεχος CH32 θα μπορούσε να φέρει μικρότερη ποσότητα του συγκεκριμένου γονιδίου στο DNA του και πιθανός να εμφανίζει αυξημένη αντοχή στην μιλτεφοσίνη. Απαιτείται σαφώς περισσότερη διερεύνηση για την επιβεβαίωση αυτής της πιθανότητας.

Αντίθετα, 9 δείγματα εμφάνισαν αρνητικό αποτέλεσμα στην PCR του γονιδίου LinJ. 31.2370, ενός από τα 4 γονίδια του γονιδιακού τόπου MSL. Η απουσία αυτού μεταφράζεται σε απουσία ολόκληρου του γονιδιακού τόπου σύμφωνα με το πρότυπο γονιδιακής αναδιάταξης. Το γεγονός ότι το γονίδιο LinJ. 31.2370 είναι απόν σε 9 από τα 80 δείγματα παρασίτων της Ανατολικής Μεσογείου που εξετάστηκαν υποδηλώνει πως η μετάλλαξη αυτή εμφανίζεται όχι μόνο στην Βραζιλία αλλά και στην Ελλάδα. Επιλέχθηκαν 4 στελέχη (GD3, GD55, GD67, GD69) στα οποία έγινε in vitro αξιολόγηση της αντίστασης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις μιλτεφοσίνης. Τα στελέχη GD3, GD55 και GD67



εμφανίζουν προφίλ αντίστασης καθώς το IC<sub>50</sub> αυτών είναι μεγαλύτερο του 8,0 μΜ. Το GD69 δεν εμφανίζει προφίλ αντίστασης. Παρόλο που το GD3 και GD55 είναι θετικά στον γονιδιακό τόπο MSL, παραδόξως, έχουν προφίλ αντίστασης στην μιλτεφοσίνη. Ακόμη ενώ το GD69 είναι αρνητικά στο γονιδιακό τόπο MSL, έχει το μικρότερο IC<sub>50</sub> και εμφανίζει προφίλ ευαισθησίας. Έτσι λοιπόν η ευαισθησία των παρασίτων στην μιλτεφοσίνη φαίνεται να είναι πολυπαραγοντική. Η μετάλλαξη αυτή σε συνδυασμό με ένα κατάλληλο γενωμικό προφίλ θα μπορούσε να προσφέρει ανθεκτικότητα στην μιλτεφοσίνη. Θα πρέπει λοιπόν να εξεταστούν περισσότερα γονίδια. Επίσης, στην έρευνα που διεξήχθη στην Βραζιλία<sup>[15]</sup> τα παράσιτα απομονώθηκαν απευθείας από δείγματα ιστών των ασθενών και η *in vitro* ευαισθησία στην μιλτεφοσίνη αξιολογήθηκε σε μοντέλα αμαστιγωτών μορφών, ενώ στην παρούσα έρευνα σε μοντέλα προμαστιγωτών μορφών. Ως γνωστόν, η μορφολογία και η μεταβολική δραστηριότητα του παρασίτου αλλάζει μεταξύ αμαστιγωτής και προμαστιγωτής μορφής. Ίσως η απουσία του γονιδιακού τόπου MSL να συμβάλει στην αντίσταση του παρασίτου μόνο στην αμαστιγωτή μορφή ή συνεργατικά με άλλα γονίδια (ακόμη και γονίδια των μακροφάγων του ξενιστή στα οποία πολλαπλασιάζεται το παράσιτο), να προσφέρει αντοχή σε αυτό. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι σε διαδοχικές ανακαλλιέργειες του ίδιου στελέχους *Leishmania* εμφανίζονται αρκετές φορές όχι μόνο ενδοχρωμοσωμικές αλλαγές αλλά και καριωτυπικές αλλαγές στο γονιδίωμα των παρασίτων. Αυτό το γεγονός δικαιολογείται καθώς οι συνθήκες καλλιέργειας στο εργαστήριο είναι βέλτιστες και η πίεση του φαρμάκου έχει σταματήσει. Το παράσιτο προσαρμόζεται στο νέο περιβάλλον αναδιοργανώνοντας το γονιδίωμα του. Εν κατακλείδι, για να προβλεφτεί η αντίσταση ή όχι στο συγκεκριμένο φάρμακο θα πρέπει να συνυπολογιστούν περισσότερα γονίδια αλλά και τα μορφολογικά στάδια του παρασίτου.

## **5.2 Ανάπτυξη μεθόδου qRT-PCR για την εκτίμηση του CNV στο γονίδιο του MRPA μεταφορέα.**

Σύμφωνα με τον Πίνακα 12 φαίνεται πως το στέλεχος CH33 έχει, κατά προσέγγιση, διπλάσια ποσότητα του γονιδίου του MRPA μεταφορέα στο DNA του σε σχέση με το στέλεχος CH34. Αυτό το εύρημα συμφωνεί με τα αποτελέσματα της χρωμοσωμικής

αλληλούχησης στα δύο στελέχη (Εικόνα 15). Εφόσον το CH33 είναι 4πλοειδές στο χρωμόσωμα 23 (στο οποίο εδράζει το γονίδιο αυτό) ενώ το CH34 3πλοειδές, είναι αναμενόμενο τα αντίγραφα του γονιδίου του MRPA μεταφορέα να εμφανίζονται περισσότερα στο πρώτο στέλεχος. Παρόλο που οι συνθήκες αυτής της PCR ανίχνευσαν με επιτυχία την σχετική διαφορά των αντιγράφων του γονιδίου, θα πρέπει να εφαρμοστούν σε περισσότερα στελέχη με σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση της αξιοπιστίας και ευαισθησίας αυτής της μεθόδου στην ανίχνευση του CNV μεταξύ διάφορων στελεχών. Η αύξηση της έκφρασης του MRPA μεταφορέα στο παράσιτο συμβάλει στην ανάπτυξη ανοχής σε διάφορα αντιλεϊσμανιακά φάρμακα. Έτσι λοιπόν η ανίχνευση αυτής της αυξημένης έκφρασης θα μπορούσε να δώσει επιπλέον πληροφορίες για την ανθεκτικότητα ενός παρασίτου.

Συνοψίζοντας, η λεισμανίαση ανήκει στην κατηγορία των «παραμελημένων» νοσημάτων του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας.<sup>[16]</sup> Η συχνότητα εμφάνισης λεισμανιάσεων στην χώρα μας<sup>[23]</sup> και σε περιοχές της Ανατολικής Μεσογείου μπορεί να είναι μικρή, αλλά σε κάποιες περιοχές της Ινδίας και της Βραζιλίας το παράσιτο αποτελεί δημόσια απειλή λόγω της ανθεκτικότητας που έχει αναπτύξει στα λιγιστά αντιλεϊσμανιακά φάρμακα που κυκλοφορούν.<sup>[8]</sup> Τα στελέχη του *Leishmania donovani complex* της Ανατολικής Μεσογείου εμφανίζουν κάποιες από τις γνωστές μεταλλάξεις που προσδίδουν ανοχή στα φάρμακα, παρόλα αυτά η αντίσταση και συγκεκριμένα στην μιλτεφοσίνη φαίνεται να είναι πολυπαραγοντική. Πρέπει να διεξαχθούν περισσότερες έρευνες και να συνυπολογιστούν και άλλοι παράγοντες ώστε να καταστεί εφικτή η ακριβής ανίχνευση την πιθανότητας θεραπευτικής αποτυχίας με μιλτεφοσίνη. Παράλληλα μια ακόμη μετάλλαξη θα μπορούσε να διερευνηθεί για προγνωστικούς σκοπούς. Το μοντέλο της qRT-PCR που αναπτύχθηκε στην παρούσα έρευνα φαίνεται να ανταποκρίνεται στις ανάγκες πρόγνωσης της ανθεκτικότητας του παρασίτου. Χρειάζεται, σαφώς, περισσότερη διερεύνηση για να επιβεβαιωθεί η ακρίβεια και η ευαισθησία αυτής της μεθόδου.

Πίνακας 13: Συνοπτικός πίνακας με τα αποτελέσματα των PCR

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ LINf_130020800 (υποδοχέα της μιττεφοσίνης, LMT)	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ LinJ 31.2370 (γονιδιακός τόπος MSL)
GD 3	Θετικό	Θετικό
GD 5	Θετικό	Θετικό
GD 8	Θετικό	Θετικό
GD 14	Θετικό	Θετικό
GD 16	Θετικό	-
GD 26	Θετικό	<b>Αρνητικό</b>
GD 27	Θετικό	<b>Αρνητικό</b>
GD 28	Θετικό	Θετικό
GD 36	Θετικό	<b>Αρνητικό</b>
GD 38	Θετικό	Θετικό
GD 41	Θετικό	-
GD 55	Θετικό	-
GD 64	Θετικό	Θετικό
GD 67	Θετικό	<b>Αρνητικό</b>
GD 69	Θετικό	<b>Αρνητικό</b>
GD 99	Θετικό	Θετικό
GD 100	Θετικό	Θετικό
GD 102	Θετικό	-
GD 103	Θετικό	-
GD 104	Θετικό	Θετικό
GD 117	Θετικό	-
GD 127	Θετικό	Θετικό
GD 167	Θετικό	<b>Αρνητικό</b>
GD 211	Θετικό	Θετικό
EP16	Θετικό	Θετικό
EP 17	Θετικό	-
EP 43	Θετικό	Θετικό
EP 44	Θετικό	Θετικό
EP 49	Θετικό	-
EP 50	Θετικό	-
EP 53	Θετικό	-
EP 55	Θετικό	Θετικό

EP 56	ΘΕΤΙΚΟ	-
EP 57	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
EP 58	ΘΕΤΙΚΟ	-
EP 59	ΘΕΤΙΚΟ	-
EP 68	ΘΕΤΙΚΟ	-
EP 88	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
EP 89	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
EP 126	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
EP 134	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
EP 163	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
EP 173	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
EP 174	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
EP 176	ΘΕΤΙΚΟ	-
EP 179	ΘΕΤΙΚΟ	-
EP 180	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
EP 182	ΘΕΤΙΚΟ	-
EP 183	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
EP 184	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
EP 185	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
EP 186	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
EP 187	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
EP 188	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
EP 189	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
CD 1	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
CD 21	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
CD 22	ΘΕΤΙΚΟ	-
CD 34	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
CD 37	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
CD 39	ΘΕΤΙΚΟ	Αρνητικό
CD 40	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
CD 42	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
CD 43	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
CD 44	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
CD 45	ΘΕΤΙΚΟ	-
CD 48	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
CD 49	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
CD 50	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
CD 54	ΘΕΤΙΚΟ	Αρνητικό

CD 57	ΘΕΤΙΚΟ	-
CD 58	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
CD 59	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
CD 60	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
CD 61	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
CD 62	ΘΕΤΙΚΟ	Αρνητικό
CD 63	ΘΕΤΙΚΟ	-
CD 66	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
CD 68	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
CD 74	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
CD 76	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
CD 77	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
CD 78	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
CD 80	ΘΕΤΙΚΟ	-
CD 83	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
CD 87	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
CD 88	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
CD 90	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
CD 91	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
CD 92	ΘΕΤΙΚΟ	-
CD 94	ΘΕΤΙΚΟ	-
CD 95	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
CD 106	ΘΕΤΙΚΟ	-
CD 108	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
CD 110	ΘΕΤΙΚΟ	-
CH 32	ΘΕΤΙΚΟ	-
CH 33	ΘΕΤΙΚΟ	-
CH 34	ΘΕΤΙΚΟ	-
CH 35	ΘΕΤΙΚΟ	-
CH 36	ΘΕΤΙΚΟ	-

## 6. Βιβλιογραφία

1. Χατζηπαναγιώτου, Στέλιος Π. [και] Λεγάκης, Νικόλαος Ι (Αθήνα 2017, 2<sup>η</sup> Έκδοση) . *Τα μικρόβια και ο άνθρωπος: ένα βιβλίο - γνωριμία με τον κόσμο των μικροβίων, για όλους.*
2. Ανδρεάδης Γεώργιος (Θεσσαλονίκη 2013, 2<sup>η</sup> Έκδοση). *Ιατρική παρασιτολογία*, Εκδόσεις Ροτόντα
3. Χαραλάμπους Χριστόφορος, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών [και] Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ (Αθήνα 2007). *Γονοτυπικός Προσδιορισμός ειδών και υποειδών του παρασίτου Leishmania*, <http://hdl.handle.net/10442/hedi/19121>
4. Burza, S., Croft, S. L., & Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *Lancet* (London, England), 392(10151), 951–970. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)
5. Randa Hilal-Dandan, Laurence L. Brunton. (2014, 2<sup>η</sup> Έκδοση, μεταφρασμένη). *Goodman & Gilman's: Η φαρμακολογική βάση της θεραπευτικής*, Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης και Broken Hill
6. Bertram G. Katzung (2004, 9<sup>η</sup> Έκδοση, μεταφρασμένη). *Βασική & Κλινική Φαρμακολογία*, Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2<sup>ος</sup> τόμος.
7. Croft, S. L., Sundar, S., & Fairlamb, A. H. (2006). Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical microbiology reviews*, 19(1), 111–126. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.111-126.2006>
8. Ponte-Sucre, A., Gamarro, F., Dujardin, J. C., Barrett, M. P., López-Vélez, R., García-Hernández, R., Pountain, A. W., Mwenechanya, R., & Papadopoulou, B. (2017). Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(12), e0006052. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>
9. Laffitte, M. N., Leprohon, P., Papadopoulou, B., & Ouellette, M. (2016). Plasticity of the *Leishmania* genome leading to gene copy number variations and drug resistance. *F1000Research*, 5, 2350. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9218.1>
10. Franssen, S. U., Durrant, C., Stark, O., Moser, B., Downing, T., Imamura, H., Dujardin, J. C., Sanders, M. J., Mauricio, I., Miles, M. A., Schnur, L. F., Jaffe, C. L., Nasereddin, A., Schallig, H., Yeo, M., Bhattacharyya, T., Alam, M. Z., Berriman, M., Wirth, T., Schönian, G., ...Cotton, J. A. (2020). Global genome diversity of the *Leishmania donovani* complex. *eLife*, 9, e51243. <https://doi.org/10.7554/eLife.51243>
11. Carnielli, J. B. T., Crouch, K., Forrester, S., Silva, V. C., Carvalho, S. F. G., Damasceno, J. D., Brown, E., Dickens, N. J., Costa, D. L., Costa, C. H. N., Dietze, R., Jeffares, D. C., & Mottram, J. C. (2018). A *Leishmania infantum* genetic marker associated with miltefosine treatment failure for visceral leishmaniasis. *EBioMedicine*, 36, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.09.029>

12. Πλαγεράς Παναγιώτης, Παπαϊωάννου Άγγελος, Βασικά θέματα Βιοχημείας, Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης και Broken Hill
13. Phumee, A., Jariyapan, N., Chusri, S., Hortiwakul, T., Mouri, O., Gay, F., Limpanasithikul, W., & Siriyasatien, P. (2020). Determination of anti-leishmanial drugs efficacy against *Leishmania martiniquensis* using a colorimetric assay. *Parasite epidemiology and control*, 9, e00143.  
<https://doi.org/10.1016/j.parepi.2020.e00143>
14. Corral, M. J., González, E., Cuquerella, M., & Alunda, J. M. (2013). Improvement of 96-well microplate assay for estimation of cell growth and inhibition of Leishmania with Alamar Blue. *Journal of microbiological methods*, 94(2), 111–116.  
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.05.012>
15. Carnielli, J. B. T., Monti-Rocha, R., Costa, D. L., Molina Sesana, A., Pansini, L. N. N., Segatto, M., Mottram, J. C., Costa, C. H. N., Carvalho, S. F. G., & Dietze, R. (2019). Natural Resistance of *Leishmania infantum* to Miltefosine Contributes to the Low Efficacy in the Treatment of Visceral Leishmaniasis in Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 101(4), 789–794.  
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0949>
16. World Health Organization, Leishmaniasis (January 2023): <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
17. Gkolfinopoulou K, Bitsolas N, Patrinos S, Veneti L, Marka A, Dougas G, Pervanidou D, Detsis M, Triantafyllou E, Georgakopoulou T, Billinis C, Kremastinou J, Hadjichristodoulou C. Epidemiology of human leishmaniasis in Greece, 1981-2011. *Euro Surveill*. 2013;18(29):pii=20532. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2013.18.28.20532>
18. Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., & WHO Leishmaniasis Control Team (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one*, 7(5), e35671.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
19. Virbac Greece, Milteforan Technical Booklet:  
<http://www.rionvets.gr/images/Rionvets/MilteforanTechnicalBookletgr.pdf>
20. Alam, M. Z., Haralambous, C., Kuhls, K., Gouzelou, E., Sgouras, D., Soteriadou, K., Schnur, L., Pratlong, F., & Schönian, G. (2009). The paraphyletic composition of *Leishmania donovani* zymodeme MON-37 revealed by multilocus microsatellite typing. *Microbes and infection*, 11(6-7), 707–715.  
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.04.009>
21. Gouzelou, E., Haralambous, C., Antoniou, M., Christodoulou, V., Martinković, F., Živičnjak, T., Smirlis, D., Pratlong, F., Dedet, J. P., Özbel, Y., Toz, S. Ö., Presber, W., Schönian, G., & Soteriadou, K. (2013). Genetic diversity and structure in

*Leishmania infantum* populations from southeastern Europe revealed by microsatellite analysis. *Parasites & vectors*, 6, 342. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-342>

22. Gouzelou, E., Haralambous, C., Amro, A., Mentis, A., Pratlong, F., Dedet, J. P., Votypka, J., Volf, P., Toz, S. O., Kuhls, K., Schönian, G., & Soteriadou, K. (2012). Multilocus microsatellite typing (MLMT) of strains from Turkey and Cyprus reveals a novel monophyletic *L. donovani* sensu lato group. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(2), e1507. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001507>

23. Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας, Λεισμανίαση:  
<https://eody.gov.gr/disease/leismaniasi/>





