Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Έλεγχος της αντιλεϊσμανιακής δράσης νέων αιθερικών φωσφολιπιδίων: Μελέτη του μηχανισμού-στόχου των δραστικών ουσιών και του μηχανισμού ανάπτυξης της αντοχής του παρασίτου.

Υποψήφια Διδάκτωρ

Ειρήνη Φραγκιαδάκη

Ηράκλειο, 2023

Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας τη διδακτορική μου διατριβή, μέσα από μια πορεία ετών που έφερε πολλές και ποικίλες αλλαγές στη ζωή μου, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όσους συνέβαλαν στην εκπόνησή της.

Ευχαριστώ θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Βακτηριολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, κυρία Σκούλικα Ευσταθία, που ως επιβλέπουσα καθηγήτριά μου έπαιξε τον καθοριστικότερο ρόλο στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής, αρχικά για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα, αλλά και για την πολύτιμη επιστημονική υποστήριξη και καθοδήγηση που μου παρείχε καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησής της.

Επίσης ευχαριστώ θερμά για την πολύτιμη παρουσία τους τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, τη Διευθύντια Ερευνών του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, κυρία Θεοδώρα Καλογεροπούλου και τον Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, κύριο Τσιώτη Γεώργιο. Δεν θα μπορούσα στο σημείο αυτό να παραβλέψω τον Ομότιμο Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστήμιου Κρήτης, κύριο Ιωάννη Τσελέντη που δυστυχώς δεν βρίσκεται πλέον κοντά μας, ωστόσο υπήρξε πάντα διαθέσιμος να ακούσει και να συμμεριστεί τις ανησυχίες μου ως Επιβλέπων Καθηγητής κατά τα πρώτα χρόνια της εκπόνησης της διαδακτορικής διατριβής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στους συναδέλφους μου στο Εργαστήριο Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, καθώς και στην κυρία Ελένη Κουταλά, μέλος ΕΙΔΙΠ του Εργαστηρίου Κυτταρομετρίας Ροής, για την επιστημονική και κυρίως ψυχολογική συμπαράσταση που απλόχερα μου πρόσφεραν.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την καθηγήτρια Αιματολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης κυρία Ελένη Παπαδάκη, καθώς και όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Μελέτης της Αιμοποίησης και της Δημόσιας Τράπεζας Ομφαλικών Βλαστοκυττάρων Κρήτης, όπου ανήκω τα τελευταία χρόνια, για την πίστη που έδειξαν στο πρόσωπό μου, την κατανόηση και την ενθάρρυνση που έλαβα, ώστε να καταφέρω να φτάσω στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη και την αγάπη μου στην οικογένειά μου, στους γονείς μου Κωνσταντίνο και Πελαγία Φραγκιαδάκη, και στους γιους μου Γεώργιο και Κωνσταντίνο Γεωργούλη, στους οποίους και αφιερώνω τη διδακτορική μου διατριβή.

Περιεχόμενα

1. Περίληψη 4

2. Abstract 8

3. Εισαγωγή 12

3.1. Ιστορική αναδρομή 12

3.2. Το παράσιτο Leishmania: Μορφολογία και κύκλος ζωής 13

3.2.1. Μορφολογία 13

3.2.2. Κύκλος Ζωής 14

3.3. Ταξινόμηση 16

3.4. Ξενιστές 18

3.4.1. Ο διαβιβαστής ξενιστής 18

3.4.2. Ο αποθηκευτικός ξενιστής 19

3.5. Η ασθένεια Λεισμανίαση 20

3.5.1. Σπλαχνική λεϊσμανίαση (Visceral leishmaniasis, VL) 20

3.5.2. Μετα-kala azar λεϊσμανίαση (Post kala azar dermal leishmaniasis, PKDL) 22

3.5.3. Δερματική λεϊσμανίαση (Cutaneous leeishmaniasis, CL) 23

3.5.4. Διάχυτη δερματική λεϊσμανίαση (Diffuse cutaneous leishmaniasis, DCL) 24

3.5.5. Βλεννώδης λεϊσμανίαση (Mucosal leishmaniasis, ML) 25

3.6. Λεϊσμανίαση και ανοσοκαταστολή 27

3.7. Η λεϊσμανίαση στα σκυλιά 27

3.8. Θεραπεία 30

3.8.1. Πεντασθενές αντιμόνιο 30

3.8.2. Αμφοτερικίνη Β 31

3.8.3. Παραμομυκίνη 33

3.8.4. Πενταμιδίνη 33

3.8.5. Αζόλια 34

3.8.6. Αλλοπουρινόλη 34

3.8.7. Simataquine 35

3.8.8. Αλκυλ-λυσοφωσφολιπίδια και Μιλτεφοσίνη 35

3.9. Αντιλεϊσμανιακή δράση των αντιμικροβιακών πεπτιδίων και το φαινόμενο της συνέργειας 37

4. Σκοπός 39

5. Υλικά και μεθοδολογία 40

6. Αποτελέσματα 51

6.1. Βιολογική αποτίμηση της δράσης αναλόγων αιθερικών φωσφολιπιδίων και μελέτη της σχέσης δομής-δραστικότητας 51

6.2. Μελέτη της ανταπόκρισης κλινικών στελεχών Λεϊσμάνιας σε επιλεγμένα ανάλογα αιθερικών φωσφολιπιδίων 62

6.3. ***Μελέτη του μηχανισμού δράσης των αναλόγων αιθερικών φωσφολιπιδίων*** 67

6.3.1. Μελέτη του σχηματισμού ενδοκυττάριων κυστιδίων και επαγωγή της αυτοφαγίας 68

6.3.2. Απόπτωση και επαγωγή δυσλειτουργίας του μιτοχονδρίου 77

6.3.3. Επαγωγή οξειδωτικού στρες 84

6.3.4. Μελέτη της ενδοκυττάριας κατανομής με τη χρήση φθοριζόντων αναλόγων 88

6.4. In vivo μελέτη της επίδρασης του αναλόγου TC106 σε σκυλιά μολυσμένα με L.infantum 92

6.5. Αντιλεϊσμανιακή δράση των peptaibols και μελέτη της συνεργητικής δράσης αιθερικών φωσφολιπιδίων και peptaibols έναντι της L.infantum 96

6.6. Πρωτεομική ανάλυση σε προμαστιγωτά μετά από προσαρμογή σε υποανασταλτικές συγκεντρώσεις μιλτεφοσίνης και του αναλόγου TC19 105

7. Συζήτηση 117

8. Βιβλιογραφία 133

1. Περίληψη

Η λεϊσμανίαση προκαλείται από το παράσιτο του γένους *Leishmania* και θεωρείται μια από τις πιο σημαντικές τροπικές, παρασιτικές ασθένειες, προσβάλλοντας παγκοσμίως 12 εκατομμύρια ανθρώπους[1]. Τα σοβαρά προβλήματα που σχετίζονται με τη θεραπεία της λεϊσμανίασης, όπως η ανάπτυξη αντοχής στα διαθέσιμα φάρμακα, η ανάγκη για θεραπείες χαμηλού κόστους σε συνδυασμό με τη χαμηλή χρηματοδότηση για τη μελέτη της θεραπείας των παρασιτικών ασθενειών, ώθησαν αρκετές ερευνητικές ομάδες να συνθέσουν νέες αντι-λεϊσμανιακές ουσίες βασισμένες σε τροποποιήσεις ήδη υπάρχοντων φαρμάκων[2-7]. Παρά το γεγονός ότι έχουν παρέλθει πάνω από τρεις δεκαετίες από την ανακάλυψη της αντιλεϊσμανιακής δράσης της μιλτεφοσίνης, που αποτελεί το πρώτο φάρμακο κατά της λεισμανίασης που χορηγείται από το στόμα[8], η γνώση γύρω από τη σχέση δομής-αντιπαρασιτικής δράσης αναλόγων του φαρμάκου είναι σχετικά περιορισμένη[9].

Όλα τα παραπάνω καθιστούν το πεδίο του σχεδιασμού και της σύνθεσης νέων αντιλεϊσμανιακών αναλόγων φωσφολιπιδίων μια συνεχή πρόκληση, οδηγώντας στην παραγωγή αναλόγων της μιλτεφοσίνης, η βιολογική δράση των οποίων αποτιμήθηκε στην παρούσα διατριβή. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν 55 ανάλογα αιθερικών φωσφολιπιδίων ως προς την αντιπαρασιτική τους δράση, στην προμαστιγωτή και την ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή του παρασίτου. Επιπρόσθετα μελετήθηκε η κυτταροτοξική δράση των αναλόγων έναντι της κυτταρικής σειράς ανθρώπινων μακροφάγων THP1, καθώς και η αιμολυτική τους δράση. Τα ανάλογα που μελετήθηκαν στην πλειοψηφία τους ήταν πιο ενεργά από τη μιλτεφοσίνη και στα δύο εργαστηριακά στελέχη του παρασίτου που χρησιμοποιήθηκαν, ενώ σημαντικά βελτιωμένη παρατηρήθηκε και η κυτταροτοξική/αιμολυτική τους δράση, αναδεικνύοντας έτσι τα δομικά χαρακτηριστικά που επηρεάζουν τις ιδιότητές τους[10-13].

Ποικίλες μελέτες έχουν αναφέρει διαφορές στην ανταπόκριση των εργαστηριακών και κλινικών στελεχών στα αντιπαρασιτικά φάρμακα, που μπορούν να αποδοθούν σε ποικιλομορφίες στους μηχανισμούς που μεσολαβούν στην πρόσληψη του φαρμάκου ή/και την αλληλεπίδρασή του με τους κυτταρικούς στόχους[14, 15]. Για τον λόγο αυτό μελετήθηκε η δράση επιλεγμένων αναλόγων σε κλινικά στελέχη που απομονώθηκαν από σκύλους πάσχοντες με σπλαχνική λεϊσμανίαση (kala azar), αναδεικνύοντας σημαντικές διαφορές στην ανταπόκριση των κλινικών στελεχών στα ανάλογα που χρησιμοποιήθηκαν. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση των παραπάνω διαφορών με την ύπαρξη πολυμορφισμών στο γονίδιο της ATP-ασης LdMT (Leishmania donovani Miltefosine Transporter), που ευθύνεται για τη μειωμένη πρόσληψη του φαρμάκου και την ανάπτυξη αντοχής στη μιλτεφοσίνη[16]. Συμπεραίνεται επομένως ότι η δράση των αναλόγων και κατ'επέκταση το τελικό παρασιτοκτόνο αποτέλεσμα

καθορίζεται από τον συνδυασμό της χημικής δομής του φαρμάκου και των βιοτυπικών χαρακτηριστικών του κάθε στελέχους.

Δεδομένου ότι η κατανόηση του τρόπου δράσης μιας ουσίας είναι καθοριστική για την αναγνώριση πιθανών φαρμακευτικών στόχων και τον σχεδιασμό νέων θεραπευτικών στρατηγικών, μελετήσαμε τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην παρασιτοκτόνο δράση των αναλόγων. Κυτταρικά φαινόμενα όπως η επαγωγή της αυτοφαγίας, η απόπτωση, η απώλεια της πόλωσης της μιτοχονδριακής μεμβράνης και η επαγωγή του οξειδωτικού στρες, μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας επιλεγμένα ενεργά ανάλογα. Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η ενδοκυττάρια κατανομή του φαρμάκου με τη χρήση φθοριζόντων αναλόγων.

Κατά την αποτίμηση της δράσης των αναλόγων στην ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή, παρατηρήθηκε μικροσκοπικά, η ύπαρξη πολυάριθμων κυστιδίων μέσα στα μολυσμένα μακροφάγα, αλλά και εντός του παρασιτοφόρου κυστιδίου, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Προκειμένου να μελετήσουμε αν τα παραπάνω κυστίδια εμπλέκονται στο παρασιτοκτόνο αποτέλεσμα, μέσω της επαγωγής της αυτοφαγικής διαδικασίας, έγινε χρώση με τον ειδικό δείκτη για την αυτοφαγία Monodancyl Cadaverine (MDC) και αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης LAMP (Lysosome Associated Membrane Protein)[17, 18]. Με αυτά τα πειράματα διακρίναμε σημαντικές διαφορές στη ροή των αυτοφαγικών κυστιδίων και την ωρίμανση των αυτοφαγοσωμάτων μετά από την επίδραση επιλεγμένων ενεργών αναλόγων, ως προς τη προσθήκη χημικών ομάδων στη λιπιδική αλυσίδα της μιλτεφοσίνης. Τα ανάλογα με τριφλουραλίνη και τριαζόλιο προκάλεσαν αξιοσημείωτη αύξηση της αυτοφαγικής ροής στα μολυσμένα μακροφάγα, σε αντίθεση με τη μιλτεφοσίνη και τα ανάλογα TC19 και TCAN26, που περιέχουν άλλου είδους δακτύλιους.

Επειδή αυτές οι δοκιμασίες δεν συσχετίζουν άμεσα το τελικό παρασιτοκτόνο αποτέλεσμα με την επαγωγή της ωρίμανσης των φαγοσωμάτων και αυτοφαγοσωμάτων, μελετήθηκε η επαγωγή της απόπτωσης μολυσμένων μακροφάγων, μετά την επίδραση μιλτεφοσίνης και επιλεγμένων αναλόγων. Με τη χρήση της φθορίζουσας πρωτεΐνης Annexin V και του ιωδιούχου προπιδίου αφ' ενός[19, 20], και του δείκτη της μιτοχονδριακής ομοιόστασης MitoTracker Red Dye αφ' ετέρου[21, 22], αναδείξαμε την επίδραση της μιλτεφοσίνης και των αναλόγων φωσφολιπιδίων στη μιτοχονδριακή λειτουργία, απόπτωση και θάνατο σε μολυσμένα μακροφάγα. Δείξαμε ότι η μιλτεφοσίνη σε συγκεντρώσεις 7,5x της IC_{50} έναντι του ενδοκυττάριου παρασίτου, σκοτώνει περίπου το 78% των μολυσμένων κυττάρων σε αντίθεση με το ανάλογο TC95 που το αντίστοιχο ποσοστό είναι <10%. Το αποτέλεσμα της ισχυρής κυτταροτοξικότητας της μιλτεφοσίνης φαίνεται στην δραστική μείωση της μιτοχονδριακής λειτουργίας και της ολοκληρωτικής απώλειας του δυναμικού της μεμβράνης. Η επίδραση αυτή είναι δοσοεξαρτώμενη και μόνο σε υποθεραπευτικές ως προς το παρασιτοκτόνο αποτέλεσμα

συγκεντρώσεις, μπορεί να μειωθεί. Αντίθετα, άλλα ανάλογα όπως το TC95 σε συγκεντρώσεις πολλαπλάσιες της IC_{50} δεν επηρεάζουν την ομοιόσταση του ξενιστή.

Το μιτοχόνδριο λειτουργεί ως σημαντική πηγή για την παραγωγή ενεργών μορίων οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) μέσα στα κύτταρα, και συγκεκριμένα έχει προταθεί ότι η μιλτεφοσίνη δρα μέσω του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που σχετίζεται με την παραγωγή ROS[23]. Στη μελέτη μας παρατηρήθηκε αυξημένη παραγωγή ριζών Οξειδίου του Αζώτου (NO^-) στις πρώτες ώρες επώασης με επιλεγμένα ανάλογα, που συνοδεύεται από χαμηλό ποσοστό επιβίωσης των προμαστιγωτών.

Τα παραπάνω αποτελέσματα έθεσαν το ερώτημα της ενδοκυττάριας κατανομής των αλκυλοφωφοχολινών στο προμαστιγωτό και στο κύτταρο-ξενιστή. Χρησιμοποιήθηκαν τρία φθορίζοντα ανάλογα με τριαζόλιο και αδαμαντάνιο στη λιπιδική αλυσίδα. Τα δυο από αυτά είχαν ισχυρό φθορισμό που επέτρεπε την ιχνιλάτησή τους στο μικροσκόπιο φθορισμού. Παρατηρήθηκε κυτταροπλασματική συσσώρευση του φθορισμού σε περιοχές που ταυτίζονται με τη μιτοχονδριακή χρωστική Mitotracker Red Dye, ενισχύοντας έτσι την υπόθεση ότι η αναστολή των μιτοχονδριακών λειτουργιών που προκαλεί η μιλτεφοσίνη οφείλεται στη συσσώρευσή της στο οργανίδιο του προμαστιγωτού. Παραμένει όμως το ερώτημα της κατανομής των αναλόγων με μειωμένη κυτταροτοξικότητα.

Επειδή τα *in vitro* αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά για ορισμένα ανάλογα και κυρίως για τα ανάλογα με τον δακτύλιο της τριφλουραλίνης, προχωρήσαμε σε *in vivo* μελέτες επίδρασης σε σκύλο με ενεργό kala azar. Εφαρμόσαμε τα εγκεκριμένα θεραπευτικά πρωτόκολλα της μιλτεφοσίνης για ένα σκύλο που θα λάμβανε το ανάλογο TC106, με παρόμοια χαρακτηριστικά με το ανάλογο TC95 αλλά μικρότερη κυτταροτοξικότητα. Η σύγκριση έγινε με σκύλο που έλαβε το κτηνιατρικό φαρμακευτικό σκεύασμα Milteforan®. Τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά ως προς την υποχώρηση των συμπτωμάτων και τη σημαντική βελτίωση της κλινικής εικόνας. Το ζώο που έλαβε το TC106 είχε σταθερούς αιματολογικούς και ηπατικούς δείκτες κατά τη θεραπεία, σημαντικά βελτιωμένους σε σύγκριση με το ζώο που έλαβε το Milteforan®. Το πιο σημαντικό ήταν ότι ο σκύλος που έλαβε το πειραματικό φάρμακο δεν παρουσίασε τις ανεπιθύμητες ενέργειες όπως ευερεθιστότητα, έμετος και διάρροια που παρατηρούνται συχνά κατά τη θεραπεία με μιλτεφοσίνη. Παρά τα ενδιαφέροντα κλινικά αποτελέσματα, το παράσιτο ήταν ανιχνεύσιμο στους λεμφαδένες και των δυο σκύλων τουλάχιστον 40 ημέρες μετά το πέρας της θεραπείας.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω ευρήματα στον σκύλο, σε συνδυασμό με τη μειωμένη αποτελεσματικότητα των διαθέσιμων θεραπειών που παρατηρείται τα τελευταία χρόνια και στον άνθρωπο, η χρήση συνδυαστικής θεραπείας για την καταπολέμηση του kala azar γίνεται ολοένα και πιο συχνή, καθώς η συνεργητική δράση των φαρμάκων οδηγεί σε ύφεση της ασθένειας και στην αποφυγή υποτροπών[24-27]. Για τον λόγο αυτό, αποπειραθήκαμε

να αξιοποιήσουμε την ενδεχόμενη συνεργητική δράση επιλεγμένου αναλόγου και της μιλτεφοσίνης, σε συνδυασμό με μία τάξη αντι-μικροβιακών πεπτιδίων, που ονομάζονται peptaibols. Παρατηρήθηκε ότι ο συνδυασμός των peptaibols με τα φωσφολιπίδια είχε συνεργητική επίδραση έναντι του ενδοκυττάριου παρασίτου, επέφερε μεταβολές στα επίπεδα οξειδοαναγωγής των προμαστιγωτών, οδήγησε σε κατακερματισμό της διαφοράς δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης και προκάλεσε αλλαγές στη μορφολογία των μιτοχονδρίων. Επομένως, συμπεραίνεται ότι η συνέργεια που παρατηρήθηκε *in vitro* ανάμεσα στα φωφολιπίδια και τα peptaibols οδηγεί σε βελτίωση της αντιπαρασιτικής δράσης[28].

Συχνά, η αδυναμία εκρίζωσης του παθογόνου από την κλινική θέση μόλυνσης οφείλεται στη φαινοτυπική ανάπτυξη ανθεκτικών/προσαρμοσμένων στελεχών του παθογόνου στα φάρμακα. Θελήσαμε να μελετήσουμε πιθανούς μηχανισμούς προσαρμογής του παρασίτου στις αλκυλοφωσφοχολίνες, με απώτερο στόχο την κατανόηση των ανεκτικών πληθυσμών και την εύρεση νέων στόχων θεραπείας για την αποτελεσματική εκρίζωσή του. Καλλιεργήσαμε στέλεχος *L. donovani* σε υποθεραπευτικές δόσεις μιλτεφοσίνης και του αναλόγου TC19, και αναλύσαμε με την χρήση πρωτεωμικής την έκφραση των πρωτεϊνών. Ανασυνθέσαμε τους κυριότερους μηχανισμούς παραγωγής ενέργειας, μεταβολισμού των λιπιδίων και μεταφοράς των αλκυλοφωσφοχολινών στο προμαστιγωτό. Βρήκαμε ομοιότητες στην επαγωγή της έκφρασης των κεντρικών μεταβολικών μηχανισμών μεταξύ των δύο αναλόγων, όπως η βιοσύνθεση των στερολών και λιπαρών οξέων μεγάλης αλυσίδας και η οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια. Βρήκαμε όμως και σημαντικές διαφορές στην παραγωγή ενέργειας από τη γλυκόλυση και τον καταβολισμό των λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια μέσω της β-οξείδωσης. Βρήκαμε επίσης ότι οι δύο ουσίες δεν χρησιμοποιούν τον ίδιο μηχανισμό εισόδου στο κυτταρόπλασμα.

Συμπερασματικά, πολλά ανάλογα της μιλτεφοσίνης έχουν εξαιρετικά βελτιωμένα χαρακτηριστικά ως προς την επίδραση έναντι του παρασίτου και του ξενιστή. Η βαθύτερη μελέτη της ικανότητας τους να χρησιμοποιούν μηχανισμούς απομάκρυνσης του παρασίτου από τον ξενιστή, είναι σημαντική για την κατανόηση του αποτελεσματικού τρόπου δράσης. Η μελέτη των μηχανισμών επιβίωσης του παρασίτου *in vivo* είναι σημαντική για την ανάδειξη νέων φαρμακευτικών στόχων και την εφαρμογή συνεργητικών θεραπειών για την αποτελεσματική εκρίζωση του παρασίτου.

2. Abstract

Leishmaniasis, caused by the protozoan parasite *Leishmania* is considered one of the most important tropical parasitic diseases, affecting 12 million people worldwide[1]. The serious problems associated with the treatment of leishmaniasis, such as the development of resistance to available drugs, the need for low-cost treatments combined with the low funding for the study of the treatment of parasitic diseases, have prompted several research groups to synthesize new anti-leishmanial compounds based on modifications of already existing drugs[2-7]. Despite the fact that more than three decades have passed since the discovery of the leishmanicidal action of miltefosine, the first orally administered anti-leishmanial drug[8], the knowledge of the structure-activity relationship of phospholipid analogues is relatively limited[9].

All the above make the field of designing and synthesizing new antileishmanial phospholipid analogues a continuous challenge, leading to the production of miltefosine analogues, whose biological activity was evaluated in this thesis. Specifically, 55 ether phospholipid analogues were studied in terms of their antiparasitic activity, in the promastigote and intracellular amastigte form of the parasite. Additionally, the cytotoxic activity of the analogues against the THP1 human macrophage cell line, as well as their hemolytic activity, was studied. The majority of the compounds were more active than miltefosine in both laboratory strains used. In addition, significantly improved cytotoxic/hemolytic activity was also observed, thus highlighting the structural characteristics that influence their properties[10-13].

Various studies have reported differences in the response of laboratory and clinical strains to antiparasitic drugs, which can be attributed to variations in the mechanisms that mediate drug uptake and/or the interaction with cellular targets[14, 15]. For this reason, the activity of selected analogues was evaluated against clinical strains isolated from dogs suffering from visceral leishmaniasis (kala azar), highlighting significant differences in the response of the clinical strains to the analogues used. However, no correlation was observed between the above differences and the existence of polymorphisms in the LdMT (Leishmania donovani Miltefosine Transporter) ATP-ase gene, which is responsible for reduced uptake of the drug and the development of resistance to miltefosine[16]. Therefore, it can be concluded that the action of the analogues and the final antiparasitic effect is determined by the combination of the chemical structure of the compound as well as the biotypic characteristics of each strain.

Understanding the mode of action of a substance is crucial for the identification of potential drug targets and design of new therapeutic strategies. Therefore, we studied the mechanisms involved in the antiparasitic activity of the analogues. Cellular phenomena such as autophagy, apoptosis, loss of mitochondrial membrane polarization and induction of oxidative

stress were studied, using selected active analogues. Additionally, the intracellular distribution of the drugs was studied using fluorescent analogues.

During the assessment of the action of the analogues in the intracellular amastigote form, the existence of numerous vesicles was microscopically observed within the infected macrophages, but also within the parasitophorous vacuole, which was further confirmed by electron microscopy. In order to study whether the above vesicles are involved in the parasiticidal effect, through the induction of the autophagic process, staining of the vacuoles was performed using the specific marker for autophagy Monodancyl Cadaverine (MDC) and antibodies against the LAMP protein (Lysosome Associated Membrane Protein)[17, 18]. We were able to detect significant differences in the autophagic vesicle flux and autophagic vesicle maturation after exposure to selected active analogues, regarding the addition of chemical groups to the lipid chain of miltefosine. Trifluralin and triazole analogues induced a marked increase in autophagic flux in infected macrophages, in contrast to miltefosine and analogues TC19 and TCAN26 that contain other types of rings.

Because the above assays do not directly correlate the final parasiticidal effect with the induction of phagosome and autophagosome maturation, the induction of apoptosis of infected macrophages after exposure to miltefosine and selected analogues was studied. Using the fluorescent protein Annexin V and propidium iodide on the one hand[19, 20], and the mitochondrial homeostasis marker MitoTracker Red Dye on the other hand[21, 22], we demonstrated the effect of miltefosine and phospholipid analogues on mitochondrial function, apoptosis and death in infected macrophages. We showed that miltefosine, at concentration x7.5 of the IC_{50} against the intracellular amastigote, kills ~78% of infected cells in contrast to TC95 analogue, where the respective percentage is <10%. The result of the strong cytotoxicity of miltefosine is reflected in the drastic reduction of mitochondrial function and the total loss of membrane potential. This effect is dose-dependent and can only be reduced at subtherapeutic concentrations in terms of the paraciticidal effect. In contrast, other analogues such as TC95, at concentrations many times higher than the IC_{50} do not affect host cell homeostasis.

In addition, the mitochondrion functions as an important source for the production of reactive oxygen species (ROS) within cells, and specifically it has been suggested that miltefosine acts through programmed cell death associated with ROS production[23]. In our study, increased Nitric Oxide (NO) ion production was observed during the first hours of incubation with selected analogues, accompanied by a low survival rate of promastigotes.

The above results raised the question of the intracellular distribution of alkylphophocholines in the promastigote and in the host cell. Three fluorescent analogues were used, containing triazole and adamantinyl rings in the lipid chain. Two of them had a strong fluorescence that allowed tracking under the fluorescence microscope. Cytoplasmic

accumulation of fluorescence was observed in regions identical with the mitochondrial dye Mitotracker Red Dye, thus strengthening the hypothesis that the inhibition of mitochondrial functions caused by miltefosine is due to its accumulation in this specific promastigote organelle. However, the question of the distribution of analogues with reduced cytotoxicity is under consideration.

Because the *in vitro* results were encouraging for some analogues, especially those containing trifluralin ring, we proceeded to study the *in vivo* effect in dogs with active kala azar. We applied the approved miltefosine treatment protocol to a dog receiving TC106, an analogue with similar characteristics to TC95 but less cytotoxic. The comparison was made with a dog that received the veterinary drug Milteforan®. The results were particularly encouraging in terms of the reduction of symptoms and the significant improvement of the clinical picture. The animal treated with TC106 had stable hematological and hepatic markers during treatment, significantly improved compared to the Milteforan®-treated animal. Most importantly, the dog that received the experimental drug did not experience side effects such as irritability, vomiting and diarrhea that are often seen with miltefosine treatment. Despite the interesting clinical results, the parasite was detectable in the lymph nodes of both dogs at least 40 days after the completion of treatment.

Taking into account the above findings in the dog combined with the reduced effectiveness of the available treatments observed in recent years also in humans, the use of combination therapy to combat kala azar is becoming more and more common, as the synergistic action of the drugs leads to remission of the disease and reduction of relapses[24-27]. For this reason, we attempted to exploit the potential synergistic effect of a selected analogue and miltefosine, in combination with a class of antimicrobial peptides, called peptaibols. It was observed that the combination of peptaibols with the drugs had a superadditive effect against the intracellular parasite, induced changes in promastigote redox levels, led to mitochondrial membrane potential fragmentation and affected mitochondrial morphology. Therefore, the synergy observed between phopholipids and peptaibols leads to an improvement of the antiparasitic action and thereby to improvement of the therapeutic effect[28].

Failure to eradicate the pathogen from the clinical site of infection is often, due to the phenotypic development of drug-resistant/tolerant strains. We aimed to study possible mechanisms of adaptation of the parasite to alkylphosphocholines, with the ultimate goal of understanding the tolerant populations and finding new treatment targets for effective parasite eradication. We cultured *L. donovani* strain in subtherapeutic doses of miltefosine and the analogue TC19, and analyzed protein expression using proteomics. We reconstructed the main mechanisms of energy production, lipid metabolism and transport of alkylphosphocholines in the promastigote. We found similarities in the induction of expression of central metabolic

machinery between the two analogues, such as biosynthesis of sterols and long-chain fatty acids and oxidative phosphorylation in mitochondria. However, we also found significant differences in energy production from glycolysis and fatty acid catabolism in mitochondria through β-oxidation. We also found that the two chemical substances do not use the same mechanism of entry into the cytoplasm.

In conclusion, many miltefosine analogues have greatly improved characteristics in terms of effect against the parasite and the host cell. A deeper study of their ability to use mechanisms to remove the parasite from the host is important, to understand the effective mode of action. The study of the survival mechanisms of the parasite *in vivo* is critical for the identification of new pharmaceutical targets and the application of synergistic treatments for effective eradication of the parasite.

3. Εισαγωγή

Το γένος *Leishmania* αποτελείται από περίπου 53 είδη, 20 από τα οποία μολύνουν τον άνθρωπο και προκαλούν την ασθένεια λεϊσμανίαση. Μεταδίδεται μέσω του τσιμπήματος της σκνίπας και εκτός από τον άνθρωπο, μολύνει οικόσιτα και άγρια ζώα όπως τα σκυλιά και τα τρωκτικά αντίστοιχα[29]. Η λεϊσμανίαση είναι ένα σύνθετο νόσημα που μεταδίδεται από διαβιβαστή (vector-borne) και εμφανίζει μεγάλη ποικιλομορφία ως προς την οικολογία και την επιδημιολογία της[30]. Ενδημεί σε 98 τροπικές και υποτροπικές χώρες και είναι η μοναδική παρασιτική ασθένεια που διατηρεί τον ενδημικό της χαρακτήρα εδώ και πολλές δεκαετίες στην Ανατολική Ευρώπη[31]. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization, WHO) αναφέρει πάνω από 2 εκατομμύρια νέα κρούσματα κάθε χρόνο, με 367 εκατομμύρια ανθρώπους να κινδυνεύουν ανά τον κόσμο[32] και 70.000 θανάτους ετησίως, κατατάσσοντας την λεϊσμανίαση μεταξύ των επτά πιο σημαντικών παρασιτικών ασθενειών. Ο ολοένα αυξανόμενος αριθμός κρουσμάτων σε συνδυασμό με τις κλιματικές αλλαγές, τον τουρισμό, τη μετανάστευση και την ανοσοκαταστολή, καθιστούν τη θεραπεία της ασθένειας ιδιαίτερα σημαντικό θέμα.

3.1. Ιστορική αναδρομή

Το παράσιτο *Leishmania* ανακαλύφθηκε το 1903 σχεδόν ταυτόχρονα από τους Leishman και Donovan, από τους οποίους και ονομάστηκε[33]. Συγκεκριμένα, ο William Leishman διαπίστωσε την παρουσία άγνωστων παρασίτων σε επίχρισμα σπλήνας από Άγγλο στρατιώτη που υπηρέτησε στην Ινδία. Ανέφερε το περιστατικό στο British Medical Journal όπου περιέγραψε την εικόνα των νεκρών και εκφυλισμένων παρασίτων, κάνοντας αναφορά σε κάποια μορφή τρυπανοσωμίασης[34]. Τον Ιούλιο του 1903, ο Charles Donovan ανέφερε την παρουσία παρασίτων σε δείγμα σπλήνας από περιστατικά διαλείποντος πυρετού, συνοδευόμενου από σπληνομεγαλία[35], γεγονός που επιβεβαίωσε και ο Leishman αυτοπροσώπως. Ακολούθησε μια περίοδος ασάφειας και διαφωνιών μεταξύ των επιστημόνων ως προς την ταυτότητα του παρασίτου και τον συσχετισμό του με την ασθένεια kala azar (σπλαχνική λεϊσμανίαση). Στα τέλη του 1904, το παράσιτο του γένους *Leishmania donovani* αναγνωρίστηκε ως αιτιολογικός παράγοντας της λεϊσμανίασης και ο όρος έγινε αποδεκτός από την επιστημονική κοινότητα[36]. Τα μικρά ωοειδή ή στρογγυλά παράσιτα ονομάστηκαν σωμάτια Leishman-Donovan και η παρουσία τους σε επιχρίσματα σπλήνας και συκωτιού αποτελούν χαρακτηριστική απόδειξη της ύπαρξης της ασθένειας[37].

Ωστόσο δερματικές βλάβες που παραπέμπουν στον δερματικό τύπο της λεϊσμανίασης αναφέρονται στην Αίγυπτο από το 2000 π.Χ.[38] και την Ασσυρία από το 650 π.Χ.[39]. Παρόμοια

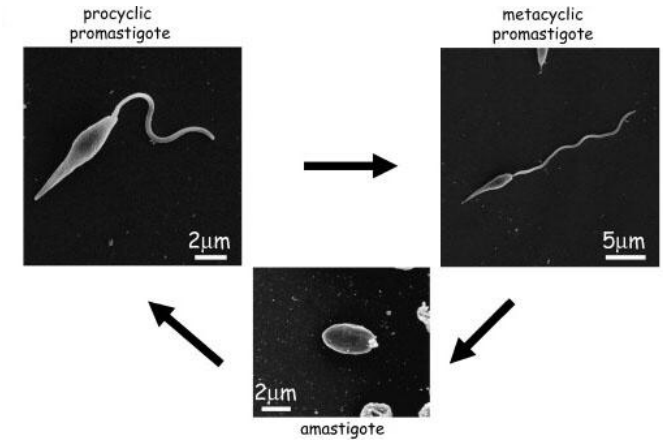
περιστατικά έχουν επίσης καταγραφεί κατά τον 18^{ο} αιώνα και σε άλλα μέρη όπως η Κρήτη και η Αλγερία. Αποδείξεις για την ύπαρξη της σπλαχνικής μορφής της νόσου βρέθηκαν πρόσφατα στην αρχαία Αίγυπτο, σε μούμιες κατά την περίοδο 2050-1650 πΧ.[40], επισημαίνοντας την παρουσία της ασθένειας παγκοσμίως εδώ και πολλούς αιώνες.

3.2. Το παράσιτο Leishmania: μορφολογία και κύκλος ζωής

3.2.1. Μορφολογία

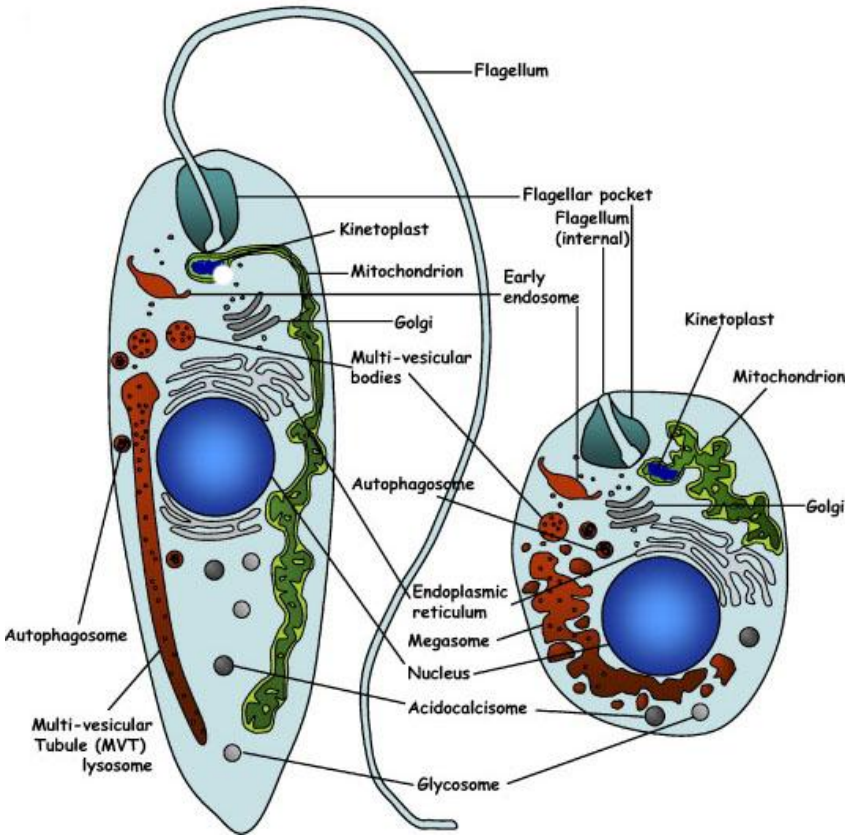
Το παράσιτο *Leishmania* ανήκει στην Οικογένεια *Trypanosomatidae* (Βασίλειο: *Πρώτιστα,* Φύλο: *Πρωτόζωα*)[30] και έχει σύνθετο κύκλο ζωής που περιλαμβάνει ποικίλες μορφές ανάπτυξης. Οι μορφές αυτές αντιπροσωπεύουν την προσαρμογή στις εναλλασσόμενες συνθήκες μεταξύ των δύο ξενιστών: των θηλαστικών (στα οποία προκαλεί παθογένεια) και της σκνίπας που αποτελεί το έντομο-φορέα του παρασίτου[41].

Μέσα στον πεπτικό σωλήνα της σκνίπας, η *Leishmania* αναπαράγεται ως δραστήριο εξωκυττάριο, κινούμενο με τη βοήθεια μαστιγίου κύτταρο, που ονομάζεται προμαστιγωτό. Τα προμαστιγωτά, έχουν μακρόστενο σχήμα και μέγεθος από 5-15 μm[42]. Κατέχουν έναν πυρήνα στο κέντρο, έναν κινετοπλάστη που περιέχει DNA και ένα εξαιρετικά ανεπτυγμένο μαστίγιο, που χρησιμεύει ως προωστικό μέσον κατά τη διάρκεια της κίνησης, και ως μέσον προσκόλλησης στα τοιχώματα της πεπτικής οδού του εντόμου. Υπάρχουν 2 βασικές μορφές προμαστιγωτών: η προκυκλική, αναπαραγόμενη αλλά μη παθογόνος για τα θηλαστικά μορφή που συναντάται στο μέσο έντερο του εντόμου, και η μη διαιρούμενη, παθογόνος μετακυκλική μορφή που βρίσκεται στο θωρακικό τμήμα του εντέρου και στην προβοσκίδα του εντόμου. Τα μετακυκλικά προμαστιγωτά έχουν μακρύτερο μαστίγιο και είναι πολύ ευκίνητα (Εικόνα 1).



Εικόνα 1*: Εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης των βασικών μορφών του παρασίτου Leishmania major*[41].

Μέσα στα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα του θηλαστικού-ξενιστή τα μετακυκλικά παράσιτα διαφοροποιούνται σε μια ενδοκυττάρια, ακίνητη, σφαιρική ή ωοειδή μορφή που ονομάζεται αμαστιγωτή. Τα αμαστιγωτά παράσιτα είναι μικρότερα σε μέγεθος (περίπου 3-5 μM σε διάμετρο), διατηρούν τον πυρήνα και τον κινετοπλάστη τους καθώς και κάποια στοιχεία από το μαστίγιο εγκλεισμένα σε μια εσοχή που ονομάζεται flagellar pocket[43] (Εικόνα 2). Το παράσιτο στην παραπάνω μορφή είναι εγκατεστημένο σε ένα κυστίδιο με χαρακτηριστικά λυσοσώματος, που ονομάζεται παρασιτοφόρο κυστίδιο. Η αμαστιγωτή, αποτελεί την πιο σημαντική μορφή του παρασίτου και είναι σχετιζόμενη με την κλινική εκδήλωση της ασθένειας.

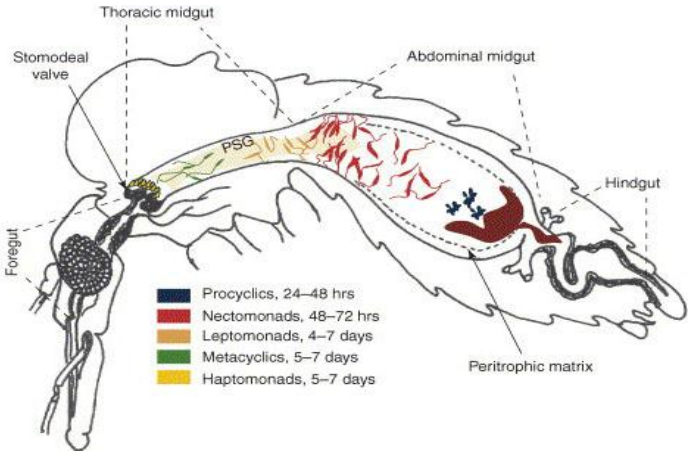


***Εικόνα 2**: Σχηματική αναπαράσταση των κύριων οργανιδίων της προμαστιγωτής (αριστερά) και της ενδοκυττάριας αμαστιγωτής μορφής (δεξιά) του παρασίτου Leishmania[41].*

3.2.2. Κύκλος ζωής

Ο κύκλος ζωής του παρασίτου περιλαμβάνει 2 στάδια: το πρώτο στάδιο λαμβάνει χώρα στον ενδιάμεσο ξενιστή, την σκνίπα, και το δεύτερο στάδιο στον σπονδυλωτό ξενιστή (θηλαστικό). Ο εκτιμώμενος χρόνος που χρειάζεται προκειμένου το παράσιτο να ολοκληρώσει την ανάπτυξή του μέσα στο έντομο είναι 6-9 μέρες, ανάλογα με το είδος[44, 45].

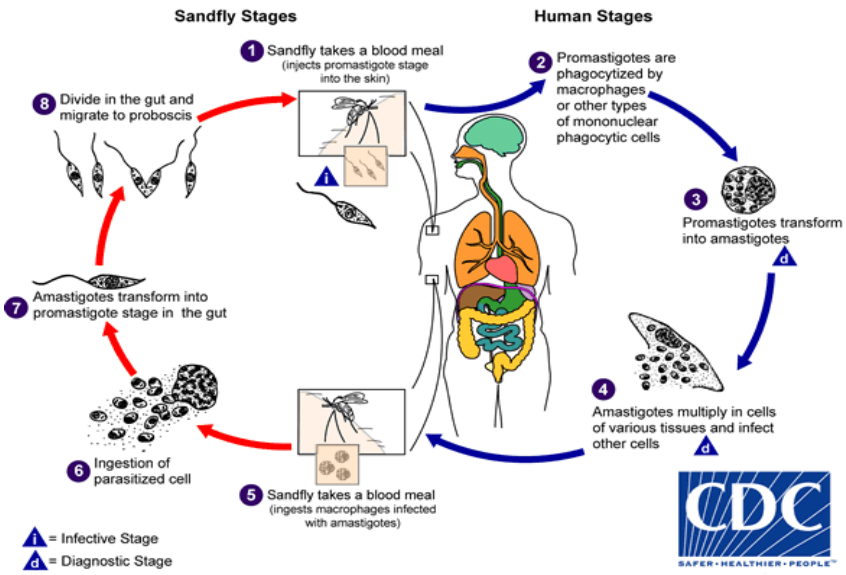
Κατά τη διάρκεια των γευμάτων της μια σκνίπα θηλυκού γένους μπορεί να μολυνθεί με το παράσιτο προσροφώντας αίμα από έναν ήδη μολυσμένο σπονδυλωτό ξενιστή. Το γεύμα αυτό περιέχει μακροφάγα που φέρουν αμαστιγωτά παράσιτα μέσα σε παρασιτοφόρα κυστίδια. Καθώς τα μολυσμένα μακροφάγα μεταφέρονται στο οπίσθιο κοιλιακό μέσο έντερο και κάτω από την επίδραση των διαφορετικών συνθηκών που επικρατούν στο εσωτερικό του εντόμου (χαμηλότερη θερμοκρασία, αύξηση του pH), τα αμαστιγωτά παράσιτα διαφοροποιούνται. Η παραπάνω διαφοροποίηση έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ποικίλων μορφών προμαστιγωτών παρασίτων. Κάθε μια από τις μορφές αυτές χαρακτηρίζεται από μορφολογικές και λειτουργικές αλλαγές που διασφαλίζουν την επιβίωση του παρασίτου μέσα στο έντομο (Εικόνα 3).



Εικόνα 3*: Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής του παρασίτου Leishmania μέσα στον ενδιάμεσο ξενιστή, προβάλλοντας την χρονο-εξαρτώμενη εμφάνιση μορφών με ξεχωριστή μορφολογία, που αναπτύσσονται στο εσωτερικό του εντέρου του εντόμου*[45]*.*

Η διαδικασία της μετακυκλογένεσης αφορά στην διαφοροποίηση των προμαστιγωτών που οδηγεί στην δημιουργία των μολυσματικών μετακυκλικών παρασίτων, και είναι το τελικό σημείο ανάπτυξης μέσα στο έντομο-φορέα. Έτσι περίπου το 50% των προμαστιγωτών θα διαφοροποιηθούν στην μετακυκλική μορφή και θα οδηγήσουν στη μόλυνση ενός υγιούς θηλαστικού, καθώς τα μετακυκλικά παράσιτα θα εισέλθουν στην κυκλοφορία του νέου ξενιστή κατά την διάρκεια ενός νέου γεύματος της σκνίπας[42].

Τα στάδια του κύκλου ζωής του παρασίτου, τόσο στον φορέα-έντομο όσο και τον ξενιστή-θηλαστικό απεικονίζονται παρακάτω στην Εικόνα 4.



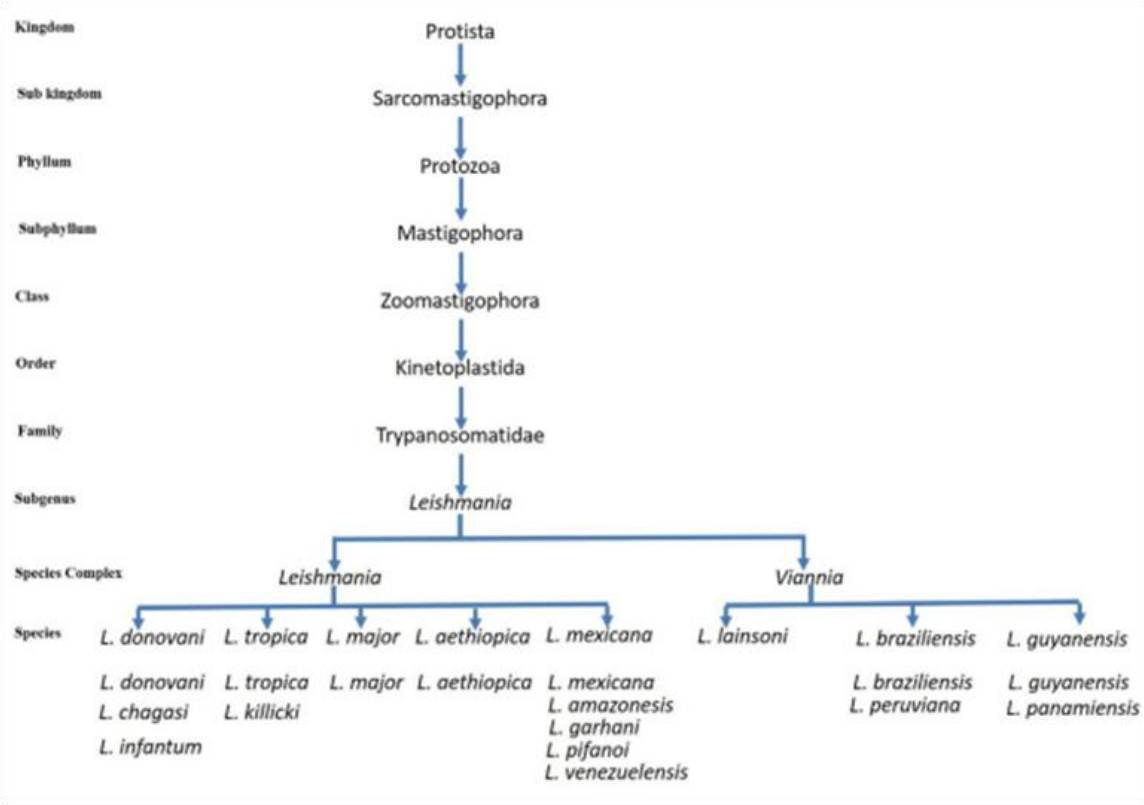
Εικόνα 4*: Κύκλος ζωής του παρασίτου Leishmania.*

Μόλις το παράσιτο εισέλθει μέσα στο θηλαστικό συλλέγεται από τα ουδετερόφιλα, από τα οποία όμως καταφέρνει να ξεφύγει. Στη συνέχεια φαγοκυτταρώνεται από τα μακροφάγα του δέρματος και διαφοροποιείται στην ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή. Μέσα σε 12-24 ώρες από την είσοδο στον ξενιστή, το παράσιτο έχει διαφοροποιηθεί σε αμαστιγωτό που φιλοξενείται μέσα στο παρασιτοφόρο κυστίδιο. Ακολουθεί πολλαπλασιασμός των αμαστιγωτών παρασίτων μέσα στο μακροφάγο, το οποίο τελικά διαρρηγνύεται, απελευθερώνοντας το περιεχόμενό του. Τα νέα αμαστιγωτά μολύνουν τα μακροφάγα κύτταρα του δικτυο-ενδοθηλιακού συστήματος ξεκινώντας ένα νέο κύκλο μόλυνσης μέσα στον σπονδυλωτό ξενιστή. Τα μολυσμένα μακροφάγα μπορεί να παραμείνουν στο δέρμα, η να εξαπλωθούν και να μολύνουν άλλους ιστούς και όργανα όπως το συκώτι, η σπλήνα και ο μυελός των οστών[30].

3.3. Ταξινόμηση

Η ταξινόμηση του παρασίτου *Leishmania* βασίστηκε αρχικά σε οικο-βιολογικά κριτήρια, όπως ο τύπος του φορέα-εντόμου, η γεωγραφική κατανομή της ασθένειας, οι αντιγονικές ιδιότητες και τα κλινικά συμπτώματα[46-49]. Ωστόσο, βιοχημικές και μοριακές μελέτες κατέδειξαν συχνά την ανεπάρκεια των παραπάνω μεθόδων, με αποτέλεσμα τη χρησιμοποίηση άλλων κριτηρίων, όπως η παρουσία πολυμορφισμών του DNA του κινετοπλάστη, πρωτεΐνες και διάφορα αντιγόνα[50-54]. Επιπρόσθετα, η χρησιμοποίηση νέων μεθόδων ανίχνευσης, απομόνωσης και γενετικής ταυτοποίησης είχε ως αποτέλεσμα τη μαζική αύξηση του αριθμού των ειδών που έχουν περιγραφεί.

Στην Εικόνα 5 απεικονίζεται η ταξινόμηση του παρασίτου *Leishmania*. Τα 2 υπογένη, *Leishmania* και *Viannia*, διαχωρίζονται βάσει της θέσης τους στο μέσο έντερο του εντόμου, και τα συμπλέγματα των ειδών μέσα στα παραπάνω υπογένη έχουν αναγνωρισθεί με τη χρήση ανάλυσης ισοενζύμων[55, 56]. Επιπλέον, η *Sauroleishmania* που μολύνει τα ερπετά και είναι μη παθογόνος για τον άνθρωπο, παρουσιάζεται σε κάποιες μελέτες ως τρίτο υπογένος[44].



Εικόνα 5*: Ταξινόμηση του γένους Leishmania. Το είδος L.chagasi θεωρείται συνώνυμο του είδους L.infantum[57].*

Τα παραπάνω είδη παρουσιάζουν γενικώς διαφορετικά επιδημιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά, τα οποία συνδέονται με διάφορα γενετικά και φαινοτυπικά προφίλ. Ωστόσο η ταξινόμηση, τόσο του παρασίτου όσο και του διαβιβαστή-ξενιστή, αποτελεί εδώ και πολλά χρόνια ένα αμφιλεγόμενο θέμα, εμποδίζοντας έτσι τον σαφή προσδιορισμό των παραγόντων που σχετίζονται με την εξάπλωση της νόσου. Η πλήρης χαρτογράφηση του γονιδιώματος και η ανάλυση πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorhisms) σε ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα από όλα τα είδη έχουν συνεισφέρει σημαντικά στη βελτίωση της ταξινόμησης του γένους[58].

3.4. Ξενιστές

3.4.1. Ο διαβιβαστής ξενιστής

Η λεϊσμανίαση μεταδίδεται μέσω του τσιμπήματος της σκνίπας του γένους *Phlebotomus* στον Παλαιό Κόσμο, και του γένους *Lutzomyia* στο Νέο Κόσμο (Εικόνα 6). Η σκνίπα είναι ένα δίπτερο έντομο που ανήκει στην Τάξη: *Insecta*, Οικογένεια: *Psychodidae* και Φύλο: *Arthropoda*[59]. Περίπου 70 από τα 1000 γνωστά είδη μεταδίδουν την ασθένεια κατά τη διάρκεια αναζήτησης τροφής[60]. Συναντώνται συνήθως κοντά σε κατοικημένες περιοχές και αναπαράγονται σε συγκεκριμένα οργανικά απόβλητα όπως περιττώματα, κοπριά, φωλιές τρωκτικών και απορρίμματα[30]. Φωλιάζουν επίσης μέσα σε ρωγμές τοίχων με υψηλή υγρασία και θερμοκρασία, αλλά και σε ξηρότερα μέρη όπως σπηλιές και κουφάλες δέντρων. Οι σκνίπες είναι περισσότερο ενεργές κατά τη διάρκεια του σούρουπου και την αυγή, όπου απομυζούν αίμα από ανθρώπους ή ζώα προκειμένου να καλύψουν τις θρεπτικές τους ανάγκες για την ανάπτυξη των αυγών τους.

Η σκνίπα έχει μικρό μέγεθος, περίπου 2-3 mm, και είναι ένα αθόρυβο ιπτάμενο έντομο. Κατά τη διάρκεια αναζήτησης τροφής καλύπτει συνήθως μια περιορισμένη ακτίνα γύρω από τη φωλιά της, καθώς δεν είναι πολύ ικανή στο πέταγμα[61]. Οι σκνίπες μπορούν να τσιμπήσουν ζώα όπως τα σκυλιά, οι γάτες, διάφορα τρωκτικά, βοοειδή, πουλιά και ερπετά, αλλά και τον άνθρωπο. Μορφολογικά, τα είδη της σκνίπας που μεταφέρουν τη νόσο παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες, και η αναγνώρισή τους γίνεται κυρίως με την χρήση μικροσκοπίου, καθώς και εξελιγμένων μοριακών τεχνικών.

Εικόνα 6*: Έντομα του είδους Phlebotomus argentipes (αριστερά) και Lutzomyia longipalis (δεξιά) αντίστοιχα*[30]*.*

Το τσίμπημα της σκνίπας προκαλεί μια ροδόχρωμη βλατίδα που είναι περικυκλωμένη από μια ερυθηματώδη περιοχή με διάμετρο 10-20 mm και αποτελεί την βασική οδό μετάδοσης της νόσου[62]. Τυπικά κάθε είδος σκνίπας μεταδίδει μόνο ένα είδος παρασίτου που

οδηγεί στην εκδήλωση συγκεκριμένου τύπου της ασθένειας. Ο κίνδυνος απόκτησης της νόσου καθορίζεται από τη συμπεριφορά του εντόμου, και την παρουσία μολυσμένων ζώων και ανθρώπων που παίζουν τον ρόλο των αποθηκευτικών ξενιστών. Στον Πίνακα 1 αναφέρονται μερικά από τα πιο σημαντικά είδη σκνίπας που σχετίζονται με τη μετάδοση της νόσου[63].

Leishmania species	Disease form in humans	Geographical distribution	Reservoir hosts	Vectors
Leishmania aethiopica@	Localised cutaneous leishmaniasis,			*Phlebotomus longipes,*
	Diffuse cutaneous leishmaniasis	Ethiopia, Kenya	Rock hyraxes	*P. pedifer*
L. major@	Localised cutaneous leishmaniasis	North Africa, Middle East and Central Asia, Sub- Saharan Africa and Sahel belt, Sudan, North India, Pakistan	Rodents	*P. papatassi,* *P. duboscqi*
*L. mexicana**	Localised cutaneous leishmaniasis	Central America	Forest rodents	*Lutzomyia olmeca*
*L.amazonensis**	Localised cutaneous leishmaniasis	South America, north of the Amazon	Forest rodents	*L. flaviscutellata*
*L.braziliensis**	Localised cutaneous leishmaniasis;	South America,	Forest rodents,	*Psychodopygus*
	Mucocutaneous leishmaniasis	Central America and Mexico	peridomestic animals	*Lutzomyia spp.*
*L. peruviana**	Localised cutaenous leishmaniasis	West Andes of Peru., Argentine highlands	Dog	*L. verrucarum,* *L. pvmenis*
L. infantum@	Visceral leishmaniasis; Localised cutaneous leishmaniasis	Mediterranean basin; Middle East and Central Asia to Pakistan; China; Central and South America, southern Europe, northwest Africa	Dogs, cats, foxes, jackals	*P. pcrniciosufi,* *P. arias*
L. donovani@	Visceral leishmaniasis	Ethiopia, Sudan, Kenya, India, China, Bangladesh, Burma	Human anthroponosis, Rodents Sudan, Canines	*Phiebotomus argentipes,* *P. orinntalis,* *P. martini*
@Old world species *New world species				

Πίνακας 1: *Είδη του γένους Phlebotomus και του γένους Lutzomyia με κλινική σημασία, που ευθύνονται για την μετάδοση συγκεκριμένων ειδών του παρασίτου και την εκδήλωση διαφορετικών μορφών της ασθένειας. Γίνεται επίσης αναφορά στους αποθηκευτικούς ξενιστές.*

3.4.2. Αποθηκευτικοί ξενιστές

Η λεισμανίαση αποτελεί ένα τυπικό παράδειγμα ανθρωποζωονόσου και ο ρόλος των αποθηκευτικών ξενιστών στη διατήρηση του κύκλου ζωής του παρασίτου είναι ιδιαίτερα σημαντικός. Αν και η πλειοψηφία των περιπτώσεων είναι ζωονοσικής προέλευσης, όπου ο αποθηκευτικός ξενιστής είναι τα συμβιωτικά, κατοικίδια και άγρια ζώα, η μετάδοση της ασθένειας μπορεί επίσης να συμβεί από άνθρωπο σε άνθρωπο (ανθρωπονοσική προέλευση).

Όπως αναφέρθηκε στον Πίνακα 1, πολυάριθμα είδη ζώων, όπως σκύλοι, γάτες, αλεπούδες, τσακάλια, λύκοι, τρωκτικά, αρμαντίλλο και νυχτερίδες αποτελούν αποθηκευτικούς ξενιστές για το παράσιτο[64]. Ανάμεσα σε αυτά, ο σκύλος θεωρείται ο πιο σημαντικός οικόσιτος αποθηκευτικός ξενιστής του είδους *L.infantum*. Επίσης, μετάδοση της νόσου στον άνθρωπο

μπορεί να πραγματοποιηθεί τυχαία ή ως αποτέλεσμα της παρουσίας άγριων ειδών ζώων κοντά σε κατοικημένες περιοχές[65]. Επιπρόσθετα, ο άνθρωπος αποτελεί αποθηκευτικό ξενιστή για την σπλαχνική μορφή της ασθένειας από *L.donovani* και την δερματική μορφή από *L.tropica*[66]. Παρόλο που κάθε είδος του παρασίτου ευθύνεται συγκεκριμένα για ζωονοσική ή ανθρωπονοσική μετάδοση της νόσου, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις όπου ανθρωπονοσικά είδη έχουν προκαλέσει ζωονόσους[67].

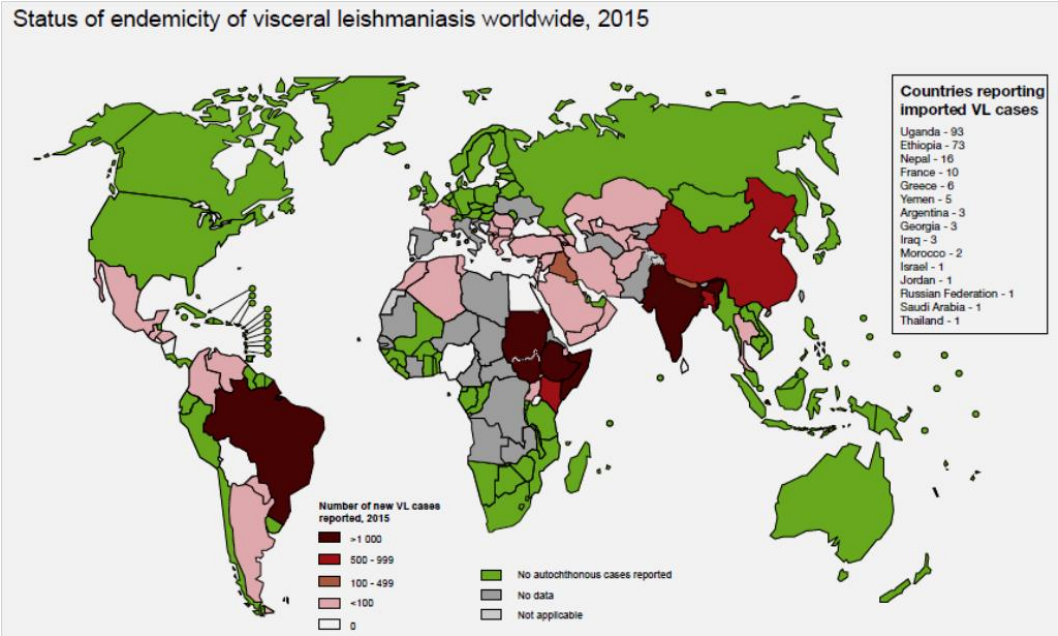
3.5. Η ασθένεια Λεϊσμανίαση

Οι κλινικές εκδηλώσεις της λεϊσμανίασης στον άνθρωπο εξαρτώνται από τις σύνθετες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μολυσματικών ειδών του παρασίτου και της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή. Στις περισσότερες περιπτώσεις η μόλυνση παραμένει εντοπισμένη στο δέρμα ή σε γειτονικούς λεμφαδένες. Ωστόσο, συγκεκριμένα είδη του παρασίτου έχουν την ικανότητα να διαφεύγουν προς τον ρινικό και στοματοφαρρυγγικό βλεννογόνο, σε διάφορες περιοχές της επιδερμίδας, και όργανα όπως το συκώτι και η σπλήνα. Άλλα σημεία του σώματος που προσβάλλονται περιλαμβάνουν τον μυελό των οστών και πιο απομακρυσμένους λεμφαδένες. Υπάρχουν 3 βασικές μορφές της ασθένειας: η σπλαχνική, η δερματική και η βλεννοδερματική λεϊσμανίαση[29, 43].

3.5.1. Σπλαχνική λεϊσμανίαση (Visceral Leishmaniasis, VL)

Η σπλαχνική λεϊσμανίαση προκαλείται συνήθως από το είδος *L.donovani* στην Ινδία, την Ασία και την Αφρική, και από το είδος *L.infantum* στην περιοχή της Μεσογείου, τη Νοτιοδυτική Ασία και τη Νότια Αμερική αντίστοιχα. Υπάρχουν επίσης είδη, όπως η *L.tropica* στη Μέση Ανατολή και η *L.amazonensis* στη Νότια Αμερική που αν και ενοχοποιούνται για άλλες μορφές λεϊσμανίασης, ενίοτε προκαλούν την εκδήλωση της σπλαχνικής μορφής της ασθένειας[60].

Η σπλαχνική λεϊσμανίαση, γνωστή και ως kala azar (μαύρη νόσος), είναι η πιο σοβαρή μορφή της ασθένειας που μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο απουσία θεραπείας. Ενδημεί σε πολλές τροπικές και υποτροπικές χώρες του πλανήτη, και στον κόλπο της Μεσογείου. Υπολογίζεται ότι περίπου 500.000 νέα κρούσματα συμβαίνουν κάθε χρόνο, ενώ 50.000 από αυτά καταλήγουν σε θάνατο. Η ασθένεια αποτελεί πολύ σημαντικό πρόβλημα υγείας σε χώρες όπως η Ινδία, το Μπαγκλαντές, η Αιθιοπία, το Νεπάλ, το Σουδάν και η Βραζιλία[68, 69]. Στην Εικόνα 7 παρουσιάζεται η παγκόσμια κατανομή της νόσου, δίνοντας έμφαση στις ενδημικές περιοχές.



***Εικόνα 7**: Γεωγραφική κατανομή της σπλαχνικής λεϊσμανίασης στον Παλαιό και Νέο Κόσμο σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis).*

Η μόλυνση ξεκινά συνήθως από μια ξηρή ή ελκωματώδη βλάβη στο σημείο τσιμπήματος από το μολυσμένο έντομο. Συστηματικά συμπτώματα, όπως πυρετός, αναιμία, σπληνομεγαλία, ηπατομεγαλία, λεμφαδενοπάθεια, κυτταροπενία, διάρροια και προοδευτική καχεξία, αναπτύσσονται από 3-8 μήνες από την αρχική μόλυνση, αλλά ο ασθενής μπορεί να παραμείνει ασυμπτωματικός για χρόνια. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η σπλαχνική λεϊσμανίαση οδηγεί στο θάνατο, συνήθως λόγω συνακόλουθης μόλυνσης που προέρχεται από την αδύναμη ανοσολογική κατάσταση του ασθενή. Στην Εικόνα 8 απεικονίζονται τα κλασσικά συμπτώματα της νόσου.

***Εικόνα 8**: Ηπατοσπληνομεγαλία σε ασθενείς με σπλαχνική λεϊσμανίαση[60, 69].*

Οι παράγοντες κινδύνου που οδηγούν στην εκδήλωση της ασθένειας είναι εν μέρει κατανοητοί και περιλαμβάνουν συνήθως περιοχές όπου ο υποσιτισμός αποτελεί ένα μεγάλο πρόβλημα[70]. Επιπλέον, η παρουσία ζώων σε κοντινή απόσταση[71], η διαμονή σε σπίτια με ακατάλληλο αποχετευτικό σύστημα[72] και σε περιοχές με πυκνή βλάστηση, αυξάνουν τον κίνδυνο εκδήλωσης της σπλαχνικής λεϊσμανίασης[73]. Το 2005, οι κυβερνήσεις του Μπαγκλαντές, της Ινδίας και του Νεπάλ προώθησαν μια φιλόδοξη πρωτοβουλία εξάλειψης της ασθένειας από τη Νότια Ασία, συνδυάζοντας στρατηγικές πρόωρης διάγνωσης και θεραπείας με τον αποτελεσματικό έλεγχο του φορέα-εντόμου[74].

3.5.2. Μετα-kala azar δερματική λεϊσμανίαση (Post-kala azar dermal leishmaniasis, PKDL)

Αυτός ο τύπος της ασθένειας αποτελεί ένα είδος δερματικής επιπλοκής της σπλαχνικής λεϊσμανίασης, και εμφανίζεται συνήθως 2-7 χρόνια μετά την επιτυχή θεραπεία με τη χρήση αντιμονίου. Χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση δερματικών βλαβών συνήθως στην περιοχή του προσώπου, που συχνά μεταφέρονται και σε άλλες περιοχές του σώματος (Εικόνα 9). Για αρκετά χρόνια θεωρείτο ένα περίεργο φαινόμενο, δύσκολό ως προς την εξήγηση και τη θεραπεία του, ωστόσο πρόσφατες έρευνες ανέδειξαν το είδος του παρασίτου, της θεραπείας και τον ρόλο του ξενιστή που συσχετίζονται με την εκδήλωση της νόσου[75].

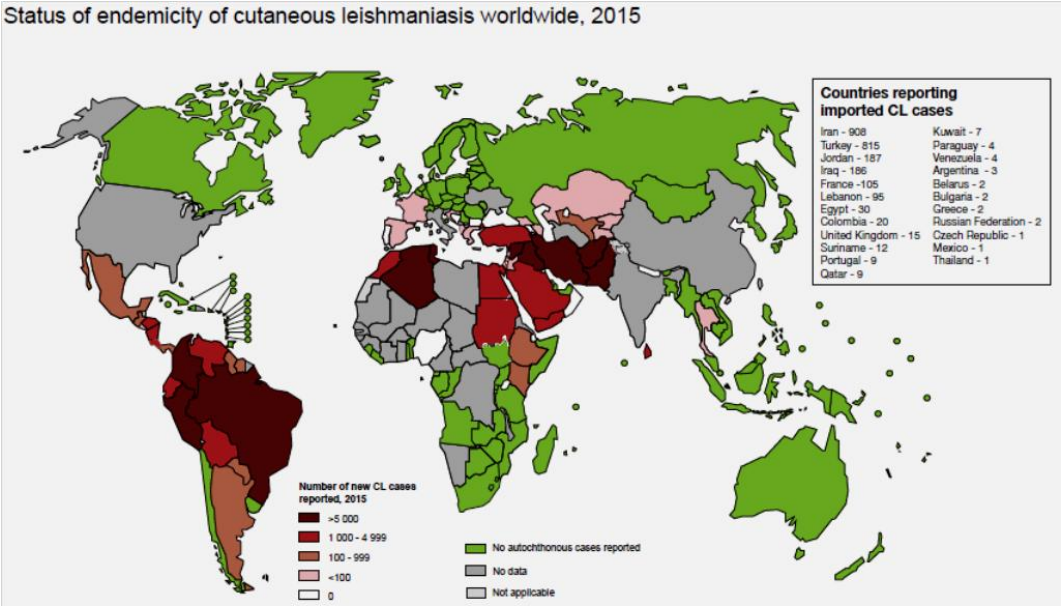
***Εικόνα 9**: Οζώδης μετα-kala azar δερματική λεϊσμανίαση (PKDL) σε ασθενή από την Ινδία.*

Στην πλειονότητά της, η παραπάνω μορφή της ασθένειας προκαλείται από το είδος *L.donovani* στην Ινδία και το Σουδάν. Πρόσφατες μοριακές μελέτες από κλινικά στελέχη στις παραπάνω περιοχές δεν ανέδειξαν κάποια ιδιαίτερη συσχέτιση μεταξύ των στελεχών και της ασθένειας[76]. Επιπλέον, κλινικές μελέτες δεν κατάφεραν να συσχετίσουν το φύλο, την ηλικία ή την εθνικότητα με την εμφάνιση της ασθένειας[77]. Ο τελευταίος παράγοντας που πιθανόν να εμπλέκεται αφορά στο είδος της θεραπείας της σπλαχνικής μορφής της νόσου. Έτσι, παρόλο του η PKDL έχει αναφερθεί και σε ασθενείς που δεν έχουν λάβει θεραπεία, είναι γενικά αποδεκτό ότι αυτή η δερματική επιπλοκή της σπλαχνικής λεϊσμανίασης συναντάται συνήθως μετά από θεραπεία. Αν και υπάρχουν ενδείξεις που συσχετίζουν την εμφάνιση της νόσου μετά

από τη χρήση πεντασθενούς αντιμονίου, περαιτέρω κλινικές μελέτες είναι αναγκαίες για την τεκμηρίωση της παραπάνω υπόθεσης.

3.5.3. Δερματική λεϊσμανίαση (Cutaneous Leishmaniasis, CL)

Η δερματική λεϊσμανίαση προκαλείται συνήθως από τα είδη *L.major*, *L.tropica* και *L.aethiopica* στον Παλαιό Κόσμο, ενώ τα είδη *L.mexicana*, *L amazonenesis*, *L.braziliensis*, *L.panamensis*, *L.peruviana*, και *L.guyanensis* ενοχοποιούνται στον Νέο Κόσμο. Η ασθένεια έχει ενδημικό χαρακτήρα σε περισσότερες από 70 χώρες παγκοσμίως, με το 90% των περιπτώσεων να συγκεντρώνονται στο Αφγανιστάν, την Αλγερία, τη Βραζιλία, το Πακιστάν, το Περού, τη Σαουδική Αραβία και τη Συρία[78] (Εικόνα 10).



Εικόνα 10*: Γεωγραφική κατανομή της δερματικής λεϊσμανίασης στον Παλαιό και Νέο Κόσμο σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis).*

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι την τελευταία δεκαετία ο αριθμός των κρουσμάτων έχει αυξηθεί σε πολλές από τις παραπάνω χώρες. Ο κύκλος μετάδοσης της νόσου έχει προσαρμοστεί γύρω από το οικόσιτο περιβάλλον και αφορά πλέον περιοχές που παλαιότερα ήταν μη ενδημικές. Παράγοντες που συντελούν στην παραπάνω αλλαγή περιλαμβάνουν την αυξανόμενη αστικοποίηση και την αποψίλωση των δασών[79], τις οικονομικές κακουχίες[80], τις φυσικές καταστροφές, τις ένοπλες συγκρούσεις[81] και τον τουρισμό[82], που εξωθούν στη μετακίνηση «ευαίσθητου» πληθυσμού προς ενδημικές περιοχές.

Οι πρώτες περιγραφές της δερματικής λεϊσμανίασης εντοπίζονται από τον 9^{ο} αιώνα, ωστόσο η νόσος αυτή παραμένει ένα σημαντικό πρόβλημα υγείας μέσα στον 21^{ο} αιώνα, με 1,5 εκατομμύριο νέα κρούσματα ετησίως[83]. Η δερματική λεϊσμανίαση, γνωστή και ως «φύμα της Ανατολής» αρχικά εμφανίζεται με τη μορφή τσιμπήματος εντόμου που δεν υποχωρεί εύκολα. Σταδιακά η πληγή αυτή μεγαλώνει και έχει έντονο κόκκινο χρώμα, ωστόσο δεν προκαλεί ιδιαίτερο πόνο ή αίσθημα καύσου στον ασθενή. Σε διάστημα μεταξύ 1-3 μηνών παίρνει ελκωματώδη μορφή και τελικά αυτοϊάται με τη μετανάστευση λευκοκυττάρων, που απομονώνουν τη μολυσμένη περιοχή και οδηγούν σε νέκρωση των μολυσμένων ιστών[43].

Χαρακτηριστικό της ασθένειας στον Παλαιό Κόσμο αποτελεί η παρουσία βλατίδων και όζων, ενώ η δερματική λεϊσμανίαση στο Νέο Κόσμο προκαλεί τη δημιουργία ελκών[60]. Στις περισσότερες περιπτώσεις η δερματική λεϊσμανίαση καταλήγει σε φυσική ίαση, ωστόσο ο χρόνος που απαιτείται ποικίλει ανάλογα με το είδος του παρασίτου και το σημείο της πληγής. Το μέγεθος της πληγής επίσης ποικίλει από μερικά χιλιοστά ως και αρκετά εκατοστά σε διάμετρο, ενώ η ταυτόχρονη παρουσία πολλών βλαβών μαζί είναι ένα αρκετά σύνηθες φαινόμενο, προκαλώντας μεγάλη παραμόρφωση και θλίψη στον ασθενή. Η θεραπεία της δερματικής λεϊσμανίασης στοχεύει στην επιτάχυνση της ίασης, τη μείωση της εμφάνισης των ουλών και την αποφυγή υποτροπής ή εξάπλωσης σε άλλα σημεία του σώματος. Στην Εικόνα 11 παρουσιάζονται χαρακτηριστικά έλκη και βλάβες της δερματικής λεϊσμανίασης.

Εικόνα 11*: Δερματική λεϊσμανίαση του Νέου και Παλαιού Κόσμου αντίστοιχα.*

3.5.4. Διάχυτη Δερματική Λεϊσμανίαση (Diffuse Cutaneous Leishmaniasis, DCL)

Η διάχυτη δερματική λεϊσμανίαση είναι μια μορφή δερματικής λεϊσμανίασης που χαρακτηρίζεται από διασπορά των βλαβών σε διάφορες περιοχές του δέρματος. Στον Νέο Κόσμο, η ασθένεια συσχετίζεται με τα είδη *L.pifanoi*, *L.amazonensis*, *L.mexicana* και *L.venezuelensis*, ενώ στον Νέο Κόσμο προκαλείται συνήθως από τα είδη *L.major*, *L.aethiopica* και *L.tropica*[84].

Η ασθένεια ξεκινά με την εμφάνιση μιας αρχικής βλάβης που προοδευτικά καταλήγει στη δημιουργία πολλών ελκωματωδών οζιδίων που διαχέονται σε όλο το σώμα δημιουργώντας μια εικόνα όμοια με την λέπρα. Οι βλάβες που είναι συνήθως ανώδυνες, συχνά συγχωνεύονται δημιουργώντας πλάκες (Εικόνα 12). Σε ιστολογικό επίπεδο, υπάρχει εξαιρετικά μεγάλο φορτίο παρασίτων στα οζίδια, ωστόσο τα εσωτερικά όργανα του σώματος δεν παρουσιάζονται μολυσμένα από το παράσιτο[85].

***Εικόνα 12**: Διάχυτη δερματική λεϊσμανίαση στην περιοχή του προσώπου και του σβέρκου[86].*

Η διάχυτη δερματική λεϊσμανίαση ανταποκρίνεται μερικώς στη θεραπεία και οι υποτροπές αποτελούν πολύ συχνό φαινόμενο, οδηγώντας σε μια χρόνια κατάσταση[86]. Πολλές μελέτες αποδίδουν την διάχυση των βλαβών που παρατηρείται στη συγκεκριμένη μορφή της νόσου σε έλλειψη ανοσολογικής ανταπόκρισης, που σχετίζεται με το γενετικό υπόβαθρο του ασθενούς και όχι με την μολυσματικότητα του στελέχους[87].

3.5.5. Βλεννώδης Λεϊσμανίαση (Mucosal Leishmaniasis, ML)

Η βλεννώδης λεϊσμανίαση (βλεννοδερματική λεϊσμανίαση ή Espundia)[43] προκαλείται από την εκ νέου ενεργοποίηση της δερματικής μορφής της νόσου, μήνες ή χρόνια μετά την έναρξη των αρχικών συμπτωμάτων. Υπολογίζεται ότι περίπου το 5% των ασθενών με δερματική λεϊσμανίαση θα αναπτύξουν αυτό το είδος μεταστατικής βλεννώδους νόσου[88]. Ωστόσο, σε κάποιες σπάνιες περιπτώσεις εκδήλωσης της νόσου δεν εμπλέκεται ιστορικό δερματικής λεϊσμανίασης[89].

Η ασθένεια ενδημεί σε διάφορες περιοχές της Λατινικής Αμερικής στις οποίες αποτελεί σοβαρό πρόβλημα δημόσιας υγείας, προκαλώντας υψηλά ποσοστά νοσηρότητας και

θνησιμότητας. Προκαλείται συνήθως από το είδος *L.braziliensis* στη Βραζιλία[90], αλλά και από άλλα είδη όπως η *L.amazonensis*, *L.guyanensis* και *L.paramensis*[91]. Προσφάτως, η οικονομική παγκοσμιοποίηση και η αυξημένη τουριστική κίνηση είχε ως αποτέλεσμα τη μεταφορά της ασθένειας σε αναπτυγμένες χώρες. Έτσι, αν και η βλεννώδης λεϊσμανίαση είναι εξαιρετικά σπάνια στις Ηνωμένες Πολιτείες, συχνά εκδηλώνεται σε τουρίστες που έχουν επιστρέψει από ενδημικές περιοχές.

Η βλεννώδης λεϊσμανίαση προκαλεί προοδευτικά καταστροφικές βλάβες στον βλεννογόνο της μύτης, του φάρυγγα, του λάρυγγα και της τραχείας, καθώς επίσης καταστροφή του διαφράγματος της μύτης και της μαλακής και σκληρής υπερώας (Εικόνα 13). Οι παραπάνω κλινικές εκδηλώσεις οδηγούν σε σοβαρή παραμόρφωση του προσώπου και διαταραχή της ομαλής λειτουργίας του αναπνευστικού συστήματος, και δεν υποχωρούν παρά μόνο μετά από θεραπεία[92].

Εικόνα 13*: Βλεννώδης λεϊσμανίαση σε ασθενείς με εκτεταμένη καταστροφή του βλεννογόνου του στόματος και της μύτης*[60, 78]*.*

Η θεραπεία της νόσου αποτελεί πρόκληση, δεδομένου ότι αν και η αρχική βλάβη μπορεί να έχει θεραπευτεί πλήρως, το παράσιτο εξακολουθεί να υπάρχει μέσα στα κύτταρα του ξενιστή, και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες να προκαλέσει αναζωπύρωση της ασθένειας[93]. Τέτοιες συνθήκες περιλαμβάνουν την ανοσοκαταστολή, τη λήψη ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων, και τη μεταμόσχευση οργάνων.

3.6. Λεϊσμανίαση και ανοσοκαταστολή

Η λεϊσμανίαση έχει αναγνωριστεί ως ευκαιριακή μόλυνση σε ανοσοκατασταλμένα άτομα και κυρίως σε ασθενείς που πάσχουν από HIV[94]. Λιγότερο συχνά η ασθένεια συναντάται σε άτομα που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση οργάνων, χημειοθεραπεία ή πάσχουν από διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος. Η ανοσοκαταστολή αποτελεί έναν από τους παράγοντες που ευθύνονται για αυξημένη ευαισθησία σε πρωτογενή μόλυνση με *Leishmania* ή επανενεργοποίηση μιας σιωπηλής προϋπάρχουσας λοίμωξης.

Από το 1985 ως τα τέλη της δεκαετίας του ΄90, η ταυτόχρονη μόλυνση με *Leishmania* και HIV θεωρούνταν μια αναδυόμενη ασθένεια στη Νότια Ευρώπη. Το 25-70% των περιστατικών με σπλαχνική λεϊσμανίαση στους ενήλικες συνδέθηκε με την παρουσία HIV και 9% των ασθενών με HIV μολύνθηκε με το παράσιτο ή εκδήλωσε την προηγουμένως ανενεργή νόσο[95]. Ωστόσο, η εισαγωγή αποτελεσματικής αντι-ιϊκής θεραπείας μείωσε αισθητά τη συχνότητα εμφάνισης της σπλαχνικής λεϊσμανίασης στους ασθενείς με HIV στην Ευρώπη[96]. Υπολογίζεται ότι η λεϊσμανίαση συνυπάρχει με τον HIV σε 35 από τις 88 χώρες στις οποίες ενδημεί, ενώ η γεωγραφική επικάλυψη των δύο ασθενειών προκαλεί ανησυχία στην Α. Αφρική τη Βραζιλία[97] και την Ινδία[98].

3.7. Η Λεϊσμανίαση στα σκυλιά (Canine Leishmaniosis, CanL)

Η λεϊσμανίαση στα σκυλιά είναι μια δυνητικά θανατηφόρος ζωονόσος, που ενδημεί στην Ευρώπη, την Ασία, την Αμερική και την Αφρική, και προκαλείται από το είδος *L.infantum*. Ο οικιακός σκύλος αποτελεί τον βασικό αποθηκευτικό ξενιστή της ασθένειας, και οι σκνίπες του γένους *Phlebotomus* και *Lutzomyia* αποτελούν το διαβιβαστή-ξενιστή του παρασίτου στον Παλαιό και Νέο Κόσμο αντίστοιχα. Η μόλυνση σκύλου με *L.infantum* περιγράφηκε πρώτη φορά το 1908[99]. Σήμερα υπολογίζεται ότι περίπου 2,5 εκατομμύρια σκυλιά είναι μολυσμένα στη ΝΔ Ευρώπη[100], ενώ η ασθένεια εξαπλώνεται στους πρόποδες των Άλπεων και των Πυρηναίων[101]. Ο αριθμός των μολυσμένων σκύλων στη Ν. Αμερική υπολογίζεται επίσης σε εκατομμύρια, με υψηλά ποσοστά μόλυνσης στη Βενεζουέλα και τη Βραζιλία, όπου η υψηλή εξάπλωση της νόσου στα σκυλιά σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο μετάδοσης της ασθένειας στον άνθρωπο[102].

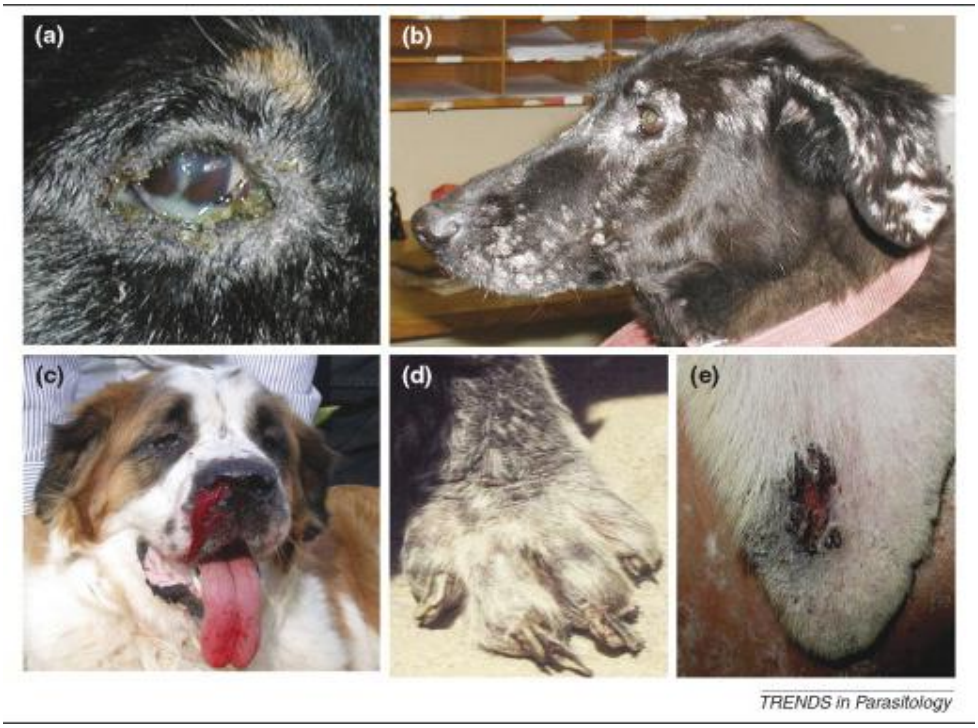
Ο ρόλος του σκύλου στις αναπτυγμένες και αναπτυσσόμενες χώρες είναι πολλαπλός. Αφορά συνήθως στην ιδιότητά του ως σύντροφο, συνοδό και φύλακα του ανθρώπου, ενώ η υγεία του αποτελεί ευθύνη και ανησυχία για τον ιδιοκτήτη του. Η λεϊσμανίαση στα σκυλιά είναι μια περίπλοκη ασθένεια με ποσοστά μόλυνσης που φτάνουν το 63-80%, αν και τις περισσότερες φορές το ποσοστό εκδήλωσης κλινικών συμπτωμάτων είναι πολύ χαμηλότερο[103,

[104]. Τα σκυλιά που νοσούν εκδηλώνουν διαφορετικά κλινικά συμπτώματα και η σοβαρότητα της κατάστασής τους ποικίλει.

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν αναδείξει σημαντικά ζητήματα που αφορούν στη λεϊσμανίαση στα σκυλιά. Στις ενδημικές περιοχές, όπου η μόλυνση είναι ευρύτατα διαδεδομένη, έχει διαπιστωθεί με τη χρήση ορολογικών και μοριακών τεχνικών, ότι ένα μεγάλο ποσοστό των μολυσμένων σκυλιών δεν αναπτύσσει ποτέ την ασθένεια[105, 106]. Επιπρόσθετα, όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές για τη μετάδοση της νόσου με την ταυτόχρονη παρουσία των διαβιβαστών-εντόμων και των ξενιστών-σκύλων, η μόλυνση εξαπλώνεται με ταχείς ρυθμούς[107]. Ωστόσο, η έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία της ασθένειας είναι επιτακτική ακόμα και στις μη-ενδημικές περιοχές όπου δεν συμβαίνει φυσική μόλυνση, κυρίως λόγω της αυξημένης μετακίνησης σκυλιών από και προς ενδημικές περιοχές[108]. Η αυτόχθονη μετάδοση της ασθένειας απουσία του διαβιβαστή είναι αρκετά σπάνια, και προέρχεται συνήθως από τη συμβίωση με μολυσμένα σκυλιά, τη γέννηση κουταβιών από μολυσμένες μητέρες, ή τη μετάδοση μέσω μεταγγίσεων αίματος από μολυσμένους δότες[109-111].

Η λεϊσμανίαση στα σκυλιά είναι μια πολύ-συστηματική ασθένεια με ποικίλα κλινικά συμπτώματα[112]. Η πλειονότητα των σκύλων εμφανίζει κακή σωματική κατάσταση, γενικευμένη ατροφία των μυών, διόγκωση των λεμφαδένων και της σπλήνας, έντονη δερματική απολέπιση και άλλα είδη δερματίτιδας που χαρακτηρίζονται από την παρουσία ελκών, οζιδίων και φλυκταινών[113]. Τα τυπικά ιστο-παθολογικά ευρήματα περιλαμβάνουν κοκκιώδη φλεγμονώδη αντίδραση που προκαλείται από την παρουσία αμαστιγωτών παρασίτων μέσα στα μακροφάγα.

Η χαρακτηριστική διόγκωση των λεμφαδένων προκαλείται από τον αυξημένο αριθμό και μέγεθος των λεμφοζιδίων και την υπερτροφία και υπερπλασία των μακροφάγων του μυελού των οστών[114]. Αντίστοιχα, η διόγκωση της σπλήνας σχετίζεται με την αυξημένη κυτταροβρίθεια μακροφάγων και άλλων μονοκυττάρων, με αλλαγές στη δομή των αγγείων και την παρουσία άφθονων φλεβών[115]. Τα νεφρά αποτελούν ένα από τα κύρια ζωτικά όργανα που επηρεάζονται σε όλα σχεδόν τα σκυλιά που πάσχουν από λεϊσμανίαση, και η νεφροπάθεια πολλές φορές είναι η μόνη ένδειξη που παραπέμπει στην παρουσία της νόσου[116]. Συχνά, τα μολυσμένα σκυλιά παρουσιάζουν πληγές στις αρθρώσεις και τα οστά[117], ενώ η εμφάνιση οφθαλμικών ελκών σε ποσοστό 16-80,5% των συμπτωματικών σκυλιών αποτελεί ένα ακόμα σημάδι εκδήλωσης της νόσου[118]. Τέλος, φαινόμενα όπως επίσταξη (αιμορραγία από τη μύτη), αιματουρία και αιμοραγική διάρροια παρατηρούνται συχνά στα μολυσμένα σκυλιά, και σχετίζονται με την εξέλκωση των ιστών και την πρωτογενή ή δευτερογενή αιμόσταση[119]. Στην Εικόνα 14 απεικονίζονται μερικά από τα πιο χαρακτηριστικά κλινικά συμπτώματα της λεϊσμανίασης στα σκυλιά.



***Εικόνα 14**: Περιοφθαλμική δερματίτιδα, επίσταξη, υπετροφία των νυχιών και δερματικά έλκη στην περιοχή του προσώπου και του αυτιού σε σκυλιά με λεϊσμανίαση[120].*

Ο έλεγχος και η πρόληψη της λεϊσμανίασης στα σκυλιά αποτελεί δύσκολο έργο δεδομένου του περίπλοκου κύκλου μετάδοσης του παρασίτου, απαιτώντας μια συνδυαστική προσέγγιση που να εστιάζει ταυτόχρονα στον αποθηκευτικό αλλά και στον διαβιβαστή-ξενιστή. Ο εμβολιασμός αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά εργαλεία και σε συνδυασμό με τα εντομοαπωθητικά αποτελούν νέες, οικονομικές λύσεις για την αντιμετώπιση της νόσου[121]. Σε ορισμένες χώρες όπως η Βραζιλία και η Κίνα έχει εφαρμοστεί ακόμα και η θανάτωση των σκύλων προκειμένου να ελεγχθεί η μετάδοση της νόσου, ωστόσο πολλαπλά ζητήματα ηθικής έχουν προκύψει από τέτοιου είδους ακραία μέτρα[122].

Παρόλο που τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει σημαντικές ανακαλύψεις σε θέματα που αφορούν στη διάγνωση και τον έλεγχο της λεϊσμανίασης στα σκυλιά, ο τομέας της θεραπείας παραμένει σχετικά στάσιμος[123]. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της ασθένειας βελτιώνουν την κλινική εικόνα των ζώων και απαλύνουν τα συμπτώματα, κανένα όμως από αυτά δεν έχει τη δυνατότητα να εξαλείψει το παράσιτο και κατ' επέκταση τη νόσο. Οι ουσίες που χορηγούνται συνήθως περιλαμβάνουν το πεντασθενές αντιμόνιο, και συγκεκριμένα την αντιμονιακή μεγλουμίνη, και την αλλοπουρινόλη, που συχνά χρησιμοποιούνται συνδυαστικά. Ωστόσο, μελέτες σε σκυλιά που έχουν λάβει την παραπάνω θεραπευτική αγωγή, έχουν δείξει ότι αν και τα ζώα θεραπεύονται κλινικά, παραμένουν φορείς

του παρασίτου, αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο για την εμφάνιση υποτροπής[124, 125]. Άλλες ουσίες που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία της ασθένειας ως φάρμακα δεύτερης επιλογής περιλαμβάνουν την αμφοτερικίνη Β, την πενταμιδίνη, την μιλτεφοσίνη, την παρομομυκίνη, την κετοκοναζόλη και την μετρονιδαζόλη, ο μηχανισμός δράσης των οποίων αναλύεται παρακάτω[126, 127].

3.8. Θεραπεία

Η θεραπεία της λεϊσμανίασης βασίζεται σχεδόν αποκλειστικά στη χημειοθεραπεία. Αν και τα περισσότερα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση της νόσου έχουν ανακαλυφθεί εδώ και αρκετές δεκαετίες, τα τελευταία χρόνια υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον είτε προς την ανακάλυψη νέων ουσιών, είτε προς τη χημική τροποποίηση των ήδη υπαρχόντων με σκοπό τη βελτίωση της αντι-λεϊσμανιακής τους δράσης. Παρακάτω περιγράφονται οι ουσίες που χρησιμοποιούνται αυτή τη στιγμή για τη θεραπεία της λεϊσμανίασης, αναλύοντας τον μηχανισμό δράσης, τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά τους καθώς και θέματα ανάπτυξης αντοχής.

3.8.1. Πεντασθενές αντιμόνιο

Η θεραπεία της λεϊσμανίασης βασίζεται κυρίως στη χρήση ενώσεων πεντασθενούς αντιμονίου, που χρησιμοποιήθηκαν πρώτη φορά στο πρώτο μισό του 20^{ου} αιώνα. Η αντιμονιακή μεγλουμίνη (N-methyl-glucamine antimoniate, Glucantime®) και το στιμπογλουκονικό νάτριο (sodium stibogluconate, (Pentostam®) αποτελούν τα προτεινόμενα φάρμακα πρώτης επιλογής για τη θεραπεία της λεϊσμανίασης σε πολλές περιοχές του κόσμου.

Τα χαμηλά ποσοστά θνησιμότητας και υποτροπών αποτελούν σημαντικά πλεονεκτήματα του πεντασθενούς αντιμονίου, που σε συνδυασμό με το σχετικά χαμηλό κόστος, καθιστούν τη χρήση του ιδιαίτερα συχνή ακόμα και σήμερα. Όμως, ο παρατεταμένος χρόνος θεραπείας, η ενδομυϊκή χορήγηση, και οι παροδικές αλλά ενίοτε θανάσιμες επιπλοκές, όπως καρδιακές αρρυθμίες, αυξημένες ηπατικές τρανσαμινάσες, παγκρεατίτιδα και πνευμονία, αποτελούν μερικά από τα βασικά μειονεκτήματά του[128].

Παρόλο που οι ουσίες αυτές βρίσκονται σε κλινική χρήση εδώ και πολλές δεκαετίες, ο μηχανισμός δράσης τους δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Είναι γενικά αποδεκτό ότι το πεντασθενές αντιμόνιο αποτελεί το προ-φάρμακο, και ότι η μετατροπή του σε τρισθενές αντιμόνιο επιφέρει τη στοχευμένη αντι-λεϊσμανιακή δράση[129]. Πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν ότι το αντιμόνιο καταπολεμά το παράσιτο μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης[130]. Επιπλέον

η ανασταλτική δράση του τρισθενούς αντιμονίου στο ένζυμο trypanothione reductase, που οδηγεί σε απώλεια των ενδοκυττάριων θειολών της λεϊσμάνιας και τη συσσώρευση ενεργών μορίων οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), αποτελεί έναν ακόμα προτεινόμενο τρόπο δράσης των παραπάνω ουσιών[131].

Τα πρώτα περιστατικά μειωμένης ανταπόκρισης στη θεραπεία με αντιμόνιο συνέβησαν περίπου πριν από 2 δεκαετίες στην Ινδία. Ωστόσο, η αύξηση των θεραπευτικών δόσεων υπήρξε ανεπιτυχής τρόπος αντιμετώπισης του παραπάνω προβλήματος, και οδήγησε στη δημιουργία ανθεκτικών στελεχών του παρασίτου. Κατά την τελευταία δεκαετία, η αντοχή στο αντιμόνιο και τα χαμηλά ποσοστά θεραπείας που προέκυψαν από τη λανθασμένη χορήγηση του φαρμάκου, οδήγησαν σε επιδημικές διαστάσεις της ασθένειας στην Ινδία, ενώ σήμερα το 60% των περιστατικών στην περιοχή δεν ανταποκρίνεται στη συγκεκριμένη θεραπεία[132]. Χαμηλά ποσοστά αντοχής έχουν αναφερθεί επίσης στο Σουδάν[133], παρόλα αυτά το αντιμόνιο παραμένει το φάρμακο πρώτης επιλογής για τη θεραπεία της σπλαχνικής λεϊσμανίασης στις υπόλοιπες ενδημικές περιοχές, όπου τα ποσοστά θεραπείας αγγίζουν το 90-95%[134, 135].

Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην ανάπτυξη αντοχής στο αντιμόνιο σε κλινικά στελέχη συχνά διαφέρουν από τους μηχανισμούς που έχουν μελετηθεί σε πειραματικά ανθεκτικά στελέχη *in vitro*[136]. Η μείωση της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο εσωτερικό του παρασίτου, μέσω μειωμένης πρόσληψης ή αυξημένης εκροής , αποτελεί την πιο συνηθισμένη αιτία ανάπτυξης αντοχής. Άλλοι πιθανοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν αναστολή της ενεργοποίησης του φαρμάκου, αδρανοποίηση του ενεργής ουσίας και ενίσχυση των εμπλεκόμενων γονιδίων[137, 138]. Πιο συγκεκριμένα, αλλαγές στον μεταβολισμό και στα επίπεδα ενδογενών θειολών[139], και υπερέκφραση της πρωτεΐνης ATP-binding cassette (ABC) της μεμβράνης του παρασίτου[140] εμπλέκονται στην ανάπτυξη αντοχής. Επιπλέον, η αύξηση των υποδοχέων της πρωτεΐνης MRP1 (multidrug resistance-associated protein 1) και της γλυκοπρωτεϊνης P-gp (permeability glycoprotein) των κυττάρων-ξενιστών, έχουν συσχετισθεί με το φαινόμενο της αντοχής στο αντιμόνιο[141]. Εν κατακλείδι, η ανάπτυξη αντοχής στο αντιμόνιο είναι μια πολυπαραγοντική κατάσταση, και παρόλο που οι *in vitro* μελέτες έχουν αναδείξει διάφορους μηχανισμούς, σε κλινικό επίπεδο παραμένουν αρκετά σημεία αδιευκρίνιστα.

3.8.2. Αμφοτερικίνη Β

Η αμφοτερικίνη Β (amphotericin deoxycholate, Fungizone®) χρησιμοποιείται ως φάρμακο δεύτερης επιλογής για τη θεραπεία της σπλαχνικής λεϊσμανίασης από το 1960[142]. Η επιλεκτική της δράση αποδίδεται στην υψηλή έλξη στις εργοστερόλες, που είναι η βασική στερόλη της λεϊσμάνιας. Ωστόσο, οι διαφορές που παρατηρούνται στη δραστικότητα του

φαρμάκου σχετίζονται με την ποικιλομορφία στον τύπο και την ποσότητα των στερολών μεταξύ των διαφορετικών στελεχών[143]. Η αμφοτερικίνη Β κατέχει εξαιρετικά υψηλή αντι-λεϊσμανιακή δράση, με ποσοστά θεραπείας της τάξης του 90-95% κατά της σπλαχνικής λεϊσμανίασης στην Ινδία, όπου και χρησιμοποιείται ως φάρμακο πρώτης επιλογής ή σε περιπτώσεις χαμηλής ανταπόκρισης στο αντιμόνιο.

Περιστατικά χαμηλής ανταπόκρισης και υποτροπή συμβαίνουν σπάνια, κυρίως σε ανοσο-κατασταλμένους ασθενείς που πάσχουν από HIV[144]. Τα βασικά μειονεκτήματα της αμφοτερικίνης Β περιλαμβάνουν την παρατεταμένη χορήγηση που απαιτείται για την αποτελεσματική θεραπεία, και παρενέργειες όπως πυρετό και ρίγη, νεφροτοξικότητα και υποκαλιαιμία που καθιστούν απαραίτητη τη νοσηλεία του ασθενή[145].

Ο εγκλεισμός της αμφοτερικίνης Β σε λιπίδια βελτίωσε το προφίλ ασφαλείας του φαρμάκου, συντελώντας στην επιλεκτική απορρόφηση από το δικτυο-ενδοθηλιακό σύστημα και την αύξηση της στοχευμένης αντιλεϊσμανιακής δράση. Υπάρχουν 3 είδη λιπιδιακών σκευασμάτων: η λιποσωμιακή αμφοτερικίνη Β (Ambisome®), το λιπιδικό σύμπλεγμα αμφοτερικίνης Β (Abelcet®) και το amphotericin B cholesterol dispersion (Amphocil®). Οι λιποσωμιακές ενώσεις χρησιμοποιούνται σήμερα ως θεραπεία πρώτης επιλογής σε ενδημικές περιοχές της Νότιας Ευρώπης και σε άλλες αναπτυγμένες χώρες και το Ambisome έχει εγκριθεί από τον Αμερικανικό Οργανισμό Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων (Food and Drug Administration, FDA). Ωστόσο, σε υποβαθμισμένες και φτωχές χώρες ακόμα και η μικρής διάρκειας θεραπεία με λιποσωμιακή αμφοτερικίνη Β έχει απαγορευτικό κόστος. Έτσι τα κριτήρια επιλογής της θεραπείας στις χώρες αυτές αφορούν περισσότερο το κόστος και όχι την αποτελεσματικότητα ή τις παρενέργειες του φαρμάκου.

Η αύξηση της δραστικότητας της αμφοτερικίνης Β έχει επίσης επιτευχθεί σε πειραματικό στάδιο με τη χρήση νανοσωματιδίων και μικροσφαριδίων, που βελτιώνουν τη κατανομή του φαρμάκου στα σημεία-στόχους[146]. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί κατά τον ανασχηματισμό της αμφοτερικίνης Β με τη χρήση θερμότητας[147].

Σε πειραματικό επίπεδο, έχει επιτευχθεί αντοχή του παρασίτου στην αμφοτερικίνη Β μέσω καλλιέργειας σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις του φαρμάκου. Η αντοχή αυτή συσχετίζεται με σημαντική αλλαγή στα επίπεδα των στερολών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης[148]. Ωστόσο, σε μια πρόσφατη έρευνα σε ασθενείς με σπλαχνική λεϊσμανίαση στο Σουδάν αναφέρθηκε αναποτελεσματικότητα της λιποσωμιακής αμφοτερικίνης Β (Ambisome), γεγονός που καταδεικνύει την ενδεχόμενη εμφάνιση αντοχής και σε κλινικό επίπεδο[149].

3.8.3. Παρομομυκίνη

Η παρομομυκίνη (Aminosidine) είναι μια αμινογλυκοσίδη που κατέχει αντιλεϊσμανιακή δράση. Χρησιμοποιείται στη θεραπεία της σπλαχνικής λεϊσμανίασης με παρεντερική χορήγηση, και στη θεραπεία της δερματικής λεϊσμανίασης με παρεντερική και τοπική χρήση[150]. Κλινικές μελέτες έχουν διεξαχθεί στην Ινδία, στο Σουδάν, στην Αιθιοπία και στην Κένυα, ωστόσο δεν υπάρχουν στοιχεία για την αποτελεσματικότητά του φαρμάκου έναντι της *L.infantum* που ενδημεί σε περιοχές όπως η Μεσόγειος και η Λατινική Αμερική.

Σε κλινική μελέτη φάσης ΙΙΙ σπλαχνικής λεϊσμανίασης στην Ινδία, η χρήση παραμομυκίνης είχε ποσοστό θεραπείας 96,4%, παρόμοιο με εκείνο της αμφοτερικίνης Β[151]. Ωστόσο, η χορήγηση της παρομομικίνης συνδυάστηκε με δυσμενείς ανεπιθύμητες ενέργειες που περιλαμβάνουν υψηλά επίπεδα ηπατικών τρανσαμινασών, ωτοτοξικότητα και πόνο στην περιοχή της ένεσης. Αν και το κόστος της θεραπείας είναι αρκετά χαμηλό, απαιτείται καθημερινή ενδομυϊκή χορήγηση για 21 μέρες, γεγονός που καθιστά δύσκολη τη θεραπεία με παραμομυκίνη στις αναπτυσσόμενες χώρες.

Η παρομομυκίνη αναστέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση και επηρεάζει τη ρευστότητα και την διαπεραστικότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Πιθανό στόχο του φαρμάκου αποτελούν επίσης τα μιτοχόνδρια, αφού *in vitro* έκθεση προμαστιγωτών και αμαστιγωτών παρασίτων στην παρομομυκίνη μειώνει τη διαφορά δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης[152]. Επιπλέον, η πρόσληψη του φαρμάκου από τεχνητώς ανθεκτικά παράσιτα είναι μειωμένη σε σύγκριση με παράσιτα άγριου τύπου, σε συνδυασμό με αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης. Η περιορισμένη χρήση της παρομομυκίνης για τη θεραπεία της σπλαχνικής λεϊσμανίασης έχει αποτρέψει την εμφάνιση αντοχής. Αν και δεν έχει παρατηρηθεί διασταυρούμενη αντοχή με άλλα φάρμακα, δεδομένου ότι η παρομομυκίνη είναι μια αμινιγλυκοσίδη, η εμφάνιση αντοχής αποτελεί πιθανό σενάριο σε περίπτωση που το φάρμακο χρησιμοποιηθεί ως αποκλειστικό μέσον θεραπείας της λεϊσμανίασης.

3.8.4. Πενταμιδίνη

Η πενταμιδίνη έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της σπλαχνικής, δερματικής και βλεννώδους λεϊσμανίασης ως φάρμακο δεύτερης επιλογής για πάνω από 40 χρόνια. Αν και η χρήση της επανεξετάστηκε κατά τη δεκαετία του 1990 με κλινικές δοκιμές δερματικής λεϊσμανίασης στο Νέο Κόσμο, δεν αποτελεί ιδιαίτερα δημοφιλές φάρμακο για τη θεραπεία της ασθένειας[153]. Η πενταμιδίνη παρεμποδίζει τη σύνθεση του DNA του παρασίτου, πιθανόν επηρεάζοντας τη μορφολογία του κινετοπλάστη και κατακερματίζοντας τη μιτοχονδριακή μεμβράνη, οδηγώντας στο θάνατο του παρασίτου[93].

Οι πιο συχνές παρενέργειες που συνδέονται με τη χορήγηση του φαρμάκου περιλαμβάνουν ναυτία, εμετό, πονοκεφάλους, υπογλυκαιμία και υπόταση. Επίσης, παρατηρείται αύξηση της κρεατινίνης και της ουρίας, διαβήτης, λευκοπενία και παγκρεατίτιδα[154]. Επιπρόσθετα, η χορήγηση της πενταμιδίνης αντενδείκνυται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και σε περιπτώσεις καρδιακής, ηπατικής και νεφρικής ανεπάρκειας. Έτσι, συχνά η χορήγηση των θεραπευτικών δόσεων είναι απαγορευτική λόγω της αυξημένης τοξικότητας του φαρμάκου.

Η αντοχή στην πενταμιδίνη έχει αναφερθεί μέσω εσωτερικών μηχανισμών που είναι άμεσα συνδεδεμένοι με το παράσιτο. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μειωμένη πρόσληψη και αυξημένη εκροή πενταμιδίνης σε ανθεκτικούς κλώνους του παρασίτου[155]. Επίσης, συγκεκριμένοι μεταφορείς του φαρμάκου υπεύθυνοι για την περεταίρω πρόσληψη από το παράσιτο έχουν αναγνωριστεί και χαρακτηρισθεί ως εμπλεκόμενοι στην ανάπτυξη αντοχής[156].

3.8.5. Αζόλια (Azoles)

Τα αζόλια αντιπροσωπεύουν μια τάξη αντι-μυκητιασικών φαρμάκων που εμπλέκονται στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των εργοστερολών, αναστέλλοντας τη σύνθεσή τους. Μεταξύ αυτών, οι ουσίες ketoconazol, itraconazole και fluconazole κατέχουν αντι-λεϊσμανιακή δράση, που έχει μελετηθεί *in vitro* με αντιφατικά αποτελέσματα[143, 157]. Ωστόσο, κλινικές δοκιμές έχουν αναδείξει την αποτελεσματικότητα της ουσίας itraconazole στη θεραπεία της βλεννώδους λεϊσμανίασης στη Βραζιλία[158] και στην Ασία[159], και της ουσίας ketoconazole στη θεραπεία της σπλαχνικής λεϊσμανίασης[160, 161]. Σε μια πρόσφατη έρευνα, το itraconazole χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς στη θεραπεία δερματικής λεϊσμανίασης[162]. Όμως, παρά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα, δεν υπάρχουν αρκετές αποδείξεις που θα οδηγήσουν στη χρησιμοποίηση των παραπάνω ουσιών ως θεραπεία πρώτης επιλογής.

3.8.6. Αλλοπουρινόλη (Allopurinol)

Η αλλοπουρινόλη είναι αναστολέας του ενζύμου xanthine oxidase, και δρα αναστέλλοντας τον μεταβολισμό των πουρινών της λεϊσμάνιας[163]. Το 1982, πειραματικές μελέτες ανέδειξαν τα πιθανά οφέλη της ουσίας στη θεραπεία της λεϊσμανίασης[164]. Έκτοτε η αλλοπουρινόλη έχει χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία διάφορων μορφών λεισμανίασης έχοντας περιορισμένη επιτυχία, συνήθως λόγω χαμηλής αποτελεσματικότητας ή τοξικότητας[165-167]. Ωστόσο, χρησιμοποιείται επιτυχώς στη θεραπεία της νόσου στα σκυλιά[168].

Οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες της αλλοπουρινόλης αποτελούν ένα από τα βασικότερα μειονεκτήματά της, παρεμποδίζοντας τη χρήση της ως δραστική αντιλεϊσμανιακή ουσία. Μελέτες κλινικής φαρμακολογίας έδειξαν ότι μετά από θεραπεία με ανάλογο αλλοπουρινόλης, τα επίπεδα της ουσίας στο ανθρώπινο πλάσμα παραμένουν χαμηλά, σε συνδυασμό με ημιτελή απορρόφηση από το έντερο[169]. Η αλλοπουρινόλη εξακολουθεί να χορηγείται σήμερα συνήθως σε συνδυαστικές θεραπείες που περιλαμβάνουν την ταυτόχρονη χορήγηση αλλοπουρινόλης και αντιμονίου[170, 171]. Αποκλειστική θεραπεία με αλλοπουρινόλη έχει επίσης αναφερθεί πρόσφατα σε ασθενή με μεταμόσχευση νεφρού, που ολοκληρώθηκε επιτυχώς, χωρίς την παρουσία υποτροπών[172].

3.8.7. Sitamaquine

Η ουσία sitamaquine (8-(6-diethylaminohexylamino)-6-methoxy-4-methylquinoline dihydrochloride) κατέχει αντιπαρασιτική δράση ευρέως φάσματος, παρόλα αυτά έχει περιορισμένη κλινική χρήση. Αναπτύχθηκε από το Στρατιωτικό Ινστιτούτο Walter Reed από το οποίο πήρε την αρχική του ονομασία, σε συνεργασία με τη φαρμακευτική εταιρία Glaxo SmithKline, σε μια ύστατη προσπάθεια για την εύρεση αποτελεσματικής από του στόματος θεραπεία κατά της σπλαχνικής λεϊσμανίασης. Η αποτελεσματικότητα της ουσίας sitamaquine μελετήθηκε αρχικά σε πειραματικά μοντέλα ζώων[173], ωστόσο μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν αρκετά στοιχεία για τον μηχανισμό δράσης της.

Έκτοτε, έγιναν αρκετές μικρές κλινικές μελέτες φάσης I και φάσης II για τη θεραπεία της σπλαχνικής λεϊσμανίασης με το συγκεκριμένο φάρμακο, που δεν έδωσαν όμως σημαντικά αποτελέσματα, με ποσοστά θεραπείας 50% στην Κένυα[174] έως 0% στη Βραζιλία. Η αύξηση των θεραπευτικών δόσεων ενίοτε βελτίωσε την δραστικότητα του φαρμάκου, ωστόσο πολλές φορές οδήγησε στη δημιουργία σοβαρών παρενεργειών, όπως νεφροπάθειες και αιμοσφαιρινοπάθειες[175]. Ωστόσο, περισσότερες κλινικές μελέτες είναι απαραίτητες προκειμένου να διευκρινιστεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια του φαρμάκου.

3.8.8. Αλκυλ-λυσο-φωσφολιπίδια και Μιλτεφοσίνη

Τα ανάλογα των αλκυλ-λυσο-φωσφολιπιδίων (alkyl-lysophospholipids, ALPs) αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη τάξη χημειοθεραπευτικών ουσιών για την καταπολέμηση του καρκίνου και των παρασιτικών ασθενειών[176-178]. Η κυτταροτοξική και κυτταροστατική δράση τους είναι εξαιρετικά επιλεκτική έναντι των καρκινικών κυττάρων, ενώ διεγείρουν την άμυνα του οργανισμού ενεργοποιώντας την κυτταροτοξικότητα των μακροφάγων[179]. Μεταξύ των αναλόγων, η μιλτεφοσίνη (hexadecylphosphocholine, HePC) κατέχει αποδεδειγμένη

θεραπευτική ογκοκατασταλτική δράση, και η χρήση της για τοπική θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του στήθους εγκρίθηκε το 1992 στη Γερμανία.

Το 1987, η ανακάλυψη της αντιλεϊσμανιακής δράσης της μιλτεφοσίνης αποτέλεσε σημαντική εξέλιξη στη μέχρι τότε διαθέσιμη χημειοθεραπεία της λεϊσμανίασης[180]. Μέσα από πολλές κλινικές δοκιμές, αναδείχθηκε η δραστικότητα του φαρμάκου στη σπλαχνική και δερματική μορφή της ασθένειας, ακόμα και σε περιπτώσεις που δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία με αντιμόνιο[181]. Σήμερα η μιλτεφοσίνη αποτελεί την πρώτη αντι-λεϊσμανιακή ουσία που χορηγείται από το στόμα, και την πιο πρόσφατα διαθέσιμη στην αγορά. Η χορήγησή της για τη θεραπεία της λεϊσμανίασης έχει επισήμως επιτραπεί στην Ινδία το 2004, στην Κολομβία το 2005[182] και στη Γερμανία.

Παρά το πλεονεκτήματά της, η μιλτεφοσίνη έχει και αρκετά μειονεκτήματα που σχετίζονται κυρίως με σοβαρές παρενέργειες στο γαστρεντερικό σύστημα, αυξημένες ηπατικές τρανσαμινάσες και κρεατινίνη[183]. Επιπλέον, ο κίνδυνος τερατογένεσης απαγορεύει τη χορήγηση του φαρμάκου σε έγκυες γυναίκες ή σε εκείνες που υπάρχει πιθανότητα να έχουν μια εγκυμοσύνη μέχρι και 2 μήνες μετά από τη διακοπή του φαρμάκου[184]. Ζητήματα εμφάνισης αντοχής προκύπτουν από τον μεγάλο χρόνος ημίσειας ζωής (περίπου 150 ώρες), και από το γεγονός ότι η μιλτεφοσίνη είναι διαθέσιμη στα φαρμακεία στην Ινδία, που αυξάνει την πιθανότητα λανθασμένης χρήσης. Τέλος, η αποτελεσματικότητα της χορήγησής της αμφισβητείται σε ασθενείς που πάσχουν από HIV, συνοδευόμενη από συχνές υποτροπές[185].

Ο μηχανισμός δράσης της μιλτεφοσίνης δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως μέχρι σήμερα. Διάφορες μελέτες έχουν αναδείξει πιθανούς μοριακούς στόχους, όπως ο μεταβολισμός των αλκυλο-λιπιδίων, η βιοσύνθεση των φωσφολιπιδίων του παρασίτου και η αναστολή του ενζύμου των γλυκοσωμάτων acyl-CoA transferase[186], η βιοσύνθεση των GPIs (glycosylphosphatidylinositol anchors) και η μετάδοση σήματος (signal transduction)[187]. Μεταξύ άλλων, η ενδοκυττάρια συσσώρευση του φαρμάκου φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στο τρόπο δράσης του. Αρχικά η μιλτεφοσίνη προσδένεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του παρασίτου, ενσωματώνεται στο εσωτερικό του με τη βοήθεια των πρωτεϊνών LdMT και της β υπομονάδας LdRos και μεταβολίζεται στα σημεία-στόχους[188, 189]. Άλλες μελέτες έχουν αναδείξει αλληλεπίδραση της μιλτεφοσίνης με τις ενδοκυττάριες στερόλες[190]. Τέλος, η μιλτεφοσίνη βρέθηκε να ενισχύει τους υποδοχείς της ιντερφερόνης-γ (IFN-γ) και κατ' επέκταση την ανταπόκριση της IFN-γ των μολυσμένων μακροφάγων[191].

Το φαινόμενο της απόπτωσης έχει προταθεί ως πιθανός μηχανισμός της αντιλεϊσμανιακής δράσης της μιλτεφοσίνης[192, 193], με τα μιτοχόνδρια να παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση αυτού του τύπου κυτταρικού θανάτου. Εκτός από την προμήθεια ενέργειας, τα μιτοχόνδρια αποτελούν σημαντική κυτταρική πηγή για την παραγωγή ROS μέσα στα κύτταρα που συνδράμει στην επαγωγή της σηματοδότησης της απόπτωσης[23]. Η οξειδωτική

ζημιά που προκαλείται από φάρμακα αλλάζει το λιπιδικό περιεχόμενο και προκαλεί μεταβολές στην λειτουργία της μιτοχονδριακής μεμβράνης[20]. Ακολουθεί εκπόλωση του δυναμικού της μεμβράνης (Δψm), μείωση των επιπέδων ATP, παραγωγή οξειδωτικού στρες και απελευθέρωση κυτοχρώματος C στο κυτταρόπλασμα, που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο μέσω ενεργοποίησης κυτταρικών πρωτεασών. Η δραστικότητα της μιλτεφοσίνης έχει αποδοθεί στον μηχανισμό της απόπτωσης που σχετίζεται με αλλαγές στο δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης και την παραγωγή ROS[194].

Η ανάπτυξη αντοχής στη μιλτεφοσίνη χαρακτηρίζεται από μειωμένη συσσώρευση φαρμάκου στο εσωτερικό του παρασίτου, και αποτελεί κοινό παράγοντα για όλα τα *in vitro* ανθεκτικά στελέχη που έχουν μελετηθεί ως σήμερα. Μπορεί να επιτευχθεί μέσω μειωμένης πρόσληψης, αυξημένης εκροής, ταχύτερου μεταβολισμού ή τροποποιημένης ρευστότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Σημειακές μεταλλάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες LdMT και LdRos έχουν εμπλακεί στην ανάπτυξη αντοχής[16], οδηγώντας σε μειωμένη ευαισθησία των στελεχών στο φάρμακο[195]. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η μιλτεφοσίνη μπορεί να αναγνωριστεί και να μεταφερθεί έξω από το παράσιτο μέσω ενός ABCG-like μεταφορέα[196]. Κλινικά, έχει αναφερθεί η περίπτωση ασθενούς που υποτροπίασε 10 μήνες μετά από επιτυχή θεραπεία σπλαχνικής λεϊσμανίασης με μιλτεφοσίνη στο Νεπάλ, γεγονός που καθιστά πιθανή την ανάπτυξη αντοχής του παρασίτου στο φάρμακο[197].

3.9. Αντιλεϊσμανιακή δράση των αντιμικροβιακών πεπτιδίων και το φαινόμενο της συνέργειας

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η χημειοθεραπεία αποτελεί παγκοσμίως τον μοναδικό τρόπο αντιμετώπισης των διαφορετικών μορφών λεϊσμανίασης, δεδομένου ότι δεν υπάρχει διαθέσιμο εμβόλιο. Ωστόσο πολύ σημαντικά ζητήματα που αφορούν στην εμφάνιση σοβαρών παρενεργειών, την ανάπτυξη αντοχής στις υπάρχουσες θεραπείες, καθώς επίσης την περιορισμένη χρηματοδότηση για την ανακάλυψη νέων αντιπαρασιτικών φαρμάκων και το υψηλό κόστος, έχουν οδηγήσει πολλές ερευνητικές ομάδες στην αναζήτηση νέων αντιλεϊσμανιακών ουσιών[198]. Επιπρόσθετα, η μελέτη της αντιπαρασιτικής δράσης φυσικών προϊόντων και εκχυλισμάτων έχει οδηγήσει στην αναγνώριση πολυάριθμων εναλλακτικών και πολλά υποσχόμενων ουσιών[199].

Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια (antimicrobial peptides, AMPs) αποτελούν μια καλή εναλλακτική ομάδα ουσιών με αντιπαρασιτική δράση. Είναι πολυπεπτίδια μήκους 10-50 αμινοξέων, προέρχονται από βακτήρια του εδάφους, μύκητες και μετάζωα και εμφανίζονται δραστικά έναντι διάφορων παθογόνων, συμπεριλαμβανομένων και πρωτόζωων[200, 201]. Σε

αντίθεση με τα αντιβιοτικά που στοχεύουν συγκεκριμένες κυτταρικές διαδικασίες, στόχος των AMPs είναι οι κυτταρικές μεμβράνες, δημιουργώντας κανάλια και διευκολύνοντας την ροή κυτταρικών συστατικών[202]. Ωστόσο η ευαισθησία των παραπάνω πεπτιδίων στις ενδοκυττάριες πρωτεάσες τα καθιστά ακατάλληλα ως αντιλεϊσμανιακά φάρμακα[203].

Τα peptaibols αποτελούν μια τάξη AMPs με αυξανόμενο ιατρικό ενδιαφέρον. Είναι γραμμικά πεπτίδια μικρότερου μήκους (μεταξύ 15 και 20 αμινοξέων), που προέρχονται από μύκητες και η ονομασία τους έχει άμεση σχέση με τη δομή τους. Πιο συγκεκριμένα, είναι *N*-acetylated **pept**ides που περιέχουν **Aib** (α-aminoisobutyric acid; 2-methylalanine) και μια *C*-terminal bound 1,2-amino alcoh**ol** όπως η φαινυλαλανίνη. Έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη βακτηρίων, μυκήτων, πρωτόζωων και πιθανόν ελμινθών[204]. Η υψηλή τους περιεκτικότητα σε αμινοϊσοβουτυρικό οξύ καθιστά αδύνατο τον μεταβολισμό τους από τις πρωτεάσες[205, 206]. Έχουν επίσης την ικανότητα να δημιουργούν πόρους στις βιολογικές μεμβράνες, μέσω του σχηματισμού ελικοειδών δεσμών στη λιπιδική διπλοστοιβάδα. Πιο συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί η αντιπαρασιτική τους δράση σε μοντέλο ποντικιού μολυσμένο με τρυπανοσωμίαση[207], και έχει αποδοθεί στην ικανότητα δημιουργίας καναλιών που οδηγούν στον κατακερματισμό της διαφοράς δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης του παρασίτου ή αλλάζουν την ακεραιότητα της κυτταροπλασματικής του μεμβράνης[208]. Έχει επίσης δειχθεί ότι προκαλούν αλλαγές στη δομή των μιτοχονδρίων[209].

Δεδομένου ότι η ανάπτυξη αντοχής στα αντιλεϊσμανιακά φάρμακα έχει αναφερθεί εδώ και πολλά χρόνια, η συνδυαστική θεραπεία αποτελεί σε πολλές περιπτώσεις έναν εναλλακτικό και αποτελεσματικό τύπο θεραπείας[210]. Η συνδυασμένη χρήση θεραπευτικών ουσιών με συνεργητική ή προσθετική δράση για την καταπολέμηση διάφορων ασθενειών έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην παραδοσιακή και μοντέρνα Ιατρική. Οι συνδυαστικές θεραπείες προσφέρουν υψηλότερη αποτελεσματικότητα, μειωμένη εμφάνιση παρενεργειών , καθώς και μειωμένη ανάπτυξη αντοχής[211]. Για τον λόγο αυτό, η μελέτη της υπεροχής των συνδυαστικών θεραπειών έναντι της μονοθεραπείας αποτελεί ένα πειραματικό πεδίο με ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Επιπρόσθετα, η παραγωγή συνδυαστικών προϊόντων από ήδη υπάρχοντα φάρμακα, με χαμηλότερο κόστος, αποτελεί τα τελευταία χρόνια στρατηγική των φαρμακευτικών εταιριών, δεδομένου ότι η ανακάλυψη νέων ουσιών και η έγκριση της χρήσης νέων μορίων ολοένα και μειώνεται[212]. Όλα τα παραπάνω, σε συνδυασμό με τα κοινωνικο-οικονομικά προβλήματα που σχετίζονται με την θεραπεία της λεϊσμανίασης δείχνουν ότι η συνδυαστική θεραπεία μπορεί να αποτελέσει μια εναλλακτική μορφή θεραπείας για την ασθένεια.

4. Σκοπός

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε σκοπό να αναδείξει χημικά ανάλογα του νεότερου αντιλεϊσμανιακού φαρμάκου μιλτεφοσίνη που κατέχουν βελτιωμένη βιολογική δράση. Για τον λόγο αυτό μελετήθηκαν *in vitro* 55 ανάλογα αιθερικών φωσφολιπιδίων που σχεδίασε και συνέθεσε η ομάδα της Δρ Θ. Καλογεροπούλου στο Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Συγκεκριμένα, η μελέτη αφορά στον χαρακτηρισμό των αναλόγων ως προς την αντιπαρασιτική τους δράση στην προμαστιγωτή και ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή του παρασίτου, την κυτταροτοξικότητα έναντι της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς μακροφάγων THP1 και την αιμολυτική τους δράση, με στόχο την ανάδειξη της βέλτιστης χημικής δομής που προσδίδει μέγιστη παρασιτοκτόνο δράση σε συνδυασμό με τη μικρότερη δυνατή κυτταροτοξικότητα.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε επιλεγμένα ενεργά, μη κυτταροτοξικά ανάλογα σε στελέχη αναφοράς αλλά και κλινικά στελέχη από σκύλους με kala azar, για να διερευνήσουμε τον μηχανισμό δράσης, μελετώντας κυτταρικά φαινόμενα όπως η αυτοφαγία, η απόπτωση και το οξειδωτικό στρες. Μελετήσαμε την επίδραση των αναλόγων στη φυσιολογία του μιτοχονδρίου του παρασίτου καθώς και την ενδοκυττάρια κατανομή τους με τη χρήση φθοριζόντων αναλόγων. Μελετήσαμε επίσης αλλαγές της έκφρασης των πρωτεϊνών σε στελέχη του παρασίτου, που έχουν προηγουμένως προσαρμοστεί στο εργαστήριο σε υποθεραπευτικές συγκεντρώσεις επιλεγμένου αναλόγου και μιλτεφοσίνης, με τη χρήση πρωτεωμικής. Τα ευρήματα σχετικά με τον τρόπο δράσης των αναλόγων μας οδήγησαν στην αναζήτηση χημικών ουσιών διαφορετικής δομής, με παρόμοιο τρόπο δράσης. Χρησιμοποιήσαμε μέλη της οικογένειας των peptaibols που κατέχουν αντιλεϊσμανιακή δράση και στοχεύουν στο μιτοχόνδριο των παρασίτων, για να διερευνήσουμε τη δυνατότητα συνέργειας με επιλεγμένα ανάλογα. Τέλος, επιλέξαμε ένα ανάλογο για θεραπευτική δοκιμή *in vivo* σε σκύλο με kala azar, εφαρμόζοντας παράλληλα το εγκεκριμένο θεραπευτικό πρωτόκολλο με μιλτεφοσίνη. Μελετήσαμε την έκβαση της θεραπείας με δείκτες την υποχώρηση των συμπτωμάτων, τη μετατροπή των αιματολογικών και βιοχημικών δεικτών και την ανοχή των δυο φαρμάκων από τα ζώα.

Τα αποτελέσματα αναλύονται στις παραγράφους που ακολουθούν και η συζήτηση εστιάζει στην αντιλεϊσμανιακή δράση αναλόγων αλκυλοφωσφοχολινών - γιατί η μιλτεφοσίνη δεν είναι καλό φάρμακο για την καταπολέμηση της λεϊσμανίασης - και ποιες αναλυτικές μέθοδοι μπορούν να αναδείξουν τα καταλληλότερα ανάλογα για δοκιμή σε ζωικό μοντέλο. Περιγράφουμε ορισμένους κεντρικούς μηχανισμούς του παρασίτου, η έκφραση των οποίων τροποποιείται ως αντίδραση στην παρατεταμένη επίδραση επιλεγμένων αναλόγων. Τέλος, συζητάμε νέες θεραπευτικές στρατηγικές με στόχο την αποτελεσματικότερη εκρίζωση του παθογόνου.

5. Υλικά και Μεθοδολογία

Καλλιέργεια παρασίτου και THP-1 μονοκυττάρων

Προμαστιγωτά παράσιτα *L.infantum* MHOM/TN/80/IPT1/LEM235, *L.donovani* MHOM/IN/80/DD8/LEM703 και τα κλινικά στελέχη που απομονώθηκαν από μολυσμένα σκυλιά, καλλιεργήθηκαν σε 25cm^3 και 75cm^3 φλάσκες πολυστυρενίου (Nunc) στους 26°C. Ο πολλαπλασιασμός της καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε με αραίωση 1/10 σε φρέσκο πλήρες καλλιεργητικό υλικό RPMI (εμπλουτισμένο με 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 1% Penicillin/Streptomycin, Invitrogen) ανά 3 ημέρες.

Τα μονοκύτταρα THP-1 καλλιεργήθηκαν με επώαση στους 37°C/5% CO_2. Ο πολλαπλασιασμός της καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε με μεταφορά 4x10^5 κύτταρα/ml σε φρέσκο πλήρες καλλιεργητικό υλικό RPMI, ανά 3 ημέρες.

Απομόνωση παρασίτου από βιολογικό υλικό από μολυσμένα σκυλιά με kala-azar

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση προμαστιγωτών παρασίτων από μυελό των οστών, αίμα και δέρμα μολυσμένων σκυλιών που προσήλθαν για εξέταση σε συνεργαζόμενους κτηνιάτρους.

- ***Μυελός των οστών***

Μυελός των οστών που συλλέχθηκε σε σωληνάριο με αντιπηκτικό EDTA, καλλιεργήθηκε με επώαση στους 26°C σε ημι-στέρεο θρεπτικό μέσον NNN [1,4% agar(Difco) / 0,5% NaCl (Sigma) / 10% defibrinated sheep blood (Thermo Scientific)]. Προστέθηκαν 0,5ml πλήρες RPMI και μερικές σταγόνες φιλτραρισμένα ούρα. Ανά τρεις ημέρες έγινε μικροσκοπική παρατήρηση μιας σταγόνας υλικού σε αντικειμενοφόρο πλάκα για την ανίχνευση προμαστιγωτών παρασίτων. Ακολούθησε μεταφορά του υλικού σε 25cm^3 φλάσκα πολυστυρενίου και επώαση στους 26°C. Κάθε δείγμα εξετάσθηκε για ένα μήνα και σε περίπτωση μη εμφάνισης προμαστιγωτών απορρίφθηκε.

- ***Περιφερικό Αίμα***

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση των εμπύπηνων κυττάρων της λευκής σειράς με επίστρωση ολικού περιφερικού αίματος σε φικόλλη (Histopaque 1077 , Invitrogen) μετά από φυγοκέντρηση στις 2500 στροφές για 10 λεπτά. Ακολούθησε ανασύσταση των κυττάρων σε

πλήρες RPMI και καλλιέργεια σε ημι-στέρεο θρεπτικό μέσον NNN, όπως αναφέρεται παραπάνω.

- ***Δέρμα***

Τμήμα δέρματος από μολυσμένο έλκος τεμαχίστηκε σε μικρότερα κομμάτια με τη χρήση αποστειρωμένων εργαλείων, μετά από καλό πλύσιμο με αιθανόλη (Sigma) και PBS (Invitrogen). Στη συνέχεια προστέθηκε μικρή ποσότητα πλήρες RPMI και όλο το υλικό μεταφέρθηκε για καλλιέργεια στο ημι-στέρεο θρεπτικό μέσον NNN στους 26°C, όπως αναφέρεται παραπάνω.

Εκχύλιση DNA από βιολογικό υλικό μολυσμένων σκυλιών και ανίχνευση του DNA του παρασίτου με PCR

Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση DNA από μυελό των οστών, αίμα και δέρμα μολυσμένων σκυλιών, χρησιμοποιώντας το QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Έγινε επίσης εκχύλιση DNA από καλλιέργειες προμαστιγωτών παρασίτων με τη μέθοδο βρασμού-κατάψυξης. Συγκεκριμένα, $10x10^6$ προμαστιγωτά, μετά από 3 πλυσίματα με PBS, ανασυστήθηκαν σε 50μl dH_2O. Ακολούθησε βρασμός για 15 λεπτά και κατάψυξη στους -20°C για 15 λεπτά. Στη συνέχεια έγινε απόψυξη του δείγματος με εμβάπτιση σε βραστό νερό, φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 10 λεπτά και μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό σωληνάριο eppendorf.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε PCR για την ανίχνευση του παρασίτου χρησιμοποιώντας το ζευγάρι εκκινητών T2 (5`-CGG CTT CGC ACC ATG CGG TG-3`) και B4 (5`-ACA TCC CTG CCC ACA TAC GC-3`) (MWG-Biotech AG). Η PCR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της Qiagen Taq Polymerase (Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή στις ακόλουθες συνθήκες: αποδιάταξη στους 94^oC για 5 λεπτά, που ακολουθείται από 35 κύκλους των κάτωθι - αποδιάταξη στους 94^oC για 30 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση στους 55^oC για 30 δευτερόλεπτα, επιμήκυνση στους 72^oC για 30 δευτερόλεπτα - επιμήκυνση στους 72^oC για 10 λεπτά. Χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής PTC-200 (MJ Research). Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν σε γέλη 1% αγαρόζης (Sigma)και έγιναν ορατά με τη χρήση βρωμιούχου αιθίδιου (Sigma).

Μοριακή τυποποίηση των κλινικών στελεχών με PCR sequencing με την χρήση 3 δεικτών μικροδορυφόρων και ανίχνευση του γονιδίου LdMT

Πραγματοποιήθηκε μοριακή τυποποίηση των κλινικών στελεχών με τη χρήση 3 δεικτών μικροδορυφόρων. Χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα ζεύγη εκκινητών (MWG-Biotech AG):

Εκκινητές	**Αλληλουχία**
A2	5'-GGG AGA AGC TCT ATT GTG-3'
B1	5'-ACA CTC AGG TCT GTA AAC-3'
Lm4A1	5'-CGG TGC ACA TTC GAC CGC TA-3'
Lm4B1	5'-ATG GCA CGG TGC ACG CTT CC-3'
Lm2A1	5'-TGA CGC GAC GTC GCA AGT CA-3'
Lm2B1	5'-CCG TGA AGT ACT CGG ACG CT-3'
Lm2A3 nested	5'-AAA AAG CGA GGA ATG AAA GAA-3'
Lm2B3 nested	5'-TAG AGG CGT GGC AGA GAC-3'

Η PCR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της Qiagen Taq Polymerase (Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή στις ακόλουθες συνθήκες: αποδιάταξη στους 94°C για 5 λεπτά, που ακολουθείται από 35 κύκλους των κάτωθι - αποδιάταξη στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση στους 55°C για 30 δευτερόλεπτα, επιμήκυνση στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα - επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά. Χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής PTC-200 (MJ Research). Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν σε γέλη 1,5% αγαρόζης (Sigma) και έγιναν ορατά με τη χρήση βρωμιούχου αιθίδιου (Sigma).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του DNA χρησιμοποιώντας το εμπορικό κιτ PCR DNA and Gel Band Purification kit (Amersham), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολούθησε αλληλούχηση του DNA κάθε στελέχους με τη χρήση του Thermosequenase Primer Cycle Sequencing kit (Amersham) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί σημασμένοι εκκινητές για αλληλούχηση (A2 700/B1 800, Lm4A1 700/Lm4B1 800 και Lm2A3 700/Lm2B3 800, MWG-Biotech AG). Η αλληλούχηση έγινε με τον αυτόματο αλληλουχητή LI-COR 4200 double-beam automated sequencer (LI-COR).

Για την ανίχνευση του γονιδίου LdMT πραγματοποιήθηκε PCR με τη χρήση της Qiagen Taq Polymerase (Qiagen), με τα ακόλουθα ζεύγη εκκινητών (MWG-Biotech AG), όπως αναφέρθηκε παραπάνω:

Εκκινητές	Αλληλουχία
PP1f	5’-TCG AAC TTC ATT CGT ACC-3’
PP3r	5’-TCT CTG TCA ACG TCC CAG T-3’
PP3f	5’-CAG CGA CAA AAC TGG GAC GT-3’
PP5r	5’-CCC ATG AAG AAG GGT GG-3’
PP1f	5’-TCG AAC TTC ATT CGT ACC-3’
PP5r	5’- CCC ATG AAG AAG GGT GG -3’
LeiP5	5’-GTT ACG CAA CAC GGA CTG-3’
LeiP6	5’-CTA ACC AGA ATG CAG CTG-3’

Ακολούθησε κλωνοποίηση των PCR προϊόντων χρησιμοποιώντας το pGEM-T Easy Vector system (Promega), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η αλληλούχηση έγινε με τους ειδικούς για τον vector εκκινητές T7 700 (5’-GCT AGTT GCT CAG CGG) και M13rev 800 (5’-AAC AGC TAT GAC CAT G-3’), χρησιμοποιώντας τον αυτόματο αλληλουχητή LI-COR 4200 double-beam automated sequencer (LI-COR).

Προσδιορισμός της αντιλεϊσμανιακής δράσης των ουσιών έναντι της προμαστιγωτής μορφής του παρασίτου

Προμαστιγωτά παράσιτα επωάστηκαν σε συγκέντρωση $1x10^6$/ml με σειριακές αραιώσεις των ουσιών για 24h ή 72h στους 26°C. Μετά το τέλος της επώασης, ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 1500 στροφές για 5 λεπτά, ανασύσταση σε διαλυμα HEPES (10mM Hepes, 150nM NaCl, 10% BSA, pH 7.4) και χρώση με 12μM PI και 100nM SYBR 14 (Invitrogen) για 10 λεπτά στους 26°C. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας το κυτταρόμετρο Cytomics FC500 (Beckman Coulter) με λέιζερ διέγερσης στα 488nm και εκπομπή στα 617nm και 516nm για το SYBR 14 και το PI αντίστοιχα.

Στη συνέχεια υπολογίστηκε η Μέση Ανασταλτική Συγκέντρωση IC_{50} για κάθε ουσία (μM), που αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση που αναστέλλει την ανάπτυξη του παρασίτου κατά 50%, σύμφωνα με τον τύπο:

$$logIC_{50} = logx_1 + \frac{y_1 - \frac{y_0}{2}}{y_1 - y_2}\, logx_2 - logx_1$$

όπου, x_1 αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση της ουσίας που αντιστοιχεί σε ποσοστό ζωντανών παρασίτων υψηλότερο από $y_{0/2}$, x_2 αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση της ουσίας που αντιστοιχεί σε ποσοστό ζωντανών παρασίτων χαμηλότερο από $y_{0/2}$, και y_0 αντιστοιχεί στο ποσοστό των ζωντανών παρασίτων στο control (απουσία ουσιών). Οι τιμές IC_{50} για κάθε ουσία υπολογίστηκαν από τουλάχιστον 3 επαναλήψεις και εκφράζονται ως mean±SEM (μM).

Προσδιορισμός της αντιλεϊσμανιακής δράσης των ουσιών έναντι της ενδοκυττάριας αμαστιγωτής μορφής του παρασίτου

Μονοκύτταρα THP-1 διαφοροποιήθηκαν με επώαση με 1μM retinoic acid (Sigma) για 72h στους 37°C/5% CO_2. Ακολούθησε μόλυνση των μακροφάγων με επώαση με προμαστιγωτά παράσιτα σε αναλογία 1:4 κύτταρα:προμαστιγωτά για 16h. Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση των κυττάρων, ανασύσταση σε RPMI και επιστρωμάτωση σε φικόλλη, με σκοπό να απομακρυνθεί η περίσσεια των προμαστιγωτών. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 2500 στροφές για 20 λεπτά και απομόνωση της στοιβάδας των μολυσμένων μακροφάγων. Τα κύτταρα επωάστηκαν σε συγκέντρωση $4x10^5$/ml με σειριακές αραιώσεις των ουσιών για 48h. Μετά το τέλος της επώασης $1x10^4$ κύτταρα επιστρώθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα, χρησιμοποιώντας την συσκευή Cyto-Tek Cytospin (Sakura) με φυγοκέντηση στις 900 στροφές για 1 λεπτό. Το ποσοστό μόλυνσης καταγράφηκε μετά από χρώση των κυττάρων με Giemsa (Merck) και χρήση του παραπάνω τύπου με σκοπό να υπολογιστεί η Μέση Ανασταλτική Συγκέντρωση IC_{50} (μM) για κάθε ουσία που αναστέλλει την ανάπτυξη του ενδοκυττάριου παρασίτου κατά 50%.

Όπου, x_1 αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση της ουσίας που αντιστοιχεί σε ποσοστό μολυσμένων κυττάρων υψηλότερο από $y_{0/2}$, x_2 αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση της ουσίας που αντιστοιχεί σε ποσοστό μολυσμένων κυττάρων χαμηλότερο από $y_{0/2}$, και y_0 αντιστοιχεί στο ποσοστό των μολυσμένων κυττάρων στο control (απουσία ουσιών). Οι τιμές IC_{50} για κάθε ουσία υπολογίστηκαν από τουλάχιστον 3 επαναλήψεις και εκφράζονται ως mean±SEM (μM).

Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης των ουσιών έναντι του κυττάρου ξενιστή

Μονοκύτταρα THP-1 επωάστηκαν σε συγκέντρωση $1x10^6$/ml με σειριακές αραιώσεις των ουσιών για 48h στους 37°C/5% CO_2. Ακολούθησε χρώση των πυρήνων με PI και SYBR 14 και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής, όπως ακριβώς αναφέρεται παραπάνω. Στη συνέχεια υπολογίστηκε η Μέση Κυτταροτοξική Συγκέντρωση CC_{50} χρησιμοποιώντας τον παραπάνω τύπο όπως ακριβώς για τα προμαστιγωτά παράσιτα. Οι τιμές CC_{50} (50% Cytotoxic Concentration) για κάθε ουσία υπολογίστηκαν από τουλάχιστον 3 επαναλήψεις και εκφράζονται ως mean±SEM (μM).

Προσδιορισμός της αιμολυτικής δράσης των ουσιών

Για τον προσδιορισμό της αιμολυστικής δράσης των ουσιών χρησιμοποιήθηκε περιφερικό αίμα από υγιείς δότες με αντιπηκτική ουσία EDTA. Τα απομονωμένα ερυθρά

αιμοσφαίρια, που προέκυψαν μετά από τρία πλυσίματα με PBS στις 2100 στροφές για 5 λεπτά, επωάστηκαν με ίση ποσότητα σειριακών αραιώσεων των ουσιών σε αναλογία 1:1 (v/v) στους 37°C για 1 ώρα σε πλάκα 96-πηγαδιών.Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 1400 στροφές για 10 λεπτά, μεταφορά των υπερκείμενων σε νέα πλάκα και ανάγνωση της απορρόφησης στα 550nm με τη χρήση φασματοφωτόμετρου (Bio-Rad Microplate Reader, Model 680).

Στη συνέχεια υπολογίστηκε η Μέση Αιμολυτική Συγκέντρωση HC_{50} (συγκέντρωση του αναλόγου που προκαλεί 50% αιμόλυση) χρησιμοποιώντας τον παραπάνω τύπο, όπου x_1 αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση της ουσίας που αντιστοιχεί σε τιμή A_{550} υψηλότερη από $y_{0/2}$, x_2 αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση της ουσίας που αντιστοιχεί σε τιμή A_{550} χαμηλότερη από $y_{0/2}$, και y_0 αντιστοιχεί στην μέγιστη τιμή A_{550} που καταγράφεται κατά την επώαση των ερυθρών αιμοσφαιρίων με νερό (A_{max}).Οι τιμές HC_{50} για κάθε ουσία υπολογίστηκαν από τουλάχιστον 3 επαναλήψεις και εκφράζονται ως mean±SEM (μM). Υπολογίστηκε επίσης το ποσοστό αιμόλυσης σε επιλεγμένες συγκεντρώσεις για κάθε ουσία, χρησιμοποιώντας τον τύπο $(A_{550}/A_{max})x100$, καθώς και το ποσοστό αιμόλυσης που παρατηρείται σε επιλεγμένες υψηλές συγκεντρώσεις των νέων αναλόγων.

Προσδιορισμός της συνεργητικής δράσης φαρμακευτικών συνδυασμών

Για τον προσδιορισμό της συνεργητικής δράσης των συνδυασμών φωσφολιπιδίων και peptaibols χρησιμοποίθηκε η προσέγγιση του γραμμικού isobole, που αφορά σε μια γραφική παράσταση όπου στον x αξονα παραθέτονται οι τιμές IC_{50} των φωσφολιπιδίων έναντι της ενδοκυττάριας αμαστιγωτής μορφής, όταν αυτά δρουν μόνα τους, και στον άξονα y σημειώνονται οι σταθερές δόσεις των peptaibols που χρησιμοποίηθηκαν. Το γραμμικό isobole περιγράφεται από την εξίσωση a/A+b/B = 1, όπου A, B είναι οι τιμές IC_{50} των φαρμάκων και a,b είναι οι θεωρητικές δόσεις των δύο φαρμάκων που σε συνδυασμό προκαλούν το ίδιο αποτέλεσμα, όπως το κάθε φάρμακο χωριστά. Κάθε σημείο στο isobole αντιπροσωπεύει την αναμενόμενη συγκέντρωση καθενός από τα φάρμακα του συνδυασμού που σκοτώνουν το 50% των ενδοκυττάριων παρασίτων, όταν αυτά δρουν με μη συνεργητικό τρόπο. Αν το σημείο τομής των πειραματικών συγκεντρώσεων βρίσκεται έξω από τη γραμμή του isobole, τότε αυτό αποτελεί ένδειξη αλληλεπίδρασης των δυο φαρμάκων. Συγκεκριμένα, όταν τα φάρμακα δρουν συνεργητικά, τα σημεία τομής εντοπίζονται κάτω από τη γραμμή, ενώ όταν δρουν ανταγωνιστικά εντοπίζονται πάνω από τη γραμμή του isobole. Οι πειραματικές δόσεις a,b στον συνδυασμό των φαρμάκων που αντιστοιχούν στις τιμές IC50 σημειώθηκαν πάνω στη γραφική παράσταση και χρησιμοποιήθηκαν για να υπολογιστεί ο Συνδιαστικός Δείκτης (Combination Index, CI) για κάθε συνδυασμό φαρμάκων.

Χρώση των αυτοφαγικών κυστιδίων με Monodancyl Cadaverine

Μακροφάγα κύτταρα THP-1, μολυσμένα ή μη, επωάστηκαν με 10μM επιλεγμένων αναλόγων για 7h, 24h και 48h. Ακολούθησε επώαση με 0,05mM Monodancyl Cadaverine σε PBS στους 37°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, η μη προσδεδεμένη χρωστική απομακρύνθηκε με 4 πλύσεις με κρύο PBS και ακολούθησε ανασύσταση σε PBS και επίστρωση σε αντικειμενοφόρο πλάκα, με φυγοκέντηση στις 900 στροφές για 1 λεπτό, χρησιμοποιώντας την συσκευή Cyto-Tek Cytospin. Τα κύτταρα εξετάστηκαν για την παρουσία αυτοφαγικών κυστιδίων στο μικροσκόπιο φθορισμού.

Η πρόσληψη της χρωστικής MDC από τα αυτοφαγικά κυστίδια, ποσοτικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ImageJ v1.45. Η ένταση του φθορισμού όλων των κυστιδίων ανά 100 κύτταρα μετατράπηκε σε Arbitrary units (AU), κατόπιν ανάλυσης του ιστογράμματος φθορισμού κάθε φθορίζοντος κυστιδίου. Η μονάδα Arbitrary ορίζεται ως μια σχετική μονάδα μέτρησης που δείχνει την αναλογία της ποσότητας μιας ουσίας ή της έντασης, σε σχέση με μια προκαθορισμένη μέτρηση αναφοράς και χρησιμοποιείται συχνά σε μελέτες όπου η ποσοτικοποίηση του φθορισμού μιας ουσίας είναι απαραίτητη.

Ανίχνευση των πρωτεϊνών LAMP με ανοσοφθορισμό

Μακροφάγα κύτταρα THP-1, μολυσμένα ή μη, επωάστηκαν με 10μM επιλεγμένων αναλόγων για 24h. Ακολούθησε σήμανση των πρωτεϊνών LAMP-1 και LAMP-2 αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας τα αντισώματα rabbit polyclonal to LAMP-1- Lysosome marker (ab19294-Abcam) και mouse monoclonal [H4B4] to LAMP-2 (ab25631-Abcam).

Αρχικά έγινε επίστρωση των κυττάρων σε αντικειμενοφόρο πλάκα, με φυγοκέντηση στις 900 στροφές για 1 λεπτό, χρησιμοποιώντας την συσκευή Cyto-Tek Cytospin. Ακολούθησε μονιμοποίηση με ακετόνη και τρύπημα των κυτταρικών μεμβρανών με 0,5% Triton X-100/PBS για 10 λεπτά. Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάστηκαν με τα πρωτοταγή αντισώματα σε αραίωση 1:200 για 1h. Ακολούθησε επώαση με τα δευτεροταγή αντισώματα (DY-495-Goat anti-rabbit IgG και DY-495-Goat anti-mouse IgG –Dyomics) για 1h στο σκοτάδι. Όλες οι επωάσεις έγιναν σε θερμακρασία δωματίου, ανάμεσα στις οποίες έγιναν πλυσίματα με 0,3% BSA/PBS και τα κύτταρα παρατηρήθηκαν με μικροσκόπιο φθορισμού (Axioscope Fluorescence Microscope, Zeiss) σε x100 μεγέθυνση.

Μελέτη του φαινομένου της απόπτωσης και παρακολούθηση της φυσιολογίας του μιτοχονδρίου

Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό κιτ Mitochondrial Membrane Potential/Annexin V Apoptosis Kit with MitoTracker Red and Alexa Fluor 488 annexin V for Flow Cytometry (Molecular Probes), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μετά το τέλος των ενδεδειγμένων επωάσεων, $5x10^5$ κύτταρα/ml επωάστηκαν 0,04 μM MitoTracker Red Dye για 30 λεπτά στους 37°C/5% CO_2. Στη συνέχεια ακολούθησε πλύσιμο με PBS, ανασύσταση σε 100 μl 1X Annexin-binding buffer, και επώαση με AlexaFluor 488 annexin V (1:20 αραίωση) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν μια φορά με PBS, έγινε ανασύσταση σε 1X Annexin-binding buffer και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (excitation/emission maxima: Alexa Fluor 488 annexin V: 499/521 nm; MitoTracker Red: 579/599 nm)

Μελέτη της επαγωγής του οξειδωτικού στρες με μέτρηση NO και ROS και παρακολούθηση της φυσιολογίας του μιτοχονδρίου

- **Απεικόνιση της παραγωγής Nitric Oxide (NO)**

Χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο DAF-FM diacetate (Molecular Probes) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή). Μετά το τέλος των ενδεδειγμένων επωάσεων, $5x10^5$ κύτταρα/ml επωάστηκαν με 5μM DAF-FM diacetate για 30 λεπτά στους 37°C/5% CO_2. Στη συνέχεια ακολούθησε πλύσιμο με PBS, ανασύσταση σε φρέσκο PBS και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Τέλος, έγινε ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (excitation/emission maxima: 495/515 nm)

- **Ποσοτικοποίηση της παραγωγής ελεύθερων ριζών Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)**

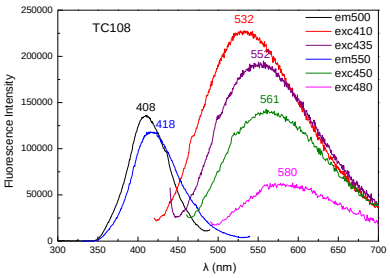
Χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο CM-H_2DCFDA (Molecular Probes) σε συνδυασμό με MitoTracker Red Dye, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μετά το τέλος των ενδεδειγμένων επωάσεων, $5x10^5$ προμαστιγωτά/ml επωάστηκαν με 0,04 μM MitoTracker Red Dye για 30 λεπτά στους 26°C. Στη συνέχεια έγινε πλύσιμο με PBS, ανασύσταση σε φρέσκο PBS και επώαση με 5μM CM-H_2DCFDA για 30 λεπτά. Ακολούθησε πλύσιμο με PBS, ανασύσταση σε φρέσκο PBS και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Ακολούθησε ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (excitation/emission maxima: 492−495/517−527 nm)

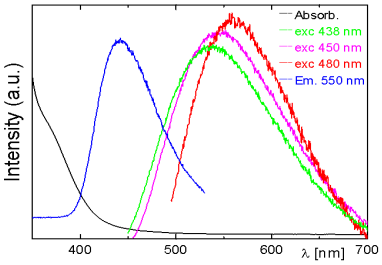
Κυτταρομετρία ροής

Χρησιμοποιήθηκε ο κυτταρομετρητής ροής Cytomics FC500 της Beckman Coulter. Τουλάχιστον 10^4 κύτταρα μετρήθηκαν ανά δείγμα, αποκλείοντας κατά την ανάλυση τον αυτοφθορισμό και τα κυτταρικά θραύσματα. Οι αναλύσεις των αποτελεσμάτων έγιναν με τα προγράμματα WINMDI 2.8 και FCS Alyzer 0.9.22 alpha.

Μελέτη της ενδοκυττάριας κατανομής με τη χρήση φθοριζόντων αναλόγων

Τα προμαστιγωτά παράσιτα επωάστηκαν με επιλεγμένες συγκεντρώσεις των φθορίζοντων αναλόγων TC108 και TC126. Σε επιλεγμένα χρονικά σημεία, έγινε επώαση $5x10^5$ προμαστιγωτών/ml με 0,04 μM MitoTracker Red Dye για 30 λεπτά στους 26°C. Ακολούθησε πλύσιμο με PBS και επίστρωση των προμαστιγωτών σε αντικειμενοφόρο πλάκα, με φυγοκέντηση στις 900 στροφές για 1 λεπτό, χρησιμοποιώντας την συσκευή Cyto-Tek Cytospin. Ακολούθησε παρατήρηση με μικροσκόπιο φθορισμού (Axioscope Fluorescence Microscope, Zeiss) σε x100 μεγέθυνση. Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής των δύο αναλόγων.





Παρατήρηση μορφολογικών και δομικών αλλαγών κατά την επώαση με τις ουσίες με SEM και TEM

Οι μορφολογικές αλλαγές στην εξωτερική επιφάνεια των προμαστιγωτών παρασίτων μελετήθηκαν με τη χρήση Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM). Μετά το τέλος των ενδεδειγμένων επωάσεων, $2x10^6$ παράσιτα πλύθηκαν με 0,1M Sodium Cacodylate buffer (SCB, Sigma), με φυγοκέντρηση στις 1500 στροφές για 5 λεπτά. Ακολούθησε μονιμοποίηση σε διάλυμα 2% glutaraldehyde (GDA)/2% paraformaldehyde (PFA) για 2 ώρες, πλύσιμο με SCB και δεύτερη μονιμοποίηση με 1% OsO4 (Sigma) in dH_2O. Στη συνέχεια έγινε βαθμιαία αφυδάτωση των δειγμάτων σε αιθανόλη και specimen coating, διαδικασίες οι οποίες διεξήχθησαν στην Μονάδα Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας του Τμήματος

Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Τα δείγματα αναλύθηκαν με Jeol Scanning Electron Microscope (Jeol).

Οι αλλαγές στην εσωτερική δομή των κυττάρων (προμαστιγωτά παράσιτα, μολυσμένα και μη μολυσμένα THP-1) μελετήθηκαν με τη χρήση Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM). Μετά το τέλος των ενδεδειγμένων επωάσεων, $20x10^6$ παράσιτα πλύθηκαν με 0,1M SCB, με φυγοκέντρηση στις 1500 στροφές για 5 λεπτά. Ακολούθησε μονιμοποίηση σε διάλυμα 2% GDA/2% PFA για 2 ώρες, πλύσιμο με SCB και επικάλυψη σε 1% αγαρ (Difco). Στη συνέχεια, τα επικαλυμμένα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 2% GDA/2% PFA για 1 ώρα και ακολούθησε χρώση με 1% OsO4. Ακολούθησε αφυδάτωση των δειγμάτων με διαδοχικές εμβαπτίσεις σε διαλύματα αιθανόλης/ dH_2O και επώαση σε ξηρή αλκοόλη. Τέλος, τα δείγματα εγκλείστηκαν σε ειδικές κάψουλες έγκλισης με βαθμιαία διαπότιση με ρητίνη. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε με τη δημιουργία μικροτομών οι οποίες παρατηρήθηκαν στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης JEM-2100 (Jeol).

Επώαση προμαστιγωτών παρασίτων σε διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις αναλόγων

Προμαστιγωτά παράσιτα επωάστηκαν με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις επιλεγμένων αναλόγων. Σαν σημείο εκκίνησης, επιλέχθηκε μια χαμηλή συγκέντρωση της τάξεως των 0.1 μM. Αρχικά έγινε επώαση των προμαστιγωτών με 0.1 μM αναλόγου για 48 ώρες στους 26°C. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η βιωσιμότητα της καλλιέργειας μετά από χρώση με Trypan Blue. Αν το ποσοστό βιωσιμότητας ήταν μεγαλύτερο από 80%, ακολουθούσε αραίωση της καλλιέργειας 1:5 και επώαση στην ίδια συγκέντρωση αναλόγου για 48 ώρες. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για 2 εβδομάδες. Κατόπιν ακολούθησε επώαση σε διπλάσια συγκέντρωση αναλόγου, με αραίωση της καλλιέργειας 1:5 και διπλασιασμό της συγκέντρωσης. Ο υψηλός αριθμός ζωντανών παρασίτων για τουλάχιστον 2 εβδομαδες καθορίζει την έναρξη επώασης σε διπλάσια συγκέντρωση αναλόγου.

Μελέτη του πρωτεώματος του παρασίτου με Φασματομετρία Μάζας

Μελετήθηκε το πρωτέωμα των προμαστιγωτών παρασίτων κατά την επώαση με επιλεγμένα ανάλογα. $2x10^6$ παράσιτα πλύθηκαν με PBS και επωάστηκαν με λυτικό buffer εμπλουτισμένο με αναστολείς των προτεασών, για 10 λεπτά στον πάγο. Ακολούθησε λύση των κυττάρων με τη χρήση υπερήχων για 1 λεπτό και φυγοκέντρηση στις 14000 στροφές για 15 λεπτά στους 4°C. Η περιεκτικότητα της πρωτεΐνης ανά δείγμα ποσοτικοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford. Στη συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφόρηση 40μg πρωτεϊνης/δείγμα σε γέλη

ακρυλαμίδης (7,5% SDS-PAGE), που οδήγησε στον αποτελεσματικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους βάρος.

Κατόπιν, οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες μονιμοποιήθηκαν με επώαση της γέλης σε διάλυμα 30% Methanol/10% Acetic acid για 45 λεπτά. Ακολούθησαν 4 πλυσίματα των 15 λεπτών σε dH_20 και χρώση των πρωτεϊνων με Blue Silver Coomasie Colloidal Blue stain για 16 ώρες. Στη συνέχεια έγινε αποχρωματισμός των πρωτεϊνών με 4 πλυσίματα των 15 λεπτών σε dH_20, μέχρι την επίτευξη της επιθυμητής αντίθεσης.

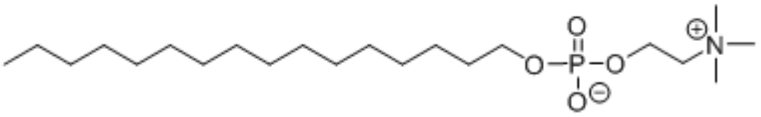
Στη συνέχεια οι διαχωρισμένες πρωτεϊνικές ζώνες αποκόπηκαν με τη χρήση νυστεριού, και κάθε ζώνη αφού κόπηκε σε μικρότερα κομμάτια, μεταφέρθηκε σε σωληνάριο eppendorf, όπου ξεκίνησε η διαδικασία της πέψης. Συνοπτικά, έγινε αποχρωματισμός με πλύσιμο με 50% Acetonitril/water (DestSol) και 50 mM Ammonium bicarbonate solution (ABS) για 15 λεπτά, ακολουθούμενο από δύο επαναλήψεις. Ακολούθησε αποδιάταξη των πρωτεϊνών με επώαση με 10 mM DTT στους 56°C για 45 λεπτά και αλκυλίωση με επώαση με 55 mM Iodacetamide (IAA) για 45 λεπτά. Ακολούθησαν τρία πλυσίματα με DestSol και ABS και επώαση με 1μg/μl θρυψίνη στους 37°C για 16 ώρες. Μετά το τέλος της πέψης, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο eppendorf, μέσα στο οποίο προστέθηκαν επίσης τα υπερκείμενα από πλυσίματα των τεμαχίων της γέλης με ddH_20, 50% ACN και 0,1% TFA. Τα συγκεντρωμένα υπερκείμενα καταψύχθηκαν σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια έγινε εξάτμιση σε στερεή σκόνη με τη χρήση Speed Vac (ThermoFisher Scientific).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία νανοροής ανάστροφης φάσης (Reverse phase nLC) συζευγμένη με το φασματόμετρο μάζας LTQ-Orbitrap XL και ιονισμός των πρωτεϊνικών πεπτιδίων με ηλεκροψεκασμό. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό Proteome Discoverer v1.4 με χρήση των αλγορίθμων Sequest v1.1.0.263 και Mascot v2.3.2. ως προς την πρωτεϊνική βάση δεδομένων Uniprot_Leishmania donovani_strain BPK282A1.

6. Αποτελέσματα

6.1. Βιολογική αποτίμηση της δράσης αναλόγων αιθερικών φωσφολιπιδίων και μελέτη της σχέσης δομής-δραστικότητας

Τα νέα ανάλογα αιθερικών φωσφολιπιδίων που μελετήθηκαν στα πλαίσια αυτής της διατριβής σχεδιαστηκαν και συνετέθησαν από την ομάδα της Δρ Θ. Καλογεροπούλου στο Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών και στοχεύουν στην ανάδειξη βελτιωμένων χημικά ουσιών ως προς την αντιπαρασιτική δράση, με μειωμένο φάσμα παρενεργειών. Προς αυτή την κατεύθυνση αναδείξαμε την επίδραση ποικίλων χημικών αλλαγών στην κυτταροτοξική και αιμολυτική δράση των αναλόγων έναντι των μακροφάγων, των φυσικών ξενιστών του παρασίτου, και των ανθρώπινων ερυθρών αιμοσφαιρίων αντίστοιχα. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η επίδραση της παρουσίας κυκλοαλκανίων, σε συνδυασμό με τροποποιήσεις του μήκους της αλειφατικής αλυσίδας και την παρουσία διπλού δεσμού. Οι τροποποιήσεις στο λιπιδικό μέρος των αναλόγων συνδυάστηκαν επίσης με διαφορές στο είδος της πολικής κεφαλής, αντικαθιστώντας τη χολίνη που καταλαμβάνει την πολική κεφαλή στο πρότυπο φάρμακο μιλτεφοσίνη (Εικόνα 15).



Εικόνα 15*: Χημική δομή του αλκυλο-φωσφολιπιδίου μιλτεφοσίνη.*

Πειραματικός σχεδιασμός

Η αντιπαρασιτική δράση των αναλόγων στην προμαστιγωτή μορφή του παρασίτου, μελετήθηκε αρχικά σε δύο στελέχη τα οποία είναι υπεύθυνα για την σπλαχνική μορφή της νόσου. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη αναφοράς *L.infanum* MHOM/TN/80/IPT1/LEM235 και *L.donovani* MHOM/IN/80/DD8/LEM703. Ο προσδιορισμός της αντιπαρασιτικής δράσης έγινε με κυτταρομετρία ροής και τη χρήση των φθορίζουσων χρωστικών Proridium Iodide, που χρωματίζει τα νεκρά ή τα τελικού σταδίου αποπτωτικά κύτταρα και SYBR-14, που συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα των ζωντανών κυττάρων. Η χρωστική SYBR-14 έχει τη δυνατότητα να διαπερνά την άθικτη κυτταροπλασματική μεμβράνη των ζωντανών κυττάρων, σε αντίθεση με το PI που διαπερνά μόνο τις κατεστραμμένες

μεμβράνες, διαχωρίζοντας έτσι τα ζωντανά από τα νεκρά κύτταρα. Με τον τρόπο αυτό επιτεύχθηκε η ταυτόχρονη απεικόνιση των ζωντανών και των νεκρών παρασίτων μέσα στο συνολικό πληθυσμό, επιτρέποντας τον προσδιορισμό της αντιπαρασιτικής δράσης των ουσιών (Μέση Ανασταλτική Συγκένρωση, IC_{50}) με ακριβή, ταχύ και επαναλήψιμο τρόπο.

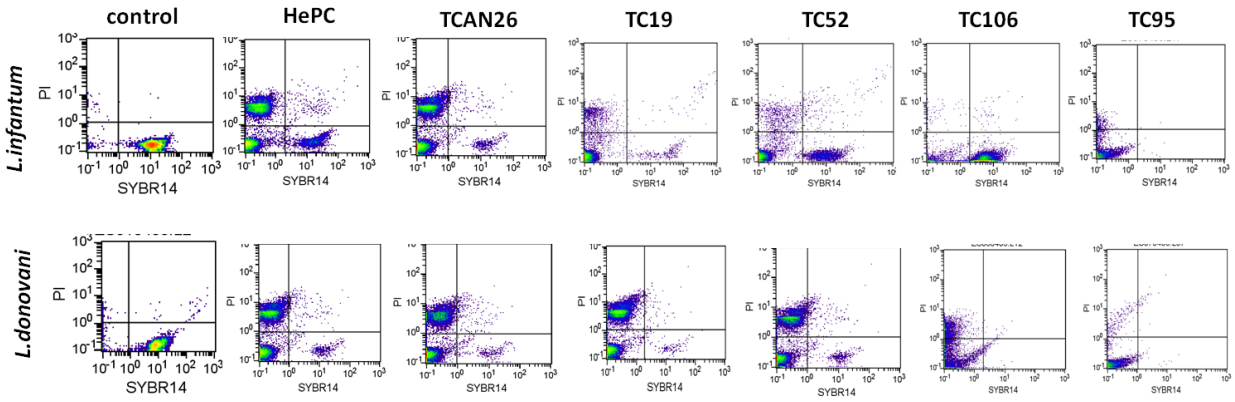
Το δεύτερο *in vitro* μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε για την αποτίμηση της δράσης των αναλόγων είναι η ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή, που αντιστοιχεί στην μορφή του παρασίτου μέσα στον σπονδυλωτό ξενιστή. Για τον λόγο αυτό, μακροφάγα κύτταρα THP-1 μολύνθηκαν με προμαστιγωτά παράσιτα *L.infantum.* Μετά από τη διαφοροποίηση των προμαστιγωτών σε ενδοκυττάρια αμαστιγωτά, ακολούθησε επώαση με τα ανάλογα και προσδιορισμός της Μέσης Ανασταλτικής Συγκένρωσης IC_{50}, με καταμέτρηση του ποσοστού των μολυσμένων μακροφάγων παρουσία φαρμάκου μετά από χρώση Giemsa.

Η κυτταροτοξική δράση των αναλόγων μελετήθηκε στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά μακροφάγων THP1, η οποία χρησιμοποιήθηκε και ως ξενιστής στις *in vitro* δοκιμασίες για την αποτίμηση της αντιλεϊσμανιακής δράσης στην ενδοκυττάρια μορφή του παρασίτου. Ο προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας επιτεύχθηκε με χρώση των μακροφάγων με τις χρωστικές PI και SYBR-14, ανάλυση με κυτταρομετρία ροής και προσδιορισμό της Μέσης Κυτταροτοξικής Συγκέντρωσης CC_{50} (50% Cytotoxic Concentration). Το πλεονέκτημα της μεθόδου βασίζεται στο ότι η κυτταρική σειρά THP1 έχει ανθρώπινη προέλευση και άρα τα αποτελέσματα αντικατοπτρίζουν σε πολύ μεγάλο βαθμό την επίδραση των αναλόγων στον άνθρωπο.

Δεδομένου ότι η αιμολυτική δράση των φαρμακευτικών ουσιών χρησιμοποιείται ως μέτρο της γενικής μεμβρανοτοξικής τους δράσης και αποτελεί σοβαρή παρενέργεια των ουσιών που χορηγούνται ενδοφλεβίως, θεωρήσαμε πολύ σημαντικό να μελετήσουμε την αιμολυτική δράση των νέων αναλόγων. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της Μέσης Αιμολυτικής Συγκέντρωσης HC_{50} (50% Hemolytic Concentration) και του ποσοστού αιμόλυσης που παρατηρείται σε επιλεγμένες συγκεντρώσεις των νέων αναλόγων.

Αποτελέσματα

Οι χημικές δομές καθώς και τα αποτελέσματα της αποτίμησης της βιολογικής δράσης της πλειοψηφίας των αναλόγων, έχουν δημοσιευτεί σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά[10-12, 128]. Κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων συμπεραίνεται ότι πολλά από τα ανάλογα που μελετήθηκαν είναι πιο ενεργά από τη μιλτεφοσίνη στην προμαστιγωτή μορφή και στα δύο εργαστηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, όπως φαίνεται από τα χαρακτηριστικά γραφήματα κυτταρομετρίας ροής στην Εικόνα 16.



Εικόνα 16: *Αντιλεϊσμανιακή δράση επιλεγμένων αναλόγων έναντι της προμαστιγωτής μορφής του παρασίτου. Χρησιμοποιήθηκαν τα εργαστηριακά στελέχη L.infantum και L.donovani. Πραγματοποιήθηκε επώαση των προμαστιγωτών με 25 μM φαρμάκου για 72h. Τα γραφήματα αποτελούν αντιπροσωπευτικές εικόνες από τη διπλή χρώση με PI και SYBR-14 και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.*

Συγκεκριμένα, από τα 52 ανάλογα που μελετήθηκαν, τα 21 είναι πιο ενεργά έναντι της προμαστιγωτής *L.infantum*, ενώ 5 ανάλογα κατέχουν παρόμοια δράση με τη μιλτεφοσίνη. Παρατηρήθηκε επίσης ότι η προμαστιγωτή *L. donovani* είναι περισσότερο ευαίσθητη από την *L. infantum*, καθώς 24 ανάλογα είναι πιο ενεργά και 9 έχουν παρόμοια δράση με τη μιλτεφοσίνη. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της δραστικότητας των αναλόγων στην ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή του παρασίτου, με την πλειοψηφία των αναλόγων να εμφανίζονται πιο ενεργά από τη μιλτεφοσίνη. Συγκεκριμένα, από τα 55 ανάλογα που μελετήθηκαν, τα 44 εμφανίζονται πιο ενεργά, 5 ανάλογα έχουν παρόμοια δράση και μόνο 6 ανάλογα είναι λιγότερο ενεργά από τη μιλτεφοσίνη. Το συγκεκριμένο εύρημα είναι εξαιρετικά σημαντικό, καθώς η αμαστιγωτή λεϊσμάνια αντιπροσωπεύει την κλινική μορφή του παρασίτου.

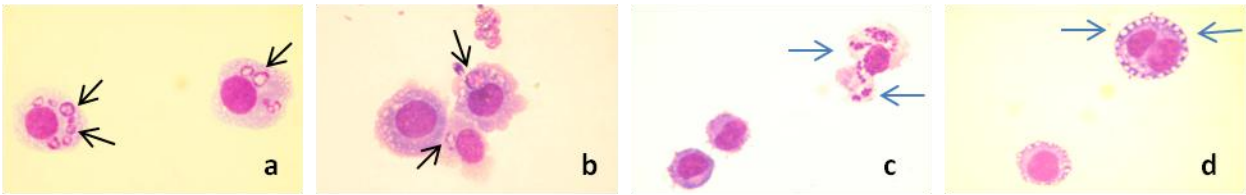
Σημαντικά βελτιωμένη παρουσιάζεται η κυτταροτοξική δράση των αναλόγων, καθώς από τα 52 ανάλογα που μελετήθηκαν, τα 41 εμφανίζουν χαμηλότερη κυτταροτοξική δράση, 5 ανάλογα έχουν παρόμοια κυτταροτοξικότητα με τη μιλτεφοσίνη, ενώ 6 μόνο ανάλογα είναι πιο κυτταροτοξικά. Ως προς την αιμολυτική τους δράση, κανένα από τα νέα ανάλογα δεν ήταν πιο αιμολυτικό από τη μιλτεφοσίνη. Από τα 55 ανάλογα που μελετήθηκαν, 2 μόνο ανάλογα κατείχαν παρόμοια αιμολυτική δράση με τη μιλτεφοσίνη, ενώ τα υπόλοιπα 53 ανάλογα ήταν λιγότερο αιμολυτικά. Από αυτά, τα 41 ανάλογα κατέχουν HC_{50}>100μM. Τα παραπάνω αποτελέσματα συνοψίζονται στους Πίνακες 2-6.

Ανάλογο	Αντιπαρασιτική δράση στην προμαστιγωτή μορφή [a]		Ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή [b]	Κυτταρο-τοξικότητα[c]	Αιμόλυση[d]	% αιμόλυση στα 100μM[e]
	L.infantum MON235	*L.donovani* MON703	*L.infantum* MON235			
HePC	23,9 ± 4,2	8,7 ± 0,7	6,7 ± 1	28,6 ± 2,5	38,3 ± 2,8	96,1
CKEL19	3,2 ± 0,6	7,1 ± 1,2	0,7 ± 0,1	25,9 ± 3,5	40,6 ± 6,6	84,9
CKEL26	5,6 ± 1,9	9,5 ± 1,4	1,9 ± 0,4	22,2 ± 2,5	75,7 ± 5,3	70
CKEL16	23,1 ± 3,6	22 ± 3,2	4,1 ± 0,5	20,4 ± 2,6	58,7 ± 2,2	98
CKEL17	16,5 ± 1,8	50,7 ± 3,6	2,3 ± 0,3	ND	>100	37,5
CKEL14	5,2 ± 0,4	3,9 ± 0,2	0,7 ± 0,2	20,1 ± 3,2	>100	26,2
CKEL15	11,4 ± 2,4	29,7 ± 3,6	11,7 ± 0,3	65	>100	3,8
CKEL10	21,2 ± 2,6	45,1 ± 7,2	2,6 ± 0,6	ND	>100	8,3
CKEL11	6,5 ± 1,7	22 ± 2	3,9 ± 0,3	25.7 ± 1,3	>100	7,9
CKEL12	3,7 ± 0,7	16,2 ± 3	6 ± 0,1	18,9 ± 3,5	>100	20,1
TCAN33	5,2 ± 1,5	2,4 ± 0,6	0,6 ± 0,1	31,3 ± 2,8	68,3 ± 3,4	85,2
TCAN58	8,4 ± 0,8	10,3 ± 1,3	0,9 ± 0,4	35,5 ± 2,3	>100	42,8
TCAN34	47,6 ± 7,3	8,7 ± 1	2,2 ± 0,2	ND	>100	12,4
TCAN41	>100	4,99 ± 1,5	13,3 ± 1,6	>500	>100	2,1
TCAN64	>100	4 ± 2,3	3,9 ± 0,5	315,9	>100	0,5
TCAN26	6,7 ± 2,4	3,2 ± 0,6	0,03 ± 0,02	59,5 ± 2,1	>100	13,2
TCAN72	6 ± 1,1	2,9 ± 0,7	0,7 ± 0,1	74,1	>100	37,8
TCAN27	22,6 ± 3,4	5,4 ± 1,1	5,7 ± 0,9	168,7	>100	10,6
TCAN28	6,6 ± 1,2	5,1 ± 1,9	1,3 ± 0,5	37,4 ± 0,7	>100	38,8

Πίνακας 2: *Βιολογική δράση αναλόγων αιθερικών φωσφολιπιδίων.*

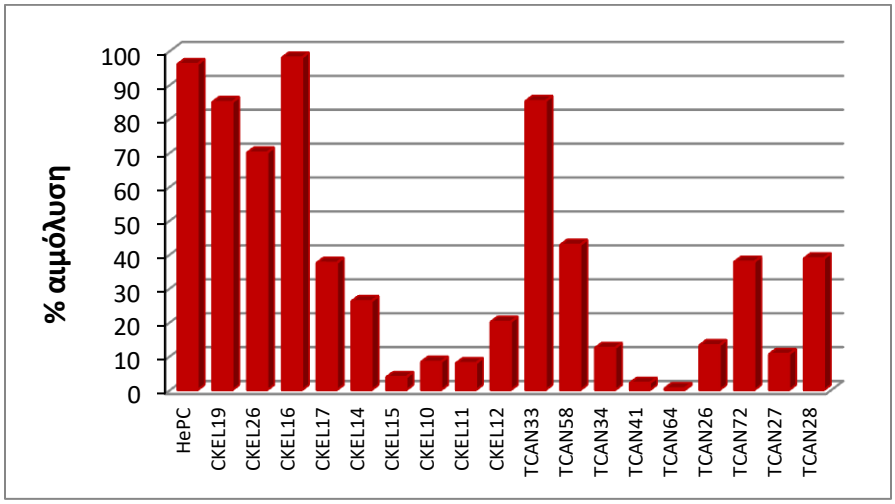
[a/b]Αντιλεϊσμανιακή δράση αναλόγων της μιλτεφοσίνης έναντι της προμαστιγωτής και ενδοκυττάριας αμαστιγωτής μορφής του παρασίτου. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως τιμές IC_{50} ± SEM (μM). [c]Κυτταροτοξικότητα έναντι της κυτταρικής σειράς THP1 (CC_{50} ± SEM, μM). [d]Αιμόλυση ερυθρών αιμοσφαιρίων κατά την επώση με τα ανάλογα. Η αιμόλυση εκφράζεται ως HC_{50} ± SEM, αφορά στη συγκέντρωση του αναλόγου που προκαλεί 50% αιμόλυση. [e]Ποσοστό αιμόλυσης στα 100μM αναλόγου. Οι παραπάνω τιμές αποτελούν τον μέσο όρο από τρία ανεξάρτητα πειράματα. ND: Not determined

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2, αυξημένη αντιπαρασιτική δράση περίπου κατά x10 φορές σε σύγκριση με τη μιλτεφοσίνη, έναντι της ενδοκυττάριας αμαστιγωτής μορφής, παρατηρείται στα ανάλογα CKEL14, CKEL19, TCAN33, TCAN26 και TCAN72. Ανάμεσα σε αυτά, το ανάλογο TCAN26, που φέρει μεγάλου μήκους αλειφατική αλυσίδα και χολίνη στην πολική κεφαλή επιδεικνύει ιδιαίτερα υψηλή αντιπαρασιτική δράση έναντι του ενδοκυττάριου παρασίτου (IC_{50} 0,03±0,02 μM), αυξημένη κατά 223 φορές σε σχέση με τη μιλτεφοσίνη (IC_{50} 23,9±4,2 μM) (Εικόνα 17).



Εικόνα 17: *Μολυσμένα κύτταρα THP1 υπό την επίδραση επίδραση μιλτεφοσίνης και TCAN26 για 48h. Τα παρασιτοφόρα κυστίδια είναι σημασμένα με μαύρα βέλη. [a]control, [b]HePC, [c,d]TCAN26. Παρατηρείται ότι κατά την επώαση με το ανάλογο TCAN26 μειώνεται αισθητά το παρασιτικό φορίο (μπλε βέλη).*

Παρατηρήθηκε ακόμα ότι η κυτταροτοξικότητα των αναλόγων που περιγράφονται στον Πίνακα 2 βελτιώθηκε, ωστόσο 7 από τα 15 ανάλογα εμφάνισαν αντίστοιχη ή υψηλότερη κυτταροτοξικότητα από τη μιλτεφοσίνη. Σημαντική βελτίωση παρουσίασε η αιμολυτική τους δράση καθώς στην πλειοψηφία τους τα ανάλογα είναι λιγότερο αιμολυτικά από τη μιλτεφοσίνη και πολλά από αυτά κατέχουν ιδιαίτερα χαμηλή αιμολυτική δράση ακόμα και σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις του φαρμάκου (HC_{50} > 100 μM). Όπως φαίνεται στο γράφημα 1, τουλάχιστον 5 ανάλογα προκαλούν αιμολυτική δράση <10% στη συγκέντρωση των 100 μM.



Γράφημα 1: *Ποσοστό αιμόλυσης αναλόγων του Πίνακα 3. Πραγματοποίθηκε επώαση ανθρώπινων ερυθρών αιμοσφαιρίων με διαδοχικές αραιώσεις των αναλόγων για 1h και ανάγνωση της απορρόφησης στα 550nm με τη χρήση φασματοφωτόμετρου.*

Συνεχίζοντας την αποτίμηση της βιολογικής δράσης των αναλόγων, αναδείχθηκαν κι άλλα ενεργά ανάλογα που κατέχουν εξαιρετικό κυτταροτοξικό και αιμολυτικό προφίλ, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.

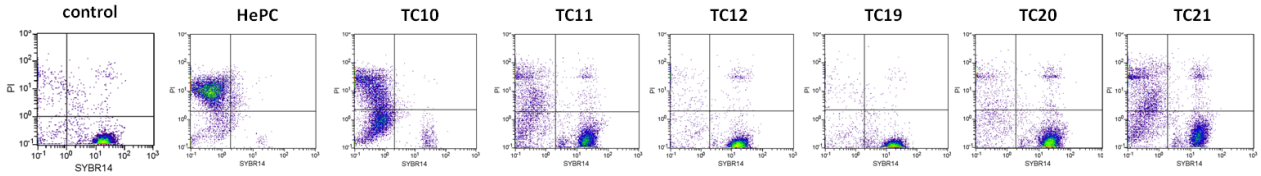
Ανάλογο	Αντιπαρασιτική δράση στην προμαστιγωτή μορφή[a]		Ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή[b]	Κυτταρο-τοξικότητα[c]	Αιμόλυση[d]	% αιμόλυση στα 100μM[e]
	L.infantum MON235	*L.donovani* MON703	*L.infantum* MON235			
HePC	23,9 ± 4,2	8,7 ± 0,7	6,7 ± 1	28,6 ± 2,5	38,3 ± 2,8	96,1
TC46	76,8	<3,1	3,3 ± 0.6	349,1	>100	2,1
TC53	21,7	<3,1	2,2 ± 0,2	363,3	>100	1,7
TC18	2,9 ± 0,3	1 ± 0,2	0,1 ± 0,02	37,9 ± 2	>100	25,5
TC10	2,2 ± 0,7	2,3 ± 0,7	3,8 ±0,8	153,6	>100	38
TC19	1,4 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,4	>500	>100	8,7
TC11	1,7 ± 0,5	2 ± 0,9	4,1 ± 0,9	272,2	68,4 ± 2,8	71,6
TC20	2,8 ± 0,3	1 ± 0,1	1 ± 0,4	332,8	>100	28,7
TC12	1,8 ± 0,5	1,9 ± 0,5	4,4 ± 0,5	372,3	>100	45,4
TC21	1,9 ±0,3	8,7 ± 0,7	6,7 ± 1	243,8	>100	34,8
TC1	100	68,2	0,75 ± 0,04	37,7 ± 2	>100	17,7
TC2	84,5	65,9	3,6 ± 0,3	72,6	>100	36
TC3	50,2	41,5	0,9 ± 0,1	36,2 ± 3,1	>100	16,9
TC51	<3,1	<3,1	0,2 ± 0,02	75,4	44,3 ± 1,9	80,5
TC45	>100	6 ± 2,1	1,6 ± 0,4	88,5	76,7 ± 2,9	60,7
TC42	>100	8,6 ± 1,4	1,1 ± 0,2	30,7 ± 3,2	76,3 ± 4,7	66,4
TC41	>100	16,1	1,1 ± 0,2	28,7 ± 3,2	59,8 ± 2	81,6
TC44	38 ± 2,5	3,9 ± 0,8	0,3 ± 0,2	75	>100	30,8
TC43	>100	16,6	0,8 ± 0,1	39,7 ± 0,3	66,6 ± 5,3	66,8
TC56	>100	41,6	9,1 ± 0,5	147,3	61,3 ± 3,6	82,3
TC59	44,3	44,1	5,2 ± 0,1	75	86,2 ±0,2	62,2
TC40	>100	54,3	3,3 ± 1,2	34,1 ± 0,4	43,1 ± 3,6	100
TC39	>100	71,9	1,7 ± 0,5	21,3 ± 3,2	>100	20,4

Πίνακας 3: *Βιολογική δράση αναλόγων αιθερικών φωσφολιπιδίων που περιέχουν δακτυλίους αυξημένου μεγέθους.*

[a/b]Αντιλεϊσμανιακή δράση αναλόγων της μιλτεφοσίνης έναντι της προμαστιγωτής και ενδοκυττάριας αμαστιγωτής μορφής του παρασίτου. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως τιμές IC_{50} ± SEM (μM). [c]Κυτταροτοξικότητα έναντι της κυτταρικής σειράς THP1 (CC_{50} ± SEM, μM). [d]Αιμόλυση ερυθρών αιμοσφαιρίων κατά την επώση με τα ανάλογα. Η αιμόλυση εκφράζεται ως HC_{50} ± SEM και αφορά στη συγκέντρωση του αναλόγου που προκαλεί 50% αιμόλυση. [e]Ποσοστό αιμόλυσης στα 100μM αναλόγου. Οι παραπάνω τιμές αποτελούν τον μέσο όρο από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε αύξηση της ενδοκυττάριας αντιπαρασιτικής δράσης, κυρίως στα ανάλογα που φέρουν μεγάλου μήκους αλειφατική αλυσίδα, όπως τα ανάλογα TC1, TC2 και TC3. Στην πλειοψηφία τους τα παραπάνω ανάλογα είναι πιο ενεργά από τη μιλτεφοσίνη στην ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή, με τα ανάλογα TC18, TC19 και TC20 να εμφανίζουν ιδιαίτερα υψηλή παρασιτοκτόνο δράση. Επιπρόσθετα, τα νέα ανάλογα, όπως το

TC10, TC11, TC12, TC20 και TC21 εμφανίζουν ιδιαίτερα χαμηλή κυτταροτοξική δράση, όπως φαίνεται στην Εικόνα 18. Ιδιαίτερα βελτιωμένη παρουσιάζεται η αιμολυτική δράση της πλειοψηφίας των αναλόγων ανεξάρτητα από το μέγεθος του δακτυλίου, την απόσταση και το είδος της πολικής κεφαλής.



Εικόνα 18: *Κυτταροτοξική δράση αναλόγων έναντι της κυτταρικής σειράς THP-1. Πραγματοποιήθηκε επώαση των μακροφάγων THP-1 με 250μM επιλεγμένων αναλόγων για 48h. Τα γραφήματα αποτελούν αντιπροσωπευτικές εικόνες από τη διπλή χρώση με PI και SYBR-14 και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.*

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον συγκεντρώνουν οι ιδιότητες του αναλόγου TC19, που φέρει μεγάλου μεγέθους κυκλοαλκανικό δακτύλιο στο λιπιδικό τμήμα, αλειφατική αλυσίδα μικρού μήκους και χολίνη στην πολική κεφαλή και κατέχει ιδιαίτερα υψηλή αντιπαρασιτική δράση έναντι του ενδοκυττάριου παρασίτου (IC_{50} 0,7±0,4 μM) καθώς και εξαιρετικά χαμηλή κυτταροτοξική και αιμολυτική δράση (IC_{50}>500 μM και HC_{50}>100 μM). Συγκεντρώνει επομένως δομικά χαρακτηριστικά που το καθιστούν ένα εξαιρετικό ανάλογο για περαιτέρω μελέτες.

Συνεχίζοντας την αναζήτηση των βέλτιστων δομικών αλλαγών πραγματοποιήθηκε εισαγωγή και άλλων ειδών δακτυλίων στο λιπιδικό μέρος των αναλόγων. Θα επικεντρωθούμε σε ανάλογα με τριαζόλιο ή τριφλουραλίνη, διάφορα μήκη της αλειφατικής αλυσίδας και χολίνη στην πολική κεφαλή.

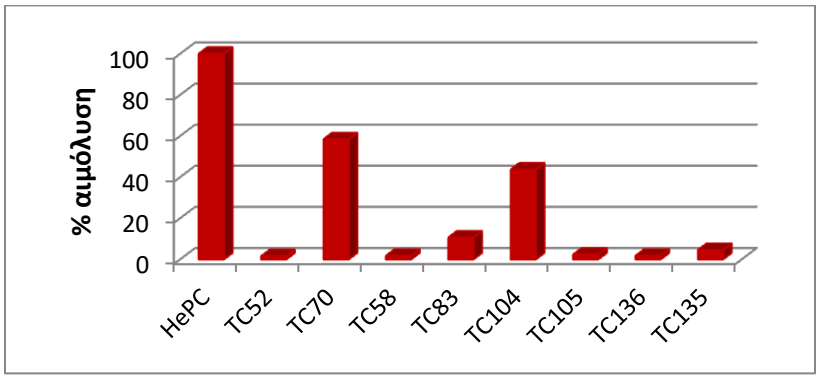
Συγκεκριμένα, η εισαγωγή του 1,2,3-τριαζολίου (πενταμελής δακτύλιος από τρία άτομα αζώτου και δύο άτομα άνθρακα) στη χημική δομή των αναλόγων βελτίωσε στην πλειοψηφία τους την ενδοκυττάρια αντιπαρασιτική δράση των αναλόγων, κυρίως των TC70, TC136 και TC135 (IC_{50} 1,5±0,2 μM, 1,5±0,4 μM και 0,5±0,2 μM αντίστοιχα), όπως φαίνεται στον Πίνακα 4. Ωστόσο, η μεγάλη βελτίωση παρατηρήθηκε στην κυτταροτοξική και αιμολυτική τους δράση, με τα ανάλογα TC52, TC104, TC105, TC136 και TC135 να εμφανίζουν πολύ χαμηλή κυτταροτοξικότητα, με τιμές CC_{50}>500 μM.

Ανάλογο	Αντιπαρασιτική δράση στην προμαστιγωτή μορφή[a]		Ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή[b]	Κυτταρο τοξικότητα[c]	Αιμόλυση[d]	% αιμόλυση στα 100μM[e]
	L.infantum MON235	*L.donovani* MON703	*L.infantum* MON235			
HePC	23,9 ± 4,2	8,7 ± 0,7	6,7 ± 1	28,6 ± 2,5	38,3 ± 2,8	96,1
TC52	36	9,8	9,3 ± 1	>500	>100	0,5
TC70	29,8	<3,1	1,5 ± 0,2	34,3 ± 1	86,1 ± 5,1	58,4
TC58	>100	>100	5,2 ± 1	10,6 ± 2	>100	1,7
TC83	23,5	64	19,1 ± 2,2	46,8 ± 1,3	>100	10,6
TC104	72	4,1	4,3 ± 1,6	>500	>100	3,8
TC105	65,8	>100	7,6 ± 2,4	>500	>100	1,1
TC136	ND	ND	1,5 ± 0,4	>500	>100	1,2
TC135	ND	ND	0,5 ± 0,2	>500	>100	1,5

Πίνακας 4: *Βιολογική δράση αναλόγων αιθερικών φωσφολιπιδίων που περιέχουν δακτύλιο τριαζόλιου.*

[a/b]Αντιλεϊσμανιακή δράση αναλόγων της μιλτεφοσίνης έναντι της προμαστιγωτής και ενδοκυττάριας αμαστιγωτής μορφής του παρασίτου. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως τιμές IC_{50} ± SEM (μM). [c]Κυτταροτοξικότητα έναντι της κυτταρικής σειράς THP1 (CC_{50} ± SEM, μM). [d]Αιμόλυση ερυθρών αιμοσφαιρίων κατά την επώαση με τα ανάλογα. Η αιμόλυση εκφράζεται ως HC_{50} ± SEM και αφορά στη συγκέντρωση του αναλόγου που προκαλεί 50% αιμόλυση. [e]Ποσοστό αιμόλυσης στα 100μM αναλόγου. Οι παραπάνω τιμές αποτελούν τον μέσο όρο από τρία ανεξάρτητα πειράματα. ND: Not determined

Αντίστοιχα, η αιμολυτική δράση όλων των αναλόγων παρουσιάζεται εξαιρετικά βελτιωμένη. Ενδιαφέρον προκαλεί η πλήρης απουσία αιμολυτικής δράσης στην πλειοψηφία των παραπάνω μη κυτταροτοξικών αναλόγων ακόμα και στην υψηλή συγκέντρωση των 500 μM (Γράφημα 2). Αναδεικνύεται έτσι ένας ακόμα αποτελεσματικός συνδυασμός δομικών χαρακτηριστικών, με έμφαση στη βελτίωση της γενικότερης μεμβρανοτοξικής δράσης που καθιστά τα συγκεκριμένα ανάλογα κατάλληλα για ενδοφλέβια χρήση.



Γράφημα 2: *Ποσοστό αιμόλυσης αναλόγων του Πίνακα 4. Πραγματοποιήθηκε επώαση ανθρώπινων ερυθρών αιμοσφαιρίων με 500 μM των αναλόγων για 1h και ανάγνωση της απορρόφησης στα 550nm με τη χρήση φασματοφωτόμετρου.*

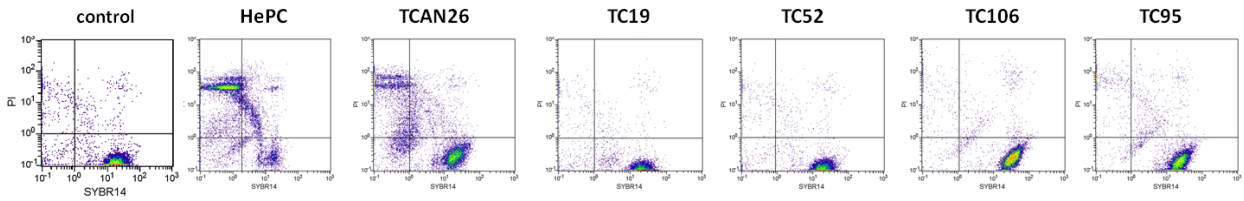
Στη συνέχεια μελετήθηκε η παρουσία του δακτυλίου της τριφλουραλίνης σε συνδυασμό με την παρουσία χολίνης και την απόσταση από την πολική κεφαλή[13]. Μελετώντας την αντιπαρασιτική δράση των υβριδίων φωσφολιπιδίων-δινιτροανιλινών διαπιστώθηκε ότι όλα τα ανάλογα εμφανίζουν υψηλή δράση έναντι της ενδοκυττάριας αμαστιγωτής μορφής με εξαίρεση το ανενεργό TC117 (IC_{50}>50 μM), όπου η απόσταση του μορίου της τριφλουραλίνης από την πολική κεφαλή είναι μειωμένη (3C), αναδεικνύοντας για ακόμα μια φορά τη σχέση μεταξύ δραστικότητας και μήκους της αλειφατικής αλυσίδας (Πίνακας 5).

Ανάλογο	Αντιπαρασιτική δράση στην προμαστιγωτή μορφή[a]		Ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή[b]	Κυτταρο-τοξικότητα[c]	Αιμόλυση[d]	% αιμόλυση στα 100μM[e]
	L.infantum MON235	*L.donovani* MON703	*L.infantum* MON235			
HePC	23,9 ± 4,2	8,7 ± 0,7	6,7 ± 1	28,6 ± 2,5	38,3 ± 2,8	96,1
TC162	>100	8,2	3,1 ± 0,7	>500	>100	9,4
TC95	<1,5	<3,1	2,2 ± 0,2	91,1 ± 1,2	>100	47,7
TC106	42,4	<3,1	0,9 ± 0,3	>500	>100	1,6
TC117	ND	ND	>50	>500	>100	2

Πίνακας 5: *Βιολογική δράση αναλόγων αιθερικών φωσφολιπιδίων που φέρουν δακτύλιο τριφλουραλίνης.*

[a/b]Αντιλεϊσμανιακή δράση αναλόγων της μιλτεφοσίνης έναντι της προμαστιγωτής και ενδοκυττάριας αμαστιγωτής μορφής του παρασίτου. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως τιμές IC_{50} ± SEM (μM). [c]Κυτταροτοξικότητα έναντι της κυτταρικής σειράς THP1 (CC_{50} ± SEM, μM). [d]Αιμόλυση ερυθρών αιμοσφαιρίων κατά την επώση με τα ανάλογα. Η αιμόλυση εκφράζεται ως HC_{50} ± SEM και αφορά στη συγκέντρωση του αναλόγου που προκαλεί 50% αιμόλυση. [e]Ποσοστό αιμόλυσης στα 100μM αναλόγου. Οι παραπάνω τιμές αποτελούν τον μέσο όρο από τρία ανεξάρτητα πειράματα. ND: Not determined

Εξαιρετικά μειωμένη παρουσιάζεται η κυτταροτοξική δράση των παραπάνω αναλόγων με τιμές CC_{50}>500 μM. Συγκεκριμένα το ανάλογο TC106 επιδεικνύει άριστη βιολογική δράση, είναι δραστικό έναντι του παρασίτου σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (IC_{50} 0,9±0,3 μM) και παρουσιάζει ιδιαίτερα χαμηλή κυτταροτοξικότητα και αιμόλυση. Αναφορικά με την κυτταροτοξική και αιμολυτική δράση, φαίνεται ότι η αύξηση της απόστασης του μορίου της τριφλουραλίνης από την πολική κεφαλή του αναλόγου TC95, οδηγεί σε μερική απώλεια της άριστης μεμβρανοτοξικής δράσης που εμφανίζουν τα αντίστοιχα ανάλογα με τις μικρότερου μήκους αλειφατικές αλυσίδες. Στην Εικόνα 19 παρουσιάζεται η κυτταροτοξική δράση επιλεγμένων αναλόγων σε σύγκριση με τη μιλτεφοσίνη.



Εικόνα 19: *Κυτταροτοξική δράση αναλόγων έναντι της κυτταρικής σειράς THP-1. Πραγματοποιήθηκε επώαση των μακροφάγων THP-1 με 50 μM επιλεγμένων αναλόγων για 48h. Τα γραφήματα αποτελούν αντιπροσωπευτικές εικόνες από τη διπλή χρώση με PI και SYBR-14 και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.*

Τέλος, μελετήθηκε η βιολογική δράση των φθορίζοντων ανάλογων TC126, TC108 και TC163, που συνετέθησαν με σκοπό την ιχνηλάτηση των ουσιών στο ενδοκυττάριο περιβάλλον. Τα φθορίζοντα ανάλογα δεν ήταν ιδιαίτερα ενεργά στην προμαστιγωτή μορφή, επέδειξαν όμως καλή δράση έναντι της ενδοκυττάριας αμαστιγωτής, με τιμές IC_{50} 6±2 μM, 3,1±0,4 μM και 3,9±1,1 μM αντίστοιχα (Πίνακας 6). Κυρίως η παρουσία τριαζολίου που προσδίδει εξαιρετικά χαμηλή κυτταροτοξική και αιμολυτική δράση καθιστά τα παραπάνω ανάλογα ιδιαίτερα χρήσιμα στην διερεύνηση του μηχανισμού δράσης και την ανίχνευση μοριακών στόχων.

Ανάλογο	Αντιπαρασιτική δράση στην προμαστιγωτή μορφή[a]		Ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή[b]	Κυτταρο-τοξικότητα[c]	Αιμόλυση[d]	% αιμόλυση στα 100μM[e]
	L.infantum MON235	*L.donovani* MON703	*L.infantum* MON235			
HePC	23,9 ± 4,2	8,7 ± 0,7	6,7 ± 1	28,6 ± 2,5	38,3 ± 2,8	96,1
TC126	>100	>100	6 ± 2	>500	>100	7,5
TC108	21,2	9,3	3,1 ± 0,4	275,6	>100	1,8
TC163	62,2	<3,1	3,9 ± 1,1	316,5	>100	2,6

Πίνακας 6: *Βιολογική δράση φθορίζοντων αναλόγων αιθερικών φωσφολιπιδίων.*

[a/b]Αντιλεϊσμανιακή δράση αναλόγων της μιλτεφοσίνης έναντι της προμαστιγωτής και ενδοκυττάριας αμαστιγωτής μορφής του παρασίτου. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως τιμές IC_{50} ± SEM (μM). [c]Κυτταροτοξικότητα έναντι της κυτταρικής σειράς THP1 (CC_{50} ± SEM, μM). [d]Αιμόλυση ερυθρών αιμοσφαιρίων κατά την επώση με τα ανάλογα. Η αιμόλυση εκφράζεται ως HC_{50} ± SEM και αφορά στη συγκέντρωση του αναλόγου που προκαλεί 50% αιμόλυση. [e]Ποσοστό αιμόλυσης στα 100μM αναλόγου. Οι παραπάνω τιμές αποτελούν τον μέσο όρο από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Συμπέρασμα

Από το σύνολο των 55 αναλόγων της μιλτεφοσίνης που μελετήθηκαν ως προς την βιολογική τους δράση, 21 ανάλογα ήταν πιο ενεργά έναντι της προμαστιγωτής *L.infantum*, 24 ανάλογα ήταν πιο ενεργά έναντι της προμαστιγωτής *L.donovani* και 44 ανάλογα εμφάνισαν υψηλότερη αντιπαρασιτική δράση από τη μιλτεφοσίνη στην ενδοκυττάρια αμαστιγωτή *L.infantum*. Βελτιωμένη παρουσιάστηκε και η γενικότερη μεμβρανοτοξική δράση των αναλόγων, καθώς 41 ανάλογα ήταν λιγότερο κυτταροτοξικά και 53 ανάλογα ήταν λιγότερο αιμολυτικά από τη μιλτεφοσίνη.

Συνολικά, τα παραπάνω αποτελέσματα αναδεικνύουν τα σημαντικά δομικά χαρακτηριστικά που επηρεάζουν την αντιπαρασιτική δράση των αναλόγων αλλά και τις κυτταροτοξικές τους ιδιότητες. Η παρουσία δακτυλίων μεγάλου μεγέθους στη λιπιδική αλυσίδα, όπως ο δακτύλιος τριφλουραλίνης, προσδίδει στα ανάλογα εξαιρετική παρασιτοκτόνο δράση ταυτόχρονα με πολύ χαμηλή κυτταροτοξικότητα για το κύτταρο-ξενιστή. Παρόμοια χαρακτηριστικά προσδίδουν και δακτύλιοι όπως το 1,2,3-τριαζόλιο και το αδαμαντάνιο. Παρατηρήσαμε επίσης ότι τα πιο ενεργά ανάλογα φέρουν χολίνη στην πολική κεφαλή ενώ το μήκος της αλειφατικής αλυσίδας ποικίλει. Τέλος, παρατηρήσαμε ότι η δράση έναντι της προμαστιγωτής μορφής δεν είναι πάντα δείκτης της αντιπαρασιτικής δράσης έναντι του ενδοκυττάριου αμαστιγωτού. Μάλιστα, κάποια πολύ ενεργά ανάλογα απεδείχθησαν μάλλον αδρανή στα προμαστιγωτά. Είναι λοιπόν σημαντικό να χρησιμοποιείται η ενδοκυττάρια μορφή για την αποτίμηση των αντιλεϊσμανιακών ουσιών παρά τις εργαστηριακές μεθοδολογικές δυσκολίες.

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν επίσης ότι η αντιπαρασιτική δράση των αναλόγων έναντι του ενδοκυττάριου παρασίτου δεν ασκείται αποκλειστικά στο παθογόνο αλλά και στο μολυσμένο κύτταρο-ξενιστή. Προκύπτει λοιπόν η ανάγκη για συνδυαστική μελέτη των μηχανισμών παθογόνου-ξενιστή που επηρεάζουν την τελική εκρίζωση του παρασίτου και οδηγούν στην ίαση της ασθένειας. Στις επόμενες ενότητες μελετήσαμε τα ανάλογα και ως προς την επίδρασή τους στο κύτταρο-ξενιστή.

6.2. Μελέτη της ανταπόκρισης κλινικών στελεχών Λεϊσμάνιας σε επιλεγμένα ανάλογα αιθερικών φωσφολιπιδίων

Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν ότι η ανταπόκριση στα αντιπαρασιτικά φάρμακα μπορεί να διαφέρει μεταξύ εργαστηριακών και κλινικών στελεχών του παρασίτου[14, 213, 214]. Επιπρόσθετα, στην περίπτωση που τα κλινικά στελέχη απομονώνονται από περιοχή όπου η μιλτεφοσίνη δεν είχε χρησιμοποιηθεί θεραπευτικά, μπορεί η ευαισθησία τους να ποικίλει με αποτέλεσμα τη μειωμένη ανταπόκριση στην θεραπεία. Η διαφορετική ευαισθησία μπορεί να οφείλεται σε ποικιλομορφίες στους μηχανισμούς που μεσολαβούν στην πρόσληψη του φαρμάκου ή/και την αλληλεπίδρασή του με τους κυτταρικούς στόχους[215].

Μια παράμετρος που ελέγξαμε αφορά στην πρωτεΐνη LdMT (*Leishmania donovani miltefosine tranporter*). Πρόκειται για μια ATP-άση που εκφράζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και μεσολαβεί στην μετακίνηση της μιλτεφοσίνης και άλλων γλυκεροφωσφολιπιδίων, από την εξωτερική στην εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης του παρασίτου. Η παρουσία της συγκεκριμένης πρωτεΐνης διαμορφώνει την πρόσληψη και την ενεργότητα των αλκυλοφωσφοχολινών και σχετίζεται με την εμφάνιση αντοχής στη μιλτεφοσίνη[216].

Πειραματικός σχεδιασμός

Για να μελετήσουμε την πιθανότητα τα κλινικά στελέχη να εκφράζουν πιθανές ποικιλομορφίες της πρωτεΐνης LdMT, έγινε αλληλούχιση του γονιδίου LdMT σε κυκλοφορούντα κλινικά στελέχη *L. Infantum* με PCR sequencing, κατόπιν κλωνοποίησης των ενδεδειγμένων περιοχών[16,217].

Για τη μελέτη απομονώθηκαν κλινικά στελέχη από μυελό των οστών και δέρμα από νοσούντες με kala azar σκύλους. Τα κλινικά δείγματα ελήφθησαν στην Κλινική Ζώων Συντροφιάς του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (υπεύθυνος Καθ. Ε. Σαριδομιχελάκης). Συγκεκριμένα, επελέγησαν 14 σκύλοι από απομακρυσμένες γεωγραφικά περιοχές και με ικανή χρονική απόσταση νόσησης, ώστε να ελαχιστοποιηθεί μια προφανής επιδημιολογική σχέση. Απομονώθηκαν συνολικά 17 στελέχη του παρασίτου, 14 στελέχη από μυελό των οστών (στελέχη A1 και A4-A16) και 3 στελέχη από δέρμα (A14skin, A15skin και A16skin). Η απομόνωση και καλλιέργεια του παρασίτου έγινε σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που περιγράφονται στο Κεφάλαιο Υλικά & Μέθοδοι. Οι σκύλοι A15 και A16 εμφάνισαν αναζωπύρωση της νόσου μετά από θεραπεία με αλλοπουρινόλη (στελέχη A15 και A16 αντίστοιχα), ενώ τα υπόλοιπα ζώα δεν είχαν λάβει ποτέ αντιλεϊσμανιακή θεραπεία. Τα κλινικά

στελέχη που απομονώθηκαν τυποποιήθηκαν με PCR-sequencing με τη χρήση 3 δεικτών μικροδορυφόρων[218].

Η αντιλεϊσμανιακή δράση της μιλτεφοσίνης και επιλεγμένων αναλόγων έναντι των κλινικών στελεχών του παρασίτου, πραγματοποιήθηκε στην προμαστιγωτή και στην ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή, ακολουθώντας ακριβώς την ίδια μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε στα εργαστηριακά στελέχη. Για συγκριτική αντιπαράθεση μετρήθηκε η ανταπόκριση του εργαστηριακού στελέχους *L. donovani* LdMT -/- (KO) στη μιλτεφοσίνη και σε επιλεγμένα ανάλογα, καθώς και του άγριου τύπου μητρικού στέλεχους *L. donovani* LdMT +/+ (WT). Το ανθεκτικό στέλεχος KO εμφανίζει εργαστηριακή αντοχή στη μιλτεφοσίνη λόγω ελαττωματικής μετακίνησης του φαρμάκου προς το εσωτερικό του κυττάρου, που προκύπτει από την απουσία του γονιδίου του μεταφορέα LdMT.

Αποτελέσματα

Η μοριακή τυποποίηση των κλινικών στελεχών έδειξε ότι τα στελέχη *L.infantum* από διαφορετικούς σκύλους δεν σχετίζονται κλωνικά μεταξύ τους. Όμως τα στελέχη που απομονώθηκαν από το δέρμα και τον μυελό του ίδιου ξενιστή είναι πανομοιότυπα (A14 και A14skin, A15 και A15skin, A16 και A16skin). Η παραπάνω μέθοδος βασίζεται στη συγκριτική ανάλυση προϊόντων PCR από τρεις πυρηνικές μη κωδικοποιητικές αλληλουχίες DNA που περιέχουν πολυμορφικούς μικροδορυφόρους, έχει υψηλή διακριτική ικανότητα και είναι κατάλληλη για τον χαρακτηρισμό στελεχών που μπορεί να συνδέονται στενά μεταξύ τους.

Κατά την αλληλούχιση του γονιδίου LdMT στα κλινικά στελέχη *L.infantum* που απομονώθηκαν από τους μολυσμένους σκύλους δεν ανιχνεύθηκαν σημειακές μεταλλάξεις σε κανένα από τα δύο αλλήλια, που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε απώλεια της λειτουργικότητας της LdMT πρωτεΐνης ή σε μειωμένη συγγένεια προς τα υποστρώματα.

Ωστόσο, η αποτίμηση της δράσης επιλεγμένων ανάλογων ανέδειξε σημαντικές διαφορές στην ευαισθησία των κλινικών στελεχών στη μιλτεφοσίνη αλλά και στα ανάλογα που χρησιμοποιήθηκαν, τόσο στην προμαστιγωτή όσο και στην ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή. Η επιλογή των αναλόγων που χρησιμοποιήθηκαν έγινε βάσει των πολύ ικανοποιητικών αποτελεσμάτων που επέδειξαν κατά την αποτίμηση της δραστικότητας έναντι των εργαστηριακών στελεχών του παρασίτου, σε συνδυασμό με χαμηλή κυτταροτοξική και αιμολυτική δράση. Τα αποτελέσματα της δράσης των αναλόγων στην προμαστιγωτή μορφή συνοψίζονται στον Πίνακα 7.

Αντιπαρασιτική δράση στην προμαστιγωτή μορφή											
	HePC	**TCAN26**	**TC52**	**TC19**	**TC95**		**HePC**	**TCAN26**	**TC52**	**TC19**	**TC95**
LEM235	23,9 ± 4,2	6,7±2,4	36	1,4 ±0,2	<1,5	**A10**	9,3	2,8	ND	ND	ND
WT	5,8	<3,1	>100	<3,1	<3,1	**A11**	12,7	5,8	ND	ND	ND
KO	58,3	54,1	>100	49,4	30,6	**A12**	11,2	5,4	ND	ND	ND
A1	13,9	0,8	58,5	ND	ND	**A13**	12,8	3,5	ND	ND	ND
A4	13,9 ± 1,6	3,7±1,5	>100	ND	ND	**A14**	11,7	6,1	ND	ND	ND
A5	13,8	6,4	>100	ND	ND	**A14sk**	10,8	ND	>100	ND	ND
A6	11,7	5,8	>100	ND	ND	**A15**	12,4	4,0	ND	ND	ND
A7	3,3	1,4	>100	ND	ND	**A15sk**	9,4	ND	>100	ND	ND
A8	9,7	4	>100	ND	ND	**A16**	48,5	10,3	>100	ND	ND
A9	10,3	4,3	>100	ND	ND	**A16sk**	42,6	8,6	>100	ND	ND

Πίνακας 7: *Αντιπαρασιτική δράση της μιλτεφοσίνης και επιλεγμένων αναλόγων έναντι της προμαστιγωτής μορφής κλινικών στελεχών L.infantum, σε συγκριτική αντιπαράθεση με τα εργαστηριακά στελέχη LEM235, WT και KO . Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως τιμές IC_{50} (μM). ND: Not determined*

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι όλα τα κλινικά στελέχη στην προμαστιγωτή μορφή είναι πιο ευαίσθητα από το εργαστηριακό στέλεχος στη μιλτεφοσίνη περίπου κατά 2 φορές, με τιμές IC_{50} που κυμαίνονται μεταξύ 9 μM και 14μM. Αρκετά πιο ευαίσθητο στη μιλτεφοσίνη εμφανίζεται μόνο το στέλεχος A7 με IC_{50} στα 3,3 μM. Εξαίρεση αποτελεί το στέλεχος A16 το οποίο προέρχεται από αναζωπύρωση της νόσου μετά από θεραπεία με αλλοπουρινόλη και εμφανίζεται γενικά πιο ανθεκτικό στη μιλτεφοσίνη αλλά και στο ανάλογο TCAN26 σε σύγκριση με όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν.

Αντίστοιχα, τα κλινικά στελέχη ανταποκρίνονται με διαφορετικό τρόπο στην επίδραση με το ανάλογο TCAN26, ωστόσο στην πλειοψηφία τους εμφανίζουν παρόμοια ευαισθησία με το εργαστηριακό στέλεχος LEM235. Εξαίρεση αποτελεί και πάλι το στέλεχος A16, το οποίο παρουσιάζει υψηλότερη τιμή IC_{50} σε σύγκριση με το στέλεχος LEM235. Η μικρότερη τιμή IC_{50} καταγράφεται για το στέλεχος A1 που εμφανίζεται γενικά πιο ευαίσθητο σε όλες τις συνθήκες επώασης που δοκιμάστηκαν.

Παρόμοια δράση σε όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν εμφανίζει το ανάλογο TC52, που είναι ανενεργό στην προμαστιγωτή μορφή του παρασίτου. Με εξαίρεση και πάλι το στέλεχος A1 που δείχνει κάποια ευαισθησία με IC_{50} στα 58,5μM, όλα τα υπόλοιπα στελέχη έχουν IC_{50}>100μM.

Τέλος, ιδιαίτερα ευαίσθητο στη μιλτεφοσίνη παρουσιάζεται το στέλεχος WT, σε αντίθεση με το ανθεκτικό στέλεχος KO, το οποίο όπως αναμένεται έχει τιμή IC_{50} στα 58,3 μM.

Τα παραπάνω στελέχη εμφανίζουν παρόμοια ανταπόκριση και στα ανάλογα αιθερικών φωσφολιπιδίων, με το στέλεχος KO να επιδεικνύει χαμηλού βαθμού ευαισθησία σε όλα τα ανάλογα αιθερικών φωσφολιπιδίων που δοκιμάστηκαν σε σύγκριση με τα προμαστιγωτά άγριου τύπου WT, επιβεβαιώνοντας έτσι την σημαντικότητα των μεταλλάξεων του γονιδίου LdMT που οδηγούν στην απενεργοποίηση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης και κατ'επέκταση στην ελλατωματική πρόσληψη του φαρμάκου και τη μείωση της παρασιτοκτόνου δράσης.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η δράση των αναλόγων στην ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή των κλινικών στελεχών, που όπως αναφέρθηκε νωρίτερα αντικατοπτρίζει σε μεγαλύτερο βαθμό την κλινική μορφή του παρασίτου. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 8, υπάρχει μεγάλη ποικιλία στην ανταπόκριση του κάθε στελέχους σε καθένα από τα ανάλογα και στην ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή, αφού οι τιμές IC_{50} για το ίδιο ανάλογο είναι πολύ διαφορετικές μεταξύ των στελεχών. Επιπρόσθετα φαίνεται ότι το εργαστηριακό στέλεχος παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία στα ενεργά ανάλογα σε σχέση με τα κλινικά στελέχη.

	Αντιπαρασιτική δράση στην ενδοκυττάρια αμστιγωτή μορφή				
	HePC	**TCAN26**	**TC52**	**TC19**	**TC95**
LEM 235	6,7 ± 1	0,03 ± 0,02	9,3 ± 1	0,7 ± 0,4	2,2 ± 0,2
WT	1,3 ± 0,1	0,2 ± 0,05	5 ± 0,7	1,4 ± 0,2	3,9 ± 1,2
KO	14,8 ± 0,8	1,1 ± 0,2	10 ± 1,6	5,4 ± 0,1	4,1 ± 1
A1	1,2 ± 0,7	0,1	4,1 ± 0,3	1,5 ± 1,2	ND
A4	2,7 ± 0,4	1,1	5,1 ± 1,9	3,9 ± 2,3	ND
A5	7,3 ± 0,6	0,7±0,2	6,3 ± 0,4	3,4 ± 0,6	ND
A6	4,4 ± 0,6	0,5±0,4	3,9 ± 0,5	2,6 ± 0,6	ND
A7	4,3 ± 0,2	0,2	4,5	2,5 ± 0,3	ND
A8	6,2 ± 0,3	0,8	4,0	2,9 ± 1,6	ND
A9	6,9 ± 1,6	3,4	39,7	13,6 ± 3,6	ND
A10	3,2 ± 0,5	3,5 ± 3,2	4,2 ± 3,5	3,1 ± 0,3	ND
A11	4,1 ± 0,3	0,5 ± 0,1	7,3	5,5 ± 1,4	ND
A12	5,9 ± 1,8	0,9 ± 0,6	2,6 ± 1,4	2,3 ± 0,4	ND
A13	3,7 ± 0,4	0,8	5,7 ±0,1	6,5 ± 3,5	ND
A14	3,02 ± 0,4	0,4 ± 0,04	4,5	3,8 ± 1,4	ND
A14 sk	3,3 ± 0,5	0,6 ± 0,3	10,6	5 ± 0,2	ND
A15	2,2 ± 0,5	0,66 ± 0,36	2,99	2,1 ± 0,4	ND
A15 sk	2,7 ± 0,7	0,36 ± 0,01	10,6	3,4 ± 0,9	ND
A16	4,7 ± 1,5	0,27 ± 0,04	9,1 ± 0,9	4,8 ± 0,3	ND
A16 sk	1,7 ± 0,3	0,35 ± 0,1	9,4 ±3,2	3 ± 0,1	ND

Πίνακας 8: *Αντιπαρασιτική δράση της μιλτεφοσίνης και επιλεγμένων αναλόγων έναντι της ενδοκυττάριας αμαστιγωτής μορφής κλινικών στελεχών L.infantum, σε συγκριτική αντιπαράθεση με τα εργαστηριακά στελέχη LEM235, WT και KO . Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως τιμές IC_{50} (μM).*

Στην πλειοψηφία τους τα κλινικά στελέχη εμφανίζουν μεγάλη ευαισθησία στο ανάλογο TCAN26. Το συγκεκριμένο ανάλογο είναι πιο ενεργό από τη μιλτεφοσίνη σε όλα τα στελέχη και κατέχει τιμές IC_{50} που κυμαίνονται μεταξύ 0,1 μM και 0,9 μM. Αντίστοιχα, διαφορετική ανταπόκριση παρουσιάζουν όλα τα κλινικά στελέχη και στο ανάλογο TC19, με τιμές IC_{50} που κυμαίνονται μεταξύ 1,5 μM και 13,5 μM. Τέλος το λιγότερα ενεργό ανάλογο TC52 είναι πιο αποτελεσματικό έναντι των κλινικών στελεχών σε σχέση με το εργαστηριακό στέλεχος.

Φαίνεται ότι και στην ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή, το στέλεχος A1 είναι το πιο ευαίσθητο κλινικό στέλεχος που απομονώθηκε, αφού οι τιμές IC_{50} για τα ενεργά ανάλογα και τη μιλτεφοσίνη είναι οι χαμηλότερες που καταγράφονται μεταξύ των στελεχών. Παρατηρήθηκε επίσης ότι οι τιμές IC_{50} των στελεχών που προέρχονται είτε από τον μυελό των οστών είτε από δέρμα, ποικίλουν για κάθε ανάλογο και στις δυο μορφές του παρασίτου.

Η μόλυνση των μακροφάγων THP1 με το ανθεκτικό στέλεχος KO και η επίδραση με μιλτεφοσίνη και τα επιλεγμένα ανάλογα, αναδεικνύει υψηλότερη ευαισθησία του στελέχους κατά την επώαση με τα ανάλογα σε σύγκριση με τη μιλτεφοσίνη. Συγκεκριμένα, το στέλεχος KO εμφανίζεται 13,4 φορές πιο ευαίσθητο στο TCAN26, 2,7 φορές πιο ευαίσθητο στο TC19, 3,6 φορές πιο ευαίσθητο στο ανάλογο TC95 και 1,5 φορές πιο ευαίσθητο στο λιγότερα ενεργό ανάλογο TC52, συγκριτικά με τη μιλτεφοσίνη.

Συμπέρασμα

Δεκαεπτά κλινικά στελέχη δοκιμάστηκαν έναντι επιλεγμένων αναλόγων και της μιλτεφοσίνης. Για την αποτίμηση επιλέξαμε από τις ομάδες αναλόγων με διαφορετική χημική τροποποίηση στο λιπιδικό μέρος, ένα αντιπροσωπευτικό ανάλογο με ισχυρή αντιπαρασιτική δράση έναντι του ενδοκυττάριου αμαστιγωτού, σε συνδυασμό με τη χαμηλότερη για την ομάδα κυτταροτοξικότητα: το TC52 που περιέχει δακτύλιο τριαζολίου, το TCAN26 που περιέχει δακτύλιο αδαμαντανίου και το TC19 που φέρει κυκλοαλκάνιο. Παρατηρήσαμε μια διακύμανση ως προς την ανταπόκριση στα φάρμακα, κυρίως έναντι του TC52 για το οποίο το IC_{50} στην ενδοκυττάρια μορφή κυμαίνεται μεταξύ 2,6 μM και 10 μM. Τα 17 διαφορετικά στελέχη που δοκιμάσαμε παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία επιλεκτικά σε διαφορετικά ανάλογα, ενώ το στέλεχος A10 ανταποκρίνεται ομοιόμορφα και στα τέσσερα ανάλογα. Παρατηρήσαμε επίσης ότι τα δυο ισογενή στελέχη A14 (A14 και A14skin), όπως επίσης και τα αντίστοιχα A15, διαφέρουν ως προς την ανταπόκρισή τους έναντι του TC52 όχι όμως έναντι των άλλων αναλόγων. Το στέλεχος που απομονώθηκε από δερματική βλάβη του ζώου και στις δυο περιπτώσεις εμφανίζει μειωμένη ευαισθησία σε σχέση με το στέλεχος από το μυελό. Αυτό το αποτέλεσμα ήταν η πρώτη ένδειξη ότι λεπτές διαφορές σε μηχανισμούς προσαρμογής, σε

γονοτυπικά όμοια ισογενή στελέχη, μπορούν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της επίδρασης ορισμένων αναλόγων.

Δεδομένου ότι δεν ανιχνεύεται πολυμορφισμός στο γονίδιο του μεταφορέα της μιλτεφοσίνης, της ATPase LdMT, δεν μπορούμε να αποδώσουμε τις διαφοροποιήσεις στην ευαισθησία έναντι των διαφορετικών αναλόγων σε διαφορές στην αλληλεπίδραση με τον μεταφορέα του φαρμάκου στο κύτταρο. Αυτό διαφαίνεται από την ανταπόκριση του LdMT -/- knockout στελέχους σε σύγκριση με το μητρικό LdMT +/+ WT στα τέσσερα ανάλογα του Πίνακα 9. Η τιμή IC_{50} της μιλτεφοσίνης για το LdMT-/- είναι 11,4 φορές μεγαλύτερη από το στέλεχος WT, του TCAN26 5,5 φορές, του TC52 είναι 2 φορές και του TC19 είναι 3,8 φορές μεγαλύτερη σε σύγκριση με το στέλεχος WT. Με ενδιαφέρον παρατηρήσαμε ότι το TC95, ανάλογο με τριφλουραλίνη στη λιπιδική αλυσίδα, επιδρά και στα δυο στελέχη με την ίδια συγκέντρωση IC_{50}. Αυτά τα αποτελέσματα ερμηνεύτηκαν από μεταγενέστερες μελέτες της ομάδας του Castanys *et al*, που έδειξαν ότι υπάρχει και εναλλακτική ATPase με δράση flippase, το υπόστρωμα της οποίας είναι φωσφολιπίδια. Τα αποτελέσματά μας που περιγράφονται στην ενότητα 6.6 επιβεβαιώνουν ότι υπάρχει εξειδίκευση στην χρησιμοποίηση αυτών των δυο μεταφορέων από τα ανάλογα φωσφολιπιδίων[196].

Συμπερασματικά, το τελικό παρασιτοκτόνο αποτέλεσμα καθορίζεται τόσο από τον συνδυασμό της χημικής δομής του φαρμάκου όσο και των βιοτυπικών χαρακτηριστικών του κάθε στελέχους. Εκτός από τον μηχανισμό εισόδου στα κύτταρα που μπορεί να διαφέρει ανάμεσα στα ανάλογα, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε και άλλα κυτταρικά ή μοριακά χαρακτηριστικά που πιθανόν να συμβάλλουν στο τελικό αποτέλεσμα.

6.3. Μελέτη του μηχανισμού δράσης των αναλόγων αιθερικών φωσφολιπιδίων

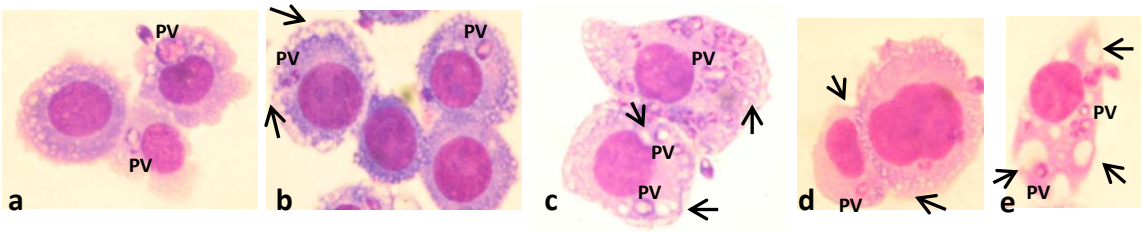
Η ολοκλήρωση της μελέτης της βιολογικής δράσης των αναλόγων έφερε στο φως ένα σημαντικό αριθμό αντιπαρασιτικών ουσιών που συνδυάζουν μέγιστη αντι-λεϊσμανιακή και βέλτιστη κυτταροτοξική δράση και ανέδειξε τη διαφορά δράσης πολλών αναλόγων μεταξύ προμαστιγωτού και ενδοκυττάριου αμαστιγωτού. Η πλειοψηφία των αναλόγων κατέχει υψηλότερη αντιλεϊσμανιακή δράση από τη μιλτεφοσίνη στην ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή, ωστόσο πολλά από τα ανενεργά ανάλογα στην προμαστιγωτή μορφή, επέδειξαν υψηλή αντι-λεϊσμανιακή δράση έναντι του ενδοκυττάριου παρασίτου.

Όπως προναναφέρθηκε, η χρησιμοποίηση του ενδοκυττάριου μοντέλου μακροφάγου-παρασίτου αποτελεί την πιο σωστή επιλογή για την αποτίμηση της αντι-παρασιτικής δράσης ουσιών, δεδομένου ότι αντικατοπτρίζει τη φυσική θέση του παρασίτου[219, 220], προσμετρώντας σημαντικές πλευρές της βιολογίας του, όπως η αλληλεπίδραση με τον ξενιστή και η προσβασιμότητα του στόχου από ουσίες που δεν μπορούν να διαπεράσουν την κυτταροπλασματική μεμβράνη του κυττάρου-ξενιστή ή αδυνατούν να διατηρήσουν τη σταθερότητά τους κάτω από συνθήκες χαμηλού pH. Επιπρόσθετα, άλλες ουσίες πρέπει να μεταβολιστούν από το μακροφάγο για να αποκτήσουν αντιπαρασιτική δράση ή το ίδιο το μακροφάγο μπορεί να στοχεύεται άμεσα, οδηγώντας έτσι σε αναστολή της ανάπτυξης του παρασίτου[221].

Συνυπολογίζοντας τα παραπάνω, καθώς και τις διαφορές που επέδειξαν τα κλινικά στελέχη στην ανταπόκριση σε επιλεγμένα ανάλογα, μας οδήγησαν στην αναζήτηση των μηχανισμών που εμπλέκονται και οδηγούν στο τελικό παρασιτοκτόνο αποτέλεσμα. Παράμετροι κυτταρικού θανάτου, όπως η διαδικασία της αυτοφαγίας, η απόπτωση, η απώλεια του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης και η επαγωγή του οξειδωτικού στρες, μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας επιλεγμένα ενεργά ανάλογα. Επιπλέον, επιχειρήθηκε η παρακολούθηση της ενδοκυττάριας κατανομής του φαρμάκου με τη χρήση φθοριζόντων αναλόγων.

6.3.1. Μελέτη του σχηματισμού ενδοκυττάριων κυστιδίων και επαγωγή αυτοφαγίας

Κατά την αποτίμηση της δράσης των αναλόγων στην ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή παρατηρήσαμε την ύπαρξη πολυάριθμων κυστιδίων στο κυτταρόπλασμα των μακροφάγων και σε κοντινή απόσταση από το παρασιτοφόρο κυστιδίο (Εικόνα 20), η παρουσία των οποίων παρατηρήθηκε λεπτομερέστερα με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.



Εικόνα 20: *Μολυσμένα κύτταρα THP1 υπό την επίδραση επίδραση επιλεγμένων αναλόγων στις αντίστοιχες τιμές IC_{50} έναντι του ενδοκυττάριου παρασίτου για 48h. [a]control, [b]HePC, [c]TC52, [d-e]TCAN26.*

PV: παρασιτοφόρο κυστίδιο. Παρατηρείται ότι κατά την επώαση με τα ανάλογα δημιουργούνται πολυάριθμα κυστίδια στο κυτταρόπλασμα των μακροφάγων (βέλη), τα οποία συχνά βρίσκονται σε κοντινή απόσταση από το παρασιτοφόρο κυστίδιο, πιθανόν ως μέρος του μηχανισμού εκρίζωσης του παρασίτου.

Στη συνέχεια μελετήσαμε αν η εμφάνιση των πολυάριθμων κυστιδίων στο κυτταρόπλασμα των μακροφάγων σχετίζεται με το φαινόμενο της αυτοφαγίας και κατά πόσο η ενδεχόμενη επαγωγή της αυτοφαγίας αποτελεί μέρος του μηχανισμού δράσης των αναλόγων. Αν και η αυτοφαγία θεωρείται ότι αποτελεί μια διαδικασία επιβίωσης, εν τούτοις έχει την δυνατότητα να προάγει τον κυτταρικό θάνατο αν δεν ελεγχθεί σωστά. Έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί μηχανισμό άμυνας έναντι πολλών ενδοκυττάριων παθογόνων, προωθώντας την αποδόμηση βακτηρίων, ιών και παρασίτων[222].

Πειραματικός σχεδιασμός

Η παρουσία των ενδοκυττάριων κυστιδίων παρατηρήθηκε αρχικά με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Μολυσμένα και μη μολυσμένα THP1 επωάστηκαν με HePC ή το ανάλογο TC52 για 48h σε συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο IC_{50} έναντι του ενδοκυττάριου παρασίτου. Κατόπιν ακολούθησε διαδικασία μονιμοποίησης των κυττάρων, χρώση με τετροξείδιο του οσμίου, έγκλειση σε ρητίνη και παρατήρηση στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης, όπως αναφέρεται αναλυτικά στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.

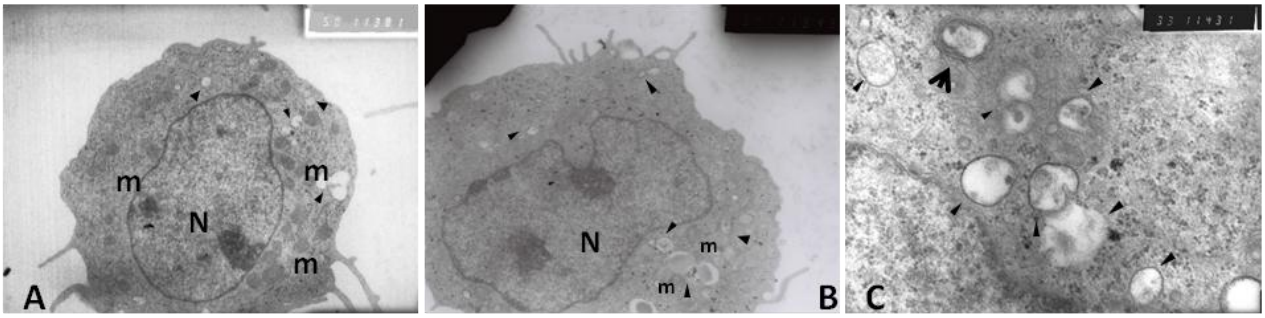
Στη συνέχεια μελετήσαμε την επαγωγή αυτοφαγίας κατά την επώαση μολυσμένων και μη μολυσμένων μακροφάγων με επιλεγμένα ανάλογα, χρησιμοποιώντας τη φθορίζουσα ουσία monodancylcadaverine (MDC). Το MDC φαίνεται να συσσωρεύεται επιλεκτικά στο εσωτερικό των αυτοφαγικών κυστιδίων και μάλιστα ο μπλε φθορισμός του γίνεται φωτεινότερος σε όξινο περιβάλλον, δηλαδή στη σύντηξη του αυτοφαγωσώματος με το λυσόσωμα και γι'αυτό έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης σε μελέτες αυτοφαγίας[17, 223]. Διαφοροποιημένα κύτταρα THP1 μολύνθηκαν με *L.infantum* (στέλεχος A1). Κατόπιν τα κύτταρα επωάστηκαν με 10 μM επιλεγμένων αναλόγων για 7h, 24h και 48h. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα ανάλογα TCAN26, TC19, TC52 και TC95, τα οποία επιλέχθηκαν βάσει της εξαιρετικής αντιλεϊσμανιακής και χαμηλής κυτταροτοξικής δράσης που επέδειξαν στις *in vitro* δοκιμασίες, συγκριτικά με τη μιλτεφοσίνη αλλά και διότι ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες ως προς τον δακτύλιο της αλειφατικής αλυσίδας. Η επαγωγή της αυτοφαγίας σε μη μολυσμένα κύτταρα THP-1 μελετήθηκε μετά από επώαση με τα επιλεγμένα ανάλογα στις 24h και 48h. Ακολούθησε παρατήρηση των κυττάρων σε μικροσκόπιο φθορισμού και ποσοτικοποίηση του φθορισμού του MDC χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ImageJ v1.45. Η ένταση του φθορισμού (FI) όλων

των κυστιδίων ανά 100 κύτταρα μετατράπηκε σε Arbitrary units (AU), κατόπιν ανάλυσης του ιστογράμματος φθορισμού κάθε φθορίζοντος κυστιδίου. Η χρήση των AU έχει αναφερθεί σε πολλές μελέτες όπου φθορίζοντα μόρια χρησιμοποιούνται για την ποσοτικοποίηση της δράσης ή των ιδιοτήτων των κυττάρων[224]. Η ειδικότητα του φαινομένου μελετήθηκε περαιτέρω χρησιμοποιώντας τον αναστολέα της αυτοφαγίας 3-methyladenine (3-MA).

Προκειμένου να διερευνηθεί αν τα κυστίδια που παρατηρήσαμε στα παραπάνω πειράματα συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα ή ωριμάζουν και ενώνονται με τα λυσοσσώματα με σκοπό στη συνέχεια να αποδομηθούν, μελετήθηκε η παρουσία των πρωτεϊνών LAMP-1 και LAMP-2. Οι πρωτεΐνες LAMP αποτελούν βασικό συστατικό της λυσοσσωμιακής μεμβάνης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτης ωρίμανσης των αυτοφαγοσωμάτων[225]. Για τον λόγο αυτό έγινε χρώση μη μολυσμένων και μολυσμένων THP1 κυττάρων μετά από επώαση με HePC και το ανάλογο TC95 για 24h με αντισώματα έναντι των συγκεκριμένων πρωτεϊνών και ακολούθησε παρατήρηση με μικροσκόπιο φθορισμού.

Αποτελέσματα

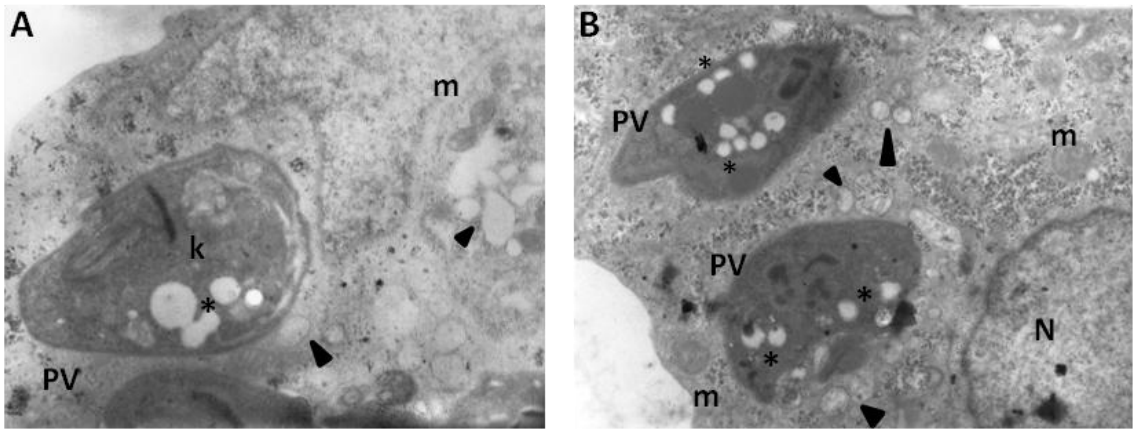
Ο σχηματισμός των ενδοκυττάριων κυστιδίων που παρατηρήθηκε γενικότερα κατά την επίδραση των αναλόγων σε μολυσμένα και μη μολυσμένα κύτταρα, μελετήθηκε λεπτομερέστερα με τη χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Παρατηρήθηκε καταρχήν ότι η επώαση των μακροφάγων κυττάρων THP1 με μιλτεφοσίνη και το ανάλογο TC52 αυξάνει την παρουσία των ενδοκυττάριων κυστιδίων που φέρουν περιεχόμενο (Εικόνα 21)



Εικόνα 21: *Μη μολυσμένα κύτταρα THP1. Τα βέλη υποδεικνύουν την παρουσία διάφορων ειδών κυστιδίων, άδεια ή με περιεχόμενο. N=πυρήνας, m=μιτοχόνδρια.* ***A:*** *Απουσία φαρμάκου παρατηρείται η ύπαρξη κυστιδίων, με περιεχόμενο ή χωρίς, τα οποία πιθανόν αποτελούν μέρος της φυσιολογικής αυτοφαγικής διαδικασίας του κυττάρου.* ***B****: Η επώαση με 1x IC_{50} HePC φαίνεται να αυξάνει την δημιουργία κυστιδίων τα οποία φέρουν στο εσωτερικό τους κάποιο περιεχόμενο, ωστόσο το κύτταρο συνολικά φαίνεται να είναι σε καλή κατάσταση.* ***C:*** *Η επώαση με 1x IC_{50} TC52 επάγει σε εντονότερο*

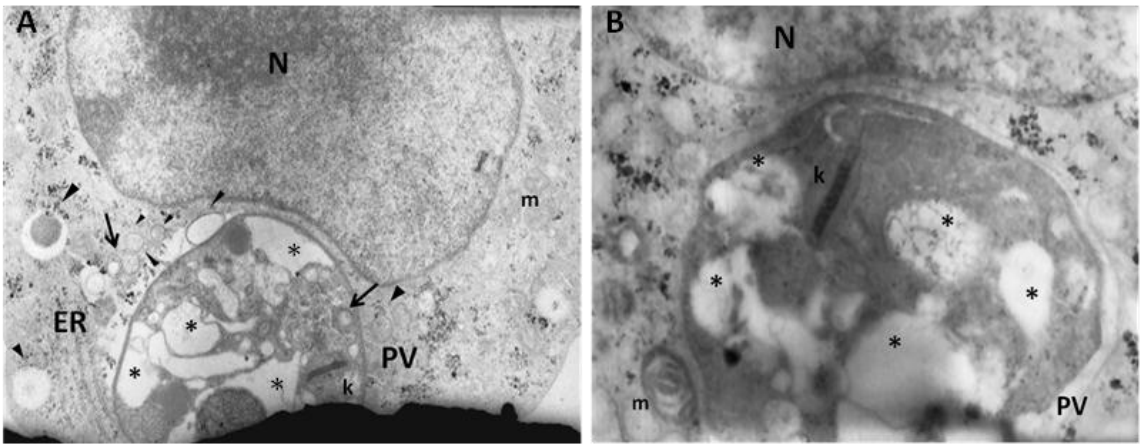
βαθμό την δημιουργία ενδοκυττάριων κυστιδίων. Παρατηρείται επίσης κυστίδιο με πολλαπλή μεμβράνη (μεγάλο βέλος).

Η μόλυνση των μακροφάγων με *L.infantum* φαίνεται να προάγει τη δημιουργία κυστιδίων, τόσο στο εσωτερικό του παρασιτοφόρου κυστιδίου, όσο και στο κυτταρόπλασμα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 22.



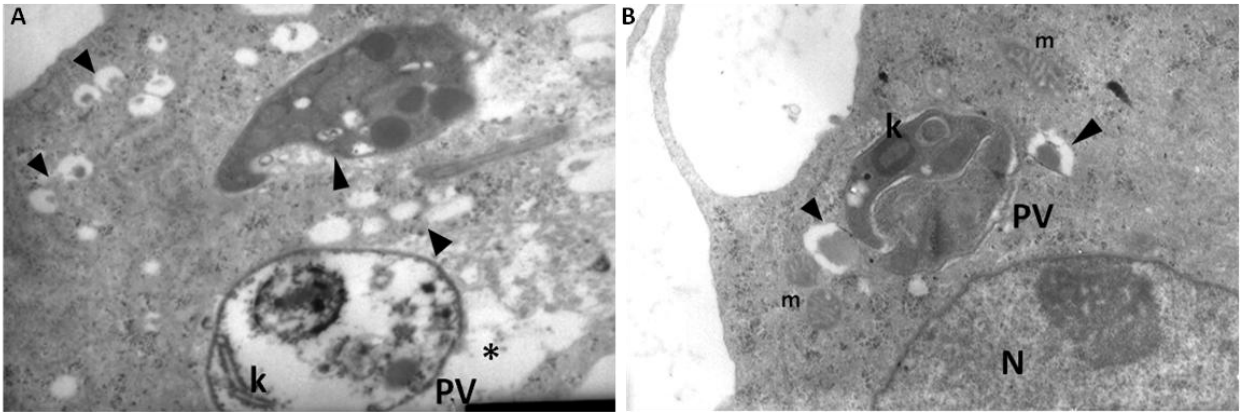
Εικόνα 22 A-B: *Μολυσμένα κύτταρα THP1 με L.infantum. Τα βέλη υποδεικνύουν την παρουσία διάφορων ειδών κυστιδίων, άδεια ή με περιεχόμενο. N=πυρήνας, m=μιτοχόνδρια, PV=παρασιτοφόρο κυστίδιο, k= κινετοπλάστης.*

Η επώαση μολυσμένων μακροφάγων με HePC φαίνεται να επάγει σε μεγάλο βαθμό τη δημιουργία κυστιδίων στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων και ιδιαίτερα σε κοντινή απόσταση από το παρασιτοφόρο κυστίδιο, όπως φαίνεται στην Εικόνα 23 (βέλη). Επιπρόσθετα, στο εσωτερικό του παρασιτοφόρου κυστιδίου φαίνεται ότι η παρουσία μεγάλων κυστιδίων που περιέχουν υπολείμματα μεμβρανών (*), έχουν διαδραματίσει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην εξάλειψη του παρασίτου. Παρατηρούνται επίσης κυστίδια και δομές με διπλή μεμβράνη που παραπέμπουν σε αυτοφαγοσώματα (μεγάλο βέλος).



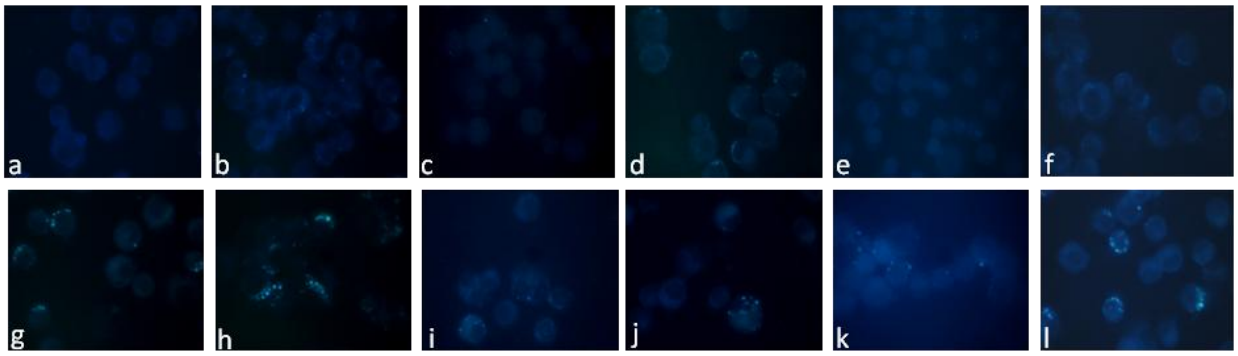
Εικόνα 23 A-B: *Μολυσμένα κύτταρα THP1, κατά την επώαση με 1x IC_{50} HePC. N=πυρήνας, m=μιτοχόνδρια, ER=ενδοπλασματικό δίκτυο, PV=παρασιτοφόρο κυστίδιο, k=κινετοπλάστης.*

Κατά την επώαση με TC52 (Εικόνα 24), παρατηρείται και πάλι έντονη παρουσία κυστιδίων, άδεια ή με περιεχόμενο, στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων μακροφάγων (βέλη). Στην Εικόνα 24A αποτυπώνεται η επαγωγή κυστιδίων μέσα στο αμαστιγωτό σε πρώιμο στάδιο, όπου το παράσιτο μοιάζει ζωντανό και δεν φαίνεται να έχει ακόμα αποδομηθεί. Λίγο πιο κάτω παρατηρείται ένα νεκρό αμαστιγωτό, με κατεστραμμένο πυρήνα και κινετοπλάστη, το εσωτερικό του οποίου είναι σχεδόν άδειο, πιθανόν ως αποτέλεσμα της προηγούμενης μεγάλης συσσώρευσης κυστιδίων. Και σε αυτήν την περίπτωση, είναι εμφανής η δημιουργία κυστιδίων γύρω από το αμαστιγωτό, αντιπροσωπεύοντας ίσως την έναρξη του φαινομένου της αυτοφαγικής διαδικασίας, με σκοπό την αποδόμηση και την εξάλειψη του ενδοκυττάριου παρασίτου (Εικόνα 24B).



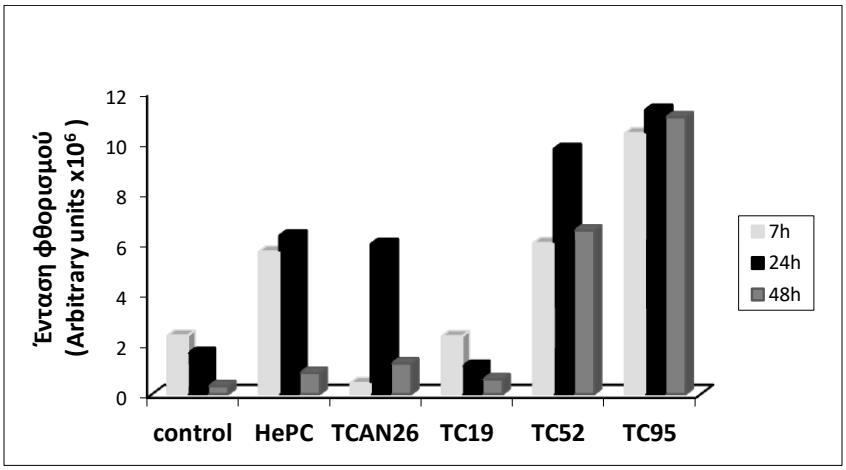
Εικόνα 24 A-B: *Μολυσμένα κύτταρα THP1, κατά την επώαση με 1x IC_{50} TC52. N=πυρήνας, m=μιτοχόνδρια, PV=παρασιτοφόρο κυστίδιο, k=κινητοπλάστης.*

Συνεχίζοντας τη μελέτη των ενδοκυττάριων κυστιδίων και κατόπιν χρώσης με MDC, παρατηρήθηκε αρχικά ότι η μόλυνση με *Leishmania* αυξάνει σημαντικά τόσο τον αριθμό των κυστιδίων στα THP1, όσο και την ένταση φθορισμού τους (Εικόνα 25). Επιπρόσθετα η επώαση με τα επιλεγμένα ανάλογα έχει διαφορετική δράση στη συσσώρευση του MDC μέσα σε κυστίδια ήδη από τις 24h.



Εικόνα 25: *Σήμανση ενδοκυττάριων κυστιδίων με MDC. Απεικονίζονται μη μολυσμένα (a-f) και μολυσμένα (g-l) κύτταρα THP1 μετά από 24h επώασης με 10 μM επιλεγμένων αναλόγων. [a/g]control, [b/h]HePC, [c/i]TCAN26, [d/j]TC19, [e/k]TC52, [f/l]TC95.*

Η πορεία της επαγωγής του σχηματισμού των παραπάνω κυστιδίων σε μολυσμένα κύτταρα THP1 μελετήθηκε περαιτέρω καταγράφοντας τη συσσώρευση του MDC μέσα σε κυστίδια μετά από επώαση με τα ανάλογα για 7h, 24h και 48h. Η ένταση του φθορισμού στα συγκεκριμένα χρονικά σημεία ποσοτικοποιήθηκε σε AU, και έγινε σύγκριση με την ένταση του φθορισμού που παρατηρείται στα μη μολυσμένα κύτταρα στις 48h.

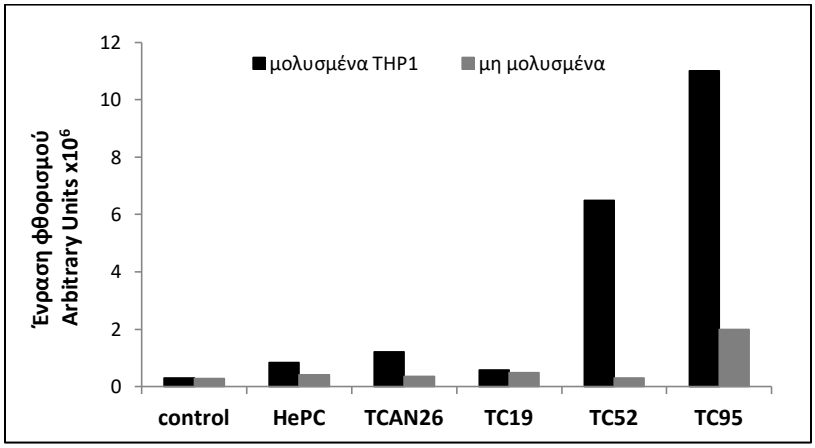


Γράφημα 3: *Προσδιορισμός της έντασης φθορισμού των ενδοκυττάριων κυστιδίων μετά από χρώση με MDC, κατά την επώαση με 10 μM επιλεγμένων αναλόγων σε μολυσμένα THP1 για 7h, 24h και 48h.*

Όπως φαίνεται στο Γράφημα 3 στις πρώτες ώρες επώασης των μολυσμένων κυττάρων με τα ανάλογα παρατηρείται έντονη συσσώρευση MDC μέσα σε κυστίδια, που φαίνεται να κορυφώνεται στις 24h, και κατόπιν επιστρέφει σε χαμηλότερα επίπεδα στις 48h. Ωστόσο, το ενεργό ανάλογο TC19 δεν φαίνεται να επάγει σε σημαντικό βαθμό την αυτοφαγία σε κανένα από τα χρονικά σημεία που μελετήθηκαν, σε αντίθεση με το επίσης ενεργό ανάλογο TC95, το οποίο προκαλεί σημαντική αύξηση της έντασης φθορισμού του MDC σε όλα τα χρονικά σημεία. Στο σημείο αυτό θα πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι κανένα από τα δύο ανάλογα δεν

είναι κυτταροτοξικά, καθώς κατέχουν τιμές CC_{50}>500 μM και 91,1±1,2 μM αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, το ανάλογο TC52 που είναι λιγότερο ενεργό από τη μιλτεφοσίνη,κατέχει όμως εξαιρετικό κυτταροτοξικό προφίλ με CC_{50}>500 μM, διατηρεί σε υψηλά επίπεδα τη συσσώρευση του MDC καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

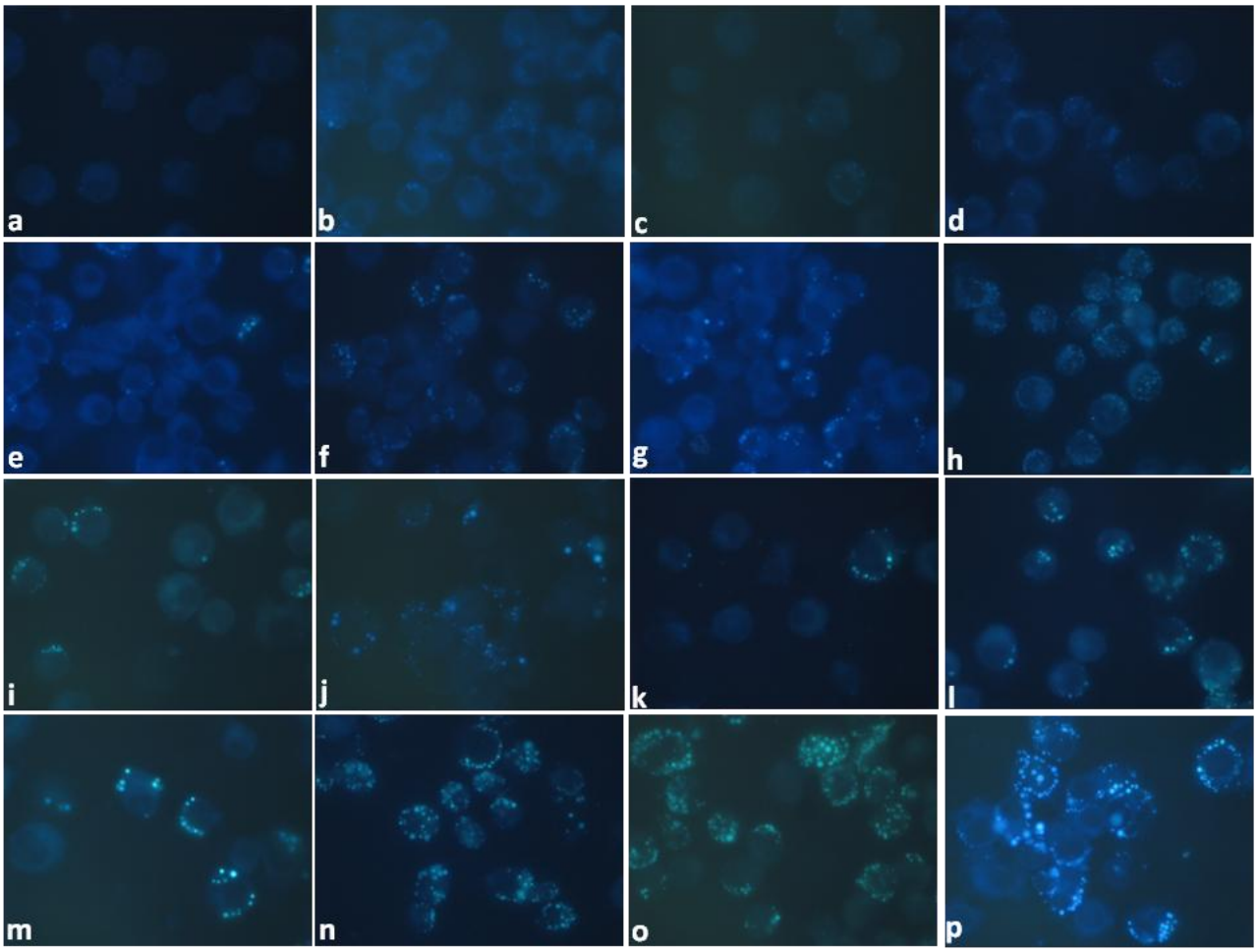
Στα μη μολυσμένα κύτταρα, παρατηρείται ότι η συσσώρευση του MDC στις 48h διατηρείται σε παρόμοια ή χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα μολυσμένα. Εξαίρεση και πάλι αποτελεί το ανάλογο TC95, που εμφανίζει υψηλές τιμές φθορισμού ιδαίτερα παρουσία του παρασίτου. Αντίστοιχα, το ανάλογο TC52 φαίνεται να επάγει την αυτοφαγική διαδικασία και να τη διατηρεί σε αρκετά υψηλά επίπεδα μέχρι και τις 48h μόνο στα μολυσμένα κύτταρα (Γράφημα 4).



Γράφημα 4: *Προσδιορισμός της έντασης φθορισμού των ενδοκυττάριων κυστιδίων μετά από σήμανση με MDC, κατά την επίδραση με 10 μM επιλεγμένων αναλόγων σε μολυσμένα και μη μολυσμένα THP1, για 48h.*

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η συσσώρευση του MDC στα ενδοκυττάρια κυστίδια, χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας της αυτοφαγίας 3-Methyladenine (3-MA). Η συγκεκριμένη ουσία αποτελεί ειδικό αναστολέα των πρώιμων σταδίων της αυτοφαγικής διαδικασίας, εμποδίζοντας τη δημιουργία των αυτοφαγοσωμάτων μέσω της αναστολής των πρωτεϊνών phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K)[226].

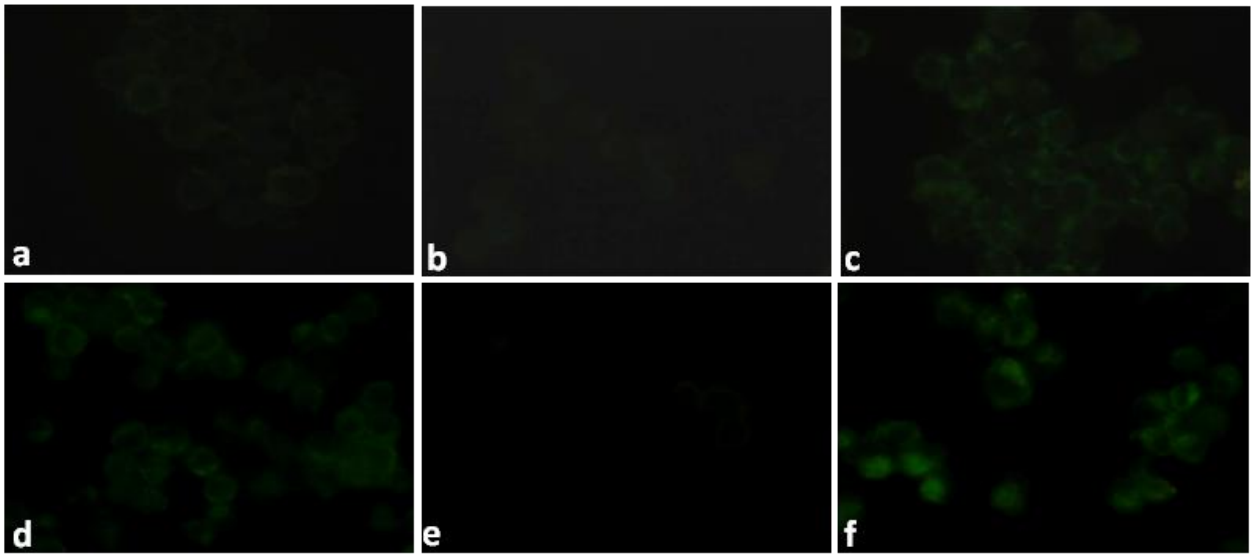
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 26, και αντίθετα με το αναμενόμενο αποτέλεσμα, η παρουσία του 3-MA αυξάνει τον αριθμό αλλά και το μέγεθος των κυστιδίων, με αποτέλεσμα να παρατηρείται μεγάλη αύξηση και στη συσσώρευση του MDC. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε μείωση στο ποσοστό των μολυσμένων κυττάρων κατά την ταυτόχρονη επώαση των αναλόγων με 3-MA, παρότι ο αναστολέας από μόνος του δεν κατέχει ούτε παρασιτοκτόνο, ούτε κυτταροτοξική δράση στη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε.



Εικόνα 26: *Σήμανση ενδοκυττάριων κυστιδίων με MDC. Απεικονίζονται μη μολυσμένα (a-h) και μολυσμένα (i-p) κύτταρα THP1 μετά από 24h επώασης με 10 μM επιλεγμένων αναλόγων. [a]control, [b]HePC, [c]TC19, [d]TC95. [e]control+3MA, [f]HePC+3MA, [g]TC19+3MA, [h]TC95+3MA. [i]control, [j]HePC, [k]TC19, [l]TC95. [m]control+3MA, [n]HePC+3MA, [o]TC19+3MA, [p]TC95+3MA.*

Στη συνέχεια, μελετήσαμε την πιθανότητα τα ανάλογα των αιθερικών φωσφολιπιδίων να δρουν εναντίον της σύντηξης του παρασιτοφόρου κυστιδίου με το λυσόσωμα που έχει ως αποτέλεσμα την εκκαθάριση του παρασίτου, χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών LAMP-1 και LAMP-2. Η σήμανση των κυττάρων με LAMP-1 δεν ήταν επιτυχής, δεδομένου ότι ο φθορισμός ήταν αρκετά διάχυτος και οι διαφορές μεταξύ των επιδράσεων δεν ήταν δυνατόν να αξιολογηθούν επαρκώς.

Όμως, αντίστοιχα με τις παρατηρήσεις μας από τη χρώση με MDC, παρατηρείται πιο έντονος φθορισμός της LAMP-2 στα μολυσμένα κύτταρα. Η επώαση με το δραστικότερο ανάλογο TC95 φαίνεται επίσης να αυξάνει την ένταση της χρώσης καθώς και τον εντοπισμό, αντίθετα παρουσία μιλτεφοσίνης η ένταση του φθορισμού είναι πιο ήπια (Εικόνα 27).



Εικόνα 27*: Σήμανση της πρωτεΐνης LAMP-2. Απεικονίζονται μη μολυσμένα (a-c) και μολυσμένα (d-f) κύτταρα THP-1 μετά από 24h επώασης με 10 μM επιλεγμένων αναλόγων. .* $^{a/d}$*control,* $^{b/e}$*HePC,* $^{c/f}$*TC95.*

Συμπέρασμα

Η λεϊσμάνια στο ενδοκυττάριο στάδιο εκφράζει τους μηχανισμούς αναστολής της σύντηξης του φαγοσώματος με το λυσόσωμα. Τα μικροβιακά υπολείμματα νεκρών παρασίτων όμως οδηγούνται για πέψη στα λυσοσώματα μετά την ωρίμανση του φαγοσώματος αλλά και με τη συμβολή του επιλεκτικού μηχανισμού αυτοφαγίας του ξενιστή. Μελετήσαμε την ενεργοποίηση της ροής των αυτοφαγικών κυστιδίων μετά την επίδραση παρασιτοκτόνων συγκεντρώσεων μιλτεφοσίνης και των αναλόγων TC95, TC52 και TC19 για 24h και 48h, μέσω της αύξησης του φθορισμού του αυτοφαγικού δείκτη MDC και της έκφρασης της LAMP-2 στο κυτταρόπλασμα των THP-1.

Το MDC βάφει ορισμένα ενδοκυττάρια κυστίδια στο μολυσμένο μακροφάγο, ως αποτέλεσμα της διέγερσης της αυτοφαγίας, στα πλαίσια της φυσικής ανοσίας του μακροφάγου έναντι του παθογόνου. Μετά την επίδραση των αναλόγων, ο αριθμός των κυστιδίων είναι πολλαπλάσιος και η ένταση του φθορισμού αυξημένη. Η επίδραση των αναλόγων στο μη μολυσμένο μακροφάγο δεν διεγείρει τον φθορισμό του MDC. Διακρίνουμε σημαντικές διαφορές στην ικανότητα των αναλόγων να επάγουν και να συντηρούν την αυτοφαγική ροή. Εξαιρετικό παράδειγμα το ανάλογο TC95 και σε δεύτερο βαθμό το TC52, τα οποία αυξάνουν τον αριθμό των αυτοφαγικών κυστιδίων ακόμα και για 48h.

Επιπλέον, η επίδραση του TC95, αυξάνει τον φθορισμό της LAMP-2 στο κυτταρόπλασμα των THP-1 μετά από 24h επώασης, σε αντίθεση με την αδύναμη χρώση με μεμβρανική

κατανομή στο μη μολυσμένο μακροφάγο. Αυτό επιβεβαιώνει την αύξηση της ωρίμανσης των φαγοσωμάτων και αυτοφαγοσωμάτων και διαφοροποιεί τη δράση του TC95 από εκείνη της μιλτεφοσίνης, η οποία δεν διεγείρει το φθορισμό της LAMP-2 στο μολυσμένο μακροφάγο.

Τέλος, το καθόλου αναμενόμενο αποτέλεσμα της επίδρασης του αναστολέα 3-MA στην αύξηση της αυτοφαγικής ροής και στην ενίσχυση του παρασιτοκτόνου αποτελέσματος, ερμηνεύεται από μεταγενέστερα αποτελέσματα της βιβλιογραφίας, σύμφωνα με τα οποία το 3-MA σε συνθήκες αδιάκοπης παροχής θρεπτικών στα κύτταρα αυξάνει την ροή αυτοφαγικών κυστιδίων, σε αντίθεση με την επίδραση σε κύτταρα που καλλιεργούνται σε έλλειψη θρεπτικών[227]. Η πιθανή αλληλεπίδραση των αλκυλοφωσφοχολινών με τον μηχανισμό αυτοφαγίας του ξενιστή διαφαίνεται ως ενδιαφέρουσα παράμετρος για την αξιολόγηση της δράσης τους και η μελέτη προς αυτή την κατεύθυνση μπορεί να αναδείξει κυτταρικούς μηχανισμούς ως στόχους νέων αντιπαρασιτικών ουσιών.

Ως προς τη μη αναμενόμενη ενίσχυση της παρασιτοκτόνου δράσης παρουσία του 3-MA, υποθέτουμε ότι η αύξηση της αυτοφαγίας ενισχύει την φυσική ανοσία του μακροφάγου έναντι του ενδοκυτταρίου παρασίτου. Όμως, νεότερα δεδομένα αναδεικνύουν και μια διαφορετική επίδραση αυτού του παράγοντα στην διαχείριση των ενδοκυττάριων κυστιδίων. Κάποιες λιπόφιλες ουσίες εγκλωβίζονται σε κυστίδια αυτοφαγικής προέλευσης με αποτέλεσμα την μειωμένη βιοδιαθεσιμότητά τους. Το 3-MA, αυξάνοντας την αυτοφαγική ροή προς τα λυσοσώματα, συμβάλλει στην απελευθέρωση του φαρμάκου ενισχύοντας την βιοδιαθεσιμότητά του στον κυτταροπλασματικό χώρο. Η πιθανότητα εγκλωβισμού των αλκυλοφωσφοχολινών σε κυτταροπλασματικά κυστίδια μπορεί να είναι αιτία μειωμένου θεραπευτικού αποτελέσματος. Πιστεύουμε ότι ανοίγεται ένα ενδιαφέρον πεδίο έρευνας που μπορεί να συμβάλει στη βελτίωση αυτής της οικογένειας φαρμάκων.

6.3.2. Απόπτωση και επαγωγή δυσλειτουργίας του μιτοχονδρίου

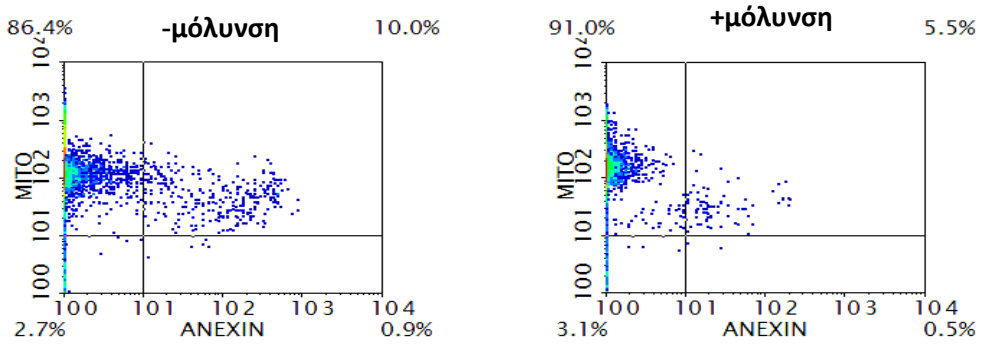
Ένας από τους μηχανισμούς που έχουν προταθεί για την εγκαθίδρυση της μόλυνσης των μακροφάγων με *Leishmania* είναι η αναστολή της απόπτωσης, προστατεύοντας έτσι το περιβάλλον της να για μπορέσει να επιζήσει και να πολλαπλασιαστεί μέσα στον ξενιστή[228]. Η απόπτωση έχει προταθεί μεταξύ άλλων ως πιθανός μηχανισμός αντιλεϊσμανιακής δράσης της μιλτεφοσίνης και έχει επιπρόσθετα αποδειχθεί ότι το μιτοχόνδριο του παρασίτου συμμετέχει στην αποπτωτική διαδικασία. Για τον λόγο αυτό μελετήσαμε την επαγωγή του φαινομένου της απόπτωσης σε μολυσμένα μακροφάγα κύτταρα THP1 κατά την επίδραση με επιλεγμένα ανάλογα.

Πειραματικός σχεδιασμός

Μολυσμένα και μη-μολυσμένα μακροφάγα κύτταρα THP-1 επωάστηκαν με HePC και το ανάλογο TC95 σε συγκέντωση 50, 10 και 2μM για 24h. Ακολούθησε χρώση των κυττάρων με AlexaFluor 488 Annexin V και MitoTracker Red (CMXRos), χρησιμοποιώντας κατάλληλο εμπορικό kit όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Το συγκεκριμένο kit επιτρέπει την μελέτη του φαινομένου της απόπτωσης βασισμένο στη μετατόπιση της φωσφατιδυλοσερίνης (PS) και τις αλλαγές στη διαφορά δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Επιπλέον, προσδιορίστηκε το ποσοστό των ζωντανών και νεκρών κυττάρων στις επιλεγμένες συγκεντρώσεις με χρώση των πυρήνων με SYBR-14 και PI και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.

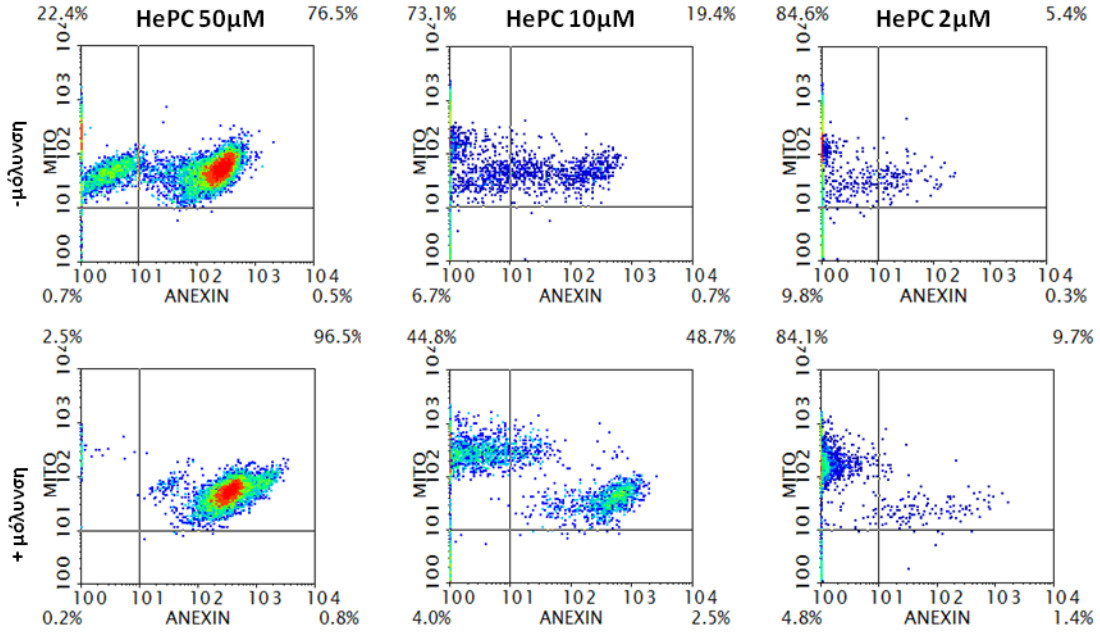
Αποτελέσματα

Κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής παρατηρήθηκε μείωση του ποσοστού των μολυσμένων κυττάρων που βρίσκονται σε διαδικασία απόπτωσης σε σύγκριση με τα φυσιολογικά μη μολυσμένα κύτταρα. Συγκεκριμένα, 10% των μη μολυσμένων κυττάρων παρουσιάζουν θετική Annexin V χρώση, έναντι 5,5% των μολυσμένων όπως φαίνεται στην Εικόνα 28. Ωστόσο, το ποσοστό των νεκρών κυττάρων (PI θετικά) είναι παρόμοιο, με τιμές 3% και 2,1% στα μη μολυσμένα και μολυσμένα κύτταρα αντίστοιχα. Φυσιολογική μιτοχονδριακή λειτουργία παρατηρείται και στις δύο συνθήκες.



Εικόνα 28: *Έκφραση της φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική μεμβράνη μακροφάγων κυττάρων THP1 και απεικόνιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, με διπλή χρώση με AlexaFluor 488 Annexin V και MitoTracker Red. Πάνω αριστερό τεταρτημόριο: ζωντανά κύτταρα, κάτω αριστερό τεταρτημόριο: νεκρωτικά κύτταρα, πάνω δεξί τεταρτημόριο: αποπτωτικά κύτταρα, κάτω δεξί τεταρτημόριο: late apoptotic κύτταρα.*Ισχύει η ίδια ανάλυση για όλα τα γραφήματα απόπτωσης που ακολουθούν.*

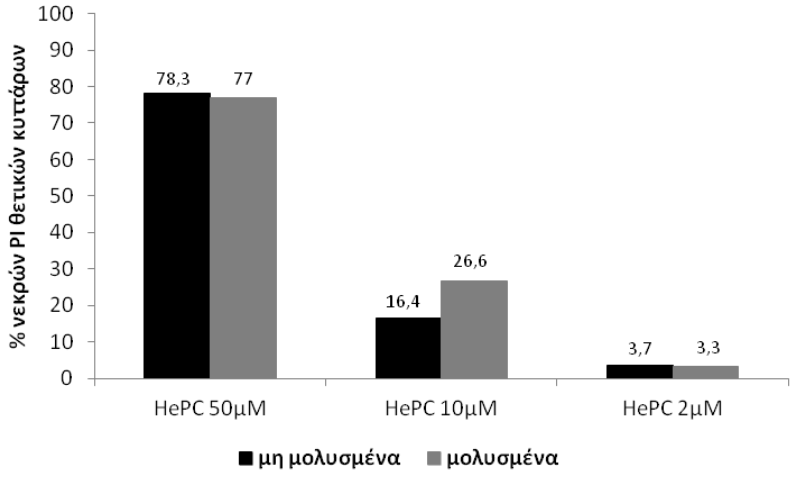
Κατά την διάρκεια επώασης με μιλτεφοσίνη παρατηρείται δοσοεξαρτώμενη αύξηση του ποσοστού των αποπτωτικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, κατά την επώαση με 50μM HePC για 24h, 76,5% των μη μολυσμένων και 96,5% των μολυσμένων κυττάρων έχουν θετική Annexin V χρώση. Αν και τα παραπάνω ποσοστά μειώνονται κατά την επώαση με χαμηλότερες συγκεντρώσεις φαρμάκου, παρατηρείται αύξηση του ποσοστού των μολυσμένων αποπτωτικών κυττάρων κατά την επώαση με 10μM HePC, τιμή που βρίσκεται αρκετά κοντά στην τιμή IC_{50} έναντι της ενδοκυττάριας μορφής του παρασίτου (6,7±1μM). Συγκεκριμένα, 19,4% των μη μολυσμένων κυττάρων παρουσιάζουν θετική Annexin V χρώση, έναντι 48,7% των μολυσμένων όπως φαίνεται στην Εικόνα 29.



***Εικόνα 29**: Διπαραμετρικό dot plot γράφημα που απεικονίζει την απόπτωση σε συνάρτηση με την μιτοχονδριακή λειτουργία, κατά την επώαση μη-μολυσμένων και μολυσμένων μακροφάγων THP1 με 50, 10 και 2μM HePC για 24h.*

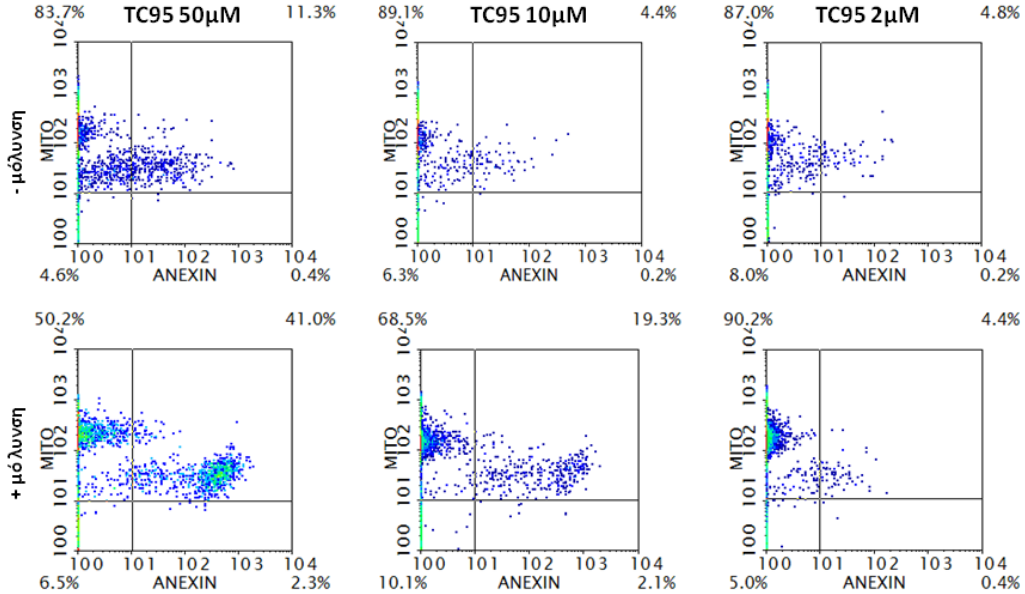
Στο Γράφημα 5 απεικονίζεται το ποσοστό των νεκρών κυττάρων που παρατηρούνται στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των φαρμάκων. Στα 50μM HePC, το ποσοστό των νεκρών κυττάρων είναι παρόμοιο και στους δύο πληθυσμούς, ωστόσο παρατηρείται ελαφριά αύξηση του ποσοστού των αποπτωτικών κυττάρων στα μολυσμένα κύτταρα κατά την επώαση με 10μM HePC, όπου ο μισός περίπου πληθυσμός βρίσκεται σε διαδικασία απόπτωσης. Στη χαμηλή συγκέντρωση των 2μM, το ποσοστό των νεκρών κυττάρων επιστρέφει στα επίπεδα του control, αν και πάλι ο αριθμός των μολυσμένων αποπτωτικών κυττάρων είναι αυξημένος έναντι των μη μολυσμένων. Φαίνεται επομένως ότι η παρουσία του παρασίτου επηρεάζει

σημαντικά, φαινόμενα όπως η διαδικασία της απόπτωσης και ο κυτταρικός θάνατος κατά την επώαση με μιλτεφοσίνη.



Γράφημα 5: *Βιοσιμώτητα μη μολυσμένων και μολυσμένων κυττάρων THP1 κατά την με επιλεγμένες συγκεντρώσεις HePC για 24h.*

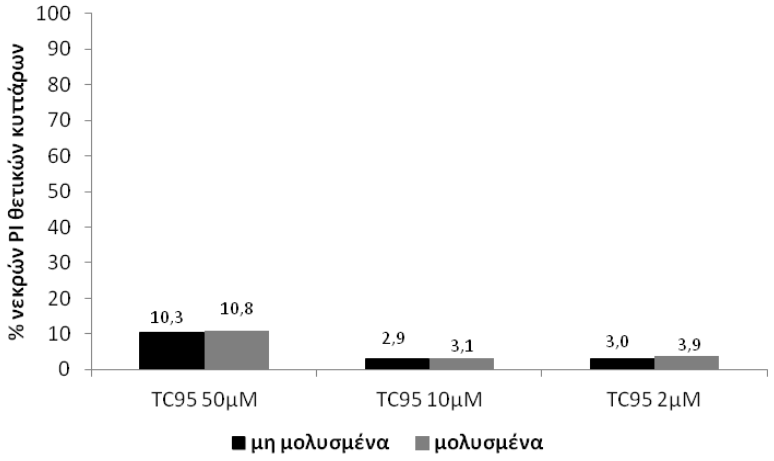
Στη συνέχεια, επιλέξαμε να συγκρίνουμε την μιλτεφοσίνη με το ενεργό ανάλογο TC95, το οποίο είναι περίπου 3 φορές πιο δραστικό στην ενδοκυττάρια μορφή του παρασίτου και 3 φορές λιγότερο κυτταροτοξικό από την μιλτεφοσίνη. Και σε αυτήν την περίπτωση η επαγωγή του φαινομένου της απόπτωσης φαίνεται να εξαρτάται τόσο από την συγκέντρωση του φαρμάκου, όσο και από την παρουσία του παρασίτου μέσα στο κύτταρο-ξενιστή (Εικόνα 30).



Εικόνα 30: *Δυπαραμετρικό dot plot γράφημα που απεικονίζει την απόπτωση σε συνάρτηση με την μιτοχονδριακή λειτουργία, κατά την επώαση μη-μολυσμένων και μολυσμένων μακροφάγων THP1 με 50, 10 και 2μM TC95 για 24h.*

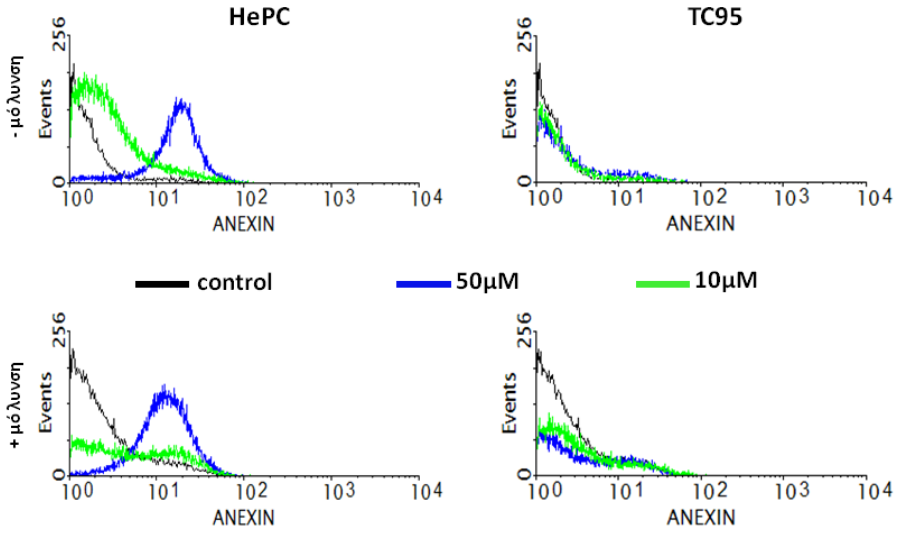
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 30 στα 50μM TC95, το 11,3% των μη μολυσμένων κυττάρων εκφράζουν φωσφατιδυλοσερίνη στην επιφάνειά τους, ωστόσο το ποσοστό αυτό τετραπλασιάζεται στα μολυσμένα κύτταρα, με 41% των μακροφάγων να βρίσκεται σε διαδικασία απόπτωσης. Αντίστοιχα, επώαση με 10μM έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή απόπτωσης στο 19,3% των μολυσμένων κυττάρων, με το ποσοστό να πέφτει στα επίπεδα του control κατά την επώαση με 2μM TC95.

Φαίνεται και πάλι, πως η παρουσία της μόλυνσης επάγει την διαδικασία της απόπτωσης σε ποσοστό του πληθυσμού των κυττάρων πολλαπλάσιο σε σύγκριση με τα μη μολυσμένα κύτταρα, όπως παρατηρήθηκε και στην HePC. Ωστόσο, δεδομένης και της χαμηλής κυτταροτοξικής δράσης του συγκεκριμένου φαρμάκου, σε καμία από τις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν δεν έχουμε υψηλό ποσοστό PI-θετικών νεκρών κυττάρων (Γράφημα 6). Μάλιστα, κατά την επώαση με 50μM TC95, το τελικό ποσοστό των νεκρών κυττάρων παραμένει ιδιαίτερα χαμηλό, τόσο στα μη μολυσμένα όσο και στα μολυσμένα κύτταρα. Αντίθετα, κατά την επώαση με 50 μM μιλτεφοσίνη (με την συγκεκριμένη συγκέντρωση να βρίσκεται πολύ κοντά στη συγκέντρωση στον ορό κατά τη θεραπεία στον σκύλο), περίπου 78% του συνολικού πληθυσμού των κυττάρων είναι νεκρά, γεγονός που εγείρει ανησυχία σε σχέση με ζητήματα κυτταροτοξικότητας της μιλτεφοσίνης.



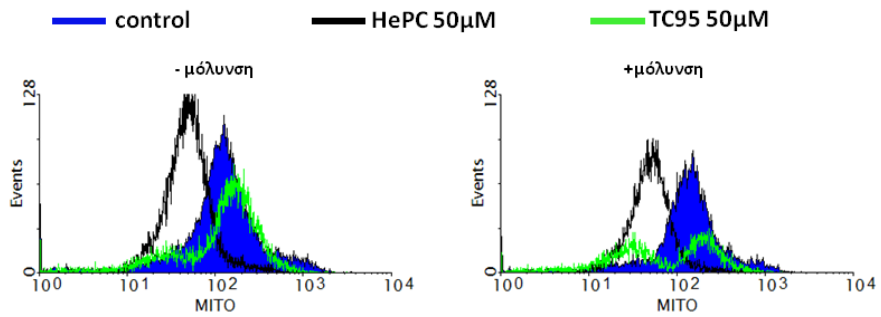
Γράφημα 6: *Βιοσιμώτητα μη μολυσμένων και μολυσμένων κυττάρων THP1 κατά την με επιλεγμένες συγκεντρώσεις HePC για 24h.*

Παρακολουθώντας την εξέλιξη του φαινομένου στις 48h, παρατηρήθηκε ότι η επώαση με 50μM HePC διατηρεί την παρουσία του αποπτωτικού πληθυσμού σε μη μολυσμένα και μολυσμένα κύτταρα, όμως στο συγκεκριμένο χρονικό σημείο η έκφραση της φωσφατιδυλοσερίνης έχει επιστρέψει στα επίπεδα του control κατά την επώαση με 50μM TC95 (Εικόνα 31). Δεν παρατηρούνται αλλαγές στα επίπεδα της έκφρασης της φωσφατιδυλοσερίνης κατά την επώαση με 10μM μιλτεφοσίνης και του αναλόγου TC95.



Εικόνα 31: *Ένταση φθορισμού της χρωστική AlexaFluor 488 Annexin V μη μολυσμένων και μολυσμένων μακροφάγων THP1, κατά την επώαση με HePC και το ανάλογο TC95 σε συγκέντρωση 50 και 10μM για 48h.*

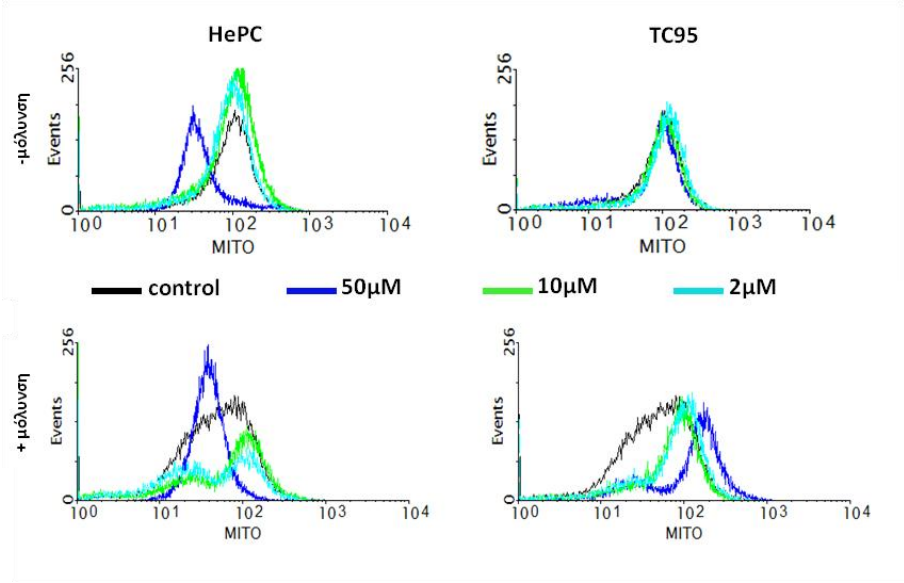
Στη συνέχεια, καταγράφοντας μέσα από το παραπάνω πείραμα τη λειτουργία του μιτοχονδρίου στις 24h, παρατηρήσαμε ότι η επώαση με 50μM HePC κατακερματίζει την διαφορά δυναμικού (Δψm) της μιτοχονριακής μεμβράνης σε μη μολυσμένα και μολυσμένα κύτταρα. Αντίθετα, επώαση με TC95 επιφέρει μικρότερης έκτασης αλλαγές στη μιτοχονδριακή μεμβράνη των μη μολυσμένων κυττάρων, επηρεάζει όμως σημαντικά το μιτοχόδριο των μολυσμένων κυττάρων. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 32, είναι ξεκάθαρο ότι το TC95 δρα στα μιτοχόνδρια των μολυσμένων κυττάρων, σε αντίθεση με τη μιλτεφοσίνη που προκαλεί παρόμοια εικόνα μείωσης της διαφοράς δυναμικού, είτε τα κύτταρα είναι μολυσμένα είτε όχι.



Εικόνα 32: *Ένταση φθορισμού της χρωστικής MitoTracker Red κατά την επώαση μη μολυσμένων και μολυσμένων μακροφάγων THP1, με 50 μM HePC και το ανάλογο TC95 για 24h.*

Αναφορικά με την μιτοχονδριακή λειτουργία στις 48h (Εικόνα 33) παρατηρήσαμε ότι κατά την επώαση με 50μM HePC εξακολουθεί να υπάρχει έντονη εκπόλωση της μεμβράνης, τόσο στα μη μολυσμένα όσο και στα μολυσμένα THP1. Όμως, σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης της χρωστικής MitoTracker στα μη μολυσμένα κύτταρα, που θα μπορούσε να παραπέμπει σε πιθανή διόγκωση των μιτοχονδρίων.

Η μιτοχονδριακή λειτουργία των μη μολυσμένων κυττάρων έχει επανέλθει στα επίπεδα του control μετά από 48h επώασης με TC95 σε όλες τις συγκεντρώσεις. Ωστόσο, στα μολυσμένα κύτταρα και ειδικότερα στα 50μM γίνεται υπερπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης αναδεικνύοντας και πάλι την πιθανότητα διόγκωσης των μιτοχονδρίων κατά την επώαση με τα αιθερικά φωσφολιπίδια και ενδεχομένως τη συμμετοχή του συγκεκριμένου οργανιδίου ως πιθανό στοχο των αναλόγων αιθερικών φωσφολιπίδίων.



Εικόνα 33 *Ένταση φθορισμού της χρωστικής MitoTracker Red κατά την επώαση μη μολυσμένων και μολυσμένων μακροφάγων THP1 με 50, 10 και 2μM HePC και το ανάλογο TC95 για 48h.*

Συμπέρασμα

Τα πειράματα που περιγράφονται σ' αυτή την ενότητα αναδεικνύουν με σαφή τρόπο τις διαφορές στην επίδραση της μιλτεφοσίνης και του αναλόγου TC95. Παρατηρούμε ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις x7,4 φορές της IC_{50} για τη μιλτεφοσίνη και x22,7 φορές της IC_{50} για το ανάλογο TC95, η επίδραση στον μολυσμένο ή μη μολυσμένο ξενιστή THP1 είναι πολύ διαφορετική:

- Η μιλτεφοσίνη σκοτώνει 77-78% των μολυσμένων ή μη μολυσμένων THP1, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά για το TC95 είναι 10-11%
- Παρατηρείται πληθυσμός που αποτελείται από 22% ζωντανά-μη αποπτωτικά, μη μολυσμένα THP-1 με απώλεια του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης, από τη μιλτεφοσίνη, έναντι 83%, με πλήρες δυναμικό μεμβράνης, από το TC95
- Παρατηρείται πληθυσμός που αποτελείται από 2% ζωντανά-μη αποπτωτικά μολυσμένα THP-1, με απώλεια του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης, από τη μιλτεφοσίνη, έναντι 50% με πλήρες δυναμικό μεμβράνης, από το TC95.

Ακόμα και σε συγκεντρώσεις x1,5 φορές της IC_{50}, η μιλτεφοσίνη σκοτώνει το 26% των μολυσμένων κυττάρων. Τα παραπάνω ευρήματα περιγράφουν τη δραματικά διαφορετική επίδραση των δύο ουσιών στο μιτοχόνδριο και στους αποπτωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου-ξενιστή, δίνοντας έμφαση στην απώλεια του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης και την απόπτωση που προκαλείται από τη μιλτεφοσίνη, σε αντιπαράθεση με τη λειτουργική μιτοχονδριακή μεμβράνη και την προστασία του κυττάρου-ξενιστή από το ανάλογο TC95. Η αυξημένη ροή των αυτοφαγοσωμάτων που προκαλεί το TC95 όπως περιγράφεται στην ενότητα 6.3.1, πιθανόν συμβάλλει στην απομάκρυνση τυχόν κατεστραμμένων μιτοχονδρίων και τη διατήρηση της ομοιόστασης στο κύτταρο-ξενιστή.

6.3.3. Επαγωγή οξειδωτικού στρες

Κατά τη διαδικασία της μόλυνσης με *Leishmania*, η αναγνώριση του παρασίτου από το μακροφάγο μπορεί να πυροδοτήσει την απελευθέρωση ενεργών ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS). Συγκεκριμένα, το υπεροξείδιο ($O_2^{\cdot -}$) και το οξείδιο του αζώτου (NO) αποτελούν μόρια-κλειδιά και είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στην άμυνα του ξενιστή κατά την μόλυνση με ενδοκυττάρια παθογόνα. Έχει αποδειχθεί ότι η παραγωγή NO, μέσω της ενεργοποίησης του ενζύμου nitric oxide synthase (iNOS) έχει ως αποτέλεσμα την εξάλειψη των

ενδοκυττάριων παρασίτων σε μοντέλο ποντικού[229]. Αν και ο ρόλος του NO στον μηχανισμό άμυνας των ανθρώπινων μακροφάγων είναι αμφιλεγόμενος, μελετήσαμε την επίδραση της παραγωγής NO από μακροφάγα κύτταρα THP1 κατά την επώαση με επιλεγμένα ανάλογα. Μελετήθηκε επίσης η παραγωγή NO από προμαστιγωτά παράσιτα *L.infantum*.

Πειραματικός σχεδιασμός

Συγκεκριμένα μελετήθηκε η επαγωγή NO σε μη μολυσμένα και μολυσμένα με *Leishmania* μακροφάγα THP1, μετά από επίδραση με το ανάλογο TCAN26 σε χαμηλή συγκέντρωση, που αντιστοιχεί στο μισό του IC_{50} για το ενδοκυττάριο παράσιτο (0,015 μM). Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε την ουσία DAF-FM diacetate, η οποία διαχέεται παθητικά μέσα από τις κυτταρικές μεμβράνες, εισχωρεί στο εσωτερικό των κυττάρων και κατά την αλληλεπίδραση με NO παράγει φθορίζων μόριο. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής.

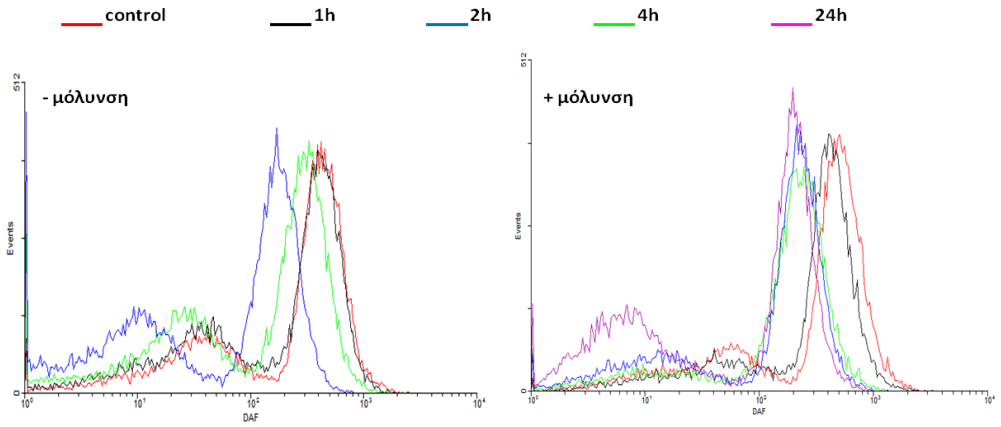
Επιπρόσθετα μελετήθηκε η επαγωγή NO από διαφορετικά κλινικά στελέχη του προμαστιγωτού παρασίτου κατά την επώαση με HePC και τα ανάλογα TCAN26, TC19 και TC52 για 3h, 7h και 24h, σε συγκεντρώσεις 1x και 2x της τιμής IC_{50} για την *L.infantum*.

Αποτελέσματα

Παρατηρήθηκε ότι τα μακροφάγα κύτταρα THP1 παράγουν NO σε υψηλό ποσοστό και με αυξημένη ένταση ανεξάρτητα από την παρουσία παρασίτου. (Πίνακας 9). Ωστόσο, κατά την επώαση με χαμηλή συγκέντρωση TCAN26, που αντιστοιχεί στο μισό της IC_{50} για το ενδοκυττάριο παράσιτο, παρατηρήθηκε σχετική μείωση στο ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν NO αλλά και στην ένταση του φθορισμού σε σχέση με το control, μετά τις 2h επώασης με το ανάλογο (Εικόνα 34).

	% κυττάρων που παράγει NO					**Ένταση φθορισμού**				
	control	**1h**	**2h**	**4h**	**24h**	**control**	**1h**	**2h**	**4h**	**24h**
Μη μολυσμένα	75	80	81,7	73,5	59,5	481	400	233	234	206
Μολυσμένα	68	64	60	54,8	61	418	389	302	184	279

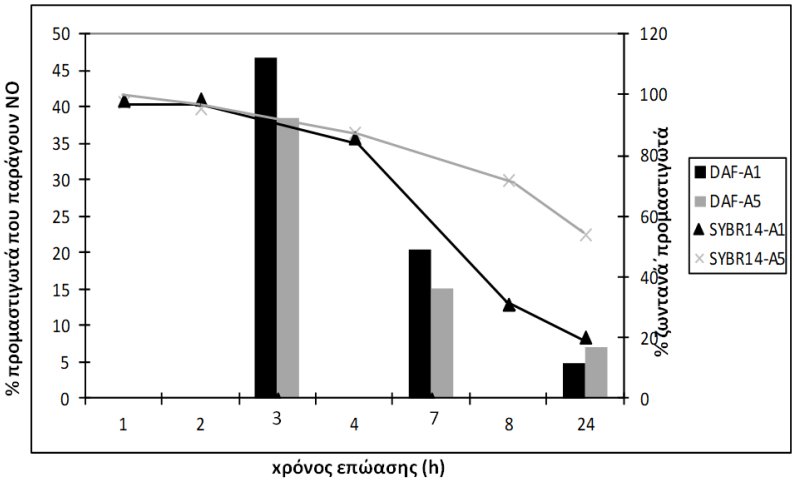
Πίνακας 9: *Ανάλυση ποσοστού κυττάρων που παράγουν NO και ποσοτικοποίηση της έντασης φθορισμού κατά την επώαση μακροφάγων κυττάρων THP-1 με το ανάλογο TCAN26 σε συγκέντρωση 0,015μM, για 1h, 2h, 4h και 24h.*



Εικόνα 34: *Επαγωγή NO σε μη μολυσμένα και μολυσμένα THP1, μετά από επίδραση με 0,015μM TCAN26, για 1h, 2h, 4h και 24h.*

Όμως, λόγω των υψηλών τιμών στην ένταση φθορισμού που παρατηρήθηκαν, δεν ήταν δυνατή η παρακολούθηση του φαινομένου στο μοντέλο μακροφάγο-παράσιτο. Για τον λόγο αυτό, μελετήσαμε την επαγωγή NO στην προμαστιγωτή μορφή του παρασίτου και πώς αυτή εξελίσσεται μέσα στον χρόνο, κατά την επίδραση με συγκεκριμένα ανάλογα.

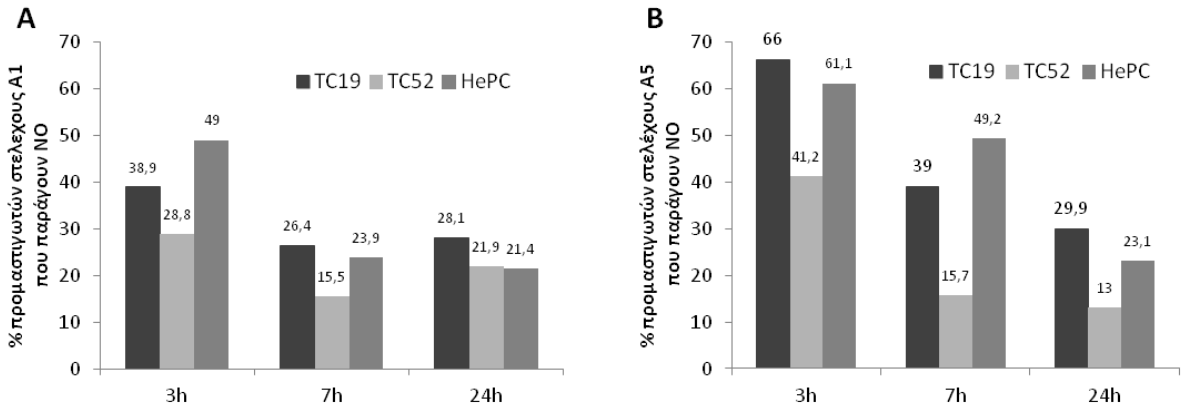
Όπως φαίνεται στο Γράφημα 7, κατά την επώαση των στελεχών A1 και A5 με 6,8 μM TCAN26 (1x IC_{50} έναντι του προμαστιγωτής *L.infantum*) παρατηρείται ότι παρόμοιο ποσοστό προμαστιγωτών παράγει NO στις 3h, που μειώνεται περίπου στο μισό μετά από 7h επώασης. Ένα ποσοστό παρασίτων που παράγει NO διατηρείται ακόμα και στις 24h, ωστόσο η παραγωγή NO μειώνεται σημαντικά και στα δύο στελέχη σε αυτό το χρονικό σημείο.



Γράφημα 7: *Ποσοστό προμαστιγωτών που παράγουν ελεύθερες ρίζες NO, κατά την επώαση με 6,8 μM TCAN26 για 3h, 7h και 24h. Οι καμπύλες απεικονίζουν το ποσοστό ζωντανών SYBR14-θετικών προμαστιγωτών.*

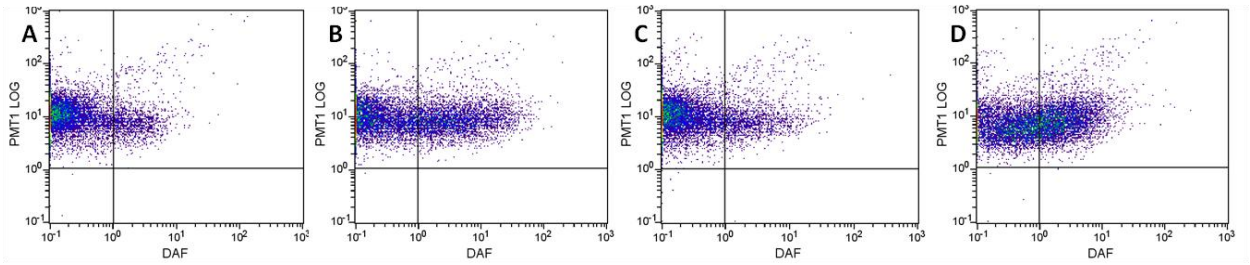
Παρατηρώντας τις καμπύλες βιωσιμότητας θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η αυξημένη παραγωγή NO στις πρώτες ώρες επώασης θα μπορούσε να συσχετισθεί με το τελικό παρασιτοκτόνο αποτέλεσμα, όπως φαίνεται από το χαμηλό ποσοστό ζωντανών προμαστιγωτών στις 24h επώασης, ωστόσο αυτή η παρατήρηση χρίζει παραπάνω διερεύνηση. Γίνεται και εδώ αντιληπτό από το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων ότι τα δύο στελέχη δεν ανταποκρίνονται με τον ίδιο τρόπο στο ανάλογο, με το στέλεχος A1 να παρουσιάζεται αρκετά πιο ευαίσθητο στο TCAN26, όπως είχε φανεί και κατά την αποτίμηση της δράσης των αναλόγων έναντι της ενδοκυττάριας μορφής των κλινικών στελεχών.

Αντίστοιχα, όπως φαίνεται στα Γραφήματα 8A και 8B, μεταξύ των στελεχών A1 και A5, παρατηρούνται διαφορές στην παραγωγή NO κατά την επώαση με HePC και τα ανάλογα TC19 και TC52. Τα προμαστιγωτά επωάστηκαν με συγκέντρωση των αναλόγων που αντιστοιχεί στο διπλάσιο του IC_{50} για την προμαστιγωτή *L.infantum*, για 3h, 7h και 24h. Συγκεκριμένα η επώαση έγινε με 2,8μM TC19, 72μM TC52 και 47,8μM HePC. Ακολουθώντας παρόμοια πορεία, και τα δυο στελέχη παράγουν NO μετά από 3h επώασης με τα ανάλογα, και συγκεκριμένα το στέλεχος A5 παράγει NO σε ποσοστό >60% κατά την επώαση με μιλτεφοσίνη και το ανάλογο TC19. Παρατηρούμε ότι σε αυτές τις συγκεντρώσεις, ποσοστό των προμαστιγωτών >20% παράγει NO ακόμα και στις 24h. Εξαίρεση αποτελεί το ανάλογο TC52, που και στα δυο στελέχη παράγει σαφώς λιγότερο NO σε σχέση με το TC19 και τη μιλτεφοσίνη σε όλα τα χρονικά σημεία που εξετάστηκαν.



Γράφημα 8: *Ποσοστό προμαστιγωτών που παράγουν ελεύθερες ρίζες NO, κατά την επώαση με 2x IC_{50} TC19, TC52 και HePC για 3h, 7h και 24h. A: στέλεχος A1, B: στέλεχος A5.*

Στην Εικόνα 35 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά dot plots από την ανάλυση με κυτταρομετρία ροής που δείχνουν τις διαφορές στο ποσοστό των κυττάρων που παράγουν NO κατά την επώαση με τα ανάλογα.



Εικόνα 35: *Παραγωγή ελεύθερων ριζών NO από προμαστιγωτά του στελέχους A5 κατά την επώαση με τα ανάλογα TC19, TC52 και HePC για7h, σε συγκέντρωση 2x IC_{50} έναντι της προμαστιγωτής L.infantum. A: control, B: TC19, C: TC52, D: HePC.*

Συμπέρασμα

Η αντιλεϊσμανιακή δράση πολυάριθμων φαρμακευτικών ουσιών έχει συσχετισθεί με την παραγωγή ενεργών μορίων οξυγόνου (ROS) που οδηγεί σε δυσλειτουργία του μιτοχονδρίου του παρασίτου και ακολούθως σε κυτταρικό θάνατο. Δεδομένων των αλλαγών που παρατηρήσαμε στη μιτοχονδριακή μεμβράνη των μολυσμένων κυττάρων υπό την επίδραση επιλεγμένων αναλόγων, μελετήσαμε ακολούθως την παραγωγή ROS σε προμαστιγωτά παράσιτα, για να διερευνήσουμε αν η παραπάνω μιτοχονδριακή δυσλειτουργία προάγεται από την παραγωγή ROS. Παρατηρήσαμε ότι υπό την επίδραση επιλεγμένων αναλόγων, αυξάνεται το ποσοστό των προμαστιγωτών που παράγουν NO και επομένως το παρασιτοκτόνο αποτέλεσμα θα μπορούσε να αποδοθεί στην αυξημένη αυτή παραγωγή. Τα αποτελέσματά μας βρίσκονται σε συμφωνία με πολυάριθμες μελέτες που συνδυάζουν την παραγωγή ROS με την εξουδετέρωση του παρασίτου.

6.3.4. Μελέτη της ενδοκυττάριας κατανομής με τη χρήση φθοριζόντων αναλόγων

Η χρήση φθοριζόντων φαρμάκων μας επιτρέπει να μελετήσουμε την κινητική εισόδου στο κύτταρο και την πρόσληψή τους από συγκεκριμένα οργανίδια, παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες για τον μηχανισμό δράσης ενός φαρμάκου[230]. Έχει το πλεονέκτημα ότι απαιτούνται ελάχιστοι χειρισμοί, μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο αλλοίωσης στο εσωτερικό του κυττάρου. Επιπλέον μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του φαρμάκου μέσα στο κύτταρο ή στα οργανίδια. Συγκεντρώνουν επομένως χαρακτηριστικά

που τα καθιστούν σημαντικά εργαλεία στη μελέτη της αντιπαρασιτικής δράσης ουσιών και την εύρεση πιθανών φαρμακευτικών στόχων.

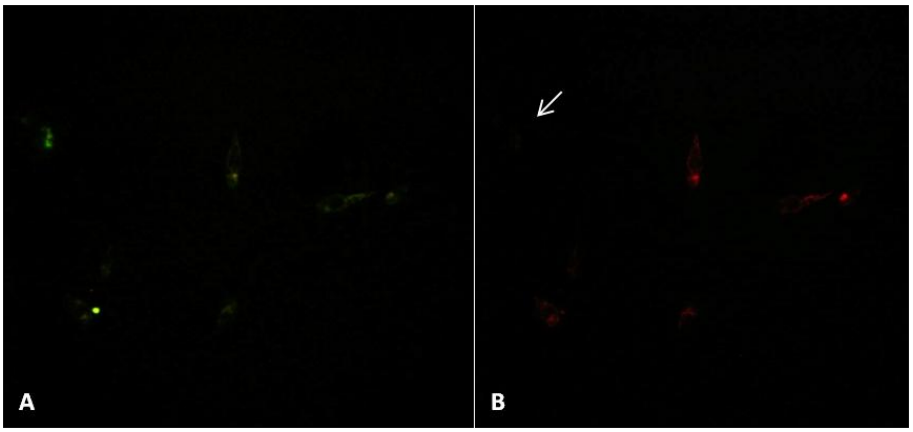
Πειραματικός σχεδιασμός

Σε προκαταρκτικά πειράματα παρατηρήσαμε συσσώρευση του φθορισμού των αναλόγων σε συγκεκριμένα σημεία μέσα στο προμαστιγωτό τα οποία πιθανόν να αντιπροσωπεύουν κυτταρικά οργανίδια. Για τον λόγο αυτό, προμαστιγωτά παράσιτα επωάστηκαν με τα φθορίζοντα ανάλογα με σκοπό να απεικονιστεί η ενδοκυττάρια κατανομή τους στο εσωτερικό του παρασίτου.

Δεδομένου ότι η βιβλιογραφία αναφέρει το μιτοχόνδριο ως πιθανό στόχο της μιλτεφοσίνης, προχωρήσαμε σε χρώση των μιτοχονδρίων του παρασίτου με σκοπό να αναγνωριστεί και να χαρακτηριστεί περαιτέρω η ενδοκυττάρια συσσώρευση των αναλόγων. Προμαστιγωτά παράσιτα επωάστηκαν σε συγκέντρωση 15μM και 25μM για 4h και 24h με τα ανάλογα TC108 και TC126. Ακολούθησε ταυτόχρονη χρώση με τη χρωστική Mitotracker Red και παρατήρηση με μικροσκόπιο φθορισμού.

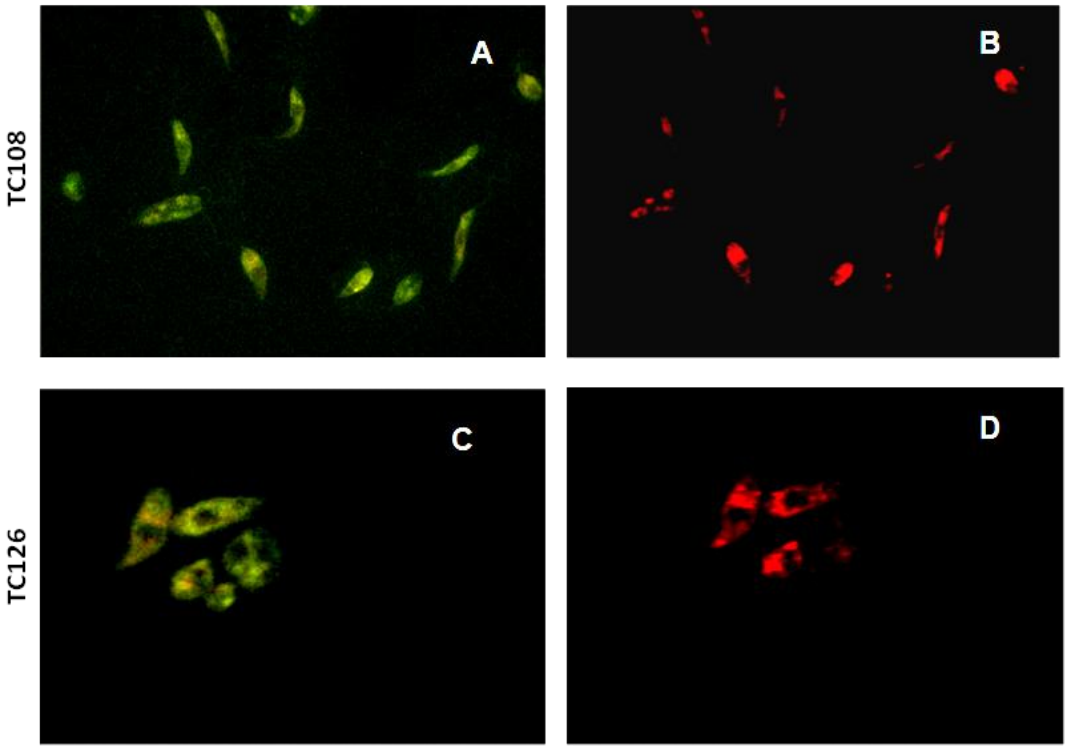
Αποτελέσματα

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 36, παρατηρείται συσσώρευση του φαρμάκου στο κυτταρόπλασμα και συγκεκριμένα κατά μήκος του προμαστιγωτού σε περιοχές που ταυτίζονται με την χρωστική Mitotracker. Δεν παρατηρείται καθόλου χρώση στον πυρήνα. Πιθανόν τα νεκρά παράσιτα να εμφανίζουν πιο έντονο φθορισμό, ωστόσο η χρώση των μιτοχονδρίων είναι αρνητική (βέλος).

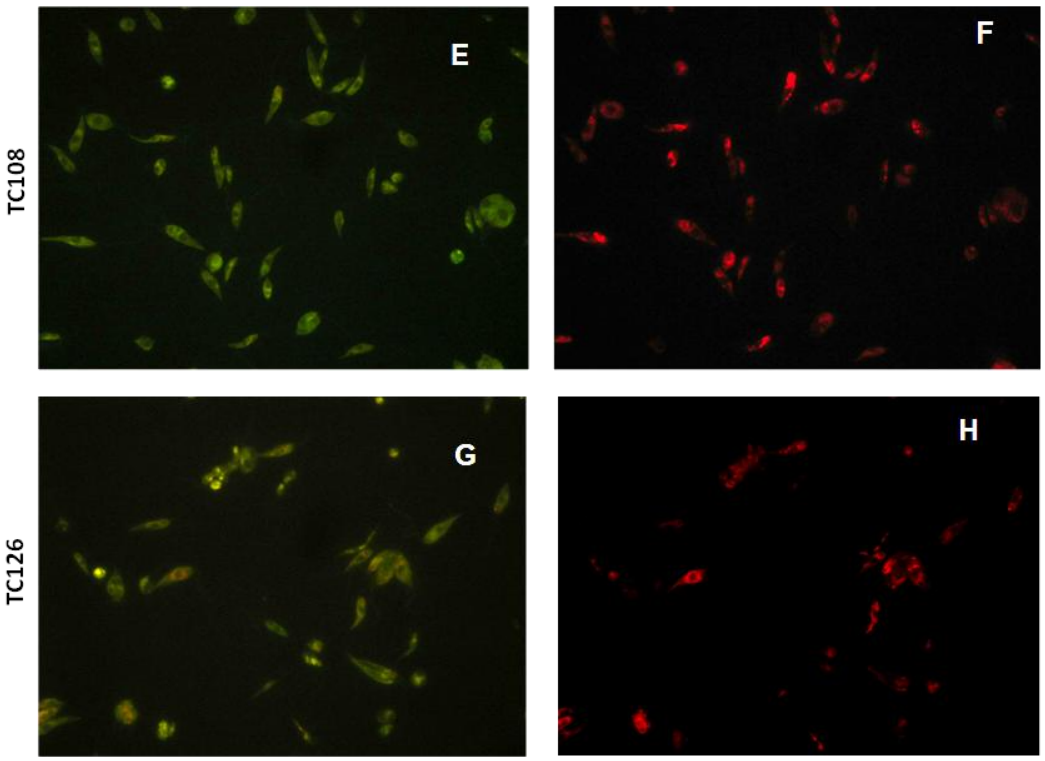


Εικόνα 36: *Επώαση προμαστιγωτών με 15μM TC126 για 24h και χρώση με Mitotracker Red (B).*

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 37 A-D, στις 4 ώρες επώασης παρατηρούμε μια κυτταροπλασματική διασπορά του φθορισμού, με μεγαλύτερη συγκέντρωση στην περιοχή των μιτοχονδρίων. Στις 24 ώρες επώασης παρατηρούμε σχεδόν αποκλειστικά την πλήρη ταύτιση του φθορισμού του αναλόγου με τον φθορισμό του MitoTracker, αναδεικνύοντας έτσι τον μιτοχονδριακό εντοπισμό των φθορίζοντων αναλόγων (Εικόνα 37 E-H). Η παραπάνω παρατήρηση αποτελεί ένδειξη ότι φωσφολιπίδια προσλαμβάνονται από τα μιτοχόνδρια μετά την είσοδό τους στο κύτταρο.

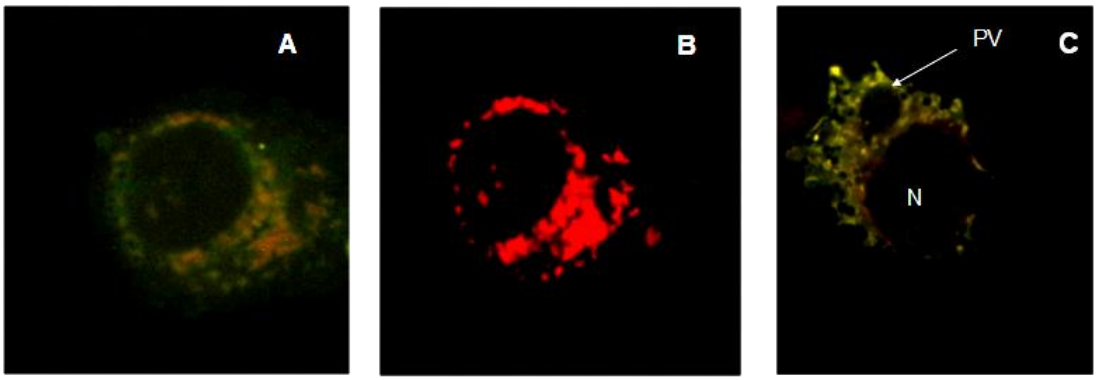


Εικόνα 37 A-D: *Ενδοκυττάρια κατανομή των φθοριζόντων αναλόγων TC108 και TC126 σε προμαστιγωτά παράσιτα, μετά από 4h επώασης. B, D: Χρώση των μιτοχονδρίων με Mitotracker Red.*



***Εικόνα 37 E-H**: Ενδοκυττάρια κατανομή των φθοριζόντων αναλόγων TC108 και TC126 σε προμαστιγωτά παράσιτα, μετά από 24h επώασης. F, H: Χρώση των μιτοχονδρίων με Mitotracker Red.*

Για να δούμε την κατανομή του φθορίζοντος φαρμάκου στο κυττάρο-ξενιστή, επωάσαμε μολυσμένα και μη μολυσμένα THP1 με το ανάλογο TC126. Παρατηρήθηκε κυτταροπλασματική διασπορά του φθορισμού, που συμπίπτει σε μεγάλο βαθμό με τη χρωστική MitoTracker Red Dye. Βλέπουμε και πάλι ότι ο πυρήνας του κυττάρου δεν βάφεται. Παρατηρήθηκε ωστόσο έντονη συσσώρευση του φθορίζοντος αναλόγου γύρω από το παρασιτοφόρο κυστίδιο, όπως φαίνεται Εικόνα 38.



***Εικόνα 38:** Συσσώρευση φθορίζουσας αλκυλοφωσφοχολίνης στο μακροφάγο (A, B) και σε μολυσμένο με L. infantum μακροφάγο (C). N: πυρήνας, PV:παρασιτοφόρο κυστίδιο.*

Συμπέρασμα

Η ενδοκυττάρια κατανομή των φθοριζόντων αναλόγων μελετήθηκε χρησιμοποιώντας μικροσκοπία φθορισμού, προσφέροντας άμεσα και αξιόπιστα αποτελέσματα σε αληθινό χρόνο. Η χρήση φθοριζόντων αντιλεισμανϊακών αναλόγων έχει αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία ως εναλλακτικός τρόπος μελέτης του ενδοκυττάριας κατανομής και εντοπισμού πιθανών στόχων, χρησιμοποιώντας ελάχιστους χειρισμούς που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε αλλοίωση των κυτταρικών δομών.

Τα φθορίζοντα ανάλογα που συνετέθησαν στην παρούσα μελέτη, διατηρούν τη χημική συγγένεια και την επιλεκτικότητα της μιλτεφοσίνης, καθώς επίσης και τις φαρμακοδυναμικές της ιδιότητες. Φαίνεται ότι τα συγκεκριμένα ανάλογα συσσωρεύονται αρκετά νωρίς σε κυτταρικές δομές, όπου παρατηρείται ταυτόχρονη χρώση με MitoTracker Red Dye, ενισχύοντας έτσι την αρχική υπόθεση άμεσης εμπλοκής των μιτοχονδρίων στην αντιπαρασιτική δράση των αναλόγων. Παρατηρούμε όμως και μια διασπορά του φθορισμού στο κυτταρόπλασμα σε περιοχές που δεν συσσωρεύεται MitoTracker. Δεν μπορούμε να αποκλείσουμε και τον εγκλωβισμό των αναλόγων σε κυτταροπλασματικά κυστίδια ή ακόμα και σε λυσοσώματα.

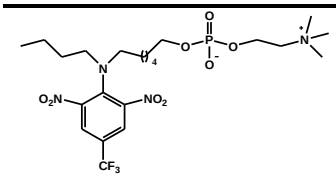
Τα παραπάνω αποτελέσματα πρέπει να τα ερμηνεύσουμε με προσοχή ως προς την γενίκευση της κατανομής για ανάλογα με διαφορετικές χημικές ομάδες. Λεπτές διαφορές στον χημικό τύπο μπορεί να αλλάξουν την αλληλεπίδραση με κυτταρικά οργανίδια και να καθορίσουν μια διαφορετική διασπορά.

6.4. In vivo μελέτη της επίδρασης του αναλόγου TC106 σε σκυλιά μολυσμένα με L.infantum

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, η *L.infantum* αποτελεί τον αιτιολογικό παράγοντα της λεϊσμανίασης στον σκύλο. Οι πιο συνηθισμένες θεραπείες που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν την αντιμονιακή μεγλουμίνη, την αλλοπουρινόλη και τη μιλτεφοσίνη, ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό. Συνήθως οι παραπάνω θεραπείες έχουν τη δυνατότητα να βελτιώσουν προσωρινά τα κλινικά συμπτώματα ή ακόμα και να θεραπεύσουν κλινικά τον σκύλο, ωστόσο καμία θεραπεία δεν εξαλείφει οριστικά τη μόλυνση με το παράσιτο[231, 232]. Επιπλέον, τοξικές παρενέργειες, κυρίως γαστεντερικές και νεφρικές, έχουν αναφερθεί κατά τη χορήγηση των παραπάνω ουσιών[233].

Στην δική μας εργασία, μελετήθηκε η βιολογική δράση ενός μεγάλου αριθμού αναλόγων της μιλτεφοσίνης, αρκετά από τα οποία επέδειξαν άριστη αντι-λεϊσμανιακή δράση και εξαιρετικά βελτιωμένη κυτταροτοξικότητα και αιμολυτική δραστηριότητα, ιδιότητες που τα καθιστούν ικανά ως υποψήφια αντι-λεϊσμανιακά φάρμακα για τη θεραπεία σκύλων που πάσχουν από kala-azar. Προκειμένου να διερευνηθεί αν τα νέα ανάλογα μπορούν να εκριζώσουν το παράσιτο από τον σκύλο, μελετήθηκε η ανταπόκριση στη θεραπεία με το ανάλογο TC106, σε συγκριτική αντιπαράθεση με τη μιλτεφοσίνη, σε δύο φυσικά μολυσμένους σκύλους με *L.ifantum*.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 10 το ανάλογο TC106 κατέχει υψηλή αντι-παρασιτική δράση έναντι του ενδοκυττάριου παρασίτου σε συνδυασμό με μηδενική κυτταροτοξική και αιμολυτική δράση, καθιστώντας το ιδανικό υποψήφιο φάρμακο για την παραπάνω μελέτη.

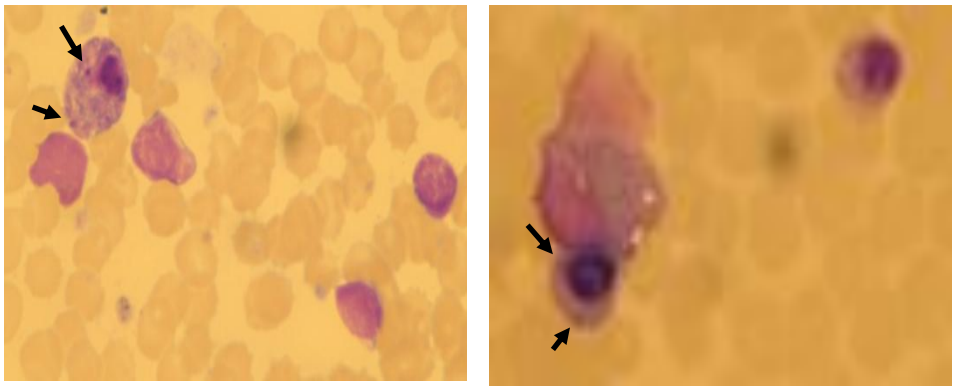
	Ενδοκυττάρια αμαστιγωτή LEM235[a]	**Κυτταροτοξικότητα[b]**	**Αιμόλυση[c]**	**% αιμόλυση στα 100μM[d]**	**% αιμόλυση στα 500μM[e]**
 **TC106**	0,9 ± 0,3	>500	>100	1,6	100

Πίνακας 10*: Βιολογική δράση του αναλόγου της τριφλουραλίνης TC106.*

[a]Αντιλεϊσμανιακή δράση του αναλόγου TC106 έναντι της ενδοκυττάριας αμαστιγωτής μορφής του παρασίτου. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως τιμές IC_{50} ± SEM (μM). [b]Κυτταροτοξικότητα έναντι της κυτταρικής σειράς THP1 (CC_{50} ± SEM, μM). [c]Αιμόλυση ερυθρών αιμοσφαιρίων κατά την επώση με το ανάλογο. Η αιμόλυση εκφράζεται ως HC_{50} ± SEM και αφορά στη συγκέντρωση του αναλόγου που προκαλεί 50% αιμόλυση. [d]Ποσοστό αιμόλυσης στα 100μM αναλόγου. [e]Ποσοστό αιμόλυσης στα 500μM αναλόγου. Οι παραπάνω τιμές αποτελούν τον μέσο όρο από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Πειραματικός σχεδιασμός

Οι σκύλοι που χρησιμοποιήθηκαν (στο εξής αναφέρονται ως ΜΚ και ΑΣ) εμφάνιζαν τυπικά συμπτώματα kala-azar, όπως σπληνομεγαλία, λεμφαδενομεγαλία, δερματολογικές βλάβες, απώλεια βάρους και επιμηκησμένα κυρτά νύχια. Η διάγνωση βασίστηκε στην κλινική εξέταση, στην ανίχνευση του παρασίτου μικροσκοπικά (Εικόνα 39) και με PCR και στην θετική καλλιέργεια του παρασίτου στο εργαστήριο. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε Κλινική Μικρών Ζώων στη Χαλκίδα, μετά από τη χορήγηση άδειας από την Κτηνιατρική Υπηρεσία του Υπουργείου Γεωργίας της Περιφερειακής Διεύθυνσης Ευβοίας, καθώς και την έγγραφη συναίνεση των ιδιοκτητών των σκύλων.



Εικόνα 39: *Επίχρισμα μυελού των οστών από μολυσμένα σκυλιά με λεϊσμάνια μετά από χρωση Giemsa. Το ενδοκυττάριο αμαστιγωτό παράσιτο εντός του μονοκυττάρου έχει σημανθεί με βέλος.*

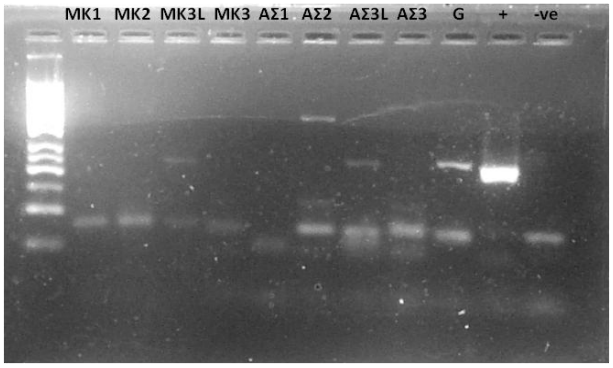
Το ανάλογο TC106 χορηγήθηκε στον σκύλο ΑΣ σε δοσολογία 2mg/kg ημερησίως, για 28 ημέρες και η διάλυσή του πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα hydroxylpropylcellulose (Klucel) σε συγκέντρωση 20mg/ml. Επιχρίσματα περιφερικού αίματος, μυελού των οστών και υλικού αναρρόφησης λεμφαδένων εξετάστηκαν μικροσκοπικά μετά από χρώση Giemsa για την παρουσία του παρασίτου. Πραγματοποιήθηκε επίσης ανίχνευση του DNA του παρασίτου στο αίμα και στους λεμφαδένες κατά την έναρξη της θεραπείας και μετά από 14 και 28 ημέρες, με πολλαπλασιασμό αλληλουχίας του γονιδίου 18sRNA, με τους εκκινητές T2/B4 όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Τέλος εξετάστηκε το αιματολογικό και βιοχημικό προφίλ των σκύλων στα αντίστοιχα χρονικά σημεία.

Αποτελέσματα

Με την ολοκλήρωση της θεραπείας παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση στην κλινική εικόνα των δύο σκύλων. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 40, τα δερματικά έλκη που έφερε ο σκύλος που έλαβε το ανάλογο TC106 επουλώθηκαν και το τρίχωμα επανήλθε στη φυσιολογική του κατάσταση. Οι τιμές από τις γενικές αίματος του ζώου παρέμειναν σταθερές εκτός από τις τιμές των αιμοπεταλίων, οι οποίες φαίνεται να παρουσιάζουν πτώση κατά τη διάρκεια των πρώτων 14 ημερών, επιστρέφουν όμως σε φυσιολογικά επίπεδα κατά την ολοκλήρωση της θεραπείας. Επιπρόσθετα, βιοχημικοί παράμετροι που αντικατοπτρίζουν την ηπατική και νεφρική λειτουργία, όπως τα επίπεδα αλβουμίνης, προσταφιλικής τρανσαμινάσης, αλκαλικής φωσφατάσης, κρεατινίνης κ.α., δεν επέδειξαν σημαντικές διαφορές κατά τη διάρκεια της θεραπείας, σε αντίθεση με τον σκύλο που έλαβε το κτηνιατρικό σκεύασμα Milteforan®. Επίσης δεν παρατηρήθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως ευερεθιστότητα, εμετός και διάρροια κατά τη διάρκεια της θεραπείας με το ανάλογο.

Εικόνα 40: *Κλινικά συμπτώματα kala azar στον σκύλο ΑΣ πριν και μετά τη θεραπεία με TC106. Παρατηρείται επούλωση των δερματικών ελκών στην περιοχή του κεφαλιού και των αρθρώσεων.*

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι δεν ανιχνεύθηκε το DNA του παρασίτου στο περιφερικό αίμα των σκύλων σε κανένα από τα χρονικά σημεία που εξετάστηκαν. Ωστόσο, πραγματοποιήθηκε ανίχνευση του παρασίτου στους λεμφαδένες μετά από 28 ημέρες θεραπείας και στα δύο σκυλιά, γεγονός που καταδεικνύει την αδυναμία της μιλτεφοσίνης και του αναλόγου TC106, να επιφέρουν την ολική εκρίζωση του παρασίτου (Εικόνα 41). Το παραπάνω εύρημα έρχεται σε συμφωνία με αντίστοιχες μελέτες, όπου η θεραπεία με μιλτεφοσίνη, αν και βελτιώνει σημαντικά τα κλινικά συμπτώματα, δεν συνοδεύεται από εκκαθάριση του παρασίτου[234,235].



Εικόνα 41: *Ανίχνευση του DNA του παρασίτου με PCR από περιφερικό αίμα και λεμφαδένες. ΜΚ1 και ΑΣ1: προ θεραπείας, ΜΚ2 και ΑΣ2: μετά από 14 ημέρες θεραπείας, ΜΚ3 και ΑΣ3: μετά από 28 ημέρες θεραπείας. ΜΚ3L και ΑΣ3L: υλικό από λεμφαδένες μετά από 28 ημέρες θεραπείας.*

Συμπέρασμα

Συμπεραίνεται ότι το ανάλογο που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη προάγει τη βελτίωση των κλινικών συμπτωμάτων στο άρρωστο σκύλο και δεν προκαλεί τοξικές παρενέργειες, όπως έχει παρατηρηθεί κατά τη χορήγηση μιλτεφοσίνης και άλλων αντι-λεισμανιακών ουσιών. Ωστόσο, η βελτίωση των συμπτωμάτων και της γενικότερης κλινικής εικόνας που παρατηρήθηκε, δεν συνοδεύεται από την εκρίζωση του παρασίτου από τους λεμφαδένες του ζώου. Επομένως, αν και το ανάλογο δεν θεραπεύει οριστικά τον σκύλο από την ασθένεια, εν τούτοις η απουσία τοξικών παρενεργειών θα μπορούσε να το κατατάξει ως χρήσιμο εργαλείο για τον έλεγχο και την επιβράδυνση της εξέλιξης της ασθένειας.

6.5. Αντιλεϊσμανιακή δράση των peptaibols και μελέτη της συνεργητικής δράσης αιθερικών φωσφολιπιδίων και peptaibols έναντι της L.infantum

Η αποτελεσματικότητα των διαθέσιμων θεραπειών έναντι της λεϊσμανίασης ολοένα και περιορίζεται, κυρίως λόγω των σοβαρών ανεπιθύμητων παρενεργειών και την ανάπτυξη αντοχής. Για τον λόγο αυτό πολύ συχνά γίνεται χρήση συνδυαστικής θεραπείας για την καταπολέμηση του kala azar στον σκύλο αλλά και στον άνθρωπο. Συγκεκριμένα, η συνδυαστική θεραπεία με πεντασθενές αντιμόνιο και αλλοπουρινόλη χρησιμοποιείται ευρέως για τη θεραπεία της λεϊσμανίασης στα σκυλιά, επειδή η συνεργητική δράση των φαρμάκων οδηγεί σε ύφεση της ασθένειας και στην αποφυγή υποτροπών[24-27].

Λαμβάνοντας υπ’όψιν τα παραπάνω καθώς και τις παρατηρήσεις μας από τη χορήγηση του αναλόγου TC106 στον μολυσμένο με kala azar σκύλο, στοχεύσαμε στη βελτιστοποίηση της αντι-λεϊσμανιακής δράσης των αναλόγων μας κατά την συγχορήγηση με ουσίες που ανήκουν σε διαφορετική χημική τάξη. Συγκεκριμένα, αποπειραθήκαμε να αξιοποιήσουμε την ενδεχόμενη συνεργητική δράση των αναλόγων σε συνδυασμό με μία τάξη αντι-μικροβιακών πεπτιδίων, που ονομάζονται peptaibols. Τα peptaibols αποτελούν μια ομάδα ουσιών, η βιολογική δράση των οποίων έχει εν μέρει αποδοθεί στις ιδιότητες που κατέχουν να τροποποιούν την κυτταροπλασματική μεμβράνη και συγκεκριμένα να επάγουν τον σχηματισμό καναλιών, που έχει ως αποτέλεσμα την διαρροή κυτταροπλασματικού περιεχομένου, οδηγώντας τελικά στον κυτταρικό θάνατο[236-239]. Επιπρόσθετα, έχει μελετηθεί η επίπτωση των παραπάνω ουσιών στη μιτοχονδριακή λειτουργία διάφορων παθογόνων, συμπεριλαμβανομένων και παρασίτων[209, 240].

Πειραματικός σχεδιασμός

Κατά την αποτίμηση της δράσης των αναλόγων που μελετήσαμε, παρατηρήθηκε ότι τα ανάλογα επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό το μιτοχόνδριο και γενικότερα τη μιτοχονδριακή λειτουργία του παρασίτου. Για τον λόγο αυτό θεωρήσαμε ότι τα peptaibols αποτελούν ιδανικό υποψήφιο για την μελέτη του φαινομένου της συνέργειας, σε συνδυασμό με επιλεγμένα ανάλογα αιθερικών φωσφολιπιδίων. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η συνεργητική δράση του συνδυασμού των peptaibols antiamoebin (AAM) και suzukacillin (SZ) (Εικόνα 42) με τη μιλτεφοσίνη και το λιγότερα ενεργό ανάλογο TC52, έναντι του ενδοκυττάριου παρασίτου.

Antiamoebin I

Ac-Phe[1]-Aib-Aib-Aib-*D*-Iva-Gly-Leu-Aib-Aib[9]-Hyp-Gln-*D*-Iva-Hyp[13]-Aib-Pro-Pheol[16]

Suzukacillin-A4

Ac-Aib[1]-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Lxx-Aib-Gly-Aib-Aib[13]-Pro-Vxx-Aib-Vxx-Gln-Gln-Pheol[20]

Alamethicin I

Ac-Aib[1]-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib[13]-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Pheol[20]

Εικόνα 42: *Αλληλουχία αμινοξέων της AAMI (βασική αλληλουχία) και της SZ-A4 σε σύγκριση με την alamethicinI.*

Παρακάτω παρουσιάζεται αναλυτικά η βιολογική δράση των peptaibols AAM και suzukacillin SZ, μόνα τους ή κατά την συγχορήγηση με μιλτεφοσίνη και το ανάλογο TC52, καθώς και η επίδραση που κατέχουν στη φυσιολογία του μιτοχονδρίου του παρασίτου. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν αφορούν στην παραγωγή ROS με τη χρήση της ουσίας CM-H_2DCFDA, σε μεταβολές της διαφοράς δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Δψm) μετά από χρώση με MitoTracker Red Dye και στην παρουσία μορφολογικών αλλαγών στο μιτοχόνδριο του παρασίτου κατόπιν παρατήρησης στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM) και στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης (TEM).

Αποτελέσματα

Κατά τη μελέτη της αντι-λεϊσμανιακής δράσης των peptaibols AAM και SZ έναντι της προμαστιγωτής και ενδοκυττάριας αμαστιγωτής μορφής κλινικού στελέχους *L.infantum* (που απομονώθηκε από μολυσμένο σκύλο όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι), παρατηρήθηκε ότι και τα δύο peptaibols είχαν παρόμοια δράση ως προς τις δύο μορφές του

παρασίτου. Μελετώντας τη γενικότερη μεμβρανοτοξική τους δράση παρατηρήθηκε ότι η AAM είναι κατά 1,8-φορές λιγότερο κυτταροτοξική από την SZ και 1,4-φορές λιγότερο κυτταροτοξική από την HePC, κατέχοντας ταυτόχρονα και χαμηλότερη αιμολυτική δράση (Πίνακας 11).

Compound or combination	Intracellular amastigotes IC_{50} (μM)[a]	CI[d]	Promastigotes IC_{50} (μM)[b]	Cytotoxicity CC_{50} (μM)[e]	Hemolysis HC_{50}(μM)[f]	% hemolysis[g]
HePC	1.8 ± 0.5		8.2 ± 0.7	28.6 ± 2.5	38.3 ± 2.8	96.1
TC52	6.6 ± 0.6		>200	>50	>100	0.5
AAM	7.5 ± 0.2		8.7 ± 0.1	40.3 ± 3.2	94.6 ± 2.6	52.9
SZ	7.6 ± 1.2		8.2 ± 0.1	22.5 ± 3.2	66.9 ± 2.2	96.6
HePC/AAM[c]	0.3 ± 0.05	0.83				
HePC/SZ[c]	0.3 ± 0.06	0.43				
TC52/AAM[c]	1.4 ± 0.02	0.88				
TC52/2SZ[c]	2.5 ± 0.3	0.48				

Πίνακας 11: *Βιολογική δράση των υπό μελέτη χημικών ουσιών και των συνδυασμών τους.*

[a,b] Αντιλεϊσμανιακή δράση των φαρμάκων έναντι της προμαστιγωτής και ενδοκυττάριας αμαστιγωτής μορφής του παρασίτου(IC_{50}).
[c] Αντιλεϊσμανιακή δράση του συνδυασμού των φαρμάκων που περιγράφεται ως το IC_{50} του φωσφολιπιδίου που προκαλεί τον αναστολή της ανάπτυξης του παρασίτου, παρουσία σταθερών συγκεντρώσεων peptaibols (5 μM AAM και 2 μM SZ).
[d] Combination Index (CI) values.
[e] Κυτταροτοξική δράση των φαρμάκων (CC_{50}) σε THP-1 μονοκύτταρα.
[f] Αιμολυτική δράση (HC_{50})
[g] Ποσοστό αιμόλυσης που παρατηρείται στα 100 μM κάθε φαρμάκου.

Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η αντι-λεϊσμανιακή δράση συγκεκριμένων δόσεων peptaibols (5μM AAM και 2μM SZ) σε συνδυασμό με διάφορες συγκεντρώσεις μιλτεφοσίνης και του λιγότερα ενεργού αναλόγου TC52 έναντι της ενδοκυττάριας μορφής του παρασίτου. Οι συγκεκριμένες δόσεις των peptaibols επιλέχθηκαν επειδή δεν επηρεάζουν την κυτταροτοξική και αιμολυτική δράση των αιθερικών φωσφολιπιδίων (Πίνακας 11). Επιπρόσθετα, το ανάλογο TC52, αν και είναι ανενεργό έναντι της προμαστιγωτής μορφής του παρασίτου στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, κατέχει υψηλότερο θεραπευτικό δείκτη από τη μιλτεφοσίνη (SI_{TC52}>75, SI_{HePC}:15.8). Όπως φαίνεται στον Πίνακα 12, το IC_{50} της HePC σε συνδυασμό και με τα δύο peptaibols είναι κατά 6 φορές χαμηλότερο σε σχέση με την HePC μόνο. Αντίστοιχα, οι τιμές IC_{50} του TC52 είναι 4,7 φορές και 2,6 φορές χαμηλότερες όταν συνδυαστεί με AAM και SZ αντίστοιχα.

Μελετήθηκε επίσης η κυτταροτοξική και αιμολυτική δράση των συνδυασμών. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι επιλεγμένες σταθερές δόσεις των peptaibols σε συνδυασμό

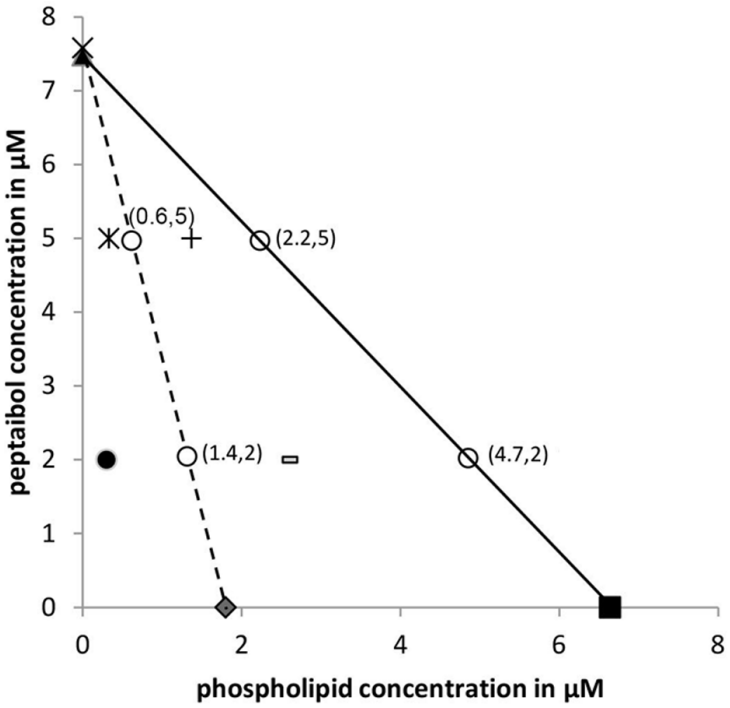
με διάφορες συγκεντρώσεις φωσφολιπιδίων. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 12, στα 15μM HePC και 25μM TC52 που αντιστοιχούν στις υψηλότερες συγκεντρώσεις φωσφολιπιδίου που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της αντι-λεϊσμανιακής δράσης έναντι της αμαστιγωτής μορφής), τόσο η κυτταροτοξική όσο και η αιμολυτική δράση παραμένουν στα ίδια επίπεδα όπως κατά την επώαση με φωσφολιπίδια μόνο.

Compound or combination	% PI-stained THP-1 cells[a]	% Hemolysis[b]
HePC	27.6	8.8 ± 0.3
HePC/AAM	27.1	10.2 ± 0.6
HePC/SZ	31.4	9.4 ± 0.8
TC52	3.8	2.1 ± 0.1
TC52/AAM	3.8	1.5 ± 0.1
TC52/SZ	3	1.9 ± 0.2

Πίνακας 12: *Κυτταροτοξική και αιμολυτική δράση 15 μM HePC και 25 μM TC52 σε συνδυασμό με 5 μM AAM and 2 μM SZ. [a]Η κυτταροτοξική δράση εκφράζεται ως ποσοστό νεκρών κυττάρων σημασμένων με PI και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. [b]Η αιμολυτική δράση εκφράζεται ως το ποσοστό αιμόλυσης που προκαλείται κατά την επώαση επυθρών αιμοσφαιρίων από ανθρωπινο περιφερικό αίμα.*

Προκειμένου να μελετηθεί η πιθανή συνεργητική δράση του συνδυασμού αιθερικών φωσφολιπιδίων και peptaibols, χρησιμοποιήθηκε το Loewe Additivity μοντέλο, που αποτελεί ένα γνωστό και ευρέως χρησιμοποιούμενο μοντέλο για την μελέτη συνεργητικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ ουσιών[241].

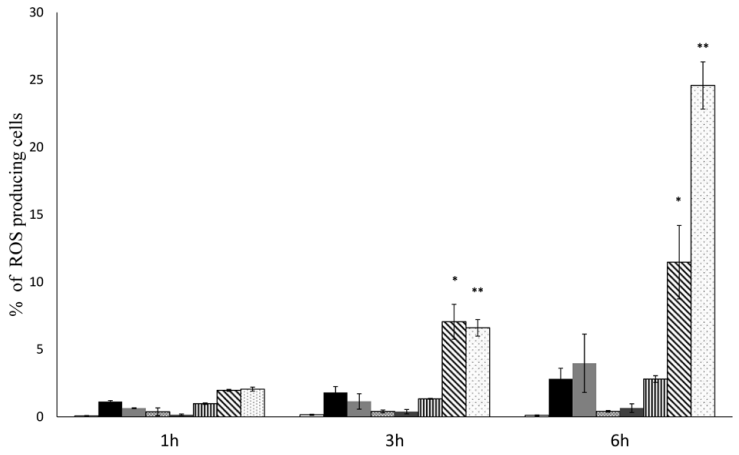
Χρησιμοποιώντας τις τιμές IC_{50} που υπολογίστηκαν για κάθε ουσία χωριστά έναντι της ενδοκυττάριας μορφής του παρασίτου, σχεδιάστηκαν τα αντίστοιχα isoboles, όπως αναφέρεται αναλυτικά στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Όπως φαίνεται στο Γράφημα 9, τα σημεία τομής των πειραματικών ζευγών συγκεντρώσεων που προκαλούν την αναστολή της ανάπτυξης του ενδοκυττάριου παρασίτου κατά 50%, εμφανίζονται κάτω από τα αντίτοιχα isoboles, υποδηλώνοντας ενισχυμένη αντιλεϊσμανιακή δράση των συνδυασμών λόγω συνεργητικής δράσης.



Γράφημα 9: *Ποσοτικός προσδιορισμός της συνδυαστικής δράσης αιθερικών φωσφιπιλιδίων και peptaibols σύμφωνα με το Loewe Addittivity μοντέλο. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν τα isoboles όπως ορίζονται από τις τιμές IC_{50} των peptaibols στον άξονα y και τις τιμές IC_{50} της μιλτεφοσίνης (διακεκομμένη γραμμή) και του TC52 (συνεχόμενη γραμμή) στον x άξονα, αντίστοιχα. Οι ανοιχτοί κύκλοι εκπροσωπούν τα θεωρητικά ζεύγη δόσεων που σκοτώνουν το 50% των παρασίτων in a simple additive manner. Τα πειραματικά ζεύγη δόσεων αποδίδονται ως εξής: (✳)HePC/AAM, (●)HePC/SZ, (+)TC52/AAM, (-)TC52/SZ.*

Όπως παρατηρήθηκε στον Πίνακα 11 οι τιμές CI (combination index) είναι χαμηλότερες κατά τον συνδυασμό των δύο φωσφολιπιδίων με την SZ, αν και η AAM χρησιμοποιήθηκε σε υψηλότερη συγκέντρωση. Ωστόσο, οι τιμές CI για όλους τους συνδυασμούς είναι κάτω από 1, επιβεβαιώνοντας την συνεργητική δράση που παρατηρήθηκε στην ανάλυση των isobologram.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η συνολική παραγωγή ROS κατά την επώαση με τα φωσφολιπίδια και τα peptaibols, με τη χρήση της ουσίας CM-H_2DCFDA. Όλες οι επωάσεις έγιναν σε συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο IC_{50} και το ποσοστό των προμαστιγωτών που παράγουν ROS ποσοτικοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής (Γράφημα 10).

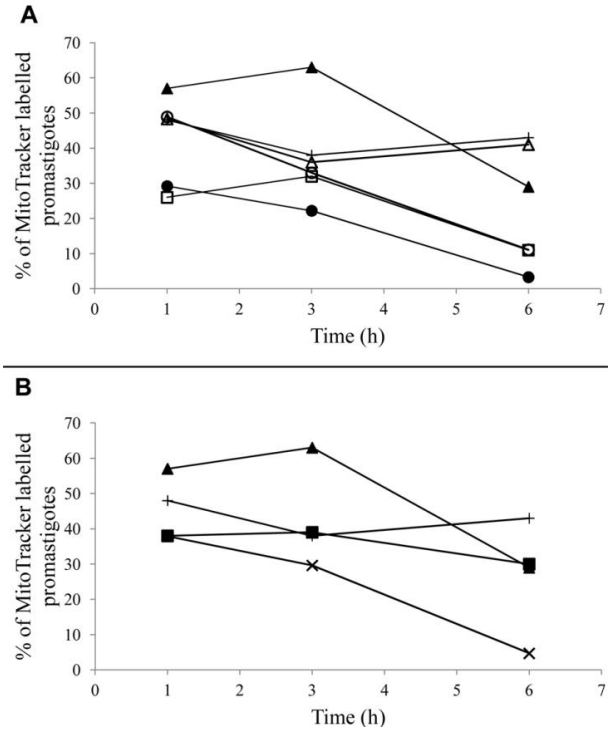


Γράφημα 10: *Παραγωγή ROS κατά την επώαση προμαστιγωτών με τα peptaibols, τα ανάλογα και τον συνδυασμό τους. (□) control, (■) AAM, (■) SZ, (▩) T52, (■) HePC, (▥) AAM/TC52, (▧) AAM/HePC, (⊡) SZ/HePC. Οι τιμές αποτελούν τον μέσο όρο του ποσοστού προμαστιγωτών που παράγει ROS από τουλάχιστον 3 πειράματα. * υποδηλώνει την στατιστικά σημαντική διαφορά του συνδυασμού AAM/HePC σε σύγκριση με την AAM μόνο. ** υποδηλώνει την στατιστικά σημαντική διαφορά του συνδυασμού SZ/HePC σε σύγκριση με την SZ (P<0.05).*

Όπως φαίνεται στο Γράφημα 10, και τα δυο peptaibols παράγουν μέτρια επίπεδα ROS που κορυφώνονται στις 6h επώασης. Ωστόσο, κατά την επώαση με μιλτεφοσίνη, παρατηρείται σημαντική αύξηση του ποσοστού προμαστιγωτών που παράγει ROS, τόσο παρουσία AAM όσο και SZ, η οποία φτάνει στο μέγιστο στις 6h. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα της παραγωγής ROS αυξάνονται δραματικά στις 6h επώασης με τον συνδυασμό HePC/SZ. Η επώαση με HePC προκάλεσε την παραγωγή ROS από ένα χαμηλό ποσοστό προμαστιγωτών κατά τη διάρκεια του πειράματος, ενώ η επώαση με το ανενεργό ανάλογο TC52 δεν φάνηκε να επηρεάζει την οξειδοαναγωγική κατάσταση των προμαστιγωτών, όπως διαφαίνεται από τα εξαιρετικά χαμηλά ποσοστά ROS που παράχθηκαν ακόμα και σε συγκέντρωση 50μM.

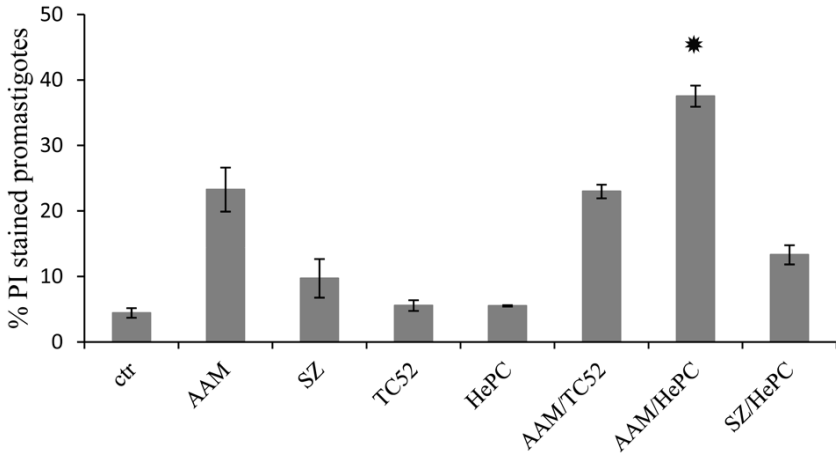
Επιπρόσθετα μελετήθηκε η διαφορά δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης (ΔΨm) κατά την επώαση προμαστιγωτών με τα φωσφολιπίδια και τους συνδυασμούς τους, μετά από χρώση με MitoTracker Red Dye. Όπως φαίνεται στο Γράφημα 11A και 11B, και τα δύο peptaibols προκάλεσαν μεταβολή στη διαφορά δυναμικού, ωστόσο η AAM προκάλεσε μεγαλύτερη αναστολή της μιτοχονδριακής λειτουργίας σε σχέση με την SZ. Παρατηρήθηκε επίσης ότι η HePC είναι η μοναδική ουσία που προκάλεσε συσσώρευση του MitoTracker πάνω από τα επίπεδα του control, στην 1h και 3h επώασης.Ωστόσο, όταν συνδυάστηκε με τα peptaibols, τα μιτοχόνδρια σταδιακά έχασαν αυτήν την ικανότητα και η διαφορά δυναμικού κατακερματίστηκε στις 6h επώασης, μαρτυρώντας τη σοβαρή δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων. Παρατηρήθηκε ότι το ανενεργό TC52 δεν επηρέασε τη μιτοχονδριακή

λειτουργία, και η αλλαγές στη διαφορά δυναμικού που παρατηρήθηκαν κατά την επώαση του TC52 με AAM αντικατοπτρίζουν την δράση της AAM μονο.



Γράφημα 11: *Απεικόνιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας προμαστιγωτών κατά την επώαση με τα peptaibols, τα ανάλογα και τον συνδυασμό τους.* ***A:*** *(+) control, (□) AAM, (▲) HePC, (Δ) TC52, (○) AAM/TC52, (●) AAM/HePC.* ***B:*** *(+) control, (■) SZ, (▲) HePC, (x) SZ/HePC. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το ποσοστό των προμαστίγωτών που εκφράζει MitoTracker με ένταση φθορισμού πάνω από* 10^2 *στην λογαριθμική κλιμακα, μετά από ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.*

Όλες οι παραπάνω μεταβολές που παρατηρήθηκαν στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των προμαστιγωτών και τη φυσιολογία του μιτοχονδρίου του παρασίτου συσχετίστηκαν με την βιωσιμότητα των προμαστιγωτών στις 6h επώασης με τα φωσφολιπίδια και τους συνδυασμούς με τα peptaibols, μετά από χρώση με PI και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (Γράφημα 12). Η επίδραση της HePC στην βιωσιμότητα των προμαστιγωτών ήταν αμελητέα (5,5% νεκρά παράσιτα έναντι 4,4% στο control), αυξήθηκε όμως σημαντικά κατά 5,3 φορές παρουσία της AAM και 2,2 φορές κατά την επώαση με SZ.



Γράφημα 12: *Βιωσιμότητα προμαστιγωτών μετά από 6h επώασης με τα peptaibols, τα ανάλογα και τον συνδυασμό τους. Απεικονίζεται το ποσοστό των PI-θετικών παρασίτων σε σύγκριση με το control. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο ± SEM από τουλαχιστον 3 πειράματα. * υποδηλώνει την στατιστικά σημαντική διαφορά του συνδυασμού AAM/HePC σε σύγκριση με την AAM μόνο (P<0.05).*

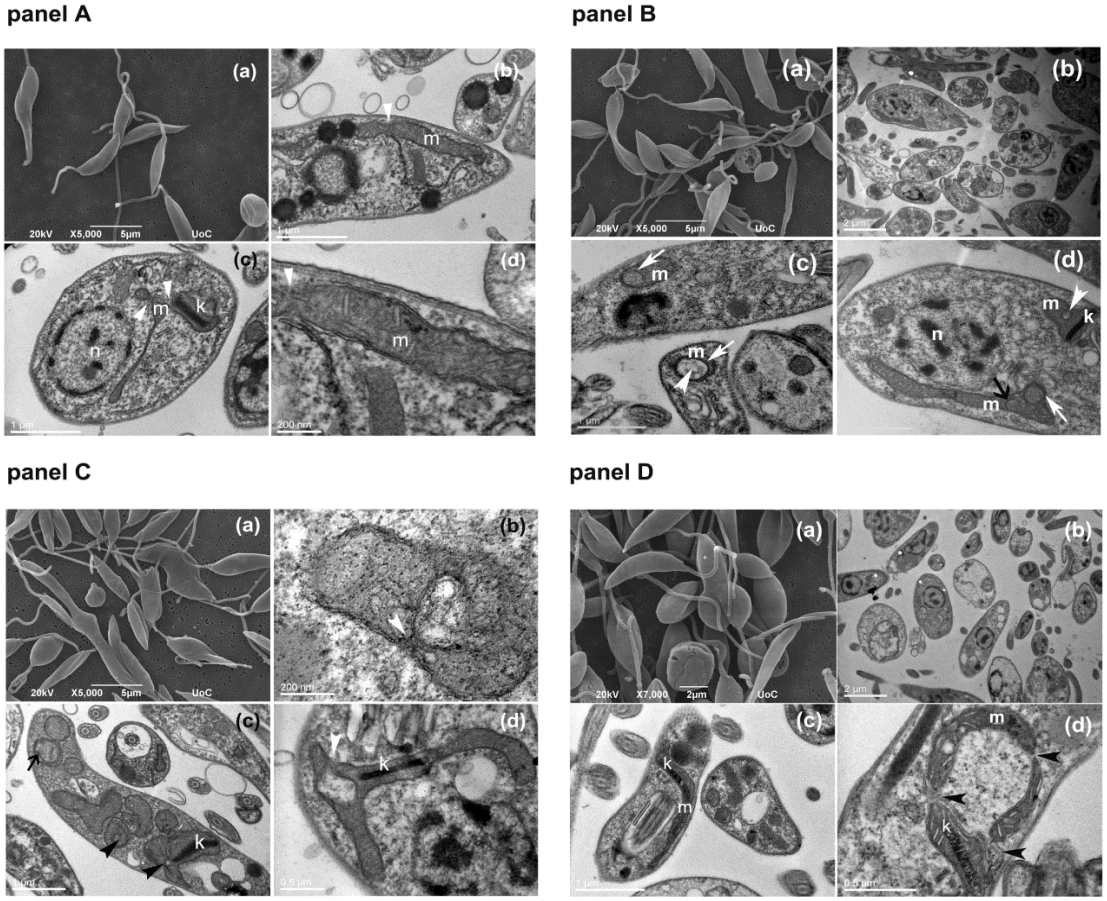
Η επώαση με τον συνδυασμό AAM/HePC προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση του ποσοστού των νεκρών προμαστιγωτών, που όπως αναφέρθηκε παραπάνω συνοδεύτηκε από αύξηση των ενδοκυττάριων επιπέδων ROS και μείωση της διαφοράς δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Προ εκπλήξεως, η βιωσιμότητα των προμαστιγωτών που επωάστηκαν με τον συνδυασμό SZ/HePC δεν επηρεάστηκε σημαντικά στις 6h επώασης, παρά την ιδιαίτερα υψηλή παραγωγή ROS καθώς και τον κατακερματισμό της $\Delta\Psi m$ που παρατηρήθηκε σε αυτόν τον συνδυασμό φαρμάκων. Ωστόσο, η μακροπρόθεσμη επίδραση του συνδυασμού της HePC και με τα δύο peptaibols στην βιωσιμότητα των προμαστιγωτών ήταν παρόμοια, με περίπου 98% των παρασίτων να εκφράζουν PI χρώση μετά από 24h επώασης. Ενδιαφέρον προκαλεί και πάλι το ανενεργό ανάλογο TC52, όπου ο συνδυασμός του με AAM προκαλεί τον ίδιο αριθμό νεκρών κυττάρων οσα η AAM μόνο.

Τέλος, μελετήθηκαν οι μορφολογικές αλλαγές που προέκυψαν από την επώαση των προμαστιγωτών με HePC και AAM, με τη χρήση SEM. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά παράσιτα, που κατέχουν επιμηκυμένο σχήμα και ελεύθερο μαστίγιο, η επώαση με AAM προκάλεσε βλάβη στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και άλλαξε τη μορφολογία του μαστιγίου (Εικόνα 43C). Οι αλλαγές αυτές παρατηρήθηκαν εντονότερα στον συνδυασμό AAM/HePC, ωστόσο η HePC από μόνη της δεν φαίνεται να επηρεάζει ιδιαίτερα τη μορφολογία των προμαστιγωτών.

Στην εσωτερική δομή του μιτοχονδρίου, η επώαση με HePC και AAM προκάλεσε την έντονη δημιουργία κυστιδίων. Παρατηρήθηκαν κυρίως αλλαγές στη δομή των μιτοχονδρίων, τα οποία υπέστησαν σημαντικές μορφολογικές αλλαγές που δηλώνονται από δύο διακριτές

δομικές αλλαγές. Η επώαση με AAM και με τον συνδυασμό AAM/HePC προκαλεί τη δημιουργία ενός υψηλά διασυνδεμένου μιτοχονδριακού δικτύου ή τη συσσώρευση ογκωδών μιτοχονδρίων (Εικόνα 43C και 43D), που πιθανόν να οφείλεται σε ανισορροπία στην διασικασία fission/fussion. Αυτές οι επιμηκυμένες και συχνά διακλαδωμένες μιτοχονδριακές δομές, κατέχοντας ένα καμπυλωτό σχήμα γύρω από το κυτταροπλασματικό περιεχόμενο, οδηγούν στη δημιουργία μιας κλειστής δομής σε σχήμα “donut” (Εικόνα 43Cc,arrow head) ή μια ανοιχτής δομή σε σχήμα δαχτυλιδιού με ανοιχτό πόρο (Εικόνα 43Cd, black arrow head). Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκαν συμπλέγματα μιτοχονδρίων (Εικόνα 43Dd black arrow head και Εικόνα 43Cd arrow head) που συνδέονται με μεμβράνες κυρίως κατά την επώαση με AAM.

Κατά την επώαση με HePC παρατηρήθηκαν κυρίως μιτοχόνδρια με ραβδοειδές ή στρογγυλό σχήμα, ενώ η διαδικασία fission/fussion δεν φάνηκε να επηρεάζεται. Τα μιτοχόνδρια σε σχήμα δαχτυλιδιού υπερισχύουν και δημιουργούν δομές που μοιάζουν με κυστίδια, που πιθανόν να προέρχονται από την επιμήκυνση των μιτοχονδριακών μεμβρανών (Εικόνα 43Bc και d, white arrows), περικλείοντας μια ηλεκτρονικά αραιή δομή που μοιάζει με κυτταρόπλασμα (Εικόνα 43Bc, white arrow head). Τέλος, παρατηρείται σε μερικά κύτταρα ένας εκκολαπτόμενος vesicle-like δακτύλιος (Εικόνα 43Bd, 43Cc, black arrows), στο σχηματισμό του οποίου πιθανόν να συμμετέχουν μιτοχονδριακές ακρολοφίες.



Εικόνα 43: *Μορφολογικές αλλαγές σε προμαστιγωτά L.infantum μετά από επώαση με AAM, HePC και τον συνδυασμό τους για 6h. Panel A: control. Panel B: Μετασχηματισμός των μιτοχονδριακών ακρολοφιών και σχηματισμός ομόκεντρων μεμβρανών κατά την επίδραση με HePC (Bb και Bd, white arrows). Σπανιότερα δομές που μοιάζουν με σφαιροειδή (spheroids) (Bd, white arrow head). Panel C: Η επώαση με AAM προκαλεί τραυματισμό της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Ca) και προωθεί τη δημιουργία ογκωδών κυρτών μοτοχονδρίων (Cb και Cd, arrows). Παρατηρείται επίσης ο σχηματισμός ενός διασυνδεμένου μιτοχονδριακού δικτύου στα περισσότερα κύτταρα, ενώ η παρουσία κυστιδίων στο κυτταρόπλασμα είναι αρκετά έντονη.Panel D: Κατά την επώαση με τον συνδυασμό AAM/HePC (Da) παρατηρείται παρατεταμένη ζημιά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και ισχυρή διασύνδεση των μιτοχονδρίων δημιουργώντας τος χαρακτηριστικές κυρτές δομές (Dd black arrow heads).*

Συμπέρασμα

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα ενισχύεται η ένδειξη για χρήση συνδυαστικών θεραπειών για την καταπολέμηση της λεϊσμανίασης. Επιπρόσθετα τα peptaibols που χρησιμοποιήσαμε φαίνεται να κατέχουν αντιλεϊσμανιακη δράση, αποσταθεροποιώντας τη μιτοχονδριακή μεμβράνη και προκαλώντας εκτεταμένες μορφολογικές αλλαγές στο μιτοχόνδριο του παρασίτου, αναδεικνύοντας έτσι την αντιπαρασιτική τους ιδιότητα. Το πιο σημαντικό εύρημα ωστόσο αφορά στην επαγωγή της συνεργητικής δράσης των ουσιών που μελετήσαμε συνδυάζοντας διαφορετικές τάξεις φαρμάκων, οδηγώντας αποτελεσματικά στην απομάκρυνση του ενδοκυττάριου παρασίτου.

6.6. Πρωτεωμική ανάλυση σε προμαστιγωτά μετά από προσαρμογή σε υποανασταλτικές συγκεντρώσεις μιλτεφοσίνης και του αναλόγου TC19

Σκοπός της μελέτης μας είναι η διερεύνηση των μηχανισμών προσαρμογής των προμαστιγωτών *L. donovani* στις αλκυλοφωσφοχολίνες. Η προσαρμοστική αντοχή αναδύεται όταν ένα παθογόνο υποβάλλεται σε σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης μιας αντιμικροβιακής ουσίας. Χαρακτηρίζεται από ταχεία εμφάνιση ανθεκτικότητας ή μειωμένης ευαισθησίας, η οποία είναι γρήγορα αναστρέψιμη όταν το αντιμικροβιακό απομακρύνεται από το μέσον. Οι μηχανισμοί που μεσολαβούν είναι κυρίως αλλαγές στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, που επηρεάζουν βασικές μεταβολικές λειτουργίες του παθογόνου όπως η παραγωγή ενέργειας, ο αναβολισμός και άλλα. Επιλέξαμε την ποσοτική πρωτεωμική ως εργαλείο για την ανάδειξη

πρωτεϊνών, η έκφραση των οποίων επηρεάζεται κατά τη διαδικασία προσαρμογής σε υποανασταλτικές συγκεντρώσεις μιλτεφοσίνης και του αναλόγου TC19.

Πειραματικός σχεδιασμός

Επιλέξαμε το ανάλογο TC19 διότι στην *in vitro* αξιολόγηση της αντιλεϊσμανιακής δράσης εμφανίστηκε κατά 9,6 φορές πιο ενεργό από τη μιλτεφοσίνη (TC19 $IC_{50\ \text{προμαστιγωτά}}$: 0,9±0,1 μM έναντι HePC $IC_{50\ \text{προμαστιγωτά}}$: 8.7± 0,5 μM και TC19 $IC_{50\ \text{αμαστιγωτά}}$: 0,7±0,4 μM έναντι HePC $IC_{50\ \text{αμαστιγωτά}}$: 6.7± 0,7 μM), ενώ δεν είναι καθόλου κυτταροτοξικό (CC_{50} >500 μM).

Τα ανθεκτικά/προσαρμοσμένα στελέχη προμαστιγωτής *L.donovani* κατασκευάστηκαν στο εργαστήριο υπό συνεχή φαρμακευτική πίεση όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση του πρωτεώματος των στελεχών με φασματομετρία μάζας και συγκρίθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών ανάμεσα στους ανθεκτικούς/προσαρμοσμένους πληθυσμούς και τον πληθυσμό ελέγχου.

Συγκεκριμένα, έγινε ανάλυση της διαφορικής έκφρασης των πρωτεϊνών στην αρχική συγκέντρωση 0,1 μM και στην καταληκτική 0,4 μM και για τα δύο φωσφολιπίδια. Η συγκέντρωση 0,4μM ήταν η καταληκτική συγκέντρωση για την HePC, καθώς η αμέσως επόμενη συγκέντρωση των 0,8μM ήταν τοξική για τα προμαστιγωτά. Παρότι μοιάζει παράδοξο, η συγκέντρωση 0,4μM είναι 22 φορές χαμηλότερη της τιμής IC_{50} έναντι της προμαστιγωτής *L.donovani* για τη μιλτεφοσίνη, αλλά μόνο 2 φορές χαμηλότερη για το TC19, πρέπει όμως να λάβουμε υπ' όψιν ότι η τιμή IC_{50} αξιολογείται μετά από 48h επώασης, ενώ η προσαρμογή εκτιμάται μετά από επώαση >7 ημερών, με κριτικό σημείο για την εφαρμογή μεγαλύτερης συγκέντρωσης φωσφολιπιδίου τη βιωσιμότητα του πληθυσμού σε ποσοστό άνω του 80%.

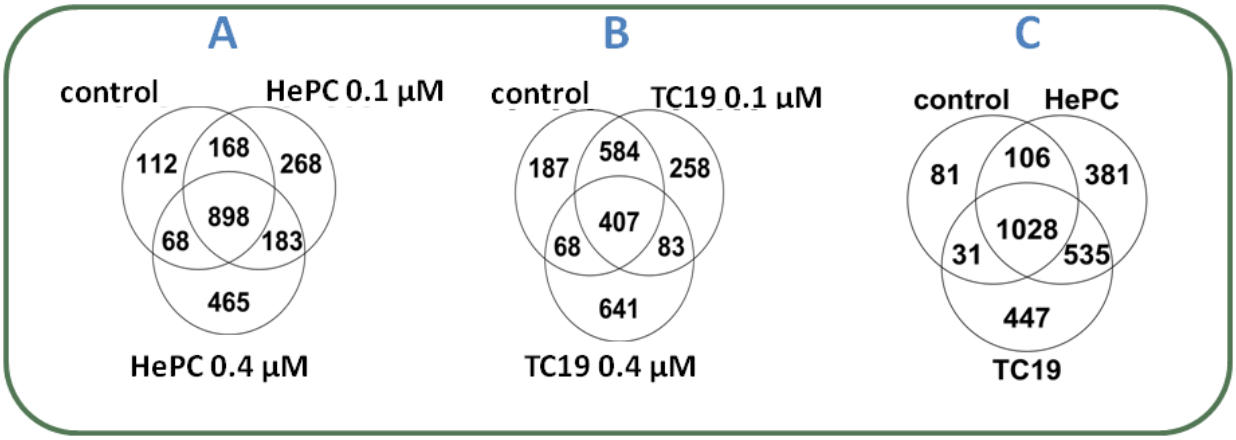
Τα αποτελέσματα που αναλύονται σε αυτό το κεφάλαιο προέρχονται από τα στελέχη που επωάστηκαν με 0,4μM. Σε επιλεγμένες περιπτώσεις παρουσιάζουμε συγκριτικά τα αποτελέσματα και στη συγκέντρωση 0,1μM, για να αναδείξουμε την επίδραση στην έκφραση ορισμένων κεντρικής σημασίας πρωτεϊνών, αναλογικά με τη συγκέντρωση του φωσφολιπιδίου.

Αποτελέσματα

Μια ακριβής πρωτεο-γονιδιωματική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρωτέωμα που προέκυψε από τα 5 σύνολα δεδομένων, χρησιμοποιώντας το γονιδίωμα από τη *L.donovani* και τη *L.infantum* που είναι διαθέσιμα στις βάσεις δεδομένων. Με αυτή την ανάλυση

ταυτοποιήθηκαν 10500 μοναδικά πεπτίδια τα οποία αντιστοιχήθηκαν με 3237 μοναδικές πρωτεϊνες της *L. donovani*. Το γονιδίωμα περιέχει 8000 ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs) εκ των οποίων τα 3386 (42,3%) έχουν ανιχνευθεί σε πρωτεωμική ανάλυση των πρωμαστιγωτών μορφών[242]. Τα δικά μας αποτέλεσματα αντιστοιχούν στο 40,7% των ORFs του γονιδιώματος της *L. donovani*. Από αυτές τις πρωτεΐνες οι 381 πρωτεΐνες εκφράζονται μόνο κατά τη συνεχόμενη επώαση με μιλτεφοσίνη και οι 447 εκφράζονται μόνο κατά την επώαση με TC19. Αντίστοιχα, 81 πρωτεΐνες εκφράζονται μόνο στον πληθυσμό ελέγχου (control).

Από το σύνολο των πρωτεϊνών οι 1028 εκφράζονται σε όλα τα στελέχη, τόσο κατά την επώαση με φωσφολιπίδιο όσο και στον πληθυσμό ελέγχου (Εικόνα 44). Παρατηρούμε επίσης ότι κατά την επώαση με μιλτεφοσίνη εκφράζονται 916 πρωτεΐνες που δεν ανιχνεύονται στον πληθυσμό ελέγχου, ενώ αντίστοιχα, η επώαση με TC19 επάγει την έκφραση 982 που δεν εκφράζονται απουσία φαρμάκου. Από αυτές τις πρωτεΐνες οι 535 (~60%) είναι κοινές μεταξύ HePC και TC19, σε αντίθεση με το υπόλοιπο 40% που ρυθμίζεται ειδικά από κάθε φωσφολιπίδιο.



Εικόνα 44: *Διάγραμμα Venn απεικόνισης των ομάδων πρωτεϊνών με αποκλειστική ή κοινή έκφραση στους πληθυσμούς με (A): 0μM (πληθυσμός ελέγχου), 0,1μM ή 0,4μM HePC και (B): 0μM (πληθυσμός ελέγχου), 0,1μM ή 0,4μM TC19. Το διάγραμμα C συγκρίνει τις πρωτεΐνες μεταξύ των 3 πληθυσμών.*

Η διαφορά στην αφθονία κάθε πρωτεΐνης παρουσιάζεται ως ο $\log_2$ του λόγου του αριθμού των φασμάτων της στο ανθεκτικό/προσαρμοσμένο στέλεχος, προς τον αντίστοιχο αριθμό στο δείγμα ελέγχου. Σημαντική αλλαγή έκφρασης μια πρωτεΐνης θεωρούμε τη μεταβολή πέραν του ±2. Από την ανάλυση των πρωτεϊνών αναγνωρίστηκαν 1099 πρωτεϊνες με αυξημένη έκφραση και 33 πρωτεϊνες με μειωμένη έκφραση στο προσαρμοσμένο στη μιλτεφοσίνη στέλεχος, ενώ στο προσαρμοσμένο στο TC19 στέλεχος εμφανίστηκαν 719 πρωτείνες με αυξημένη έκφραση και 62 πρωτεϊνες με μειωμενη έκφραση, σε σύγκριση με τον

πληθυσμό ελέγχου. Ο αριθμός των πρωτεϊνών των οποίων η έκφραση ρυθμίζεται κατά την επώαση με 0,4 μM HePC ή TC19, αποτυπώνονται στον Πίνακα 13.

	Αριθμός πρωτεϊνών με ειδική έκφραση	**Αριθμός πρωτεϊνών με αυξημένη έκφραση (>2fold)**	**Αριθμός πρωτεϊνών με μειωμένη έκφραση (<-2fold)**
***L.donovani* 0,4 μM HePC**	465	1099	33
***L.donovani* 0,4 μM TC19**	641	719	62

Πίνακας 13: *Αριθμός πρωτεϊνών με ειδική έκφραση σε στελέχη L.donovani, προσαρμοσμένα σε 0,4μM HePC ή 0.4μM TC19.*

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζουμε τα αποτελέσματα της επίδρασης των φαρμάκων σε κύρια συστατικά που συμμετέχουν στο μηχανισμό εισόδου των φωσφολιπιδίων στο κύτταρο, στον μεταβολισμό των λιπιδίων και στην παραγωγή ενέργειας από τα γλυκοσώματα και τα μιτοχόνδρια.

Μηχανισμός εισόδου των φωσφολιπιδίων στο κύτταρο

Στη *L.donovani* έχουν ταυτοποιηθεί 2 γονίδια ATPase, που ανήκουν στην υπο-οικογένεια των μεταφορέων των φωσφολιπιδίων και εκφράζονται στην πλασματική μεμβράνη των παρασίτων. Πειραματικά τεκμηριωμένη είναι η ATPase 1 (LdBPK_131590) ως ο κύριος μεταφορέας της μιλτεφοσίνης, που δρα με τη συμβολή της ROS3 (LdBPK_320540)[189]. Δεν γνωρίζουμε εάν άλλες αλκυλοφωσφοχολίνες χρησιμοποιούν τον ίδιο μηχανισμό εισόδου στο κυτταρόπλασμα με τη μιλτεφοσίνη, όπως επίσης δεν γνωρίζουμε εάν η flippase (LdBPK_302270) μπορεί να δράσει ως μεταφορέας αλκυλοφωσφοχολινών.

Protein	**Accession number**	**Fold Change**			
		HePC		**TC19**	
		0,1μM	**0,4μM**	**0,1μM**	**0,4μM**
phospholipid-translocating P-type ATPase (flippase), putative	LdBPK_302270	ND	ND	ND	5,30
miltefosine-transporting ATPase 1-like protein subunit 1	LdBPK_131590	ND	7,30	ND	ND
Miltefosine transporter ROS3, subunit 2	LdBPK_320540	-0,20	2,00	1,17	ND

Πίνακας 14: *Έκφραση των κύριων μεταφορέων φωσφολιπιδίων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. ND: μη ανιχνεύσιμο*

Τα αποτελέσματα του Πίνακα 14 υποδεικνύουν ότι η μιλτεφοσίνη και το ανάλογο TC19 χρησιμοποιούν διαφορετικούς μεταφορείς. Ο μεταφορέας της μιλτεφοσίνης ATPase 1, ανιχνεύεται μόνο στη συγκέντρωση 0,4μM της μιλτεφοσίνης, ενώ αντίστοιχα η flippase μόνο στα 0,4μM TC19. Το ενδιαφέρον είναι ότι στον πληθυσμό ελέγχου δεν ανιχνεύεται καμία από τις δυο ATPases. Η υπομονάδα 2, ROS3 παρ' ότι είναι οριακά ανιχνεύσιμη στον πληθυσμό ελέγχου και τις χαμηλές συγκεντρώσεις των αναλόγων, επάγεται σημαντικά στα 0,4μM μιλτεφοσίνης αλλά όχι στο TC19.

Μεταβολισμός των λιπιδίων

Η *Leishmania* χρειάζεται μεγάλες ποσότητες λιπαρών οξέων για την επιβίωσή της (παραγωγή ενέργειας, δομικά συστατικά μεμβρανών, παράγοντες μολυσματικότητας και επιβίωσης στον ξενιστή κ.α) τα οποία είτε συνθέτει *de novo* είτε προσλαμβάνει από το περιβάλλον. Από μελέτες ποσοτικοποίησης των λιπιδίων μετά από επώαση με μιλτεφοσίνη συνάγεται ότι στα ανθεκτικά παράσιτα έχουν επηρεαστεί τρεις βιοχημικοί μηχανισμοί μεταβολισμού των λιπιδίων:

- η επιμήκυνση των αλυσίδων των λιπαρών οξέων
- το σύστημα αλλαγής του βαθμού κορεσμού των λιπαρών οξέων (the desaturase system)
- η C-24-αλκυλίωση των στερολών

Οι μεταβολές των δυο πρώτων μηχανισμών έχουν σαν κύριο σκοπό τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης των φαρμάκων με την εξωτερική μεμβράνη, αυξάνοντας την αδιαβατότητα και κατά συνέπεια την αντοχή[243]. Ο τρίτος μηχανισμός επιδρά στην σταθερότητα των mRNAs στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ)[244]. Για τους λόγους αυτούς τα μονοπάτια βιοσύνθεσης και μεταβολισμού των λιπαρών οξέων θεωρούνται σημαντικοί στόχοι νέων αντιπαρασιτικών ουσιών.

Από τα αποτελέσματα της πρωτεωμικής ανάλυσης επικεντρωθήκαμε στους μηχανισμούς βιοσύνθεσης ορισμένων στερολών και μεταβολισμού των λιπαρών οξέων και αναλύσαμε τα κύρια ένζυμα που συμμετέχουν.

- **Μηχανισμοί που επιδρούν στις ιδιότητες της πλασματικής μεμβράνης**

Στον Πίνακα 15 αναφέρονται τρια σημαντικά ένζυμα βιοσύνθεσης των στερολών καθώς και δυο ένζυμα τροποποίησης των λιπιδίων που επηρεάζουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες της πλασματικής μεμβράνης, το ένζυμο αποκορεσμού των λιπαρών οξέων και το ένζυμο cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase που τροποποιεί τους ακόρεστους δεσμούς των αλιφατικών αλυσίδων εισάγοντας δακτυλίους κυκλοπροπανίου. Επίσης, αναφέρεται το ένζυμο LdBPK_111100 που συμβάλει στη σταθερότητα του mRNA.

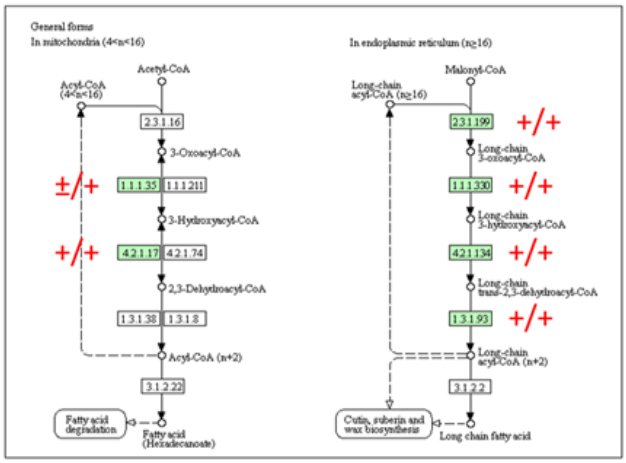
Protein	Accession number	Fold Change			
		HePC		TC19	
		0,1μM	0,4μM	0,1μM	0,4μM
lanosterol synthase, putative	LdBPK_060670	0,80	6,00	1,08	5,40
sterol C-24 reductase, putative	LdBPK_330730	ND	6,60	0,0028	5,60
sterol 24-c-methyltransferase, putative	LinJ.36.2510	-0,50	1,60	0,008	1,00
lanosterol 14-alpha-demethylase	LdBPK_111100.1	0,11	1,10	0,55	ND
fatty acid desaturase, putative	LdBPK_333420	ND	8,70	5,22	ND
cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	LdBPK_080560	ND	ND	ND	4,40

Πίνακας 15: *Ένζυμα που τροποποιούν τις φυσικοχημικές ιδιότητες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. ND: μη ανιχνεύσιμο*

Παρατηρούμε ότι τα δυο από τα τρια ένζυμα βιοσύνθεσης στερολών (LdBPK_060670 και LdBPK_330730) επάγονται ισχυρά συνέπεια της επίδρασης των δυο φωσφολιπιδίων. Τα φωσφολιπίδια επιδρούν διαφορετικά στην έκφραση της C-14 demethylase (οριακή αύξηση υπό την μιλτεφοσίνη αλλά σταδιακή μείωση υπό το TC19). Επιπλέον, το σύστημα αποκορεσμού των λιπαρών οξέων εμφανίζει σημαντικές διαφοροποιήσεις στη έκφρασή του τόσο σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση των αναλόγων όσο και μεταξύ των αναλόγων. Ενδιαφέρον εμφανίζει η έκφραση της συνθετάσης του κυκλοπροπανίου που επάγεται ισχυρά μόνο στο προσαρμοσμένο στο TC19 στέλεχος.

- **Επιμήκυνση της αλυσίδας των λιπαρών οξέων**

Στη *Leishmania* ο παραπάνω βιοσυνθετικός μηχανισμός είναι ενεργός τόσο στο ΕΔ όσο και στα μιτοχόνδρια. Σε κάθε οργανίδιο συμμετέχουν διαφορετικά ένζυμα τα οποία ανιχνεύσαμε στα πρωτεωμικά αποτελέσματα. Στην Εικόνα 45 φαίνονται τα μονοπάτια βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων στο ΕΔ και τα μιτοχόνδρια καθώς και τα ένζυμα που συμμετέχουν σε κάθε στάδιο.



protein	accesion	FC HePC	FC TC19
Fatty acid elongation in ER			
fatty acid elongase, putative (2.3.1.199)	LdBPK_140660	10	ND
fatty acid elongase, putative (2.3.1.199)	LdBPK_140680	5,34	4,55
fatty acid elongase, putative (2.3.1.199)	LdBPK_140700	4,23	4,13
hypothetical protein, conserved (1.1.1.330)	LdBPK_340010	3,77	4,97
protein tyrosine phosphatase, putative (4.2.1.134)	LdBPK_050280	4,42	2,38
3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase, putative (1.3.1.93)	LdBPK_251850	2,74	2,53
Fatty acid elongation in mitochondria			
short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, putative (1.1.1.35)	LdBPK_361200	-0,08	2,01
enoyl-CoA hydratase/isomerase-like protein (4.2.1.17)	LdBPK_292420	3,38	3,96
Substrate availability			
acetyl-CoA carboxylase, putative (ACC)	LdBPK_313080	4,5	3,6
malonyl-coa decarboxylase-(MCD)	LdBPK_070820	2,2	ND

Εικόνα 45: *Βιοσύνθεση λιπαρών οξέων στο ΕΔ και τα μιτοχόνδρια. ND: μη ανιχνεύσιμο*

Παρατηρούμε ότι η βιοσύνθεση λιπαρών οξέων είναι ενεργή και στα δυο οργανίδια. Στο ΕΔ υπάρχει ισχυρή υπερέκφραση των ενζύμων τόσο στους πληθυσμούς υπό την επίδραση 0,4μM HePC όσο και σε εκείνους υπό την επίδραση 0,4μM TC19. Στα μιτοχόνδρια φαίνεται η παρόμοια αύξηση της έκφρασης για το ένζυμο LdBPK_292420 και στους δυο πληθυσμούς, ενώ στο LdBPK_361200 η μείωση στη μιλτεφοσίνη είναι οριακή. Όπως φαίνεται στον διάγραμμα του μονοπατιού, το υπόστρωμα στα δύο οργανίδια είναι διαφορετικό. Στα μιτοχόνδρια, το υπόστρωμα είναι ακέτυλο-συνένζυμο, ενώ στο ΕΔ είναι το καρβοξυλιωμένο ακέτυλο-συνένζυμο (malonyl-CoA). Το τελευταίο δεν είναι μόνο το αρχικό υπόστρωμα της συνθετάσης των λιπαρών οξέων, αλλά είναι κεντρικός ρυθμιστής της μεταφοράς των λιπαρών οξέων στο μιτοχόνδριο, λόγω της δράσης του ως αναστολέας της πρόσδεσης των λιπαρών οξέων στην καρνιτίνη. Τα 2 τελευταία ένζυμα της Εικόνας 45 καταλύουν την αντίδραση:

$$\text{Acetyl-CoA} \underset{\text{MCD}}{\overset{\text{ACC}}{\rightleftharpoons}} \text{Malonyl-CoA}$$

Το προφίλ έκφρασης δείχνει ότι στο πληθυσμό με HePC συνυπάρχουν και τα δυο υποστρώματα, ενώ στον πληθυσμό με TC19 κυριαρχεί το malonyl-CoA. Το εύρημα αυτό συνάδει με το επίπεδο ενεργότητας του μηχανισμού β-οξείδωσης στα μιτοχόνδρια όπως περιγράφεται στην επόμενη παράγραφο.

➢ Μεταβολισμός των λιπιδίων στα μιτοχόνδρια

Η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων ρυθμίζεται ταυτόχρονα με τον μεταβολισμό τους, δηλαδή την οξείδωση, κυρίως στα μιτοχόνδρια αλλά και στα γλυκοσώματα. Η οξείδωση των λιπαρών οξέων περιλαμβάνει μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία αντιδράσεων που

καταλήγουν στη μετατροπή των λιπαρών οξέων μεγάλης αλυσίδας σε ακετυλο-CoA μικρής αλυσίδας τα οποία στη συνέχεια μεταβολίζονται στον κύκλο του κιτρικού για την παραγωγή ενέργειας. Τα λιπαρά οξέα προσλαμβάνονται είτε από το εξωκυττάριο περιβάλλον μέσω ειδικών μεταφορέων, είτε μετά από τροποποίηση των λιπιδίων του κυττάρου από την φωσφωλιπάση A2 (PLA2). Ανεξάρτητα από την προέλευσή τους, τα λιπίδια ακολουθούν τον ίδιο μεταβολικό δρόμο 6 σταδίων, με ένα καθοριστικό ένζυμο σε κάθε στάδιο. Η βήτα-οξείδωση ολοκληρώνεται σε επαναλαμβανόμενους κύκλους των 4 σταδίων, έκαστος των οποίων έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση του μήκους των λιπιδικών αλυσίδων κατά 2 άνθρακες και επαναλαμβάνεται μέχρις ότου το τελικό ακετυλο-CoA να μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον κύκλο του κιτρικού. Στον Πίνακα 16 φαίνονται τα ένζυμα και τα ισόμορφά τους που συμμετέχουν στον μεταβολισμό των λιπιδίων στα μιτοχόνδρια.

THE MITOCHONDRIAL FATTY ACID BETA OXIDATION					
Protein	**Accession Number**	**Fold change HePC**		**Fold change TC19**	
		0.1μM	**0,4μM**	**0.1μM**	**0,4μM**
Lipid activation in the cytoplasm					
long chain fatty Acyl CoA synthetase, putative	LdBPK_030220.1	-0,75	1,68	0,40	-0,75
phospholipase A2-like protein, putative	LdBPK_353070.1	0,80	2,77	1,00	1,73
fatty acid desaturase, putative	LdBPK_333420.1	ND	8,70	5,22	ND
Transfer of acyl groups to carnithine schuttle					
carnitine palmitoyltransferase-like protein	LdBPK_220190.1	0,07	2,38	ND	ND
carnitine/choline acetyltransferase, putative	LdBPK_291400.1	-2,40	0,18	-3,00	ND
choline/Carnitine o-acyltransferase-like protein	LdBPK_191570.1	2,50	4,24	2,20	ND
beta-oxidation 1st step					
acyl-CoA dehydrogenase, putative	LdBPK_282700.1	-0,77	2,54	-0,32	0,41
acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor, putative	LinJ.07.0150	0,05	1,86	0,60	ND
acyl-CoA dehydrogenase, putative	LdBPK_352780.1	0,70	1,10	-0,80	ND
acyl-CoA oxidase, putative	LdBPK_272210.1	-0,26	2,93	-0,60	ND
acyl-CoA dehydrogenase, putative	LinJ.28.2700	ND	ND	ND	ND
beta-oxidation 2nd step					
enoyl-CoA hydratase/Enoyl-CoA isomerase/ 3- hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, putative	LdBPK_332740.1	ND	7,20	ND	7,40

beta-oxidation 3d step					
short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, putative	LdBPK_361200.1	-2,00	-0,08	-0,50	2,01
beta-oxidation 4th step					
3-ketoacyl-CoA thiolase-like protein	LdBPK_230860.1	1,00	2,76	-0,37	ND

Πίνακας 16: *Τα στάδια της β-οξείδωσης και τα κύρια ένζυμα που συμμετέχουν. ND: μη ανιχνεύσιμο.*

Παρατηρούμε ότι τα δυο φωσφολιπίδια έχουν διαφορετική επίδραση σε αυτόν τον σημαντικό μεταβολικό μηχανισμό. Υπό την επίδραση της μιλτεφοσίνης ανιχνεύουμε αύξηση της έκφρασης των ενζύμων, τόσο της ενεργοποίησης και μεταφοράς των λιπιδίων στα μιτοχόνδρια, όσο και της βήτα-οξείδωσης. Αντίθετα, στα παράσιτα υπό την επίδραση του αναλόγου TC19, τα κύρια συστατικά του μεταβολικού αυτού μονοπατιού είναι συστηματικά απομειωμένα, με τα περισσότερα από αυτά να μην ανιχνεύονται.

Τα κεντρικής σημασίας στάδια της μεταφοράς των λιπιδίων στον φορέα καρνιτίνη, δεν λειτουργούν στον πληθυσμό με TC19. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της Εικόνας 45 που υποδεικνύει τη μεγάλη επάρκεια του αναστολέα malonyl-CoA. Η δραστηριότητα στα στάδια 2 και 3 της β-οξείδωσης που παρατηρείται στα παράσιτα υπό την επίδραση του TC19, πιθανόν να αντικατροπτίζει τη γλυκοσωμιακή β-οξείδωση η οποία δεν απαιτεί την μεταφορά των λιπιδίων μέσω της καρνιτίνης,. Βέβαια, η ανενεργή β-οξείδωση στα μιτοχόνδρια στον πληθυσμό με TC19 δεν υπονοεί ότι αυτό το οργανίδιο δεν είναι λειτουργικό, καθώς όπως συμπεραίνεται στην επόμενη παράγραφο, η παραγωγή ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι ενεργή και στους δύο πληθυσμούς.

Μηχανισμός παραγωγής ενέργειας

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 17, η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι υπερενεργοποιημένη για την πλειοψηφία των ενζυμικών συμπλεγμάτων και στους δυο πληθυσμούς. Παρατηρούμε επίσης την ομοιομορφία στην επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών και κυρίως των ισομορφών της prohibitin, των πρωτεϊνών που συνδέονται με την ομοιόσταση των μιτοχονδρίων και τη βιωσιμότητα του κυττάρου στο στρες.

Protein	Accession Number	FOLD CHANGE	FOLD CHANGE
		HepC 0,4μM	TC19 0,4μM
COMPLEX I			
NADH dehydrogenase, putative	LdBPK_365620.1	4,84	2,70
COMPLEX II			
succinate dehydrogenase flavoprotein, putative	LdBPK_241700.1	0,64	0,44
COMPLEX III cytochrome c reductase			
ubiquinol-cytochrome-c reductase-like protein	LdBPK_312650.1	ND	9,5
cytochrome c1, heme protein, mitochondrial precursor, putative	LdBPK_070210.1	2,97	2,92
complex III ubiquinol-cytochrome c reductase subunit 7	LdBPK_350100.1	11,3	11,8
rieske iron-sulfur protein precursor, putative	LdBPK_351540.1	1,87	1,90
cytochrome c, putative	LdBPK_161380.1	3,18	2,21
COMPLEX IV cytochrome c oxidase			
cytochrome c oxidase subunit IV	LdBPK_120620.1	0,02	-1,25
cytochrome c oxidase subunit V, putative	LdBPK_261690.1	10,6	11,4
cytochrome c oxidase assembly factor-like protein	LinJ.20.0850	3,86	4,92
cytochrome c oxidase assembly factor, putative	LinJ.04.1140	7,8	8,9
COMPLEX V proton channel			
ATPase alpha subunit	LdBPK_050510.1	2,06	-0,60
ATPase beta subunit, putative	LdBPK_251210.1	2,02	0,43
ATP synthase F1 subunit gamma protein, putative	LdBPK_212140.1	2,94	2,56
ATP synthase, epsilon chain	LdBPK_303660.1	4,25	5,25
OSCP c subunit of ATP synthase	LdBPK_210640.1	ND	8,1
Regulation of OXPHOS activity			
prohibitin	LdBPK_161710.1	5,34	5,48
prohibitin	LinJ.35.0070	1,93	1,74

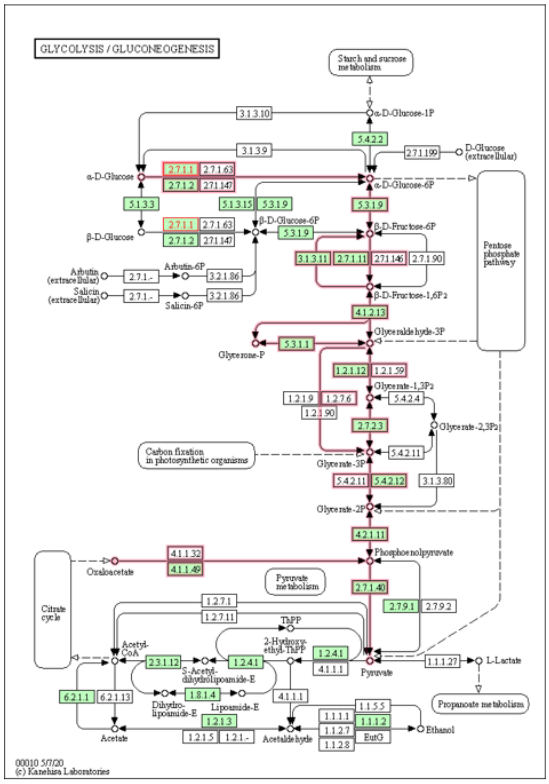
Πίνακας 17: *Οξειδωτική φωσφορυλίωση. ND: μη ανιχνέυσιμο.*

Γλυκόλυση/γλυκονεογένεση

Ο μεταβολισμός της γλυκόζης στη *Leishmania* γίνεται στα γλυκοσώματα, ένα σημαντικό κυτταρικό οργανίδιο που περιέχει τα εννέα ένζυμα του μονοπατιού της γλυκόλυσης. Τα γλυκοσώματα είναι βασικά οργανίδια παραγωγής ενέργειας μέσω των οδών της γλυκόλυσης/γλυκονεογένεσης, της ß-οξείδωσης των λιπαρών οξέων αλλά και της βιοσύνθεσης πουρινών και περιλαμβάνουν πρωτεΐνες παρόμοιες με των περοξισωμάτων. Ο αριθμός των γλυκοσωμάτων είναι σημαντικά μεγαλύτερος στο στάδιο του προμαστιγωτού και πρόσφατες γενετικές μελέτες έδειξαν ότι η σωστή στόχευση των πρωτεϊνών στο γλυκοσωμάτιο, ιδίως των ενζύμων της γλυκολυτικής οδού, είναι ζωτικής σημασίας για τη βιωσιμότητα του παρασίτου.

Στην Εικόνα 46 παρουσιάζεται το μονοπάτι της γλυκόλυσης και με πράσινο χρώμα επισημαίνονται τα λεισμανιακά ένζυμα που τεκμηριωμένα συμμετέχουν σε αυτό.

Παρουσιάζονται επίσης οι βασικές πρωτεΐνες και η διαφορά έκφρασής τους υπό την επίδραση της μιλτεφοσίνης και του αναλόγου TC19 σε σχέση με τον πληθυσμό ελέγχου.



Protein	Accession Number	FC HepC	FC TC19
hexokinase (2.7.1.1)	LinJ.21.0300	0,12	-2,64
glucokinase (2.7.1.2)	LinJ.36.2450	-5	-5
glucose-6-phosphate isomerase (5.3.1.9)	LdBPK_120490.1	0,10	-9
ATP-dependent phosphofructokinase (2.7.1.11)	LdBPK_292620.1	1,83	-0,92
fructose-1,6-bisphosphate aldolase (4.1.2.13)	LdBPK_361320.1	0,94	-1,71
triosephosphate isomerase (5.3.1.1)	LdBPK_240870.1	10	8,6
glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, glycosomal (1.2.1.12)	LinJ.30.3000	1,38	-0,60
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like protein (1.2.1.12)	LdBPK_354810.1	1,48	-5,6
PGKC Phosphoglycerate kinase (2.7.2.3)	LINJ.20.0110	1,12	0,09
PAS-domain containing phosphoglycerate kinase, putative (2.7.2.3)	LinJ.30.3430	1,16	-9,3
2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase (PGAM) (5.4.2.12)	LinJ.36.6960	-5,3	-5,3
enolase (4.2.1.11)	LdBPK_141240.1	0,37	-9,2
glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase, putative (4.1.1.49)	LinJ.27.1710	1,54	0,29

Εικόνα 46: *Γλυκόλυση/γλυκονεογένεση. Με πράσινο οι πρωτεΐνες της L. donovani που παίρνουν μέρος στο μονοπάτι. Στον παράπλευρο πίνακα αναγράφονται όσες πρωτεΐνες ανιχνεύονται από τον βασικό κορμό του μονοπατιού μέχρι το φωσφορο-ενολο-πυροσταφυλικό.*

Τα αποτελέσματα αναδεικνύουν διαφορές στην επίδραση των δυο αναλόγων στα γλυκοσωμιακά ένζυμα. Ενώ η γλυκόλυση/γλυκονεογένεση είναι ενεργή με χαμηλού επιπέδου υπερέκφραση των περισσοτέρων ενζύμων στα παράσιτα υπό την επίδραση της HepC, σε εκείνα υπό την επίδραση του αναλόγου TC19 είναι ανεσταλμένη.

Σε αντιπαραβολή με τη χαμηλού επιπέδου γλυκόλυση παραθέτουμε τον μεταβολισμό των πουρινών, τη μεταβολική οδό που παρέχει στο κύτταρο τα απαραίτητα συστατικά για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του. Και στους δυο πληθυσμούς αυτή η μεταβολική οδός είναι λειτουργική με ισχυρή επαγωγή των κεντρικής σημασίας ενζύμων, Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase LINJ.21.0980 (8x υπό την επίδραση HePC και 10x υπό την επίδραση TC19), Xanthine phosphoribosyltransferase LINJ.21.0990 (7x και για τα δυο φωσφολιπίδια) και adenine phosphoribosyltransferase LdBPK_260120.1 (8x και για τα δυο φωσφολιπίδια).

Συμπέρασμα

Σε αυτό το κεφάλαιο απομονώσαμε, από την πληθώρα των αποτελεσμάτων της πρωτεωμικής ανάλυσης, τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε βασικές λειτουργίες επιβίωσης των παρασίτων, των οποίων η τροποποίηση είναι κεντρικής σημασίας για την προσαρμογή τους στα φάρμακα. Εστιάσαμε στους μηχανισμούς βιοσύνθεσης και μεταβολισμού των λιπαρών οξέων για τους οποίους έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν ενεργά κατά την ανάπτυξη αντοχής στην μιλτεφοσίνη. Επίσης, διερευνήσαμε την ικανότητα παραγωγής ενέργειας των παρασίτων κάτω από πίεση υποανασταλτικών συγκεντρώσεων της μιλτεφοσίνης και του αναλόγου TC19.

Συμπεραίνουμε ότι η μιλτεφοσίνη και το ανάλογο TC19 έχουν παρόμοια επίδραση στους μηχανισμούς βιοσύνθεσης των στερολών και των λιπαρών οξέων μεγάλης αλυσίδας, με τα κεντρικά ένζυμα αυτών των μονοπατιών να υπερεκφράζονται στην πλειοψηφία τους. Σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως στην επιμήκυνση της αλυσίδας λιπαρών οξέων στο ΕΔ παρατηρήθηκε υπερέκφραση ισοενζύμων, των οποίων η δράση χαρακτηρίζεται «δυνητική» καθ' ότι υπάρχουν μόνον *in silico* δεδομένα για τη λειτουργία τους. Αυτή η μελέτη αναδεικνύει τον πιθανό ρόλο αυτών των πρωτεϊνών κάτω από ειδικές συνθήκες.

Παρατηρούμε επίσης ότι τα δυο ανάλογα ασκούν παρόμοια επίδραση στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, αλλά και στη συνολική λειτουργία των μιτοχονδρίων. Το συμπέρασμα αυτό υποστηρίζεται και από την ομοιόμορφα αυξημένη έκφραση των δυο ισομορφών prohibitins στους δυο πληθυσμούς. Όπως σε όλα τα ευκαρυωτικά, έτσι και στην λεϊσμάνια οι prohibitins εντοπίζονται τόσο στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, όσο και στον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια και τους αποδίδεται ρόλος στην προστασία από το οξειδωτικό στρες. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται σε αυτή την ενότητα, υπονοούν ότι τα ανάλογα δεν δρουν με απόλυτα ομοιόμορφο τρόπο και η αντιμετώπισή τους από το προμαστιγωτό μπορεί να γίνει και από διαφορετικούς μηχανισμούς. Οι διαφορές εντοπίζονται στην διαφορετική τροποποίηση των χαρακτηριστικών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης ή του ΕΔ, στον διαφορετικό μηχανισμό μεταφοράς στο κυτταρόπλασμα και στη διαφορετική χρήση του μηχανισμού γλυκόλυσης και β-οξείδωσης.

Τέλος, παρατηρούμε ότι παρά το γεγονός ότι το TC19 είναι ισχυρό αντιλεϊσμανιακό φάρμακο που στερείται τοξικότητας έναντι των ανθρώπινων μακροφάγων, το προμαστιγωτό προσαρμόζεται ευκολότερα σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις (όπως το ½ της IC_{50}), απ΄ότι στη μιλτεφοσίνη. Αντίστοιχες μελέτες με την ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή είναι απαραίτητες για την ανάδειξη της καταλληλότητας του TC19 ως αποτελεσματικού αντιλεϊσμανιακού φαρμάκου.

7. Συζήτηση

Η λεϊσμανίαση αποτελεί ένα σημαντικό παγκόσμιο «βάρος» και μια μεγάλη πρόκληση για την ανακάλυψη νέων αποτελεσματικών θεραπειών, κυρίως λόγω της ενδοκυττάριας φύσης και τις ποικίλες περιοχές εξάπλωσης του παρασίτου μέσα στον ξενιστή. Σημαντικά ζητήματα, όπως η ανάπτυξη αντοχής, οι ανεπιθύμητες ενέργειες και το υψηλό κόστος παραγωγής των διαθέσιμων φαρμακευτικών ουσιών, καθιστά το πεδίο του σχεδιασμού και της σύνθεσης αποτελεσματικών αντιλεισμανιακών ουσιών ιδιαίτερα ελκυστικό. Παγκοσμίως, οι ομάδες ερευνητών συνεχίζουν να ερευνούν την ανακάλυψη νέων μορίων και πολυάριθμες μελέτες με συνθετικές ουσίες και τα παράγωγά τους είναι διαθέσιμες[198]. Επιπρόσθετα, η μελέτη της δράσης φυσικών προϊόντων έχει αναδείξει έναν μεγάλο αριθμό πολλά υποσχόμενων υποψήφιων ουσιών, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή αναλόγων με βελτιωμένες ιδιότητες[245-249].

Η ανακάλυψη της αντιλεϊσμανιακής δράσης της μιλτεφοσίνης και της δυνατότητας χορήγησης από το στόμα ήταν σημαντική εξέλιξη στη θεραπεία της νόσου. Η μιλτεφοσίνη είναι μέλος μιας σειράς συνθετικών λιπιδίων που σχετίζονται δομικά και είναι γνωστά ως αλκυλο-φωσφολιπίδια, τα οποία χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες[250]: τα αλκυλ-λυσο-φωσφολιπίδια (ALPs) που περιέχουν αιθερικούς δεσμούς στον βασικό σκελετό του φωσφολιπιδίου (εντελφοσίνη) και τις αλκυλοφωσφοχολίνες (APCs) που αποτελούνται από μια απλή αλκαλική αλυσίδα που εστεροποιείται σε μια φωσφοβάση (μιλτεφοσίνη).

Οι πρώτες μελέτες για την αντιπαρασιτική δράση των αλκυλο-φωσφολιπιδίων το 1980 έναντι του *Tetrahymena pyriformis*[251] και της *L. donovani*[180, 252] έγιναν σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά την ανακάλυψη των αντι-καρκινικών τους ιδιοτήτων[253, 254]. Το 1987 ο Croft και οι συνεργάτες του ήταν οι πρώτοι που ανέφεραν την αντιπαρασιτική δράση της μιλτεφοσίνης έναντι της ενδοκυττάριας αμαστιγωτής μορφής της *L.donovani*. Μετά από μια σειρά 8 επιτυχών κλινικών μελετών που διήρκησαν από το 1996 ως το 2004, η μιλτεφοσίνη κατοχυρώθηκε ως το πρώτο αποτελεσματικό αντιλεϊσμανιακό φάρμακο που μπορεί να χορηγηθεί από το στόμα, με το όνομα Impavido®[8]. Ακολούθησαν στη συνέχεια πολυάριθμες μελέτες με στόχο την αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης, των μονοπατιών μετάδοσης σήματος και τον υποκυττάριων δομών που εμπλέκονται στην αντικαρκινική και αντιπαρασιτική δράση του φαρμάκου.

Η άμεση ανάγκη για νέο φάρμακο και το μεγάλο κόστος των ερευνών για τη βελτίωση των φυσικοχημικών και βιολογικών χαρακτηριστικών μιας αρχικά πολλά υποσχόμενης ουσίας, της μιλτεφοσίνης, ήταν οι κύριοι λόγοι που αυτή η ουσία εγκρίθηκε για χρήση αρχικά στην

Ινδία, όπου παρατηρείται αυξημένο ποσοστό θεραπευτικής αποτυχίας και αντοχής. Στην Ευρώπη χρησιμοποιείται συστηματικά για τη θεραπεία του kala azar στο σκύλο. Αυτή η πρακτική αναμένεται να εμπλουτίσει τη δεξαμενή των κυκλοφορούντων παρασίτων με ανθεκτικά στελέχη, μια εξέλιξη που δεν είναι ευνοϊκή για τη θεραπεία τόσο των ζώων, όσο και των ανθρώπων.

Ο σχεδιασμός και η σύνθεση των αναλόγων της μιλτεφοσίνης από την ομάδα της Δρ Θ. Καλογεροπούλου στο Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών έρχεται να καλύψει το κενό στην ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού φαρμάκου της οικογένειας των αλκυλοφωσφοχολινών, με μειωμένες παρενέργειες. Στην παρούσα μελέτη εστιάσαμε σε 55 ανάλογα της μιλτεφοσίνης.

Από τη συγκριτική εκτίμηση της δράσης των αναλόγων στην προμαστιγωτή μορφή, φάνηκε ότι τα παραπάνω ανάλογα είναι γενικά πιο ενεργά έναντι της *L.donovani*. Με ιδιαίτερη ευχαρίστηση, παρατηρήθηκε ότι όλα τα ανάλογα, πλην ενός, είναι πιο ενεργά στην ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή της *L.infantum*. Αν και τα δυο συστήματα μελέτης δεν είναι άμεσα συγκρίσιμα, οι αλκυλοφωσφοχολίνες εμφανίζονται γενικά πιο ενεργές στην ενδοκυττάρια μορφή του παρασίτου, και αυτό θα μπορούσε εν μέρει να αποδοθεί στην ικανότητά τους να ενεργοποιούν τα μακροφάγα[180]. Ωστόσο, οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στη δράση των αναλόγων ανάμεσα στα δυο στελέχη θα μπορούσαν να αποδοθούν σε διαφορές στο λιπιδικό περιεχόμενο και τις στερόλες της μεμβράνης που επιτρέπουν την αλληλεπίδραση με τα φάρμακα[255-257].

Ενθαρρυντικά αποτελέσματα καταγράφηκαν για ανάλογα στα οποία είχαν ενσωματωθεί στο λιπιδικό τμήμα του φωσφολιπιδίου, είτε ο ετεροαρωματικός δακτύλιος 1,2,3-τριαζόλιο, ή δακτύλιος αδαμαντάνιου. Εξαιρετικές επιδόσεις είχαν επίσης ανάλογα με έναν δακτύλιο τριφλουραλίνης, καθώς και κάποια που περιείχαν κυκλοαλκάνιο. Τα περισσότερα αποτελέσματα έχουν δημοσιευθεί σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά[10-13, 258].

Στα πλαίσια αυτής της διατριβής παρουσιάζουμε αποτελέσματα που πήραμε από επιλεγμένα ανάλογα: το ανάλογο τριφλουραλίνης TC95, το ανάλογο με τριαζόλιο TC52, το ανάλογο με αδαμαντάνιο TCAN26 και το ανάλογο με κυκλοαλκάνιο TC19. Αυτά επελέγησαν στη βάση της αυξημένης αντιπαρασιτικής δράσης και μειωμένης κυτταροτοξικότητας σε σύγκριση με την μιλτεφοσίνη.

Συγκρίνοντας τη βιολογική δράση των αναλόγων, το πιο σημαντικό αποτέλεσμα ήταν η θεαματική βελτίωση της κυτταροτοξικότητας και της αιμολυτικής δράσης αρκετών από αυτά που κατείχαν ισχυρή αντιλεϊσμανιακή δράση, σε σχέση με τη μιλτεφοσίνη. Στα αποτελέσματά μας δείχνουμε πως 50μM μιλτεφοσίνης, που αντιστοιχεί στη συγκέντρωση στον ορό κατά τη συμβατική θεραπεία, το 78% των κυττάρων τόσο των μη μολυσμένων THP-1 όσο και των

μολυσμένων είναι νεκρά, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά για το ανάλογο τριφλουραλίνης TC95, που είναι ισχυρότερο αντιλεϊσμανιακό, είναι 10%. Η μιλτεφοσίνη προκαλεί απώλεια του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης στο 22% των μακροφάγων THP1, ενώ το TC95 δεν προκαλεί βλάβες στα μιτοχόνδρια του ξενιστή. Ο θεραπευτικός δείκτης για τη μιλτεφοσίνη διαμορφώνεται στο 4,26 ενώ για το TC95 στο 41,4. Αυτές οι σημαντικές διαφορές ενισχύονται με την επίσης μειωμένη αιμολυτική δράση του TC95, χαρακτηριστικό που εξυπηρετεί την ενδοφλέβια χορήγηση των φαρμάκων.

Επιλεγμένα ενεργά ανάλογα χρησιμοποιήθηκαν για την *in vitro* μελέτη της ανταπόκρισης μιας σειράς στελεχών που απομονώθηκαν από μολυσμένα σκυλιά, στην προμαστιγωτή και ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή. Η ευαισθησία που επέδειξαν τα κλινικά στελέχη στα επιλεγμένα ανάλογα ποικίλει σε μεγάλο βαθμό, και όπως στην περίπτωση των εργαστηριακών στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν, θα μπορούσε να αποδοθεί σε διαφορές στην βιοχημική σύνθεση της μεμβράνης του παρασίτου[259, 260]. Επομένως, η δράση των αναλόγων επηρεάζεται σαφώς από τη χημική δομή του φαρμάκου αλλά και τα βιοχημικά χαρακτηριστικά του στελέχους του παρασίτου.

Η ταυτοποίηση των κλινικών στελεχών που συλλέχθηκαν έγινε με μοριακή τυποποίηση με την χρήση 3 δεικτών μικροδορυφόρων, που επιλέχθηκαν από δημοσιευμένες αλληλουχίες DNA του παρασίτου και συγκεκριμένα από το γονιδίωμα του χρωμοσώματος 1 της *L.major*[218]. Η χρήση των συγκεκριμένων μικροδορυφόρων επιτρέπει τον χαρακτηρισμό στελεχών *L.infantum* που μπορεί να είναι σε κοντινή συγγένεια μεταξύ τους και προσφέρει την δυνατότητα συσχέτισης με τα κλινικά χαρακτηριστικά και το είδος του ξενιστή. Αποτελεί γρήγορη και αναπαραγώγιμη μέθοδο ταυτοποίησης σε σχέση με την κλασσική τεχνική της ανάλυσης ισοενζύμων, κατέχοντας υψηλό επίπεδο διάκρισης. Η τυποποίηση έδειξε ότι τα στελέχη από διαφορετικούς σκύλους δεν σχετίζονται γενετικά μεταξύ τους.

Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου LdMT σε όλα τα κλινικά στελέχη. Η πρωτεΐνη LdMT ανήκει στην οικογένεια APT (aminophospholipid translocase) και εδράζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Σχετίζεται άμεσα με τη μεταφορά της μιλτεφοσίνης και άλλων φωσφολιπιδίων από το εξωτερικό προς το εσωτερικό μέρος της μεμβράνης, ρυθμίζοντας την πρόσληψη και κατ'επέκταση την ενεργότητα των αλκυλοφωσφοχολινών[16]. Η παρουσία της έχει σχετιστεί με την ανάπτυξη αντοχής στην μιλτεφοσίνη, αφού σημειακές μεταλλάξεις στα δυο αλλήλια του γονιδίου σε πειραματικό ανθεκτικό στέλεχος επιφέρουν απώλεια της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης[189]. Ωστόσο, τα κλινικά στελέχη που μελετήθηκαν, αν και επέδειξαν διαφορές στην ανταπόκριση στα ανάλογα, δεν φαίνεται να φέρουν μεταλλάξεις στο συγκεκριμένο γονίδιο που να σχετίζονται με μειωμένη πρόσληψη και άρα αυξημένη ευαισθησία σε αυτά.

Ο μηχανισμός δράσης της μιλτεφοσίνης έχει μελετηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια. Αρχικά αποδόθηκε στις ανοσοτροποποιητικές της ιδιότητες[261-263], καθώς και σε αλλαγές στον μεταβολισμό των αιθερικών λιπιδίων, τη βιοσύνθεση των GPI-anchor και τη μετάδοση σήματος[187]. Άλλες μελέτες κατέδειξαν εναλλακτικούς τρόπους δράσης, όπως ο μηχανισμός της απόπτωσης[264-266]. Η δυσλειτουργία του μιτοχονδρίου φαίνεται να εμπλέκεται στον παραπάνω μηχανισμό[267, 268], περιλαμβάνοντας μείωση της διαφοράς δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης, την παραγωγή ROS και την αναστολή του ενζύμου cytochrome c oxidase. Ο μεταβολισμός των λιπιδίων και συγκεκριμένα των λιπαρών οξέων και των στερολών έχει επίσης προταθεί ως πιθανός στόχος της μιλτεφοσίνης, προκαλώντας αλλαγές στην κυτταρική μεμβράνη του παρασίτου[243, 269, 270]. Οι παραπάνω διαφορετικές προσεγγίσεις δείχνουν ότι πιθανόν να υπάρχουν πολλαπλοί μηχανισμοί δράσης της μιλτεφοσίνης και των αλκυλο-φωσφολιπιδίων γενικότερα. Βασισμένοι στα ευρήματα από την παγκόσμια βιβλιογραφία, προσπαθήσαμε να μελετήσουμε τους πιθανούς στόχους που εμπλέκονται στον αντιλεϊσμανιακή δράση των αναλόγων.

Σε αρχικές μελέτες παρατήρησης μολυσμένων THP1 στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, μετά από επώαση με μιλτεφοσίνη ή επιλεγμένα ανάλογα, παρατηρήσαμε την παρουσία κυστιδίων στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή και η πιθανή συσχέτισή τους με το φαινόμενο της αυτοφαγίας αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης στην παρούσα διατριβή. Η αυτοφαγία είναι ο βασικός μηχανισμός αποδόμησης κυτταρικών πρωτεϊνών και οργανιδίων. Ξεκινά με την απομόνωση τμήματος του κυτταροπλάσματος μέσα σε διπλή μεμβράνη, δημιουργώντας τα αυτοφαγόσωματα. Η συνένωση των αυτοφαγοσωμάτων με τα λυσοσώματα οδηγεί στη δημιουργία των αυτοφαγολυσοσωμάτων, στο εσωτερικό των οποίων η δράση των λυσοσωμικών ενζύμων σε συνθήκες χαμηλού pH, οδηγεί στον καταβολισμό του περιεχομένου τους[271, 272]. Η αυτοφαγία εμπλέκεται σε ποικίλες φυσιολογικές διαδικασίες, όπως η ανανέωση πρωτεϊνών και οργανιδίων κατά την διάρκεια στέρησης θρεπτικών συστατικών, η κυτταρική διαφοροποίηση, η αναδιαμόρφωση των ιστών, ο κυτταρικός θάνατος και η παθογένεση.

Επιπρόσθετα, η αυτοφαγία παίζει σημαντικό ρόλο στον εγγενή μηχανισμό ανοσίας και εμπλέκεται στην άμυνα έναντι διάφορων παθογόνων, όπως βακτήρια, ιοί και παράσιτα[222], οδηγώντας στην αποδόμησή τους. Ωστόσο κάποια παθογόνα έχουν αναπτύξει στρατηγικές για να ξεφεύγουν από τον παραπάνω τρόπο εξουδετέρωσης ή ακόμα και να επωφεληθούν ώστε να υποστηρίξουν τη μόλυνση του ξενιστή[273].

Η επαγωγή της αυτοφαγίας στην *Leishmania* έχει αναφερθεί από αρκετές ερευνητικές ομάδες και έχει παρατηρηθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην απόκτηση θρεπτικών συστατικών, στη διαφοροποίηση, στη μολυσματικότητα των προματιγωτών παρασίτων καθώς και στην επαγωγή κυτταρικού θανάτου μετά από επίδραση με διάφορα είδη ουσιών[274, 275]. Συγκεκριμένα, οι Pinheiro et al έδειξαν ότι η επαγωγή της αυτοφαγίας αυξάνει το

ενδοκυττάριο φορτίο *L.amazonensis* σε μακροφάγα από ποντίκια BALB/c[276]. Επίσης, η μόλυνση με *L.amazonensis* προάγει το φαινόμενο της αυτοφαγίας στα μακροφάγα κύτταρα ποντικού, όπως διαπιστώνεται από την αυξημένη έκφραση της πρωτεϊνης LC3II, που αποτελεί ειδικό μάρτυρα των αυτοφαγοσωμάτων, την παρουσία κυστιδίων με πολλαπλές μεμβράνες και την αυξημένη πρόσληψη της ουσίας Lysotracker Red, που συσσωρεύεται σε όξινα κυτταρικά διαμερίσματα, όπως τα αυτοφαγοσώματα και τα λυσοσώματα[277].

Στη δική μας μελέτη παρατηρήθηκε αυξημένη συσσώρευση της φθορίζουσας ουσίας MDC σε σφαιρικές δομές μέσα στο κυτταρόπλασμα μολυσμένων μακροφάγων κυττάρων THP1. Το MDC είναι ένα αυτοφθορίζον μόριο που έχει χρησιμοποιηθεί στην επιλεκτική σήμανση των αυτοφαγικών κυστιδίων σε αρκετές μελέτες του φαινομένου της αυτοφαγίας. Ο φθορισμός του εντείνεται όταν βρίσκεται σε περιβάλλον με όξινο pH. Γι αυτό η ένταση του φθορισμού του είναι μέτρο της ωρίμανσης των αυτοφαγοσωμάτων και της σύντηξης με το λυσόσωμα. Η μόλυνση των μακροφάγων με το παράσιτο αυξάνει την ένταση φθορισμού του MDC και τον αριθμό των κυστιδίων, ως αποτέλεσμα της διέγερσης της αυτοφαγίας, στα πλαίσια της φυσικής ανοσίας του μακροφάγου έναντι του παθογόνου. Παρατηρήσαμε επίσης ότι η επώαση με τα ανάλογα πολλαπλασιάζει τη συσσώρευση του MDC μέσα σε κυστίδια στις 24h, κυρίως στα μολυσμένα κύτταρα. Διακρίναμε σημαντικές διαφορές στην ικανότητα των αναλόγων να επάγουν και να συντηρούν τη αυτοφαγική ροή. Εξαιρετικό παράδειγμα το ανάλογο TC95 και σε δεύτερο βαθμό το TC52 τα οποία αυξάνουν τον αριθμό των αυτοφαγικών κυστιδίων ακόμα και για 48h σε αντίθεση με την μιλτεφοσίνη και το TC19 που έχουν μειωμένη επίδραση σε αυτόν τον μηχανισμό.

Η ειδικότητα του φαινομένου της αυτοφαγίας μελετήθηκε αφενός με τον αναστολέα 3-methyladenine (3-MA)[278] και αφετέρου με την ανίχνευση των πρωτεϊνών LAMP-1 και LAMP-2. Το 3-MA είναι αναστολέας του ενζύμου phosphoinositide 3-kinase και έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στη μελέτη της δράσης της αυτοφαγίας στους παθογόνους οργανισμούς κατά την διάρκεια της μόλυνσης. Ο συγκεκριμένος αναστολέας έχει χρησιμοποιηθεί σε μελέτες με *Leishmania* οδηγώντας σε μειωμένο ποσοστό μόλυνσης[277]. Η παρουσία του 3-MA στην δική μας μελέτη, κατά παράδοξο τρόπο, αντι να μειώσει την αυτοφαγική ροή, την ενέτεινε, με αύξηση του αριθμού και του όγκου των κυστιδίων. Επιπλέον, σε συνδυασμό με επιλεγμενα ανάλογα προκάλεσε μεγαλύτερη μείωση του ποσοστού μόλυνσης από αυτή που προκαλούν τα ανάλογα μόνα τους. Το παράδοξο αποτέλεσμα ερμηνεύθηκε από πρόσφατα ευρήματα που δημοσιεύθηκαν στη βιβλιογραφία σύμφωνα με τα οποία το 3-MA σε συνθήκες φυσιολογικής παροχής θρεπτικών δεν προκαλεί αναστολή της αυτοφαγίας και κυρίως της επιλεκτικής αυτοφαγίας, σε αντίθεση με την περίπτωση στέρησης θρεπτικών κατά την οποία ενεργοποιείται η μη επιλεκτική αυτοφαγία και κατά την οποία το 3-MA δρα ανασταλτικά[279]. Το γεγονός ότι η συσσώρευση κυστιδίων παρατηρήθηκε μόνο στα μολυσμένα κύτταρα μετά από επίδραση θεραπευτικών δόσεων των αναλόγων μας έκανε να εμπιστευθούμε το 3-MA ως δείκτη των αυτοφαγικών κυστιδίων.

Οι πρωτεΐνες LAMP-1 και LAMP-2 αποτελούν βασικό συστατικό της λυσοσωμιακής μεμβράνης και τις χρησιμοποιήσαμε για να επιβεβαιώσουμε την αύξηση της ροής των αυτοφαγικών κυστιδίων και τη σύντηξη με το λυσόσωμα. Παρατηρήθηκε αύξηση της έντασης του φθορισμού της πρωτεΐνης LAMP-2 στα μολυσμένα κύτταρα, μετά από επώαση με το ανάλογο TC95 αλλά όχι με τη μιλτεφοσίνη. Αυτό το αποτέλεσμα επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα με τη χρώση του MDC και διαφοροποιεί σημαντικά την δράση του TC95 από της μιλτεφοσίνης και των άλλων αναλόγων που δοκιμάσαμε.

Θεωρήσαμε ότι το παράδοξο της ενίσχυσης της παρασιτοκτόνου δράσης παρουσία του 3-MA οφείλεται στην αύξηση της αυτοφαγίας, η οποία ενισχύει τη φυσική ανοσία του μακροφάγου έναντι του ενδοκυτταρίου παρασίτου. Όμως, νεότερα δεδομένα αναδεικνύουν και μια διαφορετική επίδραση αυτού του παράγοντα στη διαχείριση των ενδοκυττάριων κυστιδίων. Οι αλκυλοφωσφοχολίνες, λόγω της λιπόφιλης φύσης τους, εγκλωβίζονται σε κυστίδια αυτοφαγικής προέλευσης με αποτέλεσμα τη μειωμένη βιοδιαθεσιμότητά τους. Το 3-MA, αυξάνοντας την αυτοφαγική ροή προς τα λυσοσώματα, συμβάλει στην απελευθέρωση του φαρμάκου, ενισχύοντας τη βιοδιαθεσιμότητά του στον κυτταροπλασματικό χώρο. Η πιθανότητα εγκλωβισμού των αλκυλοφωσφοχολινών σε κυτταροπλασματικά κυστίδια μπορεί να είναι αιτία μειωμένου θεραπευτικού αποτελέσματος. Πιστεύουμε ότι ανοίγεται ένα ενδιαφέρον πεδίο έρευνας που μπορεί να συμβάλλει στη βελτίωση αυτής της οικογένειας φαρμάκων.

Η χρήση της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας αποτελεί μια από τις πρώιμες βασικές μεθόδους μελέτης της αυτοφαγίας[280]. Έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως από πολλές ομάδες ερευνητών κατά την μελέτη της εσωτερικής δομής του παρασίτου στην προμαστιγωτή και ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή. Σε πληθώρα μελετών έχει αναφερθεί η παρουσία πολλαπλών ειδών κυστιδίων που παραπέμπουν στο φαινόμενο της αυτοφαγίας και περιλαμβάνουν κυστίδια με μονή ή διπλή μεμβράνη, άδεια ή με περιεχόμενο, διασπαρμένα σε διάφορες θέσεις μέσα στο κυτταρόπλασμα[281-283]. Σε συμφωνία με τα παραπάνω έρχονται οι παρατηρήσεις μας από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, που αποκάλυψαν έντονη δημιουργία κυστιδίων στο κυτταρόπλασμα μακροφάγων κυττάρων THP1, τα οποία σε πολλές περιπτώσεις περιέχουν κυτταροπλασματικό περιεχόμενο. Ιδιαίτερα έντονη είναι η παρουσία κυστιδίων γύρω και μέσα στο παρασιτοφόρο κυστίδιο μολυσμένων μακροφάγων κατά την επώαση με μιλτεφοσίνη ή το ανάλογο TC52, υποδηλώνοντας την πιθανή συμμετοχή τους στην εξάλειψη του παρασίτου.

Σε συνέχεια της αναζήτησης του μηχανισμού δράσης των αναλόγων μελετήθηκε το φαινόμενο της απόπτωσης σε μολυσμένα και μη μολυσμένα μακροφάγα THP1. Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, ή απόπτωση, είναι ένας μηχανισμός που συμβάλει στη διατήρηση της ομοιόστασης του κυττάρου, διατηρώντας τη λεπτή ισορροπία ανάμεσα

στον πολλαπλασιασμό και τον κυτταρικό θάνατο. Επιπρόσθετα, λειτουργεί ως μηχανισμός άμυνας κατά των ιών, των ενδοκυττάριων βακτηρίων και των παρασίτων[284]. Η ταχεία επαγωγή της απόπτωσης ως ανταπόκριση στην είσοδο παθογόνων οργανισμών έχει διατηρηθεί εξελικτικά σε οργανισμούς όπως τα φυτά, τα έντομα και τα θηλαστικά, για την καταπολέμηση των μολύνσεων.

Στον αντίποδα, καθώς οι παθογόνοι οργανισμοί προσπαθούν να ξεπεράσουν τους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή, έχουν αναπτύξει διάφορους τρόπους για να ανταγωνιστούν τον αποπτωτικό θάνατο, ώστε να έχουν τον απαιτούμενο χρόνο για να πολλαπλασιαστούν[285, 286]. Για τον λόγο αυτό πολυάριθμοι ιοί, βακτήρια και παράσιτα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς εισβολής και πολλαπλασιασμού μέσα στο κύτταρο του ξενιστή ξεπερνώντας την επαγωγή του φαινομένου της απόπτωσης[287-289]. Συγκεκριμένα, η *L.donovani* είναι το πρώτο παράσιτο που αναφέρθηκε να βελτιώνει τη βιωσιμότητα του κυττάρου ξενιστή μέσω της αναστολής της απόπτωσης[290, 291].

Η σχέση ανάμεσα στην απόπτωση των μακροφάγων του ξενιστή και της μόλυνσης με *Leishmania* είναι πολύπλοκη. Το παράσιτο έχει αναφερθεί ότι προστατεύει το κύτταρο ξενιστή από την επαγωγή της απόπτωσης που συμβαίνει κατά τα πρώιμα στάδια μόλυνσης με διάφορα στελέχη[291-295]. Ωστόσο, άλλες ομάδες έχουν επιδείξει την σχέση ανάμεσα στην απόπτωση και την εξάπλωση του παρασίτου μέσα στον ξενιστή[296, 297].

Κατά την φυσική μόλυνση του σπονδυλωτού ξενιστή με το παράσιτο, τα μακροφάγα είναι ο καθοριστικός τύπος κυττάρων για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του παρασίτου. Προκειμένου να αναπαραχθεί το παραπάνω μοντέλο αλληλεπίδρασης ξενιστή-παρασίτου στον άνθρωπο *in vitro*, πολλοί ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει ανθρώπινες κυτταρικές σειρές μακροφάγων [291, 295]. Στη δική μας μελέτη χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη κυτταρική σειρά μακροφάγων THP1, πριν και μετά από μόλυνση με *L.infantum* και το φαινόμενο της απόπτωσης μελετήθηκε με τη χρήση της Annexin V, πρωτείνης που προσδένεται ειδικά στην φωσφατιδυλοσερίνη. Η φωσφατιδυλοσερίνη είναι ένα φωσφολιπίδιο που εντοπίζεται στην εσωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των φυσιολογικών ζώντων κυττάρων. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι κατά τη διάρκεια της απόπτωσης μετατοπίζεται στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης. Η Annexin V είναι μια Ca^{2+}-εξαρτώμενη πρωτεΐνη που προσδένεται στα φωσφολιπίδια και ιδιαίτερα στην φωσφατιδιλοσερίνη, επιτρέποντας έτσι την αποτελεσματική σήμανση των αποπτωτικών κυττάρων[298].

Σύμφωνα με τις δικές μας παρατηρήσεις, φαίνεται ότι η μόλυνση με *L.infantum* δρα προστατευτικά αφού σημειώθηκε μείωση του ποσοστού των μολυσμένων κυττάρων που βρίσκονται σε διαδικασία απόπτωσης σε σχέση με τα φυσιολογικά μη μολυσμένα κύτταρα. Η επώαση με μιλτεφοσίνη για 24h φαίνεται να αυξάνει σημαντικά την απόπτωση των

μολυσμένων και μη μολυσμένων κυττάρων με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Συγκεκριμένα, η υψηλή συγκέντρωση μιλτεφοσίνης (50μΜ) οδηγεί σε διαδικασία απόπτωσης πάνω από το 80% του κυτταρικού πληθυσμού σε μη μολυσμένα και μολυσμένα κύτταρα, όμως η παρασιτοκτόνος δράση θα μπορούσε να αποδοθεί στην κυτταροτοξικότητα του φαρμάκου στην συγκέντρωση αυτή. Ωστόσο, το ποσοστό των αποπτωτικών μολυσμένων κυττάρων στα 10μΜ, τιμή που βρίσκεται κοντά στο IC_{50} του φαρμάκου, είναι τουλάχιστον διπλάσιο από τα μη μολυσμένα και συνοδεύεται παράλληλα από αύξηση του ποσοστού των νεκρών κυττάρων στην συγκεκριμένη συγκέντρωση.

Κατά την επώαση με το ανάλογο TC95, το οποίο είναι πιο ενεργό από τη μιλτεφοσίνη στην ενδοκυττάρια μορφή του παρασίτου και καθόλου κυτταροτοξικό, παρατηρείται αύξηση του ποσοστού των αποπτωτικών κυττάρων κατά 4 φορές σε σχέση με τα μη μολυσμένα κύτταρα στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των 50 και 10μΜ. Το ποσοστό των νεκρών κυττάρων στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις είναι χαμηλό σε μολυσμένα και μη μολυσμένα κύτταρα. Κατά την επώαση με 2μΜ TC95, συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο IC_{50} του αναλόγου, τα ποσοστά των αποπτωτικών και νεκρών κυττάρων παραμένουν επίσης ιδιαίτερα χαμηλά.

Μετά από 48h επώαση με τα φάρμακα, το φαινόμενο της απόπτωσης αρχίζει να φθίνει και η επώαση με HePC παράγει έναν αποπτωτικό πληθυσμό σε μη μολυσμένα και μολυσμένα κύτταρα. Αντιθέτως, τα επίπεδα της έκφρασης φωσφατιδυλοσερίνης έχουν επιστρέψει στα επίπεδα του control κατά την επώαση με TC95.

Τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της απόπτωσης και έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν άμεσα τα εκτελεστικά μονοπάτια του φαινομένου στους πολυκύτταρους[299] και μονοκύτταρους οργανισμούς όπως η *Leishmania* [300-302]. Μάλιστα, η πτώση της διαφοράς δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης έχει παρατηρηθεί ως ένα από τα αρχικά γεγονότα της απόπτωσης, πριν ακόμα τον κατακερματισμό του πυρηνικού DNA.

Για τον λόγο αυτό, μελετήσαμε ταυτόχρονα τη λειτουργία του μιτοχονδρίου των παραπάνω κυττάρων με τη χρήση της χρωστικής MitoTracker Red Dye. Το MitoTracker βάφει τα ζωντανά μιτοχόνδρια και μείωση της έντασης του φθορισμού του υποδηλώνει την αποδόμηση του οργανιδίου, αποτελώντας έτσι ένα πολύ δυνατό εργαλείο για τη μελέτη της φυσιολογίας του μιτοχονδρίου[303]. Φαίνεται ότι η επώαση με HePC, ιδιαίτερα σε υψηλές συγκεντρώσεις κατακερματίζει την Δψm της μιτοχονριακής μεμβράνης. Ωστόσο, το TC95 επηρεάζει τη λειτουργία του μιτοχονδρίου με διαφορετικό τρόπο, αφού παρατηρείται υπερπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης, κυρίως στα μολυσμένα κύτταρα, που αντικατοπτρίζει την αυξημένη απορρόφηση της χρωστικής, πιθανόν λόγω διόγκωσης των μιτοχονδρίων. Ανάλυση της εσωτερικής δομής προμαστιγωτών *L.amazonensis* που έχουν επωαστεί με το ανάλογο TC95 φανερώνει ότι το μιτοχόνδριο υφίσταται εκτεταμένη ζημιά, που εκφράζεται ως διόγκωση και πλήρη αποδιοργάνωση της δομής των μεμβρανών του[304].

Τα μιτοχόνδρια είναι βασικά κυτταρικά οργανίδια που διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό της ενέργειας και είναι απαραίτητα για την επιβίωση όλων των τύπων κυττάρων. Κατά την διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης τα ηλεκτρόνια μετακινούνται μέσω της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται μια ισορροπία πρωτονίων κατά μήκος της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης ως πηγή ενέργειας για την παραγωγή ATP. Η διατήρηση της Δψm είναι απαραίτητη για αυτή την διαδικασία καθώς και για την επιβίωση του κυττάρου[305].

Η *Leishmania* έχει ένα μοναδικό μεγάλο μιτοχόνδριο που καταλαμβάνει περίπου το 12% του σώματος του παρασίτου και διανέμεται εσωτερικά σε διακλαδώσεις. Το μιτοχόνδριο της *Leishmania* επιδεικνύει μια μοναδική δομή και επειδή διαφέρει λειτουργικά από τα μιτοχόνδρια των θηλαστικών, αποτελεί ιδανικό χημειοθεραπευτικό στόχο[20, 306]. Επιπρόσθετα, πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι εναλλαγές στην διαφορά δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης σχετίζονται με την επιβίωση των παρασίτων όπως το *Trypanosoma* και η *Leishmania*[19, 307, 308].

Οι μιτοχονδριακές αλλαγές μπορεί να είναι αποτέλεσμα διάφορων επιβλαβών επιδράσεων που προκαλούνται από ενδογενείς τοξικές ουσίες, όπως το ανιόν του υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot -}$), το οξείδιο του αζώτου (NO), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), τα οποία ονομάζονται ενεργά μόρια οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)[309, 310]. Τα ενεργά μόρια οξυγόνου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάδοση του σήματος σε πολυάριθμα φυσιολογικά γεγονότα και σε μηχανισμούς κυτταρικού θανατου στη *Leishmania*[311, 312]. Είναι ευρέως γνωστό ότι το μιτοχόνδριο είναι η πιο σημαντική θέση παραγωγής ROS σε κυτταρικό επίπεδο[313-315].

Κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής της η *Leishmania* έρχεται αντιμέτωπη και τελικά προσαρμόζεται σε ποικίλες εχθρικές συνθήκες, όπως το οξειδωτικό στρες λόγω διάσπασης της αίμης στο γεύμα αίματος, τις πρωτεάσες του εντόμου, τη λύση από το σύστημα συμπληρώματος καθώς και τα ενεργά μόρια οξυγόνου που παράγονται κατά τη φαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα του ξενιστή. Κατά το αρχικό στάδιο μόλυνσης με το παράσιτο, παράγεται $O_2^{\cdot -}$ ως μέρος της οξειδωτικής έκρηξης των μακροφάγων σε ανταπόκριση στην φαγοκυττάρωση. Το NO παράγεται μετά την ενεργοποίηση των μακροφάγων[316] και προέρχεται από την οξείδωση του καταληκτικού αζώτου γουανιδίνης της L-αργινίνης, από το ένζυμο NO synthase, οδηγώντας στην εξάλειψη του παρασίτου[317].

Το NO αποτελεί γενικά δραστικό αντι-μικροβιακό παράγοντα και από το 1988 η παραγωγή του θεωρείται βασικός μικροβιοκτόνος μηχανισμός. Πρόσφατες μελέτες έχουν συσχετίσει την παραγωγή υψηλών επιπέδων ROS με την λεϊσμανιοκτόνο δράση των κυττάρων του ξενιστή[318]. Ωστόσο κάποια είδη του παρασίτου έχουν υιοθετήσει διάφορους μηχανισμούς

άμυνας για να ανταπεξέλθουν στο οξειδωτικό στρες, όπως μείωση της παραγωγής $O_2^{\cdot -}$ και έκφραση αντι-οξειδωτικών μορίων[319, 320].

Εκτός από την καταπολέμηση της μόλυνσης από παθογόνους οργανισμούς, τα ROS παράγονται και ως ανταπόκριση σε συγκεκριμένα φάρμακα. Για τον λόγο αυτό, η ιδιότητα ενός φαρμάκου να παράξει ROS με σκοπό να προκαλέσει την αποδόμηση κυτταρικών μακρομοριακών συστατικών, είναι πολύ σημαντική[321]. Μελετήσαμε επομένως την παραγωγή NO σε μολυσμένα και μη μολυσμένα κύτταρα THP1 κατά την επίδραση με το ενεργό ανάλογο TCAN26. Διαπιστώθηκε ότι ένα μεγάλο ποσοστό των μακροφάγων κύτταρων παράγουν NO, με υψηλή ένταση φθορισμού, σε όλα τα χρονικά σημεία επίδρασης και ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι του παρασίτου, γεγονός που κατέστησε αδύνατη την παρακολούθηση του φαινομένου στην ενδοκυττάρια μορφή.

Για τον λόγο αυτό, μελετήθηκε η παραγωγή NO κατά την επώαση της προμαστιγωτής μορφής της *Leishmania* με HePC και επιλεγμένα ανάλογα. Διαπιστώθηκε ότι κατά την επώαση με ορισμένα από τα ενεργά ανάλογα παράγεται NO από ένα σημαντικό ποσοστό του πληθυσμού των προμαστιγωτών, που οδηγεί στην εξουδετέρωση του παρασίτου στις 24h, ενώ το ανενεργό ανάλογο TC52 διατηρεί την παραγωγή NO σε χαμηλότερα επίπεδα. Δοκιμάζοντας διαφορετικές συνθήκες και χρόνους επώασης διαπιστώθηκε και πάλι ότι η ανταπόκριση στα ανάλογα των φωσφολιπιδίων διαφέρει ανάμεσα στα διαφορετικά στελέχη του παρασίτου.

Η αναγνώριση των θεραπευτικών στόχων της μιλτεφοσίνης είναι πολύ σημαντική προκειμένου να διερευνηθεί ο μοριακός και βιοχημικός τρόπος δράσης της και θα ανοίξει τον δρόμο για τον σχεδιασμό νέων αποτελεσματικών θεραπειών. Η χρήση φθορίζοντων μορίων και συμπλόκων για τη μελέτη της συγγένειας και της παρουσίας υποδοχέων στην κυτταρική βιολογία έχει πολλαπλώς αναφερθεί[322, 323]. Ωστόσο, υπάρχουν λίγες μελέτες για τη σύνθεση και την βιολογική αποτίμηση της δράσης αντιλεϊσμανιακών φθορίζοντων αναλόγων [230, 324, 325]. Τα φθορίζοντα ανάλογα αποτελούν έναν εναλλακτικό τρόπο μελέτης της ενδοκυττάριας κατανομής φαρμάκων και του εντοπισμού των πιθανών στόχων τους και απαιτούν ελάχιστη μεταχείριση των εξεταζόμενων κυττάρων, μειώνοντας κατά αυτό τον τρόπο την υποκυττάρια παραμόρφωση και την καταστροφή των εύθραυστων οργανιδίων.

Στη δική μας μελέτη, παρατηρήθηκε η ενδοκυττάρια κατανομή των φθοριζόντων αναλόγων TC108 και TC126 στο εσωτερικό του παρασίτου, σε μια προσπάθεια να αναγνωριστεί και να χαρακτηριστεί ο πιθανός αντιλεϊσμανιακός μηχανισμός τους. Η χρήση μικροσκοπίας φθορισμού αποτέλεσε ένα γρήγορο και αξιόπιστο τρόπο παρακολούθησης της ενδοκυττάριας συσσώρευσης σε διαφορετικούς χρόνους επώασης. Παρατηρήθηκε πρώιμη συσσώρευση, κυρίως του αναλόγου TC108, σε ενδοκυττάριες δομές που πιθανόν να αντιπροσωπεύουν κυτταρικά οργανίδια. Δεδομένης της εμπλοκής του μιτοχονδρίου στην αντιλεϊσμανιακή δράση της μιλτεφοσίνης, προχωρήσαμε σε χρώση των μιτοχονδρίων του

παρασίτου με MitoTracker Red Dye, που όπως αναφέρθηκε παραπάνω βάφει τα ζωντανά μιτοχόδρια.

Η χρώση των μιτοχονδρίων αποκάλυψε τον συνεντοπισμό κυρίως του αναλόγου TC108 με τα σημασμένα μιτοχόνδρια, προτείνοντας το οργανίδιο αυτό ως πιθανό στόχο του αναλόγου. Καθώς ο χρόνος επώασης αυξάνεται, η αυξημένη συσσώρευση του αναλόγου συμπίπτει με τον έντονο φθορισμό της χρωστικής MitoTracker Red, που πιθανόν αντανακλά την διόγκωση των μιτοχονδρίων, όπως έχει αναφερθεί και από τις παρατηρήσεις μας με κυτταρομετρία ροής και ηλεκτρονική μικροσκοπία.

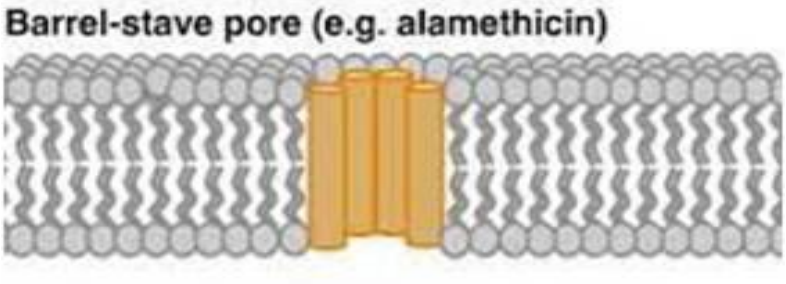
Τα ευρήματά μας είναι σε συμφωνία με τη διεθνή βιβλιογραφία, όπου αναφέρεται ότι οι αλκυλοφωσφοχολίνες έχουν άμεση επίδραση στο μιτοχόνδριο του παρασίτου [20]. Η μελέτη του τρόπου δράσης των αναλόγων οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα ενεργά ανάλογα επιδρούν στο μιτοχόνδριο του παρασίτου, προκαλώντας αλλαγές στη φυσιολογία του. Η αναζήτηση νέων θεραπευτικών στρατηγικών μας οδήγησε στην μελέτη χημικών ουσιών με άλλη δομή από εκείνη των αλκυλοφωσφοχολινών. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η αντιλεϊσμανιακή δράση των peptaibols antiamoebin (AAM) και suzukacilin (SZ) στην προμαστιγωτή και ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή του παρασίτου. Επιπρόσθετα, έγινε αποτίμηση της δράσης τους στο μιτοχόνδριο του παρασίτου, καταγράφοντας την παραγωγή ROS και τη μεταβολή της μορφολογίας και της διαφοράς δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης.

Αξιολογήθηκε επίσης η συνεργητική δράση του συνδυασμού υποβέλτιστων συγκεντρώσεων των peptaibols με τη μιλτεφοσίνη και το λιγότερο ενεργό ανάλογο TC52. Τα τελευταία χρόνια έχει αναφερθεί η ολοένα αυξανόμενη χρήση συνδυασμών φαρμάκων στην μοντέρνα ιατρική[326], ωστόσο ο αποτελεσματικός συνδυασμός διαφορετικών ενεργών μορίων είναι γνωστός εδώ και χιλιάδες χρόνια. Η χρήση συνδυαστικών θεραπειών συμβάλλει στην ανάδειξη θεραπειών με αυξημένη δραστικότητα, μειωμένη τοξικότητα και ελαττωμένη ανάπτυξη αντοχής. Επιπρόσθετα, ο ανασχηματισμός ήδη υπάρχοντων ουσιών σε συνδυαστικά προϊόντα αποτελεί βασική στρατηγική των φαρμακευτικών εταιριών[327, 328] και η ανάδειξη της βελτιωμένης δράσης των συνδυασμών φαρμάκων παρουσιάζει ιδιαίτερο ιατρικό ενδιαφέρον.

Οι παρατηρήσεις μας ανέδειξαν ότι ο συνδυασμός των δύο διαφορετικών ομάδων ουσιών έχει συνεργητική δράση έναντι της ενδοκυττάριας μορφής του παρασίτου. Ωστόσο τα δύο peptaibols έχουν διαφορετική επίδραση, αφού η 20-αμινοξεων μήκους SZ είναι πιο αποτελεσματική όταν συνδυαστεί και με τις δύο φωσφολιπίδια, υποδεικνύοντας ότι η παρουσία των ιδιαίτερων φυσικοχημικών χαρακτηριστικών κάθε ουσίας επηρεάζει το τελικό συνεργητικό αποτέλεσμα.

Η συγκριτική μελέτη των βασικών δομικών και λειτουργικών ιδιοτήτων της 16-αμινοξέων μήκους AAM και της alamethicin (που είναι ανάλογη της SZ), έδειξε ότι τα δύο

peptaibols δημιουργούν διαφορετικού τύπου κανάλια στις μεμβράνες[329]. Συγκεκριμένα, η alamethicin δημιουργεί κανάλια που περιβάλλονται από ηλεκτρικό φορτίο σε επίπεδες λιπιδικές διπλοστιβάδες[330, 331]. Σε κατάσταση ηρεμίας και απουσία επίδρασης φορτίου, τα C-termini της alamethicin συγκεντρώνονται σε μορφή στρώματος στη μεμβράνη, ενώ τα N-termini εισέρχονται βαθειά μέσα στον λιπιδικό πυρήνα σε διαφορετική έκταση. Αύξηση της τάσης οδηγεί σε άνοδο της αγωγιμότητας των καναλιών, με αποτέλεσμα τα μόρια της alamethicin να εισέρχονται στην μεμβράνη δημιουργώντας κανάλια τύπου "barrel stave" (Εικόνα 47). Αντίθετα, η AAM λόγω του κυρτού σχήματός της ευνοεί την εναπόθεση στη λιπιδική διπλοστοιβάδα προκαλώντας την αγωγιμότητα των καναλιών, γεγονός που εξαρτάται από τη συγκέντρωση του peptaibol, όχι όμως από την αύξηση της τάσης[332, 333].



Εικόνα 47: *Κανάλια τύπου barrel-stave.Τα α-ελικοειδή πεπτίδια ευθυγραμμίζονται, δημιουργώντας πόρο με τη μορφή μπαστουνιού που διαπερνά κατά μηκος τη μεμβράνη[334].*

Οι διαφορές που επιδεικνύουν τα δύο peptaibols ως προς τη φυσιολογία του μιτοχονδρίου του προμαστιγωτού παρασίτου θα μπορούσαν να αποδοθούν στον παραπάνω διαφορετικό τρόπο δράσης τους. Συγκεκριμένα, κατά τα πρώιμα στάδια επίδρασης, η AAM προκάλεσε προσωρινή αύξηση της Δψm στις 3h, η οποία μειώθηκε στο 75% μετά από 6h επώασης, υποδεικνύοντας ότι οι ιδανικές συνθήκες για τη δημιουργία αγώγιμων καναλιών επετεύχθησαν μετά τις 3h. Αντίθετα, απουσία ερεθίσματος που θα μπορούσε να επηρεάσει την Δψm, η SZ προκάλεσε ήπιες αλλαγές κατά τις πρώτες 6h επώασης, υποδεικνύοντας ότι υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες δεν έγινε δημιουργία καναλιών. Ωστόσο, η σημαντική αύξηση της Δψm που προκάλεσε η επώαση με HePC αποτελεί πιθανόν το ερέθισμα που οδήγησε στην δημιουργία καναλιών από την SZ, προκαλώντας έντονη πτώση της Δψm στον συνδυασμό SZ/HePC.

Επιπρόσθετα, ο συνδυασμός SZ/HePC προκάλεσε την παραγωγή των υψηλότερων επιπέδων ROS, που παρέμειναν υψηλά ανεξάρτητα από την πτώση της Δψm, ενώ η AAM, είτε μόνη είτε σε συνδυασμό με τη μιλτεφοσίνη, επηρέασε λιγότερο την οξειδοαναγωγική κατάσταση των προμαστιγωτών. Τα αμφιπαθητικά πεπτίδια που δημιουργούν πόρους, όπως η alamethicin, προκαλούν τη διόγκωση των μιτοχονδρίων που θυμίζει τον μιτοχονδριακό πόρο

διαπερατότητας. Επιπλέον η alamethicin δεν οδηγεί σε αναστολή του complex I, αντιθέτως προκαλεί διέγερση της δράσης του, επιτρέποντας στο NADH να έχει πρόσβαση στην αντίστοιχη θέση πρόσδεσης[335]. Επομένως η υψηλή παραγωγή ROS παρά την ελλάτωσης της Δψm, θα μπορούσε να αποδοθεί στην λειτουργικότητα του complex I κάτω από αυτές τις συνθήκες.

Επιπλέον, η διόγκωση και δυσλειτουργία του μιτοχονδρίου μπορεί να προκληθεί και από τη μαζική μετακίνηση ιόντων ασβεστίου (Ca^{+}), οδηγώντας σε ανισορροπία των επιπέδων Ca^{+}[336]. Τα κανάλια που δημιουργούνται από τα peptaibols είναι διαπερατά από κατιόντα, και η δράση τους ευνοεί την εισροή ιόντων για την επίτευξη της ηλεκτροχημικής κλίσης. Το μέγεθος του πόρου που μπορεί να υποστηρίξει την αγωγιμότητα αυτή καθορίζει τις ανάγκες ως προς τη συγκέντρωση και την κινητική που οδηγούν στην εξαφάνιση της Δψm και τελικά στον κυτταρικό θάνατο[337]. Και τα δυο peptaibols που χρησιμοποιήσαμε πρέπει να φτάσουν σε κρίσιμη συγκέντρωση ώστε να μπορέσουν να δημιουργήσουν πόρους διαπερατούς από κατιόντα, ωστόσο η SZ, όπως έχει προταθεί και για την alamethicin, χρειάζεται επιπλέον αυξημένη διαμεμβρανική τάση για να προκαλέσει το παραπάνω αποτέλεσμα.

Εκτός από τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά του κάθε peptaibol, ο ρυθμός δημιουργίας των πόρων μπορεί να επηρεάζεται και από τη λιπιδική σύσταση της μεμβράνης. Συγκεκριμένα, η HePC επηρεάζει το μεταβόλωμα της *Leishmania* σε πρώιμα στάδια επώασης επιδρώντας στην παραγωγή αλκανίων, μεταβάλλοντας τελικά τη σύσταση των κυτταρικών μεμβρανών[338]. Επιπρόσθετα, η μακροχρόνια επίδραση με χαμηλές συγκεντρώσεις HePC οδηγεί σε μειωμένο περιεχόμενο φωσφατιδυλοχολίνης και αυξημένο ποσοστό φωσφατιδιλοεθανολαμίνης της μεμβράνης του παρασίτου, προκαλώντας αλλαγές στη σύσταση και τη ρευστότητα της μεμβράνης[269]. Οι αλλαγές της σύστασης της μεμβράνης θα μπορούσαν να δρουν ευνοϊκά στην ικανότητα των peptaibols να δημιουργούν κανάλια, με αποτέλεσμα να ενισχύουν την συνολική αντιλεϊσμανιακή δράση τους. Δεδομένου ότι η συνεργητική δράση φαίνεται να είναι ειδικό αντιλεϊσμανιακό φαινόμενο, αφού δεν παρατηρείται τοξική δράση στο κύτταρο ξενιστή, συμπεραίνουμε ότι τα συγκεκριμένα λιπιδικά συστατικά της μεμβράνης του παρασίτου αποτελούν τη βάση για την επιλεκτική μεμβρανοτοξική δράση των peptaibols.

Η πιθανότητα να επηρεάζεται η βιολογική δράση λιγότερο ενεργών αναλόγων από τον τρόπο δράσης των peptaibols μελετήθηκε χρησιμοποιώντας το ανάλογο TC52. Παρατηρήθηκε ότι ο συνδυασμός του αναλόγου με AAM δεν επέφερε αλλαγές στην μιτοχονδριακή λειτουργία ή την οξειδοαναγωγική κατάσταση των προμαστιγωτών. Για τον λόγο αυτό προτείνουμε ότι η δράση του μορίου της φωσφοχολίνης αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για το τελικό συνεργητικό αποτέλεσμα.

Η επίδραση με AAM προκάλεσε επίσης σημαντικές αλλαγές στη μορφολογία των μιτοχονδρίων των προμαστιγωτών, όπου παρατηρείται έντονη σύνδεση και παρουσία

σφαιροειδών. Το φαινόμενο παρατηρείται ακόμα εντονότερο κατά τον συνδυασμό με μιλτεφοσίνη, καταδεικνύοντας τη σημασία της δράσης των peptaibols, που θα μπορούσε να ευθύνεται για την παραπάνω εικόνα. Τα σφαιροειδή είναι μοναδικές μιτοχονδριακές δομές που προκαλούνται από διάφορες στρεσογόνες καταστάσεις, συχνά φαρμακολογικής προέλευσης[339]. Αντίστοιχη εικόνα έχει αναφερθεί στη *L.amazonensis*[340]. Οι δικές μας παρατηρήσεις αφορούν στη δημιουργία δακτυλίων κατά την επώαση με HePC και την παρουσία επιμηκυμένων μιτοχονδρίων που έχουν διαστρεβλωθεί, ωστόσο δεν είναι ξεκάθαρο αν αντιπροσωπεύουν το ίδιο υποκυτταρικό φαινόμενο. Παρατηρήσαμε επίσης μια σοβαρή ανισσοροπία της διαδικασίας fission/fusion κατά την επώαση με AAM. Ωστόσο, ο φυσιολογικός ρόλος των σφαιροειδών ως προ- ή αντι-αποπτωτική ένδειξη πρέπει να αποσαφηνιστεί[341, 342].

Τα παραπάνω αποτελέσματα αναδεικνύουν τη χρησιμότητα των συνεργητικών συνδυασμών φαρμακων, που κατέχουν σαφή πλεονεκτήματα έναντι της μονοθεραπείας και αποτελούν εναλλακτικό τρόπο αντιμετώπισης και θεραπείας της λεϊσμανίασης στον άνθρωπο και στον σκύλο. Ο πολυμορφισμός της ασθένειας στον σκύλο αποτελεί συνεχή πρόκληση για τους κτηνιάτρους και η θεραπεία της απαιτεί προσεκτικές φαρμακευτικές επιλογές, προσαρμοσμένες στην κλινική εικόνα του ζώου και στις διεθνείς θεραπευτικές οδηγίες[343]. Η μιλτεφοσίνη αποτελεί ένα από τα πιο πολυσυζητημένα φάρμακα για τη θεραπεία της λεϊσμανίασης στον σκύλο, ειδικά οσον αφορά στη μακροπρόθεσμη αποτελεσματικότητά της, καθώς αν και είναι ιδιαίτερα δραστική, δεν συστήνεται για μονοθεραπεία λόγω υψηλού ρίσκου θεραπευτικής αποτυχίας[344], που συνδέεται με συχνές υποτροπές ή την ανάπτυξη αντοχής[345].

Στη μελέτη μας χρησιμοποιήθηκε το ανάλογο της τριφλουραλίνης TC106 που κατέχει ιδιαίτερα υψηλή παρασιτοκτόνο δράση σε συνδυασμό με χαμηλή εως μηδενική κυτταροτοξικότητα, για τη θεραπεία φυσικά μολυσμένου σκύλου. Με την ολοκλήρωση της θεραπείας παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση στην κλινική εικόνα του ζώου, ενώ από τις βιοχημικές παραμέτρους που εξετάστηκαν δεν φάνηκε να προκύπτει κάποιου είδους τοξικότητας στα ζώα, ωστόσο δεν επιτεύχθηκε η εκρίζωση του παρασίτου από τους λεμφαδένες μετά το πέρας της θεραπείας.

Στα πλαίσια αυτής της διατριβής μελετήσαμε μηχανισμούς προσαρμοστικής αντοχής των παρασίτων σε επιλεγμένα ανάλογα. Το φαινόμενο της προσαρμοστικής αντοχής αναγνωρίζεται ως κεντρικής σημασίας αίτιο της κλινικής αποτυχίας στη θεραπεία των λοιμώξεων. Ειδικότερα για την λεισμάνια, η εμφάνιση αντοχής είναι ένα συχνό ανησυχητικό φαινόμενο κατά τη θεραπεία με το νεότερης γενιάς φάρμακο, τη μιλτεφοσίνη. Αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν μελετήσει τον μηχανισμό ανάπτυξης επίκτητης αντοχής της

Leishmania στα φάρμακα, όμως δεν υπάρχουν δεδομένα για τους μηχανισμούς προσαρμογής του παρασίτου σε υποθεραπευτικές συγκεντρώσεις των φαρμάκων.

Από πειράματα ανάπτυξης ανθεκτικών προμαστιγωτών *L. donovani*, διαφαίνεται ότι η επίκτητη αντοχή και προσαρμοστική αντοχή είναι δύο αλληλοσυνδεόμενα φαινόμενα. Οι Seifert *et al* έδειξαν οτι σε 40μΜ μιλτεφοσίνης δημιουργείται ένας ανθεκτικός πληθυσμός, στον οποίο η είσοδος του φαρμάκου είναι μειωμένη κατά >95% και επομένως η ενδοκυττάρια συγκέντρωση δεν ξεπερνά τα, ούτως ή άλλως, θεραπευτικά ανεπαρκή επίπεδα των 2 μΜ. Η μειωμένη είσοδος επιτρέπει τη σταδιακή προσαρμογή των κυτταρικών μηχανισμών με αποτέλεσμα τη δημιουργία παρακαταθήκης του παθογόνου στον οργανισμό[346].

Η μελέτη έγινε με τη χρήση πρωτεωμικής, η οποία τα τελευταία χρόνια έχει συμβάλλει σημαντικά στην αναγνώριση και τον χαρακτηρισμό βιολογικών μονοπατιών και σε πολλές περιπτώσεις αποδεικνύεται αποτελεσματικότερη μέθοδος από τη μελέτη μεμονομένων μορίων[347]. Η πρωτεωμική αναφέρεται στον ευρείας-κλίμακας χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών ενός κυττάρου, ιστού ή οργανισμού, με σκοπό να αποκτηθεί μια πιο καθολική και ενοποιημένη εικόνα των ποικίλων βιολογικών διαδικασιών[348]. Επίσης, έχει συμβάλει στην κατανόηση και αναγνώριση ποικίλων σημαντικών βιοδεικτών που σχετίζονται με διάφορες ασθένειες. Συγκεκριμένα, έχει συμβάλει στην αναγνώριση μορίων που εμπλέκονται στην εγκαθίδρυση και εξέλιξη της μόλυνσης με *Leishmania*[349], την ανάπτυξη αντοχής[350] καθώς και στον χαρακτηρισμό νέων χημειοθεραπευτικών στόχων[351]. Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχάνεται η αναγνώριση και ο χαρακτηρισμός μορίων και μονοπατιών που εκφράζονται στο παράσιτο, αλλά και στον σπονδυλωτό και ασπόνδυλο ξενιστή[352]. Συγκεκριμένα, η πρωτεωμική έχει χρησιμοποιηθεί σε μελέτες αλληλεπίδρασης παρασίτου-ξενιστή και στην αναγνώριση στόχων που σχετίζονται με την προφύλαξη ή την χημειοθεραπεία[353].

Η επιδίωξή μας ήταν να αναδείξουμε μηχανισμούς επιβίωσης του παρασίτου σε συνθήκες στρες με υποθεραπευτικές συγκεντρώσεις επιλεγμένων αναλόγων. Κάποιοι από αυτούς θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως στόχοι για νέα φάρμακα. Χρησιμοποιήσαμε το εργαστηριακό στέλεχος της *L. donovani* λόγω της ευκολίας να προσαρμόζεται στην παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων αλκυλοφωσφοχολινών. Επιδράσαμε με μιλτεφοσίνη και το ανάλογο TC19 και στη συνέχεια αναλύσαμε τα φάσματα των πρωτεϊνών. Λόγω της πληθώρας των αποτελεσμάτων και της έλλειψης ένδειξης λειτουργίας στο 30% των πρωτεϊνών, επιλέξαμε να περιοριστούμε σε πρωτη φάση σε γνωστά μεταβολικά μονοπάτια και να ελέγξουμε κεντρικά ένζυμα ως προς τη μεταβολή της έκφρασής τους.

Παρατηρήσαμε ότι σε ορισμένα μονοπάτια υπάρχει ομοιόμορφη αντίδραση του παρασίτου έναντι των δυο ουσιών. Με ενδιαφέρον είδαμε όμως και διαφοροποιήσεις ανάμεσα στα δυο ανάλογα, με πρώτη τη χρησιμοποίηση δυο διαφορετικών μεταφορέων για την είσοδο των ουσιών στο κύτταρο. Παρατηρήσαμε επίσης διαφορές στις μεταβολικές

λειτουργίες του μιτοχονδρίου, που υπονοεί διαφορετικό τρόπο επίδρασης των αναλόγων. Όμως, η ευκολία με την οποία το παράσιτο απέκτησε ανοχή σε σχετικά ψηλές συγκεντρώσεις (1/2 της IC_{50}) του TC19, σε αντίθεση με τη μιλτεφοσίνη (1/22 της IC_{50}), υπονοεί ότι το ανάλογο TC19 ίσως να μην είναι ένα καλό αντολεϊσμανιακό, παρότι έχει πολύ χαμηλή IC_{50} και εξαιρετικά μειωμένη κυτταροτοξικότητα για τα μακροφάγα THP1.

Η επεξεργασία του συνόλου των αποτελεσμάτων που παρουσιάστηκαν στην παρούσα διατριβή, έδωσε μια εικόνα των μηχανισμών που χρησιμοποιεί το παράσιτο για την επιβίωσή του και την εγκαθίδρυση της μόλυνσης του ξενιστή. Επίσης, τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να χρησιμεύσουν για στοχευμένες μελέτες στα ενδοκυττάρια παράσιτα ή και σε παράσιτα που απομονώνονται από κλινικά δείγματα, για την ανίχνευση της έκφρασης επίμαχων κυτταρικών μηχανισμών και την αναγνώριση πιθανών φαρμακευτικών στόχων.

8. Βιβλιογραφία

Reference List

1. Mann S, Frasca K, Scherrer S, Henao-Martinez AF, Newman S, Ramanan P, Suarez JA. A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. Curr Trop Med Rep 2021;8:121-132.

2. Sahu NP, Pal C, Mandal NB, Banerjee S, Raha M, Kundu AP, Basu A, Ghosh M, Roy K, Bandyopadhyay S. Synthesis of a novel quinoline derivative, 2-(2-methylquinolin-4-ylamino)-N-phenylacetamide--a potential antileishmanial agent. Bioorg Med Chem 2002;10:1687-1693.

3. Nakayama H, Desrivot J, Bories C, Franck X, Figadere B, Hocquemiller R, Fournet A, Loiseau PM. In vitro and in vivo antileishmanial efficacy of a new nitrilquinoline against Leishmania donovani. Biomed Pharmacother 2007;61:186-188.

4. Agarwal A, Ramesh, Ashutosh, Goyal N, Chauhan PM, Gupta S. Dihydropyrido[2,3-d]pyrimidines as a new class of antileishmanial agents. Bioorg Med Chem 2005;13:6678-6684.

5. de MH, Echevarria A, Bernardino AM, Canto-Cavalheiro M, Leon LL. Antileishmanial pyrazolopyridine derivatives: synthesis and structure-activity relationship analysis. J Med Chem 2004;47:5427-5432.

6. Martin MB, Grimley JS, Lewis JC, Heath HT, III, Bailey BN, Kendrick H, Yardley V, Caldera A, Lira R, Urbina JA, Moreno SN, Docampo R, Croft SL, Oldfield E. Bisphosphonates inhibit the growth of Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, Leishmania donovani, Toxoplasma gondii, and Plasmodium falciparum: a potential route to chemotherapy. J Med Chem 2001;44:909-916.

7. Singh FV, Vatsyayan R, Roy U, Goel A. Arylanthranilodinitriles: a new biaryl class of antileishmanial agents. Bioorg Med Chem Lett 2006;16:2734-2737.

8. Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Bhattacharya SK, Rai M. Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 2006;100 Suppl 1:S26-S33.

9. Sindermann H, Croft SL, Engel KR, Bommer W, Eibl HJ, Unger C, Engel J. Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. Med Microbiol Immunol 2004;193:173-180.

10. Avlonitis N, Lekka E, Detsi A, Koufaki M, Calogeropoulou T, Scoulica E, Siapi E, Kyrikou I, Mavromoustakos T, Tsotinis A, Grdadolnik SG, Makriyannis A. Antileishmanial ring-substituted ether phospholipids. J Med Chem 2003;46:755-767.

11. Calogeropoulou T, Angelou P, Detsi A, Fragiadaki I, Scoulica E. Design and synthesis of potent antileishmanial cycloalkylidene-substituted ether phospholipid derivatives. J Med Chem 2008;51:897-908.

12. Magoulas GE, Afroudakis P, Georgikopoulou K, Roussaki M, Borsari C, Fotopoulou T, Santarem N, Barrias E, Tejera NP, Hachenberg J, Bifeld E, Ellinger B, Kuzikov M, Fragiadaki I, Scoulica E, Clos J,

Gul S, Costi MP, de SW, Prousis KC, Cordeiro da SA, Calogeropoulou T. Design, Synthesis and Antiparasitic Evaluation of Click Phospholipids. Molecules 2021;26.

13. Roussaki M, Magoulas GE, Fotopoulou T, Santarem N, Barrias E, Pohner I, Luelmo S, Afroudakis P, Georgikopoulou K, Nevado PT, Eick J, Bifeld E, Corral MJ, Jimenez-Anton MD, Ellinger B, Kuzikov M, Fragiadaki I, Scoulica E, Gul S, Clos J, Prousis KC, Torrado JJ, Alunda JM, Wade RC, de SW, Cordeiro da SA, Calogeropoulou T. Design, synthesis and biological evaluation of antiparasitic dinitroaniline-ether phospholipid hybrids. Bioorg Chem 2023;138:106615.

14. Eddaikra N, Ait-Oudhia K, Kherrachi I, Oury B, Moulti-Mati F, Benikhlef R, Harrat Z, Sereno D. Antimony susceptibility of Leishmania isolates collected over a 30-year period in Algeria. PLoS Negl Trop Dis 2018;12:e0006310.

15. Ait-Oudhia K, Gazanion E, Sereno D, Oury B, Dedet JP, Pratlong F, Lachaud L. In vitro susceptibility to antimonials and amphotericin B of Leishmania infantum strains isolated from dogs in a region lacking drug selection pressure. Vet Parasitol 2012;187:386-393.

16. Perez-Victoria FJ, Gamarro F, Ouellette M, Castanys S. Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from Leishmania involved in drug resistance. J Biol Chem 2003;278:49965-49971.

17. Biederbick A, Kern HF, Elsasser HP. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. Eur J Cell Biol 1995;66:3-14.

18. Eskelinen EL. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. Mol Aspects Med 2006;27:495-502.

19. Sen N, Banerjee B, Das BB, Ganguly A, Sen T, Pramanik S, Mukhopadhyay S, Majumder HK. Apoptosis is induced in leishmanial cells by a novel protein kinase inhibitor withaferin A and is facilitated by apoptotic topoisomerase I-DNA complex. Cell Death Differ 2007;14:358-367.

20. Sen N, Majumder HK. Mitochondrion of protozoan parasite emerges as potent therapeutic target: exciting drugs are on the horizon. Curr Pharm Des 2008;14:839-846.

21. Antwi CA, Amisigo CM, Adjimani JP, Gwira TM. In vitro activity and mode of action of phenolic compounds on Leishmania donovani. PLoS Negl Trop Dis 2019;13:e0007206.

22. Dey R, Meneses C, Salotra P, Kamhawi S, Nakhasi HL, Duncan R. Characterization of a Leishmania stage-specific mitochondrial membrane protein that enhances the activity of cytochrome c oxidase and its role in virulence. Mol Microbiol 2010;77:399-414.

23. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods Enzymol 1990;186:1-85.

24. Denerolle P, Bourdoiseau G. Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). J Vet Intern Med 1999;13:413-415.

25. Vercammen F, Fernandez-Perez FJ, del AC, Alunda JM. Follow-up of Leishmania infantum naturally infected dogs treated with allopurinol: immunofluorescence antibody test, ELISA and Western blot. Acta Trop 2002;84:175-181.

26. Esfandiarpour I, Dabiri SH. Treatment of cutaneous leishmaniasis recidivans with a combination of allopurinol and meglumine antimoniate: a clinical and histologic study. Int J Dermatol 2007;46:848-852.

27. Manna L, Vitale F, Reale S, Picillo E, Neglia G, Vescio F, Gravino AE. Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. Vet J 2009;182:441-445.

28. Fragiadaki I, Katogiritis A, Calogeropoulou T, Bruckner H, Scoulica E. Synergistic combination of alkylphosphocholines with peptaibols in targeting Leishmania infantum in vitro. Int J Parasitol Drugs Drug Resist 2018;8:194-202.

29. Piscopo TV, Mallia AC. Leishmaniasis. Postgrad Med J 2007;83:649-657.

30. Sharma U, Singh S. Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control. J Vector Borne Dis 2008;45:255-272.

31. Dujardin JC, Campino L, Canavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, Mazeris A, Ozbel Y, Boelaert M. Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. Emerg Infect Dis 2008;14:1013-1018.

32. Martinez-Calvillo S, Vizuet-de-Rueda JC, Florencio-Martinez LE, Manning-Cela RG, Figueroa-Angulo EE. Gene expression in trypanosomatid parasites. J Biomed Biotechnol 2010;2010:1.

33. Donovan C. Lancet 1904;ii:744.

34. Leishman W.B. Ibid 1903;1:1252.

35. Donovan C. Brit Med J 1903;2:79.

36. Gibson ME. The identification of kala-azar and the discovery of Leishmania donovani. Med Hist 1983;27:203-213.

37. BAILEY H, BISHOP WJ. Leishman-Donovan bodies and donovaniasis; Sir William Boog Leishman, 1865-1926; Charles Donovan, 1863-1951. Br J Vener Dis 1959;35:8-9.

38. Oumeish OY. Cutaneous leishmaniasis: a historical perspective. Clin Dermatol 1999;17:249-254.

39. Bray RS. Note on the history of cutaneous leishmaniasis in the Mediterranean and Middle East area. Parassitologia 1987;29:175-179.

40. Zink AR, Spigelman M, Schraut B, Greenblatt CL, Nerlich AG, Donoghue HD. Leishmaniasis in ancient Egypt and Upper nubia. Emerg Infect Dis 2006;12:1616-1617.

41. Besteiro S, Williams RA, Coombs GH, Mottram JC. Protein turnover and differentiation in Leishmania. Int J Parasitol 2007;37:1063-1075.

42. Bates PA. Leishmania sand fly interaction: progress and challenges. Curr Opin Microbiol 2008;11:340-344.

43. Ashford RW. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. Int J Parasitol 2000;30:1269-1281.

44. Bates PA. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. Int J Parasitol 2007;37:1097-1106.

45. Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? Trends Parasitol 2006;22:439-445.

46. Bray RS. Leishmania. Annu Rev Microbiol 1974;28:189-217.

47. Pratt DM, David JR. Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of Leishmania. Nature 1981;291:581-583.

48. Lumsden WH. Letter: Biochemical taxonomy of Leishmania. Trans R Soc Trop Med Hyg 1974;68:74-75.

49. Lainson RaSJJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: W.Peters and R.Killick-Kendrick, ed. The Leishmaniases in Biology and Medicine. 1987:1-120.

50. Arnot DE, Barker DC. Biochemical identification of cutaneous leishmanias by analysis of kinetoplast DNA. II. Sequence homologies in Leishmania kDNA. Mol Biochem Parasitol 1981;3:47-56.

51. Chance ML, Peters W, Shchory L. Biochemical taxonomy of Leishmania. I. Observations on DNA. Ann Trop Med Parasitol 1974;68:307-316.

52. Handman E, Curtis JM. Leishmania tropica: surface antigens of intracellular and flagellate forms. Exp Parasitol 1982;54:243-249.

53. Kreutzer RD, Christensen HA. Characterization of Leishmania spp. by isozyme electrophoresis. Am J Trop Med Hyg 1980;29:199-208.

54. Le Blancq SM, Cibulskis RE, Peters W. Leishmania in the Old World: 5. Numerical analysis of isoenzyme data. Trans R Soc Trop Med Hyg 1986;80:517-524.

55. Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of Leishmania. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. Ann Parasitol Hum Comp 1990;65:111-125.

56. Banuls AL, Hide M, Prugnolle F. Leishmania and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. Adv Parasitol 2007;64:1-109.

57. Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of Leishmania chagasi. Parasitol Today 2000;16:188-189.

58. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votypka J, Marty P, Delaunay P, Sereno D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. PLoS Negl Trop Dis 2016;10:e0004349.

59. Kalra NL, Bang YH. Sandfly vector competence for transmission of Leishmania parasite in tropical Asia. J Commun Dis 1986;18:28-34.

60. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. Lancet 2005;366:1561-1577.

61. Neuber H. Leishmaniasis. J Dtsch Dermatol Ges 2008;6:754-765.

62. Bates PA, Rogers ME. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of Leishmania. Curr Mol Med 2004;4:601-609.

63. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votypka J, Marty P, Delaunay P, Sereno D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. PLoS Negl Trop Dis 2016;10:e0004349.

64. Roque AL, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of Leishmania species in the Americas. Int J Parasitol Parasites Wildl 2014;3:251-262.

65. Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. Acta Trop 2001;78:103-116.

66. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nat Rev Microbiol 2007;5:873-882.

67. Bashaye S, Nombela N, Argaw D, Mulugeta A, Herrero M, Nieto J, Chicharro C, Canavate C, Aparicio P, Velez ID, Alvar J, Bern C. Risk factors for visceral leishmaniasis in a new epidemic site in Amhara Region, Ethiopia. Am J Trop Med Hyg 2009;81:34-39.

68. World Health Organization. Leishmaniasis: burden of disease. 2009.

69. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nat Rev Microbiol 2007;5:873-882.

70. Cerf BJ, Jones TC, Badaro R, Sampaio D, Teixeira R, Johnson WD, Jr. Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. J Infect Dis 1987;156:1030-1033.

71. Oliveira CD, Diez-Roux A, Cesar CC, Proietti FA. A case-control study of microenvironmental risk factors for urban visceral leishmaniasis in a large city in Brazil, 1999-2000. Rev Panam Salud Publica 2006;20:369-376.

72. Costa CH, Werneck GL, Rodrigues L, Jr., Santos MV, Araujo IB, Moura LS, Moreira S, Gomes RB, Lima SS. Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. Ann Trop Med Parasitol 2005;99:229-236.

73. Romero GA, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. PLoS Negl Trop Dis 2010;4:e584.

74. Bhattacharya SK, Sur D, Sinha PK, Karbwang J. Elimination of leishmaniasis (kala-azar) from the Indian subcontinent is technically feasible & operationally achievable. Indian J Med Res 2006;123:195-196.

75. Croft SL. PKDL--a drug related phenomenon? Indian J Med Res 2008;128:10-11.

76. Subba Raju BV, Singh R, Sreenivas G, Singh S, Salotra P. Genetic fingerprinting and identification of differentially expressed genes in isolates of Leishmania donovani from Indian patients of post-kala-azar dermal leishmaniasis. Parasitology 2008;135:23-32.

77. Zijlstra EE, el-Hassan AM. Leishmaniasis in Sudan. Post kala-azar dermal leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 2001;95 Suppl 1:S59-S76.

78. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. Lancet Infect Dis 2007;7:581-596.

79. Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Trans R Soc Trop Med Hyg 2001;95:239-243.

80. Guthmann JP, Calmet J, Rosales E, Cruz M, Chang J, Dedet JP. Patients' associations and the control of leishmaniasis in Peru. Bull World Health Organ 1997;75:39-44.

81. Weina PJ, Neafie RC, Wortmann G, Polhemus M, Aronson NE. Old world leishmaniasis: an emerging infection among deployed US military and civilian workers. Clin Infect Dis 2004;39:1674-1680.

82. Blum J, Desjeux P, Schwartz E, Beck B, Hatz C. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. J Antimicrob Chemother 2004;53:158-166.

83. Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis: an overview. J Postgrad Med 2003;49:50-54.

84. Ogawa MM, Casseb RL, Michalany N, Tomimori-Yamashita J. Disseminated cutaneous leishmaniasis, an emerging form of cutaneous leishmaniasis: report of two cases. Int J Dermatol 2006;45:869-871.

85. Salman SM, Rubeiz NG, Kibbi AG. Cutaneous leishmaniasis: clinical features and diagnosis. Clin Dermatol 1999;17:291-296.

86. Mehta V, Balachandran C, Rao R, Dil SK, Indusri L. Diffuse cutaneous leishmaniasis in HIV. Dermatol Online J 2009;15:9.

87. Niamba P, Goumbri-Lompo O, Traore A, Barro-Traore F, Soudre RT. Diffuse cutaneous leishmaniasis in an HIV-positive patient in western Africa. Australas J Dermatol 2007;48:32-34.

88. Jones TC, Johnson WD, Jr., Barretto AC, Lago E, Badaro R, Cerf B, Reed SG, Netto EM, Tada MS, Franca TF, . Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to Leishmania braziliensis braziliensis. J Infect Dis 1987;156:73-83.

89. Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). Trans R Soc Trop Med Hyg 1986;80:859-876.

90. Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi JG, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de JA, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM, . Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that Leishmania amazonensis produces a wide spectrum of clinical disease. Am J Trop Med Hyg 1991;44:536-546.

91. Osorio LE, Castillo CM, Ochoa MT. Mucosal leishmaniasis due to Leishmania (Viannia) panamensis in Colombia: clinical characteristics. Am J Trop Med Hyg 1998;59:49-52.

92. Amato VS, Tuon FF, Siqueira AM, Nicodemo AC, Neto VA. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. Am J Trop Med Hyg 2007;77:266-274.

93. Amato VS, Tuon FF, Bacha HA, Neto VA, Nicodemo AC. Mucosal leishmaniasis . Current scenario and prospects for treatment. Acta Trop 2008;105:1-9.

94. Pagliano P, Esposito S. Visceral leishmaniosis in immunocompromised host: an update and literature review. J Chemother 2017;29:261-266.

95. Cruz I, Nieto J, Moreno J, Canavate C, Desjeux P, Alvar J. Leishmania/HIV co-infections in the second decade. Indian J Med Res 2006;123:357-388.

96. Lopez-Velez R. The impact of highly active antiretroviral therapy (HAART) on visceral leishmaniasis in Spanish patients who are co-infected with HIV. Ann Trop Med Parasitol 2003;97 Suppl 1:143-147.

97. Albuquerque LC, Mendonca IR, Cardoso PN, Baldacara LR, Borges MR, Borges JC, Pranchevicius MC. HIV/AIDS-related visceral leishmaniasis: a clinical and epidemiological description of visceral leishmaniasis in northern Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2014;47:38-46.

98. Burza S, Mahajan R, Sanz MG, Sunyoto T, Kumar R, Mitra G, Lima MA. HIV and visceral leishmaniasis coinfection in Bihar, India: an underrecognized and underdiagnosed threat against elimination. Clin Infect Dis 2014;59:552-555.

99. Nicolle CCC. Origine canine du Kala-azar. Bull Soc Pathol Exot 1908;1:299-301.

100. Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. Trends Parasitol 2002;18:399-405.

101. Ferroglio E, Maroli M, Gastaldo S, Mignone W, Rossi L. Canine leishmaniasis, Italy. Emerg Infect Dis 2005;11:1618-1620.

102. Werneck GL, Costa CH, Walker AM, David JR, Wand M, Maguire JH. Multilevel modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. Epidemiol Infect 2007;135:195-201.

103. Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of Leishmania infantum infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. J Clin Microbiol 2001;39:560-563.

104. Leontides LS, Saridomichelakis MN, Billinis C, Kontos V, Koutinas AF, Galatos AD, Mylonakis ME. A cross-sectional study of Leishmania spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. Vet Parasitol 2002;109:19-27.

105. Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of Leishmania infantum infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. J Clin Microbiol 2001;39:560-563.

106. Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. Adv Parasitol 2004;57:1-88.

107. Oliva G, Scalone A, Foglia M, V, Gramiccia M, Pagano A, Di MT, Gradoni L. Incidence and time course of Leishmania infantum infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. J Clin Microbiol 2006;44:1318-1322.

108. Shaw SE, Lerga AI, Williams S, Beugnet F, Birtles RJ, Day MJ, Kenny MJ. Review of exotic infectious diseases in small animals entering the United Kingdom from abroad diagnosed by PCR. Vet Rec 2003;152:176-177.

109. de FE, Melo MN, da Costa-Val AP, Michalick MS. Transmission of Leishmania infantum via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. Vet Parasitol 2006;137:159-167.

110. Diaz-Espineira MM, Slappendel RJ. A case of autochthonous canine leishmaniasis in The Netherlands. Vet Q 1997;19:69-71.

111. Rosypal AC, Troy GC, Zajac AM, Frank G, Lindsay DS. Transplacental transmission of a North American isolate of Leishmania infantum in an experimentally infected beagle. J Parasitol 2005;91:970-972.

112. Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, Scalone A, Persechino A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by Leishmania infantum. Vet Rec 1997;141:539-543.

113. Solano-Gallego L, Fernandez-Bellon H, Morell P, Fondevila D, Alberola J, Ramis A, Ferrer L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of Leishmania infantum-infected dogs. J Comp Pathol 2004;130:7-12.

114. Lima WG, Michalick MS, de Melo MN, Luiz TW, Luiz TW. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. Acta Trop 2004;92:43-53.

115. Alexandre-Pires G, Pais D, Correia M, Pina JA. Leishmaniosis--a report about the microvascular and cellular architecture of the infected spleen in Canis familiaris. Microsc Res Tech 2006;69:227-235.

116. Costa FA, Goto H, Saldanha LC, Silva SM, Sinhorini IL, Silva TC, Guerra JL. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. Vet Pathol 2003;40:677-684.

117. Agut A, Corzo N, Murciano J, Laredo FG, Soler M. Clinical and radiographic study of bone and joint lesions in 26 dogs with leishmaniasis. Vet Rec 2003;153:648-652.

118. Naranjo C, Fondevila D, Leiva M, Roura X, Pena T. Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis. Vet Parasitol 2005;133:37-47.

119. Ciaramella P, Pelagalli A, Cortese L, Pero ME, Corona M, Lombardi P, Avallone L, Persechino A. Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by Leishmania infantum. Vet J 2005;169:465-467.

120. Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. Trends Parasitol 2008;24:324-330.

121. Otranto D, Dantas-Torres F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. Trends Parasitol 2013;29:339-345.

122. Costa CH. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. Rev Soc Bras Med Trop 2011;44:232-242.

123. Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. Trends Parasitol 2008;24:371-377.

124. Ikeda-Garcia FA, Lopes RS, Marques FJ, de Lima VM, Morinishi CK, Bonello FL, Zanette MF, Perri SH, Feitosa MM. Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi submitted to treatment with meglumine antimoniate. Vet Parasitol 2007;143:254-259.

125. Guarga JL, Moreno J, Lucientes J, Gracia MJ, Peribanez MA, Castillo JA. Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. Vet Immunol Immunopathol 2002;88:13-20.

126. Noli C, Auxilia ST. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. Vet Dermatol 2005;16:213-232.

127. Bianciardi P, Fasanella A, Foglia M, V, Trotta T, Pagano A, Sorino S, Gradoni L, Oliva G. The efficacy of enrofloxacin, alone or combined with metronidazole, in the therapy of canine leishmaniasis. Parasitol Res 2004;93:486-492.

128. Maltezou HC. Drug resistance in visceral leishmaniasis. J Biomed Biotechnol 2010;2010:617521.

129. Kothari H, Kumar P, Sundar S, Singh N. Possibility of membrane modification as a mechanism of antimony resistance in Leishmania donovani. Parasitol Int 2007;56:77-80.

130. Singh N. Drug resistance mechanisms in clinical isolates of Leishmania donovani. Indian J Med Res 2006;123:411-422.

131. Wyllie S, Vickers TJ, Fairlamb AH. Roles of trypanothione S-transferase and tryparedoxin peroxidase in resistance to antimonials. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:1359-1365.

132. Sundar S, More DK, Singh MK, Singh VP, Sharma S, Makharia A, Kumar PC, Murray HW. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. Clin Infect Dis 2000;31:1104-1107.

133. Abdo MG, Elamin WM, Khalil EA, Mukhtar MM. Antimony-resistant Leishmania donovaniin eastern Sudan: incidence and in vitro correlation. East Mediterr Health J 2003;9:837-843.

134. Gradoni L, Soteriadou K, Louzir H, Dakkak A, Toz SO, Jaffe C, Dedet JP, Campino L, Canavate C, Dujardin JC. Drug regimens for visceral leishmaniasis in Mediterranean countries. Trop Med Int Health 2008;13:1272-1276.

135. Raguenaud ME, Jansson A, Vanlerberghe V, Deborggraeve S, Dujardin JC, Orfanos G, Reid T, Boelaert M. Epidemiology and clinical features of patients with visceral leishmaniasis treated by an MSF clinic in Bakool region, Somalia, 2004-2006. PLoS Negl Trop Dis 2007;1:e85.

136. Decuypere S, Rijal S, Yardley V, De DS, Laurent T, Khanal B, Chappuis F, Dujardin JC. Gene expression analysis of the mechanism of natural Sb(V) resistance in Leishmania donovani isolates from Nepal. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:4616-4621.

137. Choudhury K, Zander D, Kube M, Reinhardt R, Clos J. Identification of a Leishmania infantum gene mediating resistance to miltefosine and SbIII. Int J Parasitol 2008;38:1411-1423.

138. Mukherjee A, Padmanabhan PK, Singh S, Roy G, Girard I, Chatterjee M, Ouellette M, Madhubala R. Role of ABC transporter MRPA, gamma-glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of Leishmania donovani. J Antimicrob Chemother 2007;59:204-211.

139. Mittal MK, Rai S, Ashutosh, Ravinder, Gupta S, Sundar S, Goyal N. Characterization of natural antimony resistance in Leishmania donovani isolates. Am J Trop Med Hyg 2007;76:681-688.

140. Mandal G, Sarkar A, Saha P, Singh N, Sundar S, Chatterjee M. Functionality of drug efflux pumps in antimonial resistant Leishmania donovani field isolates. Indian J Biochem Biophys 2009;46:86-92.

141. Mookerjee BJ, Mookerjee A, Banerjee R, Saha M, Singh S, Naskar K, Tripathy G, Sinha PK, Pandey K, Sundar S, Bimal S, Das PK, Choudhuri SK, Roy S. Inhibition of ABC transporters abolishes antimony resistance in Leishmania Infection. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:1080-1093.

142. SAMPAIO SA, GODOY JT, PAIVA L, DILLON NL, da LACAZ CS. The treatment of American (mucocutaneous) leishmaniasis with amphotericin B. Arch Dermatol 1960;82:627-635.

143. Beach DH, Goad LJ, Holz GG, Jr. Effects of antimycotic azoles on growth and sterol biosynthesis of Leishmania promastigotes. Mol Biochem Parasitol 1988;31:149-162.

144. Lachaud L, Bourgeois N, Plourde M, Leprohon P, Bastien P, Ouellette M. Parasite susceptibility to amphotericin B in failures of treatment for visceral leishmaniasis in patients coinfected with HIV type 1 and Leishmania infantum. Clin Infect Dis 2009;48:e16-e22.

145. Sundar S, Chakravarty J, Rai VK, Agrawal N, Singh SP, Chauhan V, Murray HW. Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: response to 15 daily versus alternate-day infusions. Clin Infect Dis 2007;45:556-561.

146. Manandhar KD, Yadav TP, Prajapati VK, Kumar S, Rai M, Dube A, Srivastava ON, Sundar S. Antileishmanial activity of nano-amphotericin B deoxycholate. J Antimicrob Chemother 2008;62:376-380.

147. Gupta S, Dube A, Vyas SP. Antileishmanial efficacy of amphotericin B bearing emulsomes against experimental visceral leishmaniasis. J Drug Target 2007;15:437-444.

148. Mbongo N, Loiseau PM, Billion MA, Robert-Gero M. Mechanism of amphotericin B resistance in Leishmania donovani promastigotes. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:352-357.

149. Mueller M, Ritmeijer K, Balasegaram M, Koummuki Y, Santana MR, Davidson R. Unresponsiveness to AmBisome in some Sudanese patients with kala-azar. Trans R Soc Trop Med Hyg 2007;101:19-24.

150. Sinha PK, Jha TK, Thakur CP, Nath D, Mukherjee S, Aditya AK, Sundar S. Phase 4 pharmacovigilance trial of paromomycin injection for the treatment of visceral leishmaniasis in India. J Trop Med 2011;2011:645203.

151. Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Sinha PK, Bhattacharya SK. Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India. N Engl J Med 2007;356:2571-2581.

152. Jhingran A, Chawla B, Saxena S, Barrett MP, Madhubala R. Paromomycin: uptake and resistance in Leishmania donovani. Mol Biochem Parasitol 2009;164:111-117.

153. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. Clin Microbiol Rev 2006;19:111-126.

154. Markle WH, Makhoul K. Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. Am Fam Physician 2004;69:1455-1460.

155. Basselin M, Denise H, Coombs GH, Barrett MP. Resistance to pentamidine in Leishmania mexicana involves exclusion of the drug from the mitochondrion. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:3731-3738.

156. Coelho AC, Beverley SM, Cotrim PC. Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in Leishmania major. Mol Biochem Parasitol 2003;130:83-90.

157. Rangel H, Dagger F, Hernandez A, Liendo A, Urbina JA. Naturally azole-resistant Leishmania braziliensis promastigotes are rendered susceptible in the presence of terbinafine: comparative

study with azole-susceptible Leishmania mexicana promastigotes. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:2785-2791.

158. Amato VS, Padilha AR, Nicodemo AC, Duarte MI, Valentini M, Uip DE, Boulos M, Neto VA. Use of itraconazole in the treatment of mucocutaneous leishmaniasis: a pilot study. Int J Infect Dis 2000;4:153-157.

159. Nassiri-Kashani M, Firooz A, Khamesipour A, Mojtahed F, Nilforoushzadeh M, Hejazi H, Bouzari N, Dowlati Y. A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of itraconazole in the treatment of cutaneous leishmaniasis. J Eur Acad Dermatol Venereol 2005;19:80-83.

160. Jha TK, Singh NK, Jha S. Ketoconazole in antimonial unresponsive cases of Kala-azar. J Assoc Physicians India 1995;43:347.

161. Sundar S, Singh VP, Agrawal NK, Gibbs DL, Murray HW. Treatment of kala-azar with oral fluconazole. Lancet 1996;348:614.

162. Baroni A, Aiello FS, Vozza A, Vozza G, Faccenda F, Brasiello M, Ruocco E. Cutaneous leishmaniasis treated with itraconazole. Dermatol Ther 2009;22 Suppl 1:S27-S29.

163. LaFon SW, Nelson DJ, Berens RL, Marr JJ. Inosine analogs. Their metabolism in mouse L cells and in Leishmania donovani. J Biol Chem 1985;260:9660-9665.

164. Avila JL, Casanova MA. Comparative effects of 4-aminopyrazolopyrimidine, its 2'-deoxyriboside derivative, and allopurinol on in vitro growth of American Leishmania species. Antimicrob Agents Chemother 1982;22:380-385.

165. Velez I, Agudelo S, Hendrickx E, Puerta J, Grogl M, Modabber F, Berman J. Inefficacy of allopurinol as monotherapy for Colombian cutaneous leishmaniasis. A randomized, controlled trial. Ann Intern Med 1997;126:232-236.

166. Marsden PD, Cuba CC, Barreto AC. Allopurinol treatment in human Leishmania braziliensis braziliensis infections. Trans R Soc Trop Med Hyg 1984;78:701.

167. Sampaio RN, Marchan EM, Vexenat A, Tristao RJ, Marsden PD. Combined antimonial allopurinol therapy in mucosal leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 1990;85:373-374.

168. Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides L, Polizopoulou Z, Billinis C, Argyriadis D, Diakou N, Papadopoulos O. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. Vet Parasitol 2001;98:247-261.

169. Shapiro TA, Were JB, Danso K, Nelson DJ, Desjardins RE, Pamplin CL, III. Pharmacokinetics and metabolism of allopurinol riboside. Clin Pharmacol Ther 1991;49:506-514.

170. Momeni AZ, Aminjavaheri M. Treatment of recurrent cutaneous Leishmaniasis. Int J Dermatol 1995;34:129-133.

171. Nilforoushzadeh MA, Sadeghian G, Jaffary F, Ziaei H, Shirani-Bidabad L, Mahzoni P. Successful treatment of lupoid cutaneous leishmaniasis with glucantime and topical trichloroacetic acid (a case report). Korean J Parasitol 2008;46:175-177.

172. Harzallah K, Belhadj R, Jemli B, Haloues M, Berraies N, Gargouri S, Hmida J, Battikh R, Manaa J. Visceral leishmaniasis in a renal transplant recipient treated with allopurinol. Saudi J Kidney Dis Transpl 2010;21:105-108.

173. White MR, Chapman WL, Jr., Hanson WL. Chemotherapy of experimental visceral leishmaniasis in the opossum. J Parasitol 1989;75:176-178.

174. Sherwood JA, Gachihi GS, Muigai RK, Skillman DR, Mugo M, Rashid JR, Wasunna KM, Were JB, Kasili SK, Mbugua JM, . Phase 2 efficacy trial of an oral 8-aminoquinoline (WR6026) for treatment of visceral leishmaniasis. Clin Infect Dis 1994;19:1034-1039.

175. Dietze R, Carvalho SF, Valli LC, Berman J, Brewer T, Milhous W, Sanchez J, Schuster B, Grogl M. Phase 2 trial of WR6026, an orally administered 8-aminoquinoline, in the treatment of visceral leishmaniasis caused by Leishmania chagasi. Am J Trop Med Hyg 2001;65:685-689.

176. Berkovic D. Cytotoxic etherphospholipid analogues. Gen Pharmacol 1998;31:511-517.

177. Croft SL, Seifert K, Duchene M. Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. Mol Biochem Parasitol 2003;126:165-172.

178. Junghahn I, Bergmann J, Langen P, Thun I, Vollgraf C, Brachwitz H. Effect of ALP analogs on inositol trisphosphate formation in H184 mammary epithelial cells before and after transfection with v-erb B oncogene. Anticancer Res 1995;15:449-454.

179. Grosman N. Effect of the anti-neoplastic agents edelfosine (ET-18-OCH3), ilmofosine (BM 41.440) and the hexadecylphosphocholine analogues D-20133 and D-21266 on histamine release from isolated rat mast cells. Immunopharmacology 1999;44:211-221.

180. Croft SL, Neal RA, Pendergast W, Chan JH. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against Leishmania donovani. Biochem Pharmacol 1987;36:2633-2636.

181. Ritmeijer K, Dejenie A, Assefa Y, Hundie TB, Mesure J, Boots G, den BM, Davidson RN. A comparison of miltefosine and sodium stibogluconate for treatment of visceral leishmaniasis in an Ethiopian population with high prevalence of HIV infection. Clin Infect Dis 2006;43:357-364.

182. Croft SL, Barrett MP, Urbina JA. Chemotherapy of trypanosomiases and leishmaniasis. Trends Parasitol 2005;21:508-512.

183. Bhattacharya SK, Sinha PK, Sundar S, Thakur CP, Jha TK, Pandey K, Das VR, Kumar N, Lal C, Verma N, Singh VP, Ranjan A, Verma RB, Anders G, Sindermann H, Ganguly NK. Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. J Infect Dis 2007;196:591-598.

184. Herwaldt BL. Miltefosine--the long-awaited therapy for visceral leishmaniasis? N Engl J Med 1999;341:1840-1842.

185. Sindermann H, Engel KR, Fischer C, Bommer W. Oral miltefosine for leishmaniasis in immunocompromised patients: compassionate use in 39 patients with HIV infection. Clin Infect Dis 2004;39:1520-1523.

186. Lux H, Heise N, Klenner T, Hart D, Opperdoes FR. Ether--lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether--lipid analogues in Leishmania. Mol Biochem Parasitol 2000;111:1-14.

187. Lux H, Hart DT, Parker PJ, Klenner T. Ether lipid metabolism, GPI anchor biosynthesis, and signal transduction are putative targets for anti-leishmanial alkyl phospholipid analogues. Adv Exp Med Biol 1996;416:201-211.

188. Perez-Victoria FJ, Sanchez-Canete MP, Seifert K, Croft SL, Sundar S, Castanys S, Gamarro F. Mechanisms of experimental resistance of Leishmania to miltefosine: Implications for clinical use. Drug Resist Updat 2006;9:26-39.

189. Perez-Victoria FJ, Sanchez-Canete MP, Castanys S, Gamarro F. Phospholipid translocation and miltefosine potency require both L. donovani miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in Leishmania parasites. J Biol Chem 2006;281:23766-23775.

190. Saint-Pierre-Chazalet M, Ben BM, Le ML, Bories C, Rakotomanga M, Loiseau PM. Membrane sterol depletion impairs miltefosine action in wild-type and miltefosine-resistant Leishmania donovani promastigotes. J Antimicrob Chemother 2009;64:993-1001.

191. Wadhone P, Maiti M, Agarwal R, Kamat V, Martin S, Saha B. Miltefosine promotes IFN-gamma-dominated anti-leishmanial immune response. J Immunol 2009;182:7146-7154.

192. Paris C, Loiseau PM, Bories C, Breard J. Miltefosine induces apoptosis-like death in Leishmania donovani promastigotes. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:852-859.

193. Verma NK, Dey CS. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of Leishmania donovani. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:3010-3015.

194. Mishra J, Singh S. Miltefosine resistance in Leishmania donovani involves suppression of oxidative stress-induced programmed cell death. Exp Parasitol 2013;135:397-406.

195. Seifert K, Perez-Victoria FJ, Stettler M, Sanchez-Canete MP, Castanys S, Gamarro F, Croft SL. Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of Leishmania donovani and persists in vivo. Int J Antimicrob Agents 2007;30:229-235.

196. Castanys-Munoz E, Perez-Victoria JM, Gamarro F, Castanys S. Characterization of an ABCG-like transporter from the protozoan parasite Leishmania with a role in drug resistance and transbilayer lipid movement. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:3573-3579.

197. Pandey BD, Pandey K, Kaneko O, Yanagi T, Hirayama K. Relapse of visceral leishmaniasis after miltefosine treatment in a Nepalese patient. Am J Trop Med Hyg 2009;80:580-582.

198. Tiuman TS, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Filho BP, Nakamura CV. Recent advances in leishmaniasis treatment. Int J Infect Dis 2011;15:e525-e532.

199. Rocha LG, Almeida JR, Macedo RO, Barbosa-Filho JM. A review of natural products with antileishmanial activity. Phytomedicine 2005;12:514-535.

200. Hancock RE, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. Trends Microbiol 2000;8:402-410.

201. Kulkarni MM, McMaster WR, Kamysz W, McGwire BS. Antimicrobial peptide-induced apoptotic death of leishmania results from calcium-de pend ent, caspase-independent mitochondrial toxicity. J Biol Chem 2009;284:15496-15504.

202. Teixeira V, Feio MJ, Bastos M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. Prog Lipid Res 2012;51:149-177.

203. Kulkarni MM, McMaster WR, Kamysz E, Kamysz W, Engman DM, McGwire BS. The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, Leishmania, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. Mol Microbiol 2006;62:1484-1497.

204. Szekeres A, Leitgeb B, Kredics L, Antal Z, Hatvani L, Manczinger L, Vagvolgyi C. Peptaibols and related peptaibiotics of Trichoderma. A review. Acta Microbiol Immunol Hung 2005;52:137-168.

205. Bruckner H, Graf H. Paracelsin, a peptide antibiotic containing alpha-aminoisobutyric acid, isolated from Trichoderma reesei Simmons. Part A. Experientia 1983;39:528-530.

206. Bruckner H, Graf H, Bokel M. Paracelsin; characterization by NMR spectroscopy and circular dichroism, and hemolytic properties of a peptaibol antibiotic from the cellulolytically active mold Trichoderma reesei. Part B. Experientia 1984;40:1189-1197.

207. Kumar A, Dhuley JN, Naik SR. Evaluation of microbial metabolites for trypanocidal activity: significance of biochemical and biological parameters in the mouse model of trypanosomiasis. Jpn J Med Sci Biol 1991;44:7-16.

208. Nagaraj G, Uma MV, Shivayogi MS, Balaram H. Antimalarial activities of peptide antibiotics isolated from fungi. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:145-149.

209. Bruckner H, Toniolo C. Towards a myriad of peptaibiotics. Chem Biodivers 2013;10:731-733.

210. Sundar S, Singh A. Recent developments and future prospects in the treatment of visceral leishmaniasis. Ther Adv Infect Dis 2016;3:98-109.

211. Sundar S, Chakravarty J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. Expert Opin Pharmacother 2013;14:53-63.

212. Foucquier J, Guedj M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. Pharmacol Res Perspect 2015;3:e00149.

213. Kumar D, Kulshrestha A, Singh R, Salotra P. In vitro susceptibility of field isolates of Leishmania donovani to Miltefosine and amphotericin B: correlation with sodium antimony gluconate susceptibility and implications for treatment in areas of endemicity. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:835-838.

214. da Luz RI, Vermeersch M, Dujardin JC, Cos P, Maes L. In vitro sensitivity testing of Leishmania clinical field isolates: preconditioning of promastigotes enhances infectivity for macrophage host cells. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:5197-5203.

215. Chakravarty J, Sundar S. Drug resistance in leishmaniasis. J Glob Infect Dis 2010;2:167-176.

216. Seifert K, Perez-Victoria FJ, Stettler M, Sanchez-Canete MP, Castanys S, Gamarro F, Croft SL. Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of Leishmania donovani and persists in vivo. Int J Antimicrob Agents 2007;30:229-235.

217. Cojean S, Houze S, Haouchine D, Huteau F, Lariven S, Hubert V, Michard F, Bories C, Pratlong F, Le BJ, Loiseau PM, Matheron S. Leishmania resistance to miltefosine associated with genetic marker. Emerg Infect Dis 2012;18:704-706.

218. Bulle B, Millon L, Bart JM, Gallego M, Gambarelli F, Portus M, Schnur L, Jaffe CL, Fernandez-Barredo S, Alunda JM, Piarroux R. Practical approach for typing strains of Leishmania infantum by microsatellite analysis. J Clin Microbiol 2002;40:3391-3397.

219. Buckner FS, Wilson AJ. Colorimetric assay for screening compounds against Leishmania amastigotes grown in macrophages. Am J Trop Med Hyg 2005;72:600-605.

220. Sereno D, Cordeiro da SA, Mathieu-Daude F, Ouaissi A. Advances and perspectives in Leishmania cell based drug-screening procedures. Parasitol Int 2007;56:3-7.

221. Vermeersch M, da Luz RI, Tote K, Timmermans JP, Cos P, Maes L. In vitro susceptibilities of Leishmania donovani promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:3855-3859.

222. Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. Nat Rev Immunol 2013;13:722-737.

223. Munafo DB, Colombo MI. A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. J Cell Sci 2001;114:3619-3629.

224. Beal J, Haddock-Angelli T, Baldwin G, Gershater M, Dwijayanti A, Storch M, de MK, Lizarazo M, Rettberg R. Quantification of bacterial fluorescence using independent calibrants. PLoS One 2018;13:e0199432.

225. Eskelinen EL, Schmidt CK, Neu S, Willenborg M, Fuertes G, Salvador N, Tanaka Y, Lullmann-Rauch R, Hartmann D, Heeren J, von FK, Knecht E, Saftig P. Disturbed cholesterol traffic but normal proteolytic function in LAMP-1/LAMP-2 double-deficient fibroblasts. Mol Biol Cell 2004;15:3132-3145.

226. Seglen PO, Gordon PB. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 1982;79:1889-1892.

227. Wu YT, Tan HL, Shui G, Bauvy C, Huang Q, Wenk MR, Ong CN, Codogno P, Shen HM. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. J Biol Chem 2010;285:10850-10861.

228. Srivastav S, Basu BW, Gupta P, Giri J, Ukil A, Das PK. Leishmania donovani prevents oxidative burst-mediated apoptosis of host macrophages through selective induction of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins. J Biol Chem 2014;289:1092-1105.

229. Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RM, Moncada S. Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. J Immunol 1990;144:4794-4797.

230. Saugar JM, Delgado J, Hornillos V, Luque-Ortega JR, Amat-Guerri F, Acuna AU, Rivas L. Synthesis and biological evaluation of fluorescent leishmanicidal analogues of hexadecylphosphocholine (miltefosine) as probes of antiparasite mechanisms. J Med Chem 2007;50:5994-6003.

231. Palatnik-de-Sousa CB, dos Santos WR, Franca-Silva JC, da Costa RT, Reis AB, Palatnik M, Mayrink W, Genaro O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. Am J Trop Med Hyg 2001;65:510-517.

232. Manna L, Reale S, Vitale F, Picillo E, Pavone LM, Gravino AE. Real-time PCR assay in Leishmania-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. Vet J 2008;177:279-282.

233. Proverbio D, Spada E, de Giorgi GB, Perego AR. Proteinuria reduction after treatment with miltefosine and allopurinol in dogs naturally infected with leishmaniasis. Vet World 2016;9:904-908.

234. Andrade HM, Toledo VP, Pinheiro MB, Guimaraes TM, Oliveira NC, Castro JA, Silva RN, Amorim AC, Brandao RM, Yoko M, Silva AS, Dumont K, Ribeiro ML, Jr., Bartchewsky W, Monte SJ. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with L. infantum (=L. chagasi) in Brazil. Vet Parasitol 2011;181:83-90.

235. Manna L, Gravino AE, Picillo E, Decaro N, Buonavoglia C. Leishmania DNA quantification by real-time PCR in naturally infected dogs treated with miltefosine. Ann N Y Acad Sci 2008;1149:358-360.

236. Boheim G. Statistical analysis of alamethicin channels in black lipid membranes. J Membr Biol 1974;19:277-303.

237. Balaram P, Bothner-By AA, Dadok J. Negative nuclear Overhauser effects as probes of macromolecular structure. J Am Chem Soc 1972;94:4015-4017.

238. Peltola J, Ritieni A, Mikkola R, Grigoriev PA, Pocsfalvi G, Andersson MA, Salkinoja-Salonen MS. Biological effects of Trichoderma harzianum peptaibols on mammalian cells. Appl Environ Microbiol 2004;70:4996-5004.

239. Shi M, Wang HN, Xie ST, Luo Y, Sun CY, Chen XL, Zhang YZ. Antimicrobial peptaibols, novel suppressors of tumor cells, targeted calcium-mediated apoptosis and autophagy in human hepatocellular carcinoma cells. Mol Cancer 2010;9:26.

240. Reed PW, Lardy HA. Uncoupling and specific inhibition of phosphoryl transfer reactions in mitochondria by antibiotic A20668. J Biol Chem 1975;250:3704-3708.

241. Tallarida RJ. Quantitative methods for assessing drug synergism. Genes Cancer 2011;2:1003-1008.

242. Nirujogi RS, Pawar H, Renuse S, Kumar P, Chavan S, Sathe G, Sharma J, Khobragade S, Pande J, Modak B, Prasad TS, Harsha HC, Patole MS, Pandey A. Moving from unsequenced to sequenced genome: reanalysis of the proteome of Leishmania donovani. J Proteomics 2014;97:48-61.

243. Rakotomanga M, Saint-Pierre-Chazalet M, Loiseau PM. Alteration of fatty acid and sterol metabolism in miltefosine-resistant Leishmania donovani promastigotes and consequences for drug-membrane interactions. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:2677-2686.

244. Karamysheva ZN, Moitra S, Perez A, Mukherjee S, Tikhonova EB, Karamyshev AL, Zhang K. Unexpected Role of Sterol Synthesis in RNA Stability and Translation in Leishmania. Biomedicines 2021;9.

245. Rocha LG, Almeida JR, Macedo RO, Barbosa-Filho JM. A review of natural products with antileishmanial activity. Phytomedicine 2005;12:514-535.

246. Germonprez N, Maes L, Van PL, Van TM, Tuan DA, De KN. In vitro and in vivo anti-leishmanial activity of triterpenoid saponins isolated from Maesa balansae and some chemical derivatives. J Med Chem 2005;48:32-37.

247. Chen M, Christensen SB, Blom J, Lemmich E, Nadelmann L, Fich K, Theander TG, Kharazmi A. Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of Leishmania. Antimicrob Agents Chemother 1993;37:2550-2556.

248. Narender T, Khaliq T, Shweta, Nishi, Goyal N, Gupta S. Synthesis of chromenochalcones and evaluation of their in vitro antileishmanial activity. Bioorg Med Chem 2005;13:6543-6550.

249. Kayser O, Kiderlen AF, Bertels S, Siems K. Antileishmanial activities of aphidicolin and its semisynthetic derivatives. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:288-292.

250. Gajate C, Mollinedo F. Biological activities, mechanisms of action and biomedical prospect of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH(3) (edelfosine), a proapoptotic agent in tumor cells. Curr Drug Metab 2002;3:491-525.

251. Tsushima S, Yoshioka Y, Tanida S, Nomura H, Nojima S, Hozumi M. Syntheses and antimicrobial activities of alkyl lysophospholipids. Chem Pharm Bull (Tokyo) 1982;30:3260-3270.

252. Achterberg V, Gercken G. Cytotoxicity of ester and ether lysophospholipids on Leishmania donovani promastigotes. Mol Biochem Parasitol 1987;23:117-122.

253. Berdel WE. Membrane-interactive lipids as experimental anticancer drugs. Br J Cancer 1991;64:208-211.

254. Berdel WE, Bausert WR, Fink U, Rastetter J, Munder PG. Anti-tumor action of alkyl-lysophospholipids (Review). Anticancer Res 1981;1:345-352.

255. Konstantinov SM, Eibl H, Berger MR. Alkylphosphocholines induce apoptosis in HL-60 and U-937 leukemic cells. Cancer Chemother Pharmacol 1998;41:210-216.

256. Konstantinov SM, Topashka-Ancheva M, Benner A, Berger MR. Alkylphosphocholines: Effects on human leukemic cell lines and normal bone marrow cells. Int J Cancer 1998;77:778-786.

257. Kotting J, Marschner NW, Neumuller W, Unger C, Eibl H. Hexadecylphosphocholine and octadecyl-methyl-glycero-3-phosphocholine: a comparison of hemolytic activity, serum binding and tissue distribution. Prog Exp Tumor Res 1992;34:131-142.

258. Papazafiri P, Avlonitis N, Angelou P, Calogeropoulou T, Koufaki M, Scoulica E, Fragiadaki I. Structure-activity relationships of antineoplastic ring-substituted ether phospholipid derivatives. Cancer Chemother Pharmacol 2005;56:261-270.

259. Seifert K, Escobar P, Croft SL. In vitro activity of anti-leishmanial drugs against Leishmania donovani is host cell dependent. J Antimicrob Chemother 2010;65:508-511.

260. De MG, Ang KK, Chen S, Arkin MR, Engel JC, McKerrow JH. A screen against Leishmania intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. PLoS Negl Trop Dis 2011;5:e1253.

261. Hochhuth CH, Vehmeyer K, Eibl H, Unger C. Hexadecylphosphocholine induces interferon-gamma secretion and expression of GM-CSF mRNA in human mononuclear cells. Cell Immunol 1992;141:161-168.

262. Zeisig R, Rudolf M, Eue I, Arndt D. Influence of hexadecylphosphocholine on the release of tumor necrosis factor and nitroxide from peritoneal macrophages in vitro. J Cancer Res Clin Oncol 1995;121:69-75.

263. Eue I. Hexadecylphosphocholine selectively upregulates expression of intracellular adhesion molecule-1 and class I major histocompatibility complex antigen in human monocytes. J Exp Ther Oncol 2002;2:333-336.

264. Das M, Mukherjee SB, Shaha C. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in Leishmania donovani promastigotes. J Cell Sci 2001;114:2461-2469.

265. Marinho FA, Goncalves KC, Oliveira SS, Oliveira AC, Bellio M, d'Avila-Levy CM, Santos AL, Branquinha MH. Miltefosine induces programmed cell death in Leishmania amazonensis promastigotes. Mem Inst Oswaldo Cruz 2011;106:507-509.

266. Khademvatan S, Gharavi MJ, Saki J. Miltefosine induces metacaspase and PARP genes expression in Leishmania infantum. Braz J Infect Dis 2011;15:442-448.

267. Santa-Rita RM, Henriques-Pons A, Barbosa HS, de Castro SL. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against Leishmania amazonensis. J Antimicrob Chemother 2004;54:704-710.

268. Luque-Ortega JR, Rivas L. Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in Leishmania donovani promastigotes. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:1327-1332.

269. Rakotomanga M, Blanc S, Gaudin K, Chaminade P, Loiseau PM. Miltefosine affects lipid metabolism in Leishmania donovani promastigotes. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:1425-1430.

270. Moreira RA, Mendanha SA, Fernandes KS, Matos GG, Alonso L, Dorta ML, Alonso A. Miltefosine increases lipid and protein dynamics in Leishmania amazonensis membranes at concentrations similar to those needed for cytotoxicity activity. Antimicrob Agents Chemother 2014;58:3021-3028.

271. Mizushima N. Methods for monitoring autophagy. Int J Biochem Cell Biol 2004;36:2491-2502.

272. Gonzalez-Polo RA, Boya P, Pauleau AL, Jalil A, Larochette N, Souquere S, Eskelinen EL, Pierron G, Saftig P, Kroemer G. The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. J Cell Sci 2005;118:3091-3102.

273. Deretic V, Levine B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. Cell Host Microbe 2009;5:527-549.

274. Bera A, Singh S, Nagaraj R, Vaidya T. Induction of autophagic cell death in Leishmania donovani by antimicrobial peptides. Mol Biochem Parasitol 2003;127:23-35.

275. Schurigt U, Schad C, Glowa C, Baum U, Thomale K, Schnitzer JK, Schultheis M, Schaschke N, Schirmeister T, Moll H. Aziridine-2,3-dicarboxylate-based cysteine cathepsin inhibitors induce cell death in Leishmania major associated with accumulation of debris in autophagy-related lysosome-like vacuoles. Antimicrob Agents Chemother 2010;54:5028-5041.

276. Pinheiro RO, Nunes MP, Pinheiro CS, D'Avila H, Bozza PT, Takiya CM, Corte-Real S, Freire-de-Lima CG, DosReis GA. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of Leishmania amazonensis in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. Microbes Infect 2009;11:181-190.

277. Cyrino LT, Araujo AP, Joazeiro PP, Vicente CP, Giorgio S. In vivo and in vitro Leishmania amazonensis infection induces autophagy in macrophages. Tissue Cell 2012;44:401-408.

278. Blommaart EF, Krause U, Schellens JP, Vreeling-Sindelarova H, Meijer AJ. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. Eur J Biochem 1997;243:240-246.

279. Guo B, Tam A, Santi SA, Parissenti AM. Role of autophagy and lysosomal drug sequestration in acquired resistance to doxorubicin in MCF-7 cells. BMC Cancer 2016;16:762.

280. Mitou G, Budak H, Gozuacik D. Techniques to study autophagy in plants. Int J Plant Genomics 2009;2009:451357.

281. Naderer T, McConville MJ. The Leishmania-macrophage interaction: a metabolic perspective. Cell Microbiol 2008;10:301-308.

282. Sengupta S, Chowdhury S, Bosedasgupta S, Wright CW, Majumder HK. Cryptolepine-Induced Cell Death of Leishmania donovani Promastigotes Is Augmented by Inhibition of Autophagy. Mol Biol Int 2011;2011:187850.

283. Frank B, Marcu A, de Oliveira Almeida Petersen AL, Weber H, Stigloher C, Mottram JC, Scholz CJ, Schurigt U. Autophagic digestion of Leishmania major by host macrophages is associated with differential expression of BNIP3, CTSE, and the miRNAs miR-101c, miR-129, and miR-210. Parasit Vectors 2015;8:404.

284. Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. Cell 1994;76:777-779.

285. Fiorentini C, Falzano L, Travaglione S, Fabbri A. Hijacking Rho GTPases by protein toxins and apoptosis: molecular strategies of pathogenic bacteria. Cell Death Differ 2003;10:147-152.

286. Campanella M, de Jong AS, Lanke KW, Melchers WJ, Willems PH, Pinton P, Rizzuto R, van Kuppeveld FJ. The coxsackievirus 2B protein suppresses apoptotic host cell responses by manipulating intracellular Ca2+ homeostasis. J Biol Chem 2004;279:18440-18450.

287. Gao LY, Kwaik YA. The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. Trends Microbiol 2000;8:306-313.

288. Sinai AP, Payne TM, Carmen JC, Hardi L, Watson SJ, Molestina RE. Mechanisms underlying the manipulation of host apoptotic pathways by Toxoplasma gondii. Int J Parasitol 2004;34:381-391.

289. Schaumburg F, Hippe D, Vutova P, Luder CG. Pro- and anti-apoptotic activities of protozoan parasites. Parasitology 2006;132 Suppl:S69-S85.

290. Moore KJ, Matlashewski G. Intracellular infection by Leishmania donovani inhibits macrophage apoptosis. J Immunol 1994;152:2930-2937.

291. Ruhland A, Leal N, Kima PE. Leishmania promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis. Cell Microbiol 2007;9:84-96.

292. Akarid K, Arnoult D, Micic-Polianski J, Sif J, Estaquier J, Ameisen JC. Leishmania major-mediated prevention of programmed cell death induction in infected macrophages is associated with the repression of mitochondrial release of cytochrome c. J Leukoc Biol 2004;76:95-103.

293. Lisi S, Sisto M, Acquafredda A, Spinelli R, Schiavone M, Mitolo V, Brandonisio O, Panaro M. Infection with Leishmania infantum Inhibits actinomycin D-induced apoptosis of human monocytic cell line U-937. J Eukaryot Microbiol 2005;52:211-217.

294. Donovan MJ, Maciuba BZ, Mahan CE, McDowell MA. Leishmania infection inhibits cycloheximide-induced macrophage apoptosis in a strain-dependent manner. Exp Parasitol 2009;123:58-64.

295. Rai R, Dyer P, Richardson S, Harbige L, Getti G. Apoptotic induction induces Leishmania aethiopica and L. mexicana spreading in terminally differentiated THP-1 cells. Parasitology 2017;144:1912-1921.

296. Getti GT, Cheke RA, Humber DP. Induction of apoptosis in host cells: a survival mechanism for Leishmania parasites? Parasitology 2008;135:1391-1399.

297. Real F, Florentino PT, Reis LC, Ramos-Sanchez EM, Veras PS, Goto H, Mortara RA. Cell-to-cell transfer of Leishmania amazonensis amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. Cell Microbiol 2014;16:1549-1564.

298. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. J Immunol Methods 1995;184:39-51.

299. Bossy-Wetzel E, Green DR. Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier. Mutat Res 1999;434:243-251.

300. Debrabant A, Lee N, Bertholet S, Duncan R, Nakhasi HL. Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. Int J Parasitol 2003;33:257-267.

301. Arnoult D, Akarid K, Grodet A, Petit PX, Estaquier J, Ameisen JC. On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote Leishmania major involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. Cell Death Differ 2002;9:65-81.

302. Zangger H, Mottram JC, Fasel N. Cell death in Leishmania induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? Cell Death Differ 2002;9:1126-1139.

303. Xiao B, Deng X, Zhou W, Tan EK. Flow Cytometry-Based Assessment of Mitophagy Using MitoTracker. Front Cell Neurosci 2016;10:76.

304. Godinho JL, Georgikopoulou K, Calogeropoulou T, de SW, Rodrigues JC. A novel alkyl phosphocholine-dinitroaniline hybrid molecule exhibits biological activity in vitro against Leishmania amazonensis. Exp Parasitol 2013;135:153-165.

305. de SW, Attias M, Rodrigues JC. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). Int J Biochem Cell Biol 2009;41:2069-2080.

306. Rodrigues JC, de SW. Ultrastructural alterations in organelles of parasitic protozoa induced by different classes of metabolic inhibitors. Curr Pharm Des 2008;14:925-938.

307. Roy A, Ganguly A, BoseDasgupta S, Das BB, Pal C, Jaisankar P, Majumder HK. Mitochondria-dependent reactive oxygen species-mediated programmed cell death induced by 3,3'-

diindolylmethane through inhibition of F0F1-ATP synthase in unicellular protozoan parasite Leishmania donovani. Mol Pharmacol 2008;74:1292-1307.

308. Sen N, Das BB, Ganguly A, Mukherjee T, Bandyopadhyay S, Majumder HK. Camptothecin-induced imbalance in intracellular cation homeostasis regulates programmed cell death in unicellular hemoflagellate Leishmania donovani. J Biol Chem 2004;279:52366-52375.

309. Lapidot T, Walker MD, Kanner J. Antioxidant and prooxidant effects of phenolics on pancreatic beta-cells in vitro. J Agric Food Chem 2002;50:7220-7225.

310. De MU, Biasutto L, Garbisa S, Toninello A, Zoratti M. Quercetin can act either as an inhibitor or an inducer of the mitochondrial permeability transition pore: A demonstration of the ambivalent redox character of polyphenols. Biochim Biophys Acta 2009;1787:1425-1432.

311. Castro-Pinto DB, Lima EL, Cunha AS, Genestra M, De Leo RM, Monteiro F, Leon LL. Leishmania amazonensis trypanothione reductase: evaluation of the effect of glutathione analogs on parasite growth, infectivity and enzyme activity. J Enzyme Inhib Med Chem 2007;22:71-75.

312. Zilberstein D, Dwyer DM. Identification of a surface membrane proton-translocating ATPase in promastigotes of the parasitic protozoan Leishmania donovani. Biochem J 1988;256:13-21.

313. Alzate JF, Arias AA, Moreno-Mateos D, Alvarez-Barrientos A, Jimenez-Ruiz A. Mitochondrial superoxide mediates heat-induced apoptotic-like death in Leishmania infantum. Mol Biochem Parasitol 2007;152:192-202.

314. Getachew F, Gedamu L. Leishmania donovani mitochondrial iron superoxide dismutase A is released into the cytosol during miltefosine induced programmed cell death. Mol Biochem Parasitol 2012;183:42-51.

315. Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, Treberg JR, Brand MD. Mitochondrial proton and electron leaks. Essays Biochem 2010;47:53-67.

316. Gantt KR, Goldman TL, McCormick ML, Miller MA, Jeronimo SM, Nascimento ET, Britigan BE, Wilson ME. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of Leishmania chagasi. J Immunol 2001;167:893-901.

317. Carneiro PP, Conceicao J, Macedo M, Magalhaes V, Carvalho EM, Bacellar O. The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of Leishmania braziliensis by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. PLoS One 2016;11:e0148084.

318. Khouri R, Bafica A, Silva MP, Noronha A, Kolb JP, Wietzerbin J, Barral A, Barral-Netto M, Van WJ. IFN-beta impairs superoxide-dependent parasite killing in human macrophages: evidence for a deleterious role of SOD1 in cutaneous leishmaniasis. J Immunol 2009;182:2525-2531.

319. Van AT, Deschacht M, da Luz RA, Maes L, Cos P. Leishmania-macrophage interactions: insights into the redox biology. Free Radic Biol Med 2011;51:337-351.

320. Almeida TF, Palma LC, Mendez LC, Noronha-Dutra AA, Veras PS. Leishmania amazonensis fails to induce the release of reactive oxygen intermediates by CBA macrophages. Parasite Immunol 2012;34:492-498.

321. Fonseca-Silva F, Inacio JD, Canto-Cavalheiro MM, Almeida-Amaral EE. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in Leishmania amazonensis. PLoS One 2011;6:e14666.

322. Giepmans BN, Adams SR, Ellisman MH, Tsien RY. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. Science 2006;312:217-224.

323. McGrath JC, Daly CJ. Do fluorescent drugs show you more than you wanted to know? Br J Pharmacol 2003;139:187-189.

324. Hornillos V, Carrillo E, Rivas L, Amat-Guerri F, Acuna AU. Synthesis of BODIPY-labeled alkylphosphocholines with leishmanicidal activity, as fluorescent analogues of miltefosine. Bioorg Med Chem Lett 2008;18:6336-6339.

325. de la Torre BG, Hornillos V, Luque-Ortega JR, Abengozar MA, Amat-Guerri F, Acuna AU, Rivas L, Andreu D. A BODIPY-embedding miltefosine analog linked to cell-penetrating Tat(48-60) peptide favors intracellular delivery and visualization of the antiparasitic drug. Amino Acids 2014;46:1047-1058.

326. Keith CT, Borisy AA, Stockwell BR. Multicomponent therapeutics for networked systems. Nat Rev Drug Discov 2005;4:71-78.

327. Pangalos MN, Schechter LE, Hurko O. Drug development for CNS disorders: strategies for balancing risk and reducing attrition. Nat Rev Drug Discov 2007;6:521-532.

328. Herrick TM, Million RP. Tapping the potential of fixed-dose combinations. Nat Rev Drug Discov 2007;6:513-514.

329. Kirschbaum J, Krause C, Winzheimer RK, Bruckner H. Sequences of alamethicins F30 and F50 reconsidered and reconciled. J Pept Sci 2003;9:799-809.

330. Chugh JK, Wallace BA. Peptaibols: models for ion channels. Biochem Soc Trans 2001;29:565-570.

331. Salnikov ES, De ZM, Formaggio F, Li X, Toniolo C, O'Neil JD, Raap J, Dzuba SA, Bechinger B. Alamethicin topology in phospholipid membranes by oriented solid-state NMR and EPR spectroscopies: a comparison. J Phys Chem B 2009;113:3034-3042.

332. Snook CF, Woolley GA, Oliva G, Pattabhi V, Wood SF, Blundell TL, Wallace BA. The structure and function of antiamoebin I, a proline-rich membrane-active polypeptide. Structure 1998;6:783-792.

333. Duclohier H. Helical kink and channel behaviour: a comparative study with the peptaibols alamethicin, trichotoxin and antiamoebin. Eur Biophys J 2004;33:169-174.

334. Qian S, Wang W, Yang L, Huang HW. Structure of the alamethicin pore reconstructed by x-ray diffraction analysis. Biophys J 2008;94:3512-3522.

335. Hansson MJ, Mansson R, Morota S, Uchino H, Kallur T, Sumi T, Ishii N, Shimazu M, Keep MF, Jegorov A, Elmer E. Calcium-induced generation of reactive oxygen species in brain mitochondria is mediated by permeability transition. Free Radic Biol Med 2008;45:284-294.

336. Jeyaraju DV, Cisbani G, Pellegrini L. Calcium regulation of mitochondria motility and morphology. Biochim Biophys Acta 2009;1787:1363-1373.

337. Wilson MA, Wei C, Bjelkmar P, Wallace BA, Pohorille A. Molecular dynamics simulation of the antiamoebin ion channel: linking structure and conductance. Biophys J 2011;100:2394-2402.

338. Vincent IM, Weidt S, Rivas L, Burgess K, Smith TK, Ouellette M. Untargeted metabolomic analysis of miltefosine action in Leishmania infantum reveals changes to the internal lipid metabolism. Int J Parasitol Drugs Drug Resist 2014;4:20-27.

339. Ding WX, Li M, Biazik JM, Morgan DG, Guo F, Ni HM, Goheen M, Eskelinen EL, Yin XM. Electron microscopic analysis of a spherical mitochondrial structure. J Biol Chem 2012;287:42373-42378.

340. Britta EA, Silva AP, Ueda-Nakamura T, Dias-Filho BP, Silva CC, Sernaglia RL, Nakamura CV. Benzaldehyde thiosemicarbazone derived from limonene complexed with copper induced mitochondrial dysfunction in Leishmania amazonensis. PLoS One 2012;7:e41440.

341. Ding WX, Eskelinen EL. Do mitochondria donate membrane to form autophagosomes or undergo remodeling to form mitochondrial spheroids? Cell Biosci 2014;4:65.

342. Williams JA, Ding WX. Mitophagy, mitochondrial spheroids, and mitochondrial-derived vesicles in alcohol-induced liver injury. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2015;309:G515.

343. Solano-Gallego L, Cardoso L, Pennisi MG, Petersen C, Bourdeau P, Oliva G, Miro G, Ferrer L, Baneth G. Diagnostic Challenges in the Era of Canine Leishmania infantum Vaccines. Trends Parasitol 2017;33:706-717.

344. Woerly V, Maynard L, Sanquer A, Eun HM. Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. Parasitol Res 2009;105:463-469.

345. Goncalves G, Campos MP, Goncalves AS, Medeiros LCS, Figueiredo FB. Increased Leishmania infantum resistance to miltefosine and amphotericin B after treatment of a dog with miltefosine and allopurinol. Parasit Vectors 2021;14:599.

346. Seifert K, Matu S, Javier Perez-Victoria F, Castanys S, Gamarro F, Croft SL. Characterisation of Leishmania donovani promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). Int J Antimicrob Agents 2003;22:380-387.

347. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den BM. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One 2012;7:e35671.

348. Graves PR, Haystead TA. Molecular biologist's guide to proteomics. Microbiol Mol Biol Rev 2002;66:39-63.

349. Veras PS, Bezerra de Menezes JP. Using Proteomics to Understand How Leishmania Parasites Survive inside the Host and Establish Infection. Int J Mol Sci 2016;17.

350. Brooks DR, Denise H, Westrop GD, Coombs GH, Mottram JC. The stage-regulated expression of Leishmania mexicana CPB cysteine proteases is mediated by an intercistronic sequence element. J Biol Chem 2001;276:47061-47069.

351. Clayton C, Shapira M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. Mol Biochem Parasitol 2007;156:93-101.

352. El FY, Ouellette M, Papadopoulou B. A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in Leishmania infantum. Proteomics 2002;2:1007-1017.

353. Costa MM, Andrade HM, Bartholomeu DC, Freitas LM, Pires SF, Chapeaurouge AD, Perales J, Ferreira AT, Giusta MS, Melo MN, Gazzinelli RT. Analysis of Leishmania chagasi by 2-D difference gel electrophoresis (2-D DIGE) and immunoproteomic: identification of novel candidate antigens for diagnostic tests and vaccine. J Proteome Res 2011;10:2172-2184.