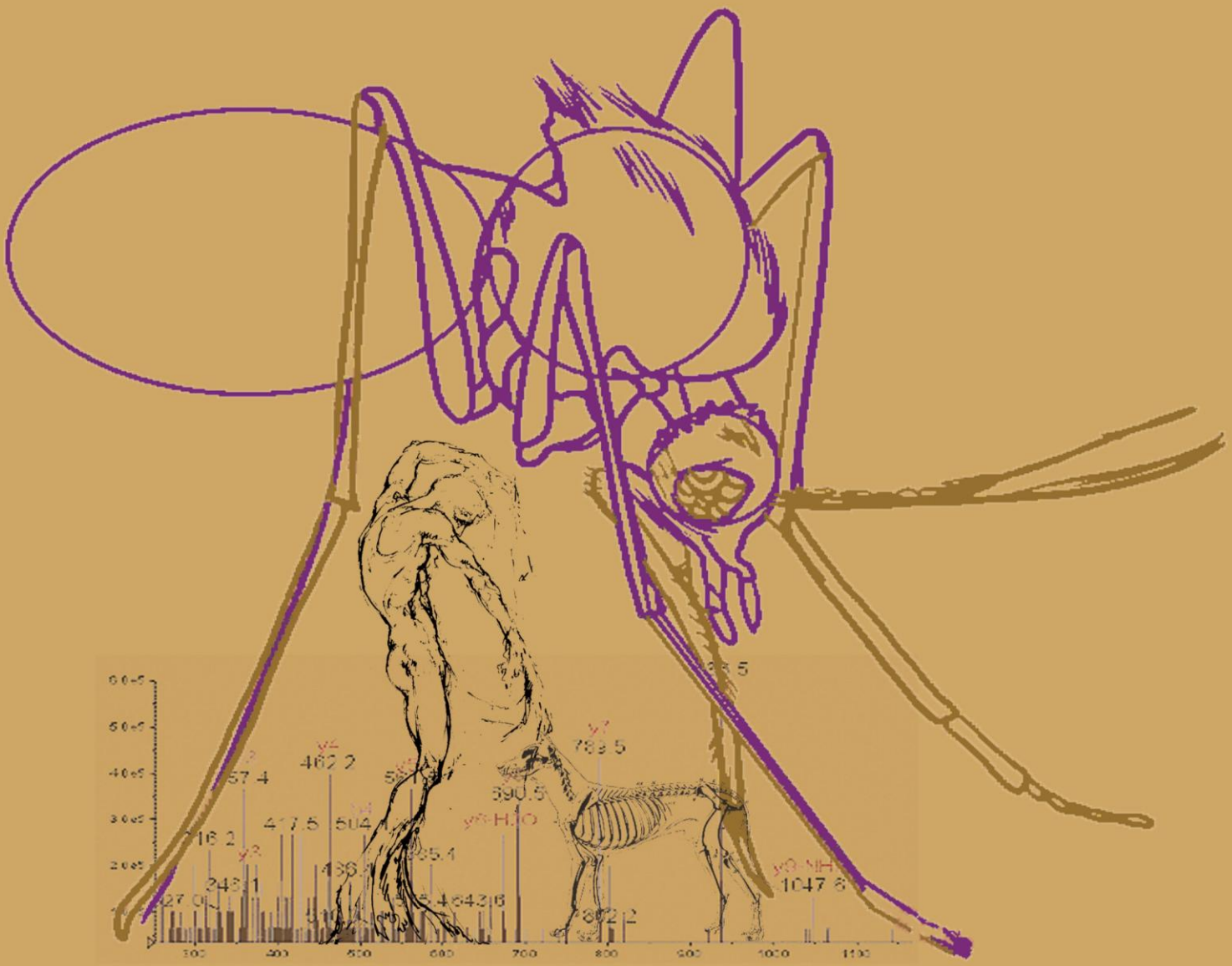
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



"Μελέτη του φαινομένου της αντοχής του Πρωτόζωου παράσιτου *Leishmania* στα φάρμακα, με τη σύγκριση δομικών και βιολογικών χαρακτηριστικών ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών"

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ ΜΕΣΣΑΡΙΤΑΚΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2010

«Μελέτη του φαινομένου της αντοχής του Πρωτόζωου παράσιτου *Leishmania* στα φάρμακα με τη σύγκριση δομικών και βιολογικών χαρακτηριστικών, ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών»

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο

Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τμήμα Ιατρικής

Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής

WHO Collaborating Center
for Research and Training in
Mediterranean Zoonoses
Διευθυντής Ι. Τσελέντης

Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Παρασιτώσεων,
Ζωονόσων και Τροπικών Νόσων.

Και υποστηρίχτηκε οικονομικά

Από το Πρόγραμμα Νο: 1251, του Ειδικού Λογαριασμού Κονδυλίων και Έρευνας (ΕΛΚΕ), του Πανεπιστημίου Κρήτης
και
από το Βαρδινογιάννειο Ίδρυμα

Στους γονείς και τα αδέρφια μου,

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Μαρία Αντωνίου, Επίκουρη Καθηγήτρια Παρασιτολογίας

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

Μαρία Αντωνίου, Επίκουρη Καθηγήτρια Παρασιτολογίας

Δόμνα Καραγωγέως, Καθηγήτρια Νευροεπιστημών

Γεώργιος Τσιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας

Λοιπά Μέλη Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

Βασίλειος Γεωργούλιας, Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας

Γεώργιος Σαμώνης, Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας

Σπυρίδων Περγαντής, Επίκουρος Καθηγητής Αναλυτικής Χημείας

Διαμαντής Κοφτερίδης, Λέκτορας Γενικής Παθολογίας

Ευχαριστίες

Θερμά ευχαριστώ την επιβλέπουσα, κα Μαρία Αντωνίου, Επίκουρο Καθηγήτρια Παρασιτολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης για την συνεχή υποστήριξη και καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας μελέτης αλλά και όχι μόνο. Πολλές ευχαριστίες οφείλω και στον Καθηγητή κ. Ιωάννη Τσελέντη για την υποστήριξη και τις συμβουλές του, αλλά και στα υπόλοιπα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, κα. Δόμνα Καραγωγέως, Καθηγήτρια Νευροεπιστημών και κ. Γεώργιο Τσιώτη, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας, για τη βοήθεια που μου προσέφεραν ώστε να πραγματοποιηθεί αυτό το έργο.

Ευχαριστώ πολύ τους συνεργάτες του Εργαστηρίου Παρασιτολογίας, κο Απόστολο Μαζέρη για την συλλογή των δειγμάτων από την Κύπρο, την κα Βασιλική Χριστοδούλου και την κα Ελένη Σβυρινάκη για τη συμβολή τους στις προκαταρκτικές μελέτες καθώς και την κα Ελένη Κουταλά για τη βοήθειά της στη χρήση του κυτταρομετρητή ροής. Πολλές ευχαριστίες και στον κ. Χρήστο Κουρουνιώτη για την βοήθειά του στην ανάλυση των αποτελεσμάτων αντοχής του παράσιτου *Leishmania* στα φάρμακα, την κα Κλειώ Μαμαλάκη για την ευγενική παραχώρηση της χρωστικής CFSE, τον κο Francisco Gamarro (Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra", CSIC, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Armilla, Granada, Spain) για την ευγενική παραχώρηση του Πολυκλωνικού αντισώματος και τέλος την κα Τόνια Βλάχου, από το Ίδρυμα Ιατρικών και Βιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, για την φιλοξενία που μου προσέφεραν στο εργαστήριο

Βιοτεχνολογίας αλλά και για την βοήθεια και τις συμβουλές της, προκειμένου να πραγματοποιηθεί την πρωτεωμική ανάλυση των δειγμάτων.

Θερμές ευχαριστίες στο Χρήστο Μηνόπουλο για τη συμβολή του στην επιμέλεια του εξώφυλλου.

Τέλος, τιμώ τους γονείς μου Λουκά και Μαρία και τα αδέρφια μου Ευαγγελία και Μάνο που ήταν πάντα δίπλα μου, καθώς και όσους πίστεψαν σε μένα, φίλους και μη.

«Κάθε άνθρωπος μπορεί να υιοθετήσει 2 στάσεις: να χτίζει ή να φυτεύει. Οι χτίστες μπορεί να χρειαστούν χρόνια για το έργο τους, κάποτε όμως τελειώνουν αυτό που χτίζουν. Τότε σταματούν και περιορίζονται στους ίδιους τους τοίχους τους. Όταν ολοκληρώνεται το χτίσιμο, η ζωή χάνει το νόημά της. Υπάρχουν όμως κι εκείνοι που φυτεύουν. Μερικές φορές οι καταιγίδες και οι εποχές τούς προκαλούν προβλήματα και σπάνια ξεκουράζονται. Σε αντίθεση με τα κτίρια όμως, ένας κήπος δεν σταματά ποτέ να αναπτύσσεται. Και, παρόλο που απαιτεί την προσοχή του κηπουρού, του δίνει παράλληλα και τη δυνατότητα να ζήσει τη ζωή του σαν μια μεγάλη περιπέτεια.
Οι κηπουροί αναγνωρίζουν ο ένας τον άλλον, γιατί ξέρουν ότι στην ιστορία του κάθε φυτού βρίσκεται η δημιουργία όλης της Γης»

Αγνώστου συγγραφέα

Περίληψη

Η *Leishmania* είναι ένα Πρωτόζωο παράσιτο που αποτελεί το αίτιο μιας ομάδας ασθενειών, των λεϊσμανιάσεων (Ross, 1903). Μεταδίδονται μέσω του ασπόνδυλου αιματοφάγου ενδιάμεσου ξενιστή, της σκνίπας και είναι ανθρωπονόσοι ή ζωονόσοι (Killick-Kendrick, 1999). Οι λεϊσμανιάσεις αποτελούν ένα σημαντικό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία καθώς ο αριθμός των κρουσμάτων συνεχώς αυξάνεται. Η οικονομική ανάπτυξη, οι κλιματολογικές και περιβαλλοντικές αλλαγές που ευνοούν την μετακίνηση των εντόμων - φορέων σε χώρες που μέχρι πρόσφατα δεν υπήρχαν, η αυξημένη μετανάστευση από ενδημικές χώρες αλλά και ο αυξημένος αριθμός ταξιδιωτών παγκοσμίως έχει συντελέσει στο φαινόμενο αυτό (Dujardin, 2008).

Η σπλαχνική λεϊσμανίαση (ΣΛ) είναι η πιο σοβαρή μορφή της νόσου και είναι θανατηφόρα στο 95% των περιπτώσεων αν δεν δοθεί έγκαιρα θεραπεία. Μπορεί να προκληθεί από την *Leishmania infantum* ή την *L. donovani* του «Παλαιού Κόσμου». Τα δυο είδη του παράσιτου διαφέρουν στην εκδήλωση της ασθένειας, στους μεταβιβαστές και στους σπονδυλωτούς ξενιστές που χρησιμοποιούν και στη γεωγραφική τους κατανομή. Ανησυχητικό είναι το γεγονός ότι το παράσιτο *Leishmania* έχει αναπτύξει αντοχή στα αντιμονιούχα φάρμακα (φάρμακα 1^{ης} γραμμής για την θεραπεία της νόσου). Τα τελευταία χρόνια έχουν ανακαλυφθεί φάρμακα και σχήματα τα οποία προσφέρουν βελτιωμένη θεραπεία από την ασθένεια (Murray, 2004). Η θεραπεία 1^{ης} γραμμής περιλαμβάνει τη χρήση της λιποσωμικής Αμφοτερικίνης Β (AmB) η οποία, παρά την υψηλή αποτελεσματικότητά της, μπορεί να παρουσιάσει σοβαρές παρενέργειες (Ashford, 2000). Επιπρόσθετα, μια νέα δραστική ουσία, η hexadecyl phosphocholine (Miltefosine), αντιπροσωπεύει τον πρώτο

αναγνωρισμένο αντι-λεϊσμανιακό παράγοντα με αποτελεσματική χορήγηση *per os* (www.virbac.gr; Sundar, 2002).

Το φαινόμενο της πολλαπλής αντοχής στα φάρμακα (multi drug resistance, MDR), η ικανότητα δηλαδή που έχει ένα ζωντανό κύτταρο να εμφανίζει ανθεκτικότητα σε μια μεγάλη ποικιλία από δομικά και λειτουργικά ανόμοια σκευάσματα, αντιπροσωπεύει μία σημαντική δυνατότητα κάποιων μονοκυττάριων οργανισμών και κυττάρων των θηλαστικών (Singh, 2006). Η ικανότητα αυτή είναι εμπόδιο στη θεραπεία όχι μόνο της λεϊσμανίασης αλλά και άλλων ασθενειών και καρκίνων και η κατανόηση του φαινόμενου θα βοηθήσει στην καλύτερη αντιμετώπισή τους.

Καρκινικά κύτταρα που έχουν αναπτυχθεί σε καλλιέργειες στο εργαστήριο και διάφορα παράσιτα που εμφανίζουν το MDR, φαίνεται να υπερεκφράζουν μια διαμεμβρανική αντλία εκροής, την P - γλυκοπρωτεϊνη μεγέθους 170kDa (Pgp - 170), η οποία έχει την ικανότητα να αντλεί από το κύτταρο ένα μεγάλο αριθμό λιποφιλικών ουσιών που συμπεριλαμβάνουν πολλά φάρμακα και φθορίζουσες χρωστικές ουσίες όπως η Rhodamine 123 (Rhod - 123) (Riordan, 1985). Πριν την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών παραγόντων, είναι σημαντική η διερεύνηση των πιθανών μηχανισμών αντοχής του κυττάρου – στόχου, στους οποίους μπορεί να συμπεριλαμβάνεται μεταξύ άλλων και η αυξημένη εκροή ή μειωμένη εισροή του φαρμάκου.

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η σύγκριση 10 διαφορετικών στελεχών *Leishmania* (2 *L. donovani* και 8 *L. infantum*) με σκοπό τον εντοπισμό διαφορών ως προς τα βιολογικά και δομικά χαρακτηριστικά τους σε σχέση με την αντοχή τους στα φάρμακα.

Η απομόνωση των στελεχών έγινε στο εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής, του Τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Κρήτης, από ασθενείς και σκυλιά από την Κύπρο. Τα στελέχη αυτά είχαν χαρακτηριστεί ως «ανθεκτικά: 5» και «ευαίσθητα: 5» (1 *L. donovani* και 4 *L. infantum* σε κάθε κατηγορία), σύμφωνα με το ρυθμό εκροής της χρωστικής Rhod - 123 από την προμαστιγωτή μορφή του κάθε στελέχους, κατά την διάρκεια προκαταρκτικής μελέτης με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής.

Στα 10 στελέχη μελετήθηκαν: α) βιολογικά χαρακτηριστικά: η πολλαπλασιαστική και η μολυσματική ικανότητα των προμαστιγωτών μορφών του παράσιτου (το μολυσματικό στάδιο για τον άνθρωπο/σκύλο) καθώς και ο χρόνος που χρειάζονται οι προμαστιγωτές μορφές για να μετατραπούν σε αξενικές αμαστιγωτές (η μετατροπή της προμαστιγωτής μορφής σε αμαστιγωτή πραγματοποιείται ενδοκυττάρια στο σώμα του θηλαστικού-ξενιστή) και αντίστροφα, ο χρόνος που χρειάζονται οι αξενικές αμαστιγωτές μορφές για να μετατραπούν σε προμαστιγωτές, β) η αντοχή τους σε 3 από τα φαρμακευτικά σκευάσματα (Glucantime, Amphotericin B και Miltefosine) που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία της νόσου και γ) δομικά χαρακτηριστικά: σύγκριση του πρωτεϊνικού προφίλ των 10 στελεχών και αναζήτηση σε αυτά της αντλίας εκροής Pgp - 170 με τη μέθοδο του Western Blotting (WB).

Τα βιολογικά χαρακτηριστικά που επελέγησαν να μελετηθούν, ενδεχομένως να σχετίζονται με την επιθετικότητα και την μολυσματική ικανότητα του κάθε στελέχους και στόχος της μελέτης ήταν να δημιουργηθεί το προφίλ του κάθε στελέχους σαν παθογόνου παράγοντα (επιθετικότητα – μολυσματικότητα - αντοχή στα φάρμακα) και να διερευνηθεί η σχέση των παραγόντων αυτών με

τα δομικά χαρακτηριστικά τους καθώς και με την κλινική εικόνα του ασθενή/σκύλου από τον οποίο απομονώθηκε το παράσιτο και την γεωγραφική του κατανομή.

Συγκρίνοντας το προφίλ των 10 στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, προέκυψε ότι τα 2 στελέχη *L. donovani,* που απομονώθηκαν από ασθενείς, είχαν χαμηλότερη πολλαπλασιαστική ικανότητα από τα 8 στελέχη *L. infantum* που απομονώθηκαν από σκυλιά, και χρειάστηκαν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα προκειμένου οι προμαστιγωτές τους μορφές να μετατραπούν σε αξενικές αμαστιγωτές και αντίστροφα. Η μολυσματική ικανότητα ήταν όμοια μεταξύ των 2 στελεχών *L. donovani* αλλά παρουσίαζε μεγάλη ετερογένεια μεταξύ των 8 στελεχών *L. infantum.*

Κατά τη μελέτη της αντοχής των στελεχών στα φάρμακα έγινε σύγκριση του ρυθμού μεταβολής του πληθυσμού των 10 υπό μελέτη στελεχών σε διάφορες συγκεντρώσεις των 3 φαρμάκων σε διάφορα χρονικά διαστήματα. Το Glucantime, ένα φάρμακο που χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα σαν φάρμακο 1^{ης} γραμμής έναντι της λεϊσμανίασης, απεδείχθη μη αποτελεσματικό στη μείωση του πληθυσμού των προμαστιγωτών μορφών, *in vitro*. Αντίθετα, με την μεμονωμένη χορήγηση των παραγώγων του Glucantime, και κυρίως του SbV, τα αποτελέσματα ήταν πιο ενθαρρυντικά. Με τη χρήση της λιποσωμικής Αμφοτερικίνης Β, που έχει αντικαταστήσει το Glucantime σαν φάρμακο 1^{ης} γραμμής σε πολλές περιοχές, τα στελέχη παρουσίασαν αντοχή σε μικρότερο βαθμό, ενώ με την χρήση του νέου φαρμάκου Miltefosine δεν παρατηρήθηκε σημαντική αντοχή σε κανένα από τα 10 στελέχη.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η πρωτεωμική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν 2 «ευαίσθητα» (H1, D2) και 2 «ανθεκτικά» (H2, D3) στελέχη. Το «ανθεκτικό»

στέλεχος H2 (*L. donovani*) ήταν το μόνο στο οποίο ανιχνεύτηκε η πρωτεΐνη Heat Shock Protein 70 kDa (HSP 70) πλήρους μεγέθους. Στο «ανθεκτικό» στέλεχος D3 (*L. infantum*) ανιχνεύτηκαν 2 πρόδρομες μιτοχονδριακές και συγγενικές με την HSP 70 πρωτεΐνες αλλά και μια μη χαρακτηρίσιμη πρωτεΐνη. Και στα 4 στελέχη που μελετήθηκαν με την πρωτεωμική ανάλυση ανιχνεύθηκαν 2 επιπλέον πρωτεΐνες, οι οποίες υπερεκφράζονταν στα «ανθεκτικά» αλλά δεν ταυτοποιήθηκαν. Με την ανάλυση του WB ανιχνεύθηκε η Pgp – 170 και στα 5 «ανθεκτικά» (H2, D3, D4, D5, D8) στελέχη, με μεγαλύτερη έκφραση στα στελέχη *L. infantum* (D3, D4, D5, D8).

Συνεπώς: α) η χρήση της φθορίζουσας χρωστικής CFSE και της κυτταρομετρίας ροής, για τον προσδιορισμό της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των στελεχών συνιστούν μια γρήγορη, ευαίσθητη και σχετικά χαμηλού κόστους μέθοδο για την σύγκριση μεταξύ στελεχών, β) η πολλαπλασιαστική ικανότητα ήταν διαφορετική μεταξύ των στελεχών *L. donovani* και *L. infantum*, γ) η μολυσματική ικανότητα ήταν όμοια μεταξύ των στελεχών *L. donovani* αλλά παρουσίαζε μεγάλη ετερογένεια μεταξύ των στελεχών *L. infantum* καθώς ήταν και ανεξάρτητη από την πολλαπλασιαστική ικανότητα, δ) τα στελέχη *L. donovani* χρειάστηκαν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για την μετατροπή τους από προμαστιγωτά σε αξενικά αμαστιγωτά, και αντίστροφα, σε σχέση με τα στελέχη *L. infantum,* και τα "ανθεκτικά" στελέχη χρειάστηκαν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για την μετατροπή τους από προμαστιγωτά σε αξενικά αμαστιγωτά, και αντίστροφα, σε σχέση με τα "ευαίσθητα" στελέχη, ε) λόγω ανάπτυξης αντοχής (MDR) του παράσιτου στο Glucantime, το φάρμακο αυτό δεν μπορεί πλέον να χρησιμοποιείται σαν θεραπεία 1^{ης} γραμμής σε πολλές περιοχές, στ) η Αμφοτερικίνη Β παρουσίασε

κάποιο βαθμό αντοχής, *in vitro,* στο 70% των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν, ζ) το Miltefosine είναι πολύ αποτελεσματικό στην θεραπεία της λεϊσμανίασης. Όμως, σε περίπτωση χρήσης του για την θεραπεία των σκυλιών με λεϊσμανίαση σε περιοχές που αυτά θεωρούνται οι κύριοι ξενιστές παρακαταθήκη για το παράσιτο, υπάρχει περίπτωση σύντομα να αποκτηθεί αντοχή και στο φάρμακο αυτό, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την θεραπεία της νόσου στον άνθρωπο, η) με την ανίχνευση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αντοχή του παράσιτου στα φάρμακα, Pgp – 170 στα στελέχη H2, D3, D4, D5, D8 και HSP 70 στα στελέχη H2, D3 (5 στελέχη τα οποία είχαν χαρακτηριστεί με την κυτταρομετρία ροής σαν «ανθεκτικά») επιβεβαιώνεται ότι η κυτταρομετρία ροής μπορεί να δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα ως προς το βαθμό αντοχής του στελέχους, θ) η κυτταρομετρία ροής έχει το πλεονέκτημα να ανιχνεύει την Pgp σε ένα σχετικά μικρό αριθμό παράσιτων (<100,000) σε σχέση με το WB για το οποίο χρειάζεται συλλογή πρωτεϊνών από μεγαλύτερο αριθμό, περισσότερος χρόνος και πολύπλοκη διαδικασία.

Τα παραπάνω δεδομένα επισημαίνουν την προσπάθεια κατανόησης των παραγόντων (το slope που προέκυψε από την παρακολούθηση της εκροής της Rhod – 123, το MDR, τη Pgp – 170, την HSP 70 και τη μετατροπή των στελεχών μεταξύ των 2 μορφών – προμαστιγωτά και αξενικά αμαστιγωτά -) που σχετίζονται με την αντοχή του παράσιτου *Leishmania* στα φάρμακα, η γνώση των οποίων θα βοηθήσει στον προγραμματισμό της θεραπείας καθώς και στην παρακολούθηση του ασθενούς για την αποφυγή της αναζωπύρωσης της νόσου.

Summary

Leishmania, a protozoan parasite, is responsible for a group of diseases known as leishmaniases (Ross, 1903). They are transmitted by the bite of the phlebotomine sandly to humans and animals (Killick-Kendrick, 1999). The disease is spreading because of changes in several risk factors such as climatic changes, environmental changes and population movements (for economic or political reasons) which may lead to alterations in the range and densities of the vectors and reservoirs of the disease, increasing human exposure to infected sandflies (Dujardin, 2008).

Visceral Leishmaniasis (VL), which is the most severe form of the disease, is caused by *Leishmania infantum* and *L. donovani* and may lead to death in 95% of the cases if not treated. These two species differ in: the pathology of the disease they cause, vectors and reservoir hosts as well as in their geographical distribution. There is a worrying augmentation of *Leishmania's* resistance to pentavalent antimonial drugs (1st line treatment). However, alternative drugs have been developed for the successful treatment of the disease (Murray, 2004). First line treatment includes the use of liposomal Amphotericin B which may cause manifestations due to its acute toxicity (Ashford, 2000). Miltefosine (hexadecyl phosphocholine), the first oral drug against leishmaniasis, presents promising success (www.virbac.gr; Sundar, 2002).

Multi-drug resistance (MDR), is a condition enabling a disease – causing organism, or a cell, to resist substances of a wide variety of drugs (Singh, 2006). Today, MDR constitutes a major problem in the treatment of leishmaniasis and other infectious diseases and cancers.

Cancer cell lines can acquire cross-resistance to a remarkably wide range of compounds which have no obvious structural or functional similarities. The cross-resistance seems to be due to the decreased accumulation of the drug, or the fluorescent dye (e.g Rhodamine – 123, Rhod - 123) in the cell, and has been attributed to alterations in the cell plasma membrane. An over-expressed plasma membrane glycoprotein of relative molecular mass (Mr) 170,000 Da (the P - glycoprotein Pgp - 170) is consistently found in different multidrug-resistant human and animal cell lines, in tumours and in various parasites. Consequently, it has been postulated that Pgp directly or indirectly mediates multidrug resistance (Riordan, 1985).

Prior the development of new drugs, it is important to investigate potential mechanisms underlying drug resistance which may include increased efflux or decreased influx of the drug.

The aim of this work was to assess and compare the biological and structural characteristics and the drug resistance of 10 *Leishmania* isolates, *in vitro*.

For this, 2 *L. donovani* and 8 *L. infantum* isolates, were used. The 10 strains were isolated from patients (2 *L. donovani*) and from dogs (8 *L. infantum*), from Cyprus, in the Laboratory of Clinical Bacteriology, Parasitology, Zoonoses and Geographical Medicine, Faculty of Medicine, University of Crete.

These isolates were characterized as “resistant: 5” (1 *L. donovani* and 4 *L. infantum*) and “sensitive: 5” (1 *L. donovani* and 4 *L. infantum*), according to the efflux rate of Rhod – 123 of the promastigote stage of each isolate, during preliminary studies using flow cytometry.

Studies were carried out on the 10 isolates regarding their: a) biological characteristics such as the growth kinetics of their culture *in vitro*, the *in vitro* infectivity of the promastigotes (the infectious stage of the parasite for the vertebrate host) and the time required by the promastigotes to transform into axenic amastigotes *in vitro* (the form representing the intracellular form of the parasite in the vertebrate host) as well as the time required by the axenic amastigotes to transform into the promastigotes stage, b) the resistance expressed by the parasite to the 3 drugs used for the treatment of leishmaniasis (Glucantime, Amphotericin B και Miltefosine) and c) structural characteristics: comparison of the proteinic profile of the 10 isolates and the detection of the efflux pump Pgp – 170, by Western Blotting (WB).

The biological characteristics studied are probably related to the infectivity of the isolates to man, and the aim of the study was to characterize each isolate according to their infectivity and their resistance to drugs and to investigate how these factors are correlated with the structural characteristics studied (proteomic profile and the presence of the efflux pump), the disease pathology caused to the host and the geographical distribution of the isolate.

The two complementary methods used to study population growth (flow cytometry and the haemocytometer), showed consistent results for the 10 *Leishmania* isolates studied. The 2 *L. donovani* (H1, H2) isolates had lower growth rate, similar infectivity and required longer period for their promastigotes to transform into axenic amastigotes and reversely, in correlation to the 8 *L. infantum* (D1 – D8) isolates that had higher growth, presented diversity on their infectivity rates and required shorted period for their promastigotes to transform into axenic amastigotes, and reversely.

All 10 isolates were resistant to Glucantime, a drug extensively used as a standard treatment against leishmaniasis in human and dogs in many countries. However, studying the resistance of a “sensitive” (H1) and 4 “resistant” (H2, D3, D4, D5) isolates on the main Glucantime compounds (SbV and SbIII), the results were consistent to those arouse during the preliminary studies.

The 5 “resistant” (H2, D3, D4, D5, D8) and the 2 out of 5 “sensitive” isolates (D1, D6) demonstrated some resistance to Liposomal Amphotericin B, a drug which substituted Glucantime as 1st line drug in many countries, whilst all 10 isolates showed no resistance to Miltefosine, a new drug used for the treatment of leishmaniasis.

For the proteomic analysis, 2 “sensitive” (H1, D2) and 2 “resistant” (H2, D3) isolates were studied. The isolate H2 (*L. donovani*) which was characterized as “resistant” during the preliminary studies was the only strain in which Heat Shock 70 kDa protein (HSP 70) was detected. The D3 (*L. infantum*) is a “resistant” isolate in which 2 HSP 70 - related mitochondrial precursor and 1 putative uncharacterized protein were detected. Two unidentified proteins were detected in all 4 isolated but over-expressed in “resistant” isolates. The Pgp – 170 efflux pump was detected in all 5 “resistant” isolates characterized as “resistant” during preliminary studies, whilst its expression was qualitatively higher in *L. infantum* isolates.

In conclusion, a) The use of CFSE vital stain and flow cytometry for the determination of the proliferation capacity of isolates is rapid, precise, sensitive and non-costly, b) The results of growth kinetics show that promastigotes of different species and strains have different division potential

with *L. donovani*, isolated from patients, lower than *L. infantum*, isolated from dogs, c) the infectivity rate was different among the 10 isolates, d) the results of the, *in vitro,* transformation of promastigotes into axenic amastigotes and reversely, show that the species need different periods with *L. donovani,* longer than *L. infantum*, e) Glucantime cannot any longer be effectively used due to the multidrug resistance phenomenon (MDR) *Leishmania* parasites have induced, f) 70% of the isolates studied *in vitro,* developed some resistance in Amphotericin B, g) Miltefosine is a very effective drug against leishmaniasis, but its veterinary use should be avoided in areas of zoonotic leishmaniasis, where the dog is the reservoir for the parasite, since this might accelerate the emergence of drug resistance, h) the detection of Pgp – 170 and HSP 70 only in “resistant” isolates (Pgp – 170: H2, D3, D4, D5, D8 and HSP 70: H2, D3), supports that flow cytometry can safely be used to study the parasite’s drug resistance, i) flow cytometry detects Pgp using a relatively small number of parasites (<100,000) whilst WB needs greater amount and longer time and procedure.

These data highlight the large effort that has been invested in understanding the changes associated with drug-resistance in *Leishmania*. Nevertheless, it is hoped that knowledge of such variety of physiological mechanisms (such as the efflux rate of Rhod – 123, the MDR, Pgp – 170, HSP 70 and promastigote - amastigote differentiation), will be translated into a more effective treatment and control of leishmaniasis.

«Ο δρόμος προς τη σοφία είναι να μην φοβάσαι να κάνεις λάθος»

Paulo Coelo

Περιεχόμενα

Πίνακας Συντμήσεων 29
1. Εισαγωγή 34
1.1 Το παράσιτο *Leishmania* 34
1.1.1 Μορφολογία και δομή του παράσιτου 34
1.1.2 Ταξινόμηση 36
1.1.3 Διαβιβαστής ξενιστής 38
1.1.4 Πολλαπλασιασμός και Βιολογικός Κύκλος του παράσιτου 39
1.1.4.1 Στάδιο ανάπτυξης στον ασπόνδυλο ενδιάμεσο ξενιστή 40
1.1.4.2 Στάδιο ανάπτυξης στον σπονδυλωτό ξενιστή 41
1.2 Λεϊσμανίαση 44
1.2.1 Κλινικές Μορφές της νόσου 47
1.2.1.1 Δερματική Λεϊσμανίαση 48
1.2.1.2 Βλεννογονοδερματική Λεϊσμανίαση 51
1.2.1.3 Σπλαχνική Λεϊσμανίαση 52
1.2.2 Διάγνωση 55
1.2.3 Θεραπεία 57
1.2.4 Ομοιότητες και διαφορές μεταξύ L. infantum και L. donovani 59
1.3 Μηχανισμοί Πολλαπλής Αντοχής στα Φάρμακα 60
1.4 Στόχος της μελέτης 62
1.5 Προκαταρκτικές Μελέτες 63
2. Υλικά και Εργαστηριακές Δοκιμασίες 67
2.1 Παράσιτα και κυτταρικές σειρές 67
2.1.1 Απομόνωση και καλλιέργεια του παράσιτου Leishmania 67
2.1.2 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς THP-1 73
2.2 Εργαστηριακές Δοκιμασίες 74

2.2.1 Μελέτη της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των προμαστιγωτών μορφών των 10 στελεχών Leishmania 74
2.2.1.1 Εισαγωγή 74
2.2.2 Ποσοτικός προσδιορισμός της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των προμαστιγωτών μορφών των 10 στελεχών με την χρήση της μικροσκοπίας και του αιμοκυτταρόμετρου. 75
2.2.2.1 Εισαγωγή 75
2.2.2.2 Μεθοδολογία 77
2.2.2.3 Αποτελέσματα και Συζήτηση 78
2.2.3 Ποιοτικός προσδιορισμός της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των προμαστιγωτών μορφών των 10 στελεχών με την χρήση της κυτταρομετρίας ροής και της φθορίζουσας CFSE 82
2.2.3.1 Εισαγωγή 82
2.2.3.2 Μεθοδολογία 86
2.2.3.3 Αποτελέσματα και Συζήτηση 87
2.2.4 Μελέτη της μολυσματικής ικανότητας των προμαστιγωτών μορφών των 10 στελεχών in vitro 92
2.2.4.1 Εισαγωγή 92
2.2.4.2 Μεθοδολογία 92
2.2.4.3 Αποτελέσματα και Συζήτηση 95
2.2.5 Μελέτη του χρόνου μετασχηματισμού των προμαστιγωτών μορφών των 10 στελεχών σε αξενικές αμαστιγωτές μορφές in vitro και αντίστροφα 97
2.2.5.1 Εισαγωγή 97
2.2.5.2 Μεθοδολογία 98

2.2.5.3 Αποτελέσματα και Συζήτηση 99
2.2.6 Μελέτη της επιβίωσης του παράσιτου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις των αντιλεϊσμανιακών φαρμάκων Glucantime, Amphotericin B και Miltefosine. 102
2.2.6.1 Εισαγωγή 102
2.2.6.2 Μεθοδολογία 105
2.2.6.3 Αποτελέσματα και Συζήτηση 107
2.2.7 Μελέτη των πρωτεϊνικών διαφορών μεταξύ των προμαστιγωτών μορφών 2 «ανθεκτικών» και 2 «ευαίσθητων» στελεχών του παράσιτου Leishmania 113
2.2.7.1 Εισαγωγή 113
2.2.7.2 Μεθοδολογία 118
2.2.7.2.1 Πρωτεωμική ανάλυση - γενικά σημεία 118
2.2.7.2.2 Προετοιμασία του δείγματος 119
2.2.7.2.3 2D Ηλεκτροφόρηση και καταγραφή των πρωτεϊνών 122
2.2.7.2.3.a Immobilized pH gradient: η 1η Διάσταση (1D) 122
2.2.7.2.3.b Εξισορρόπηση των IPG Strips 124
2.2.7.2.4 Ηλεκτροφόρηση με βάση το μοριακό βάρος (SDS - PAGE): Η 2η Διάσταση (2D) 125
2.2.7.2.5 Χρώση και αποθήκευση των 2D πηκτωμάτων 128
2.2.7.2.5.a Χρώση με Coomassie Brilliant Blue και με Silver Nitrate 128
2.2.7.2.6 Ανίχνευση των κηλίδων με την χρήση του λογισμικού PD-Quest 6.1 130

2.2.7.2.7 Σημεία στα οποία δόθηκε προσοχή κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης της μεθόδου, για καλύτερα αποτελέσματα 132
2.2.7.3 Αποτελέσματα και Συζήτηση 134
2.2.8 Δοκιμασία Western Blotting για την ανίχνευση της Pgp - 170 138
2.2.8.1 Εισαγωγή 138
2.2.8.2 Μεθοδολογία 144
2.2.8.2.1 Καλλιέργεια παράσιτων και Συλλογή Πρωτεϊνών 144
2.2.8.2.2 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών (Παράρτημα 4.19) 145
2.2.8.2.3 Ανοσοαποτύπωση (Παράρτημα 4.23) 146
2.2.8.2.4 Ακινητοποίηση μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντιγόνων στις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης 148
2.2.8.2.5 Ανοσοενζυμική ανίχνευση των πρωτεϊνών 148
2.2.8.3 Αποτελέσματα και Συζήτηση 150
3. Συζήτηση 154
4.1 Απομόνωση *Leishmania spp* από δείγματα περιφερικού αίματος με EDTA 174
4.2 Απομόνωση *Leishmania spp* από δείγματα περιφερικού αίματος χωρίς EDTA 176
4.3 Απομόνωση *Leishmania spp* από δείγματα μυελού των οστών 178
4.4 Καλλιεργητικό υλικό RPMI 1640 10% 180
4.5 Διφασικό Καλλιεργητικό υλικό NNN 180
4.6 Πάγωμα παράσιτων στους – 80 ^{o}C 181
4.7 Πάγωμα παράσιτων σε υγρό άζωτο 181
4.8 Ξεπάγωμα παράσιτων από τους – 80 ^{o}C ή το υγρό άζωτο 182
4.9 Μόλυνση κυτταρικής σειράς THP-1 με το παράσιτο *Leishmania* 183

4.10 Χρώση Diff Quick Panoptic 185

4.11 Μετασχηματισμός προμαστιγωτών μορφών του παράσιτου *Leishmania* σε αξενικές αμαστιγωτές 186

4.12 Κλασματοποίηση πρωτεϊνών με το kit της Qiagen 188

4.13 Sample Buffer 190

4.14 Ακρυλαμίδη 12% 190

4.15 Διάλυμα Αγαρόζης 0,5% 190

4.16 Διάλυμα Μονιμοποίησης (Fixation Buffer) 191

4.17 Urea Cracking Buffer 191

4.18 Urea – Laemmly Buffer 2X 191

4.19 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών 192

4.20 Ηλεκτροφορητικό Πήκτωμα Ανάλυσης 8% 193

4.21 Ηλεκτροφορητικό Πήκτωμα Συμπύκνωσης 5% 193

4.22 Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης 1X (Electrode Buffer) 193

4.23 Ανοσοαποτύπωση 194

4.24 Διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer) 195

4.25 Ponceau S 195

4.26 Πλυστικό διάλυμα 10X (Wash Buffer 10X) 195

4.27 Δεσμευτικό διάλυμα (Blocking buffer) 196

4.28 Alkaline phosphate buffer 196

5.1 % Κατανομής του φθορισμού των προμαστιγωτών των 10 στελεχών μεταξύ των καναλιών 1 - 5, μετά από χρώση με CFSE (Πίνακες) 198

5.2 % Κατανομής του φθορισμού των προμαστιγωτών των 10 στελεχών μεταξύ των καναλιών 1 - 5, μετά από χρώση με CFSE (Γραφήματα) 204

5.3 % Κατανομής του φθορισμού των προμαστιγωτών των 10 στελεχών μεταξύ των καναλιών 1 - 5, μετά από χρώση με CFSE (3D - Γραφήματα με το WinMDi 2.8) 209
5.4 Ανταπόκριση των 10 στελεχών στο Glucantime (Πίνακες) 213
5.5 Ανταπόκριση των 10 στελεχών στο Glucantime (Γραφήματα) 219
5.6 Ανταπόκριση των 10 στελεχών στην Amphotericin B (Πίνακες) 224
5.7 Ανταπόκριση των 10 στελεχών στην Amphotericin B (Γραφήματα) 230
5.8 Ανταπόκριση των 10 στελεχών στο Miltefosine (Πίνακες) 235
5.9 Ανταπόκριση των 10 στελεχών στο Miltefosine (Γραφήματα) 241
5.10 Πηκτώματα πολυακρυλαμίδης μετά από χρώση με Colloidal Coomasie Blue 246
5.11 Πηκτώματα πολυακρυλαμίδης μετά από χρώση με Silver Nitrate 250
6. Βιβλιογραφία 255

Πίνακας Συντμήσεων

Πίνακας Συντμήσεων

1D	1η Διάσταση
2D	2η Διάσταση
A	Αδενίνη
ACN	Acetonitrile
AIDS	Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας
AP	Αλκαλική Φωσφατάση
APS	Ammonium Persulphate
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-Indolyl-Phosphatase
Blocking buffer	Δεσμευτικό Διάλυμα
C	Κυτοσίνη
CFDA – SE	Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CO2	Διοξείδιο του άνθρακα
CyaDye	Χρωστική Cyanide
DDT	Dichloro Diphenyl Trichloroethane
DIGE	Difference gel electrophoresis
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DTE	Dithioerythritol
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting

FBS	Ορός Εμβρύου Βοδιού
FSC	Front Scatter
G	Γουανίνη
H_2O_2	Υπεροξύδιο του υδρογόνου
H_3PO_4	Φωσφορικό οξύ
CH_3OH	Μεθανόλη
HCl	Υδροχλωρικό Οξύ
HIV	Ιός Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας
HPLC	High-performance liquid chromatography
HRP	Horse Radish Peroxidase
HSP	Heat Shock Protein
IC_{50}	Συγκέντρωση που επιφέρει το θάνατο στο 50% ενός πληθυσμού
IEF	Ισοηλεκτρηκή Εστίαση
IFAT	Ανοσοφθορισμός
in vitro	Μελέτη που πραγματοποιείται εκτός ζωντανού οργανισμού
in vivo	Μελέτη που πραγματοποιείται σε ζωντανό οργανισμό
IoA	Iodoacetamide
IPG	Immobilised pH gradient
KDa	KiloDalton
LASER	Light amplification by stimulated emission of radiation
LPG	λιποφωσφογλυκάνιο
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
TOF	Time of Flight
MDR	Πολλαπλή Αντοχή στα φάρμακα
$MgCl_2$	Χλωριούχο Μαγνήσιο

MS	Φασματοφωτομετρία
NaCl	Χλωριούχο Νάτριο
NaH_2PO_4	Άνυδρο μονοφασικό Φωσφορικό Νάτριο
NBT	Nitro Blue Tetrazolium Chloride
PAGE	Ηλεκροφορητικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης
Passage	Ανακαλλιέργεια
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PDA	Pull Down Assay Buffer
per os	Από του στόματος χορήγηση
Pgp - 170	P-γλυκοπορωτεΐνη 170kDa
PI	Propidium iodide
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
Rh – 123	Ροδαμίνη 123
RNA	Ριβονουκλεϊκό οξύ
Sample Buffer	Διάλυμα ανασύστασης
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SSC	Side Scatter
T	Θυμίνη
TEMED	N,N, N’N’-tetramethylethylenediamine
TFA	Trifluoroacetic acid
TGS	Tris-Glycine SDS
w/v	Βάρος κατ' όγκο
WB	Western Blotting
WHO	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

ΒΔΛ	Βλεννοδερματική Λεϊσμανίαση
ΔΕΚ	Δικτυοερυθροκύτταρα - Νεαρά Εμπύρηνα Ερυθροκύτταρα
ΔΛ	Δερματική Λεϊσμανίαση
ΕΝΥ	Εγκεφαλονωτιαίο Υγρό
ΣΛ	Σπλαχνική Λεϊσμανίαση

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

1. Εισαγωγή

1.1 Το παράσιτο *Leishmania*

Η *Leishmania* είναι ένα Πρωτόζωο υποχρεωτικά ενδοκυττάριο παράσιτο που αποτελεί το αίτιο μιας ομάδας ασθενειών, των λεϊσμανιάσεων (Ross, 1903).

1.1.1 Μορφολογία και δομή του παράσιτου

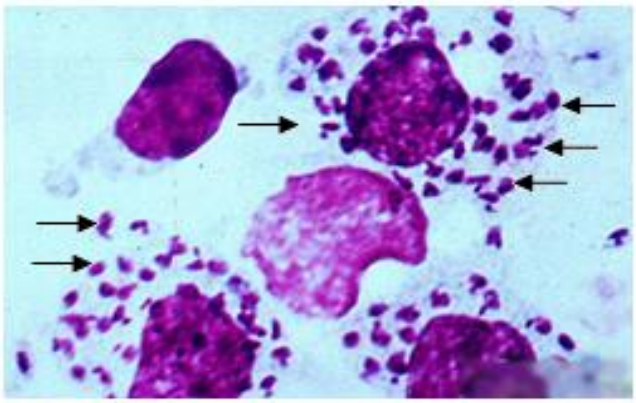
Η *Leishmania* απαντάται σε δύο διαφορετικά στάδια ανάπτυξης, την προμαστιγωτή και την αμαστιγωτή μορφή. Η προμαστιγωτή μορφή απαντάται στον εντερικό σωλήνα του ασπόνδυλου διαβιβαστή ξενιστή - Φλεβοτόμο σκνίπα (Diptera: Psychodidae) και στις *in vitro* καλλιέργειες, στους 26 ^{o}C (Molyneux, 1977). Η αμαστιγωτή μορφή απαντάται ενδοκυτταρικά στα μακροφάγα των σπονδυλωτών ξενιστών.

Η προμαστιγωτή μορφή έχει μέγεθος 12 - 30 μm. Διαθέτει ένα μεγάλο σφαιρικό έκκεντρο πυρήνα με σαφή πυρηνίσκο και περιφερική χρωματίνη. Στο κυτταρόπλασμα υπάρχουν πολυάριθμα ριβοσώματα, το σύμπλεγμα Golgi, κοκκώδες και λείο ενδοπλασματικό δίκτυο, ένα μιτοχόνδριο και ένας δισκοειδής κινητοπλάστης που εκτείνεται σε όλη την έκταση του μιτοχονδρίου (Englund, 1981). Η κίνηση του παράσιτου στην μορφή αυτή υποβοηθείται με την παρουσία ενός εξωκυτταρικού μαστίγιου. Κατά την παρατήρηση, στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, διακρίνεται η κυτταροπλασματική μεμβράνη πάχους 10 nm (Fuge, 1968; Dwyer, 1980). Το πρώτο στάδιο ανάπτυξης της προμαστιγωτής μορφής είναι η μετακυκλική μορφή όπου τα παράσιτα είναι

μικρότερα σε μέγεθος, περισσότερο μολυσματικά και χαμηλότερης περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες (Mallinson and Coombs, 1989) (Εικόνα 1).

Εικόνα 1: Παράσιτο *Leishmania* κατά το προμαστιγωτό στάδιο, μορφή την οποία συναντάμε στις καλλιέργειες στους 26 ^{o}C και στο σώμα της σκνίπας.

Η αμαστιγωτή μορφή έχει σχήμα ωοειδές με διάμετρο 2 - 5 μm. Διαθέτει εμφανή πυρήνα και κινητοπλάστη που καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος του κυττάρου. Διαθέτει επίσης οργανίδια, όπως η προμαστιγωτή μορφή, που όμως είναι λιγότερο ανεπτυγμένα. Επιπλέον υπάρχει ένα ενδοκυτταρικό μαστίγιο, σε αντίθεση με το εξωκυτταρικό της προμαστιγωτής μορφής (Jeffrey, 1975; Killick-Kendrick, 1979) (Εικόνα 2).



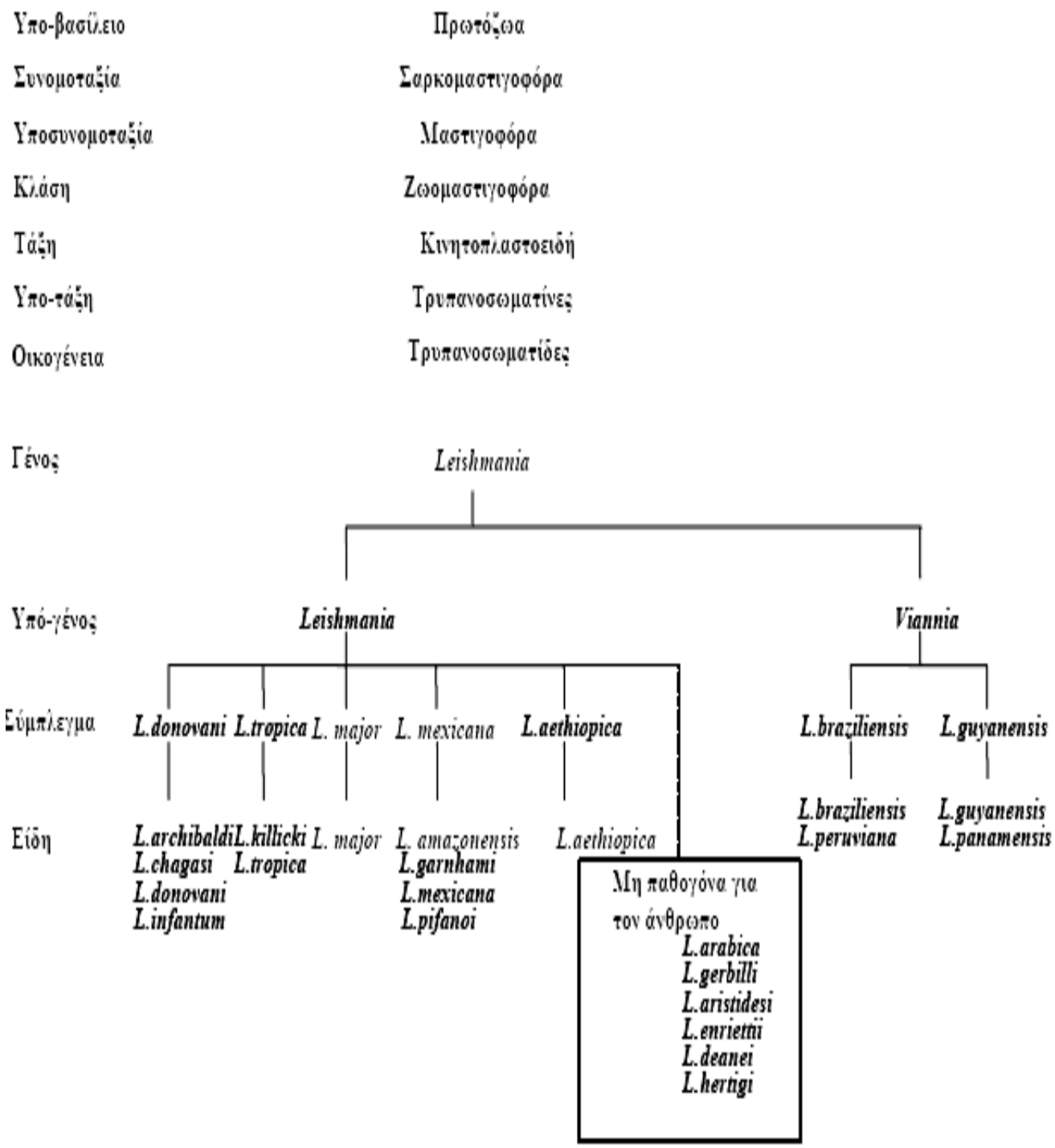
Εικόνα 2: Αμαστιγωτή στάδιο του παράσιτου *Leishmania* όπως φαίνεται μέσα στο κυτταρόπλασμα εμπύρηνων κυττάρων.

1.1.2 Ταξινόμηση

Το γένος *Leishmania* ανήκει στο Φύλο *Sarcomastigophora*, Σειρά *Kinetoplastida* και Οικογένεια *Trypanosomatidae*. Με βάση το τμήμα του εντέρου του εντόμου ενδιάμεσου ξενιστή στο οποίο αναπτύσσονται τα προμαστιγωτά, η *Leishmania* διακρίνεται σε δύο υπογένη: *Leishmania* και *Viannia* (Lianson, 1987; Banuls, 2007). Η ανάπτυξη του υπογένους *Leishmania* περιορίζεται στο πρόσθιο τμήμα του πυλωρικού σωλήνα του Φλεβοτόμου, στο σημείο της ένωσης του μεσεντέριου και του οπίσθιου εντέρου. Αντίθετα, η ανάπτυξη του παράσιτου του υπογένους *Viannia* λαμβάνει χώρα και στο μεσεντέριο αλλά και στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου της σκνίπας.

Η κατάταξη των ειδών της *Leishmania* βασίστηκε αρχικά σε διάφορα εξωτερικά χαρακτηριστικά του παράσιτου, αλλά και σε άλλα κριτήρια όπως οι ξενιστές που χρησιμοποιεί, η γεωγραφική τους κατανομή, ο τροπισμός στο σώμα του ξενιστή και οι κλινικές εκδηλώσεις (Bray, 1974; Lumsden, 1974; Pratt and David, 1981). Όμως, από την δεκαετία του 1970, οι ανοσολογικές μέθοδοι που αναπτύχθηκαν (κυρίως η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων), βιοχημικές και μοριακές αναλύσεις (ισοενζυμική ανάλυση και ανάλυση του DNA με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων και τεχνικές υβριδοποίησης με σημασμένα μόρια DNA), απέδειξαν ότι κριτήρια όπως η γεωγραφική κατανομή και οι κλινικές εκδηλώσεις δεν επαρκούσαν για την κατάταξη των στελεχών σε είδη (Chance, 1974; Kreutzer and Christensen, 1980).

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον 30 είδη *Leishmania*, 21 από τα οποία έχει αποδειχθεί ότι είναι παθογόνα για τον άνθρωπο (W.H.O., 1990; Banuls, 2007) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Σχηματική κατάταξη του γένους *Leishmania* (Banuls 2007).

1.1.3 Διαβιβαστής ξενιστής

Οι ασπόνδυλοι διαβιβαστές ξενιστές είναι ξανθά αιματοφάγα έντομα μεγέθους 1 – 5 mm και είναι γνωστά ως Φλεβοτόμοι ή σκνίπες (Εικόνα 4). Υπάρχουν περίπου 600 είδη, και ανήκουν στην σειρά *Diptera*, οικογένεια *Psychodidae* και υποοικογένεια *Phlebotominae*. Από τα 6 γένη που έχουν περιγραφεί, μόνο τα 3 έχουν ιατρική σημασία: τα έντομα του γένους *Phlebotomus* (*Larroussius*) και *Sergentomyia* του «Παλαιού Κόσμου» και το γένος *Lutzomyia* του «Νέου Κόσμου». Από τα 600 περίπου γνωστά είδη φλεβοτόμων μόνο 31 έχουν αποδειχθεί φορείς παθογόνων στελεχών *Leishmania*, και 43 είδη, μέχρι στιγμής, πιθανοί φορείς (Killick-Kendrick, 1990; Killick-Kendrick, 1999). Στην Ελλάδα έχουν βρεθεί 12 είδη φλεβοτόμων τα: *Phlebotomus tobbi, P. sergenti, P. balcanicus, P. perfilievi, P. neglectus, P. papatasi, P. simici, P. mascittii, P. alexandri, Sergentomyia detata, S. minuta* και *S. theodori* (Leger, 1988; Chaniotis, 1994; Ivovic, 2007). Οι σκνίπες ζουν κυρίως σε θερμά κλίματα και μεταδίδουν το παράσιτο τις νυχτερινές ώρες, μετά την δύση του ηλίου. Γεννούν τα αυγά τους και φωλιάζουν σε σκοτεινά και υγρά μέρη, σε ρωγμές τοίχων, μέρη όπου υπάρχουν κόπρανα ζώων. Μόνο τα θηλυκά χρειάζονται αίμα για την ανάπτυξη των αυγών τους και συνεπώς εκείνα απομυζούν αίμα και μεταδίδουν το παράσιτο. Η ασθένεια δεν παρουσιάζει εποχιακή μορφή, παρόλο που οι σκνίπες είναι παρούσες από Μάρτιο μέχρι Οκτώβριο, γιατί η περίοδος επώασης της νόσου είναι μεγάλη (1 μήνας – 9 χρόνια) (www.vetmed.gr).

Εικόνα 4: Φλεβοτόμος σκνίπα κατά την διάρκεια του δήγματος. Διακρίνεται ποσότητα αίματος στο σώμα της σκνίπας που έχει ληφθεί κατά την απομύζηση.

1.1.4 Πολλαπλασιασμός και Βιολογικός Κύκλος του παράσιτου

Το παράσιτο *Leishmania* πολλαπλασιάζεται με απλή διχοτόμηση κατά τον επιμήκη άξονά του, που αρχίζει από το πρόσθιο άκρο του σώματός του (Blaineau, 1992; Gibson and Stevens, 1999).

Το παράσιτο, κατά την διάρκεια του πολύπλοκου κύκλου ζωής του, εκτίθεται σε διαφορετικές συνθήκες, ενδοκυτταρικές και εξωκυτταρικές. Λόγω της διγενετικότητάς του (της ιδιότητάς του να διαθέτει δυο μορφολογικά στάδια), διαθέτει και δυο βασικά στάδια ανάπτυξης: το εξωκυτταρικό στάδιο (προμαστιγωτό) μέσα στον ασπόνδυλο ενδιάμεσο ξενιστή (σκνίπα) και το ενδοκυτταρικό στάδιο (αμαστιγωτό) στον σπονδυλωτό ξενιστή.

1.1.4.1 Στάδιο ανάπτυξης στον ασπόνδυλο ενδιάμεσο ξενιστή

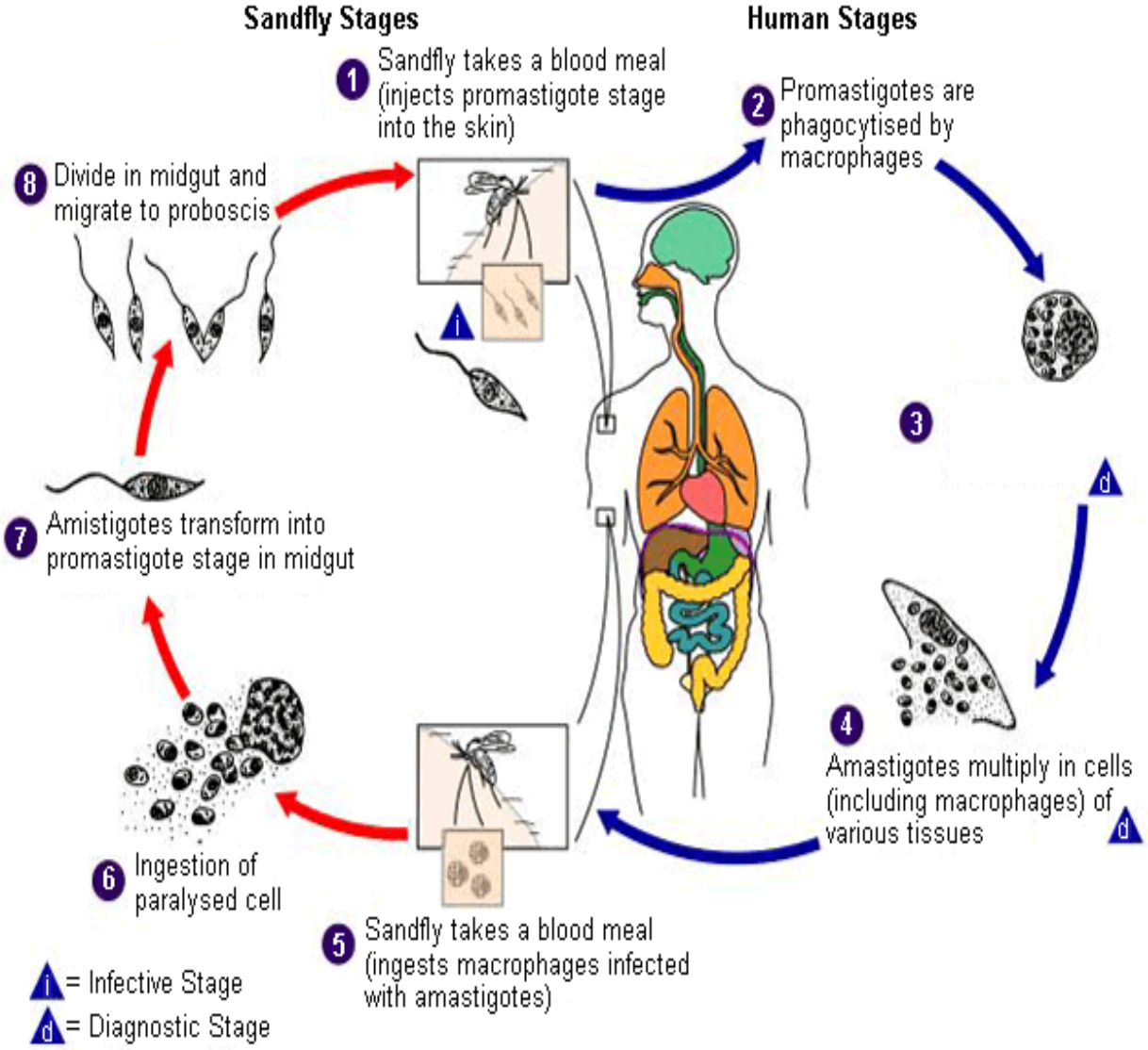
Ο ενδιάμεσος - διαβιβαστής ξενιστής μολύνεται με την αμαστιγωτή μορφή του παράσιτου που βρίσκεται μέσα στα μακροφάγα, κατά την απομύζηση αίματος από μολυσμένο σπονδυλωτό ξενιστή. Η *Leishmania* ελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της πέψης των μακροφάγων και αναπτύσσει την μαστιγοφόρο προκυκλική προμαστιγωτή μορφή της, η οποία προσδένεται στο επιθήλιο του μεσέντερου και ξεκινά να διαιρείται ενώ παραμένει μη μολυσματική (Descoteaux and Turco, 1999). Ο μηχανισμός της μεταμόρφωσης είναι ακόμα άγνωστος αλλά φαίνεται να σχετίζεται με τη μειωμένη θερμοκρασία που επικρατεί στο έντερο του εντόμου. Στη συνέχεια λαμβάνει μέρος μια διαδικασία, η μετακυκλογένεση, κατά την οποία οι διαιρούμενες, μη μολυσματικές προκυκλικές μορφές του παράσιτου διαφοροποιούνται σε μη διαιρούμενες, μολυσματικές μετακυκλικές μορφές (Sacks, 1989; Descoteaux and Turco, 1999). Αυτές με την σειρά τους αποκολλώνται από το επιθήλιο του μεσεντέρου και μεταναστεύουν στους σιελογόνους αδένες και το φάρυγγα του εντόμου, γεγονός που είναι πιθανό να οφείλεται στους απωθητικούς για το παράσιτο υδατάνθρακες που ελευθερώνονται στο μεσέντερο (Bray, 1983; Descoteaux and Turco, 1999). Η ανάπτυξη της προμαστιγωτής μορφής ολοκληρώνεται στο έντομο σε 8 - 10 ημέρες (Molyneux, 1977) (Εικόνα 5). Από τους σιελογόνους αδένες οι μετακυκλικές προμαστιγωτές μορφές του παράσιτου, που είναι το μολυσματικό στάδιο, μεταφέρονται στον τελικό ξενιστή κατά το δήγμα.

Εικόνα 5: Προμαστιγωτό στάδιο του παράσιτου που απαντάται στο σώμα της σκνίπας. Το στάδιο αυτό είναι το μολυσματικό στάδιο για τον ξενιστή (άνθρωπο, σκύλο κα).

1.1.4.2 Στάδιο ανάπτυξης στον σπονδυλωτό ξενιστή

Η μόλυνση του σπονδυλωτού ξενιστή επιτυγχάνεται κατά τη διάρκεια απομύζησης αίματος από μολυσμένη σκνίπα. Έτσι μεταφέρονται τα μολυσματικά μετακυκλικά προμαστιγωτά στο δέρμα του σπονδυλωτού ξενιστή μαζί με το σάλιο του εντόμου, το οποίο περιέχει φαρμακολογικά ενεργά υποστρώματα που αναστέλλουν τους αιμοστατικούς μηχανισμούς του ξενιστή και προκαλούν αγγειοδιαστολή και τοπική ανοσοκαταστολή (Molyneux, 1977). Τα παράσιτα προσλαμβάνονται από τοπικά ουδετερόφιλα και μακροφάγα και τα περισσότερα καταστρέφονται από τους μηχανισμούς της φυσικής ανοσίας του ξενιστή (ένζυμα, πρωτεΐνες συμπληρώματος, φαγοκύτταρα). Υπό κανονικές συνθήκες, όταν ένας μικροοργανισμός φαγοκυτταρώνεται από τα μακροφάγα, εισέρχεται στα φαγολυσοσώματα, που δημιουργούνται από την

σύντηξη των φαγοσωμάτων (κυστίδια τα οποία περικλείουν τον μικροοργανισμό όταν αυτός φαγοκυτταρώνεται) και των λυσοσωμάτων, και θανατώνεται. Όμως, το παράσιτο *Leishmania* διαθέτει ένα μοριακό μηχανισμό με τον οποίο μπορεί να επιβιώνει στο αφιλόξενο περιβάλλον του φαγοσώματος. Το λιποφωσφογλυκάνιο (LPG), βασικό μόριο της κυτταρικής μεμβράνης του παράσιτου, συμβάλλει στην αναστολή της ωρίμανση του φαγοσώματος, συνεπώς και της σύντηξής του με το λυσόσωμα, και έτσι αποτρέπεται η επιβλαβής δράση των λυσοσωματικών υδρολασών σε αυτό (lysosomal hydrolases) (Mauel, 1984; Desjardins and Descoteaux, 1998). Όσα από τα παράσιτα επιβιώσουν εξελίσσονται μέσα στα μακροφάγα στην αμαστιγωτή μορφή (30 min μετά τη μόλυνση) και πολλαπλασιάζονται στα φαγοσώματα των μακροφάγων με απλή διαίρεση. Τα μολυσμένα κύτταρα εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και όταν ο αριθμός των παράσιτων στο κύτταρο-ξενιστή αυξηθεί (συχνά περισσότερα των 200), το κύτταρο ρήγνυται, τα παράσιτα ελευθερώνονται και μολύνουν γειτονικά μακροφάγα με την διαδικασία της φαγοκυττάρωσης, ξεκινώντας έναν νέο κύκλο (Descoteaux and Turco, 1999) (Εικόνα 6).



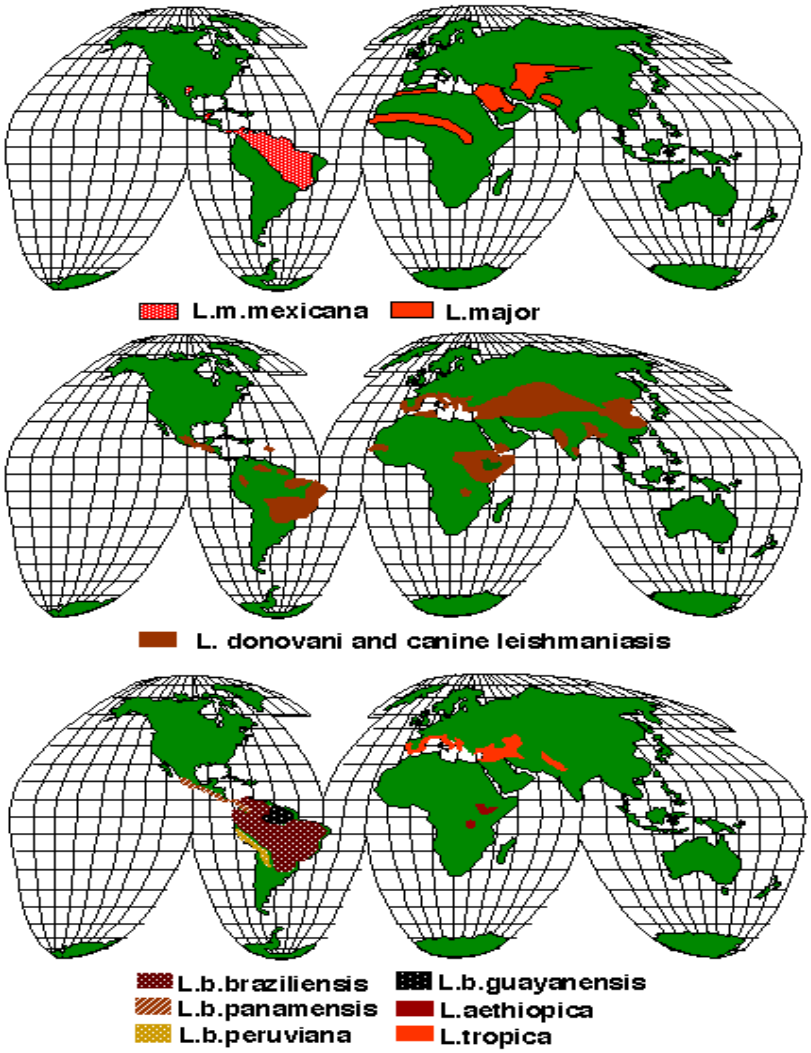
Εικόνα 6: Κύκλος ζωής του παράσιτου Leishmania (CDC).

1.2 Λεϊσμανίαση

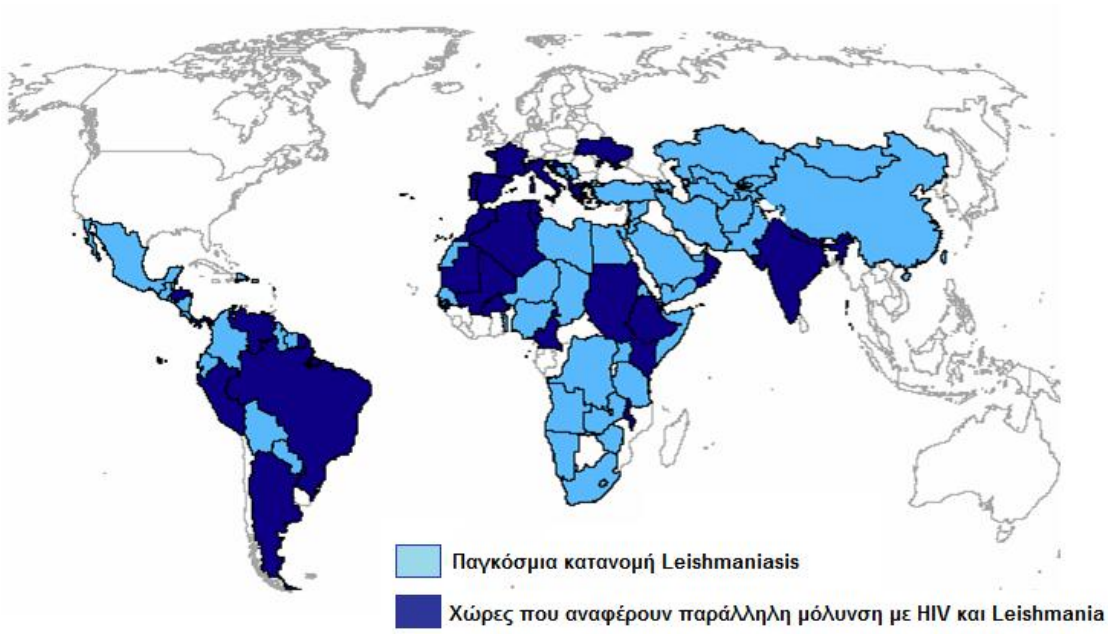
Οι λεϊσμανιάσεις είναι μια ομάδα παρασιτικών ασθενειών που προκαλούνται από τα παράσιτα του γένους *Leishmania*. Προσβάλλουν τον άνθρωπο, τα άγρια και τα κατοικίδια ζώα και κατανέμονται γεωγραφικά σε όλες τις ηπείρους, σε περιοχές όπου οι θερμοκρασίες ευνοούν την ανάπτυξη της σκνίπας (http://www.who.int/leishmaniasis_maps/en/index.html).

Οι λεϊσμανιάσεις αποτελούν ένα σημαντικό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία καθώς ο αριθμός των κρουσμάτων συνεχώς αυξάνεται (Desjeux, 2001; Desjeux, 2004). Όπως υπολογίστηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) το 2002, ο αριθμός των ατόμων που βρίσκονταν σε κίνδυνο ήταν περίπου 350 εκατομμύρια, ενώ ο αριθμός των νέων κρουσμάτων ετησίως κυμαίνεται στους 2,357,000 και προέρχονται από 88 χώρες (Εικόνα 7). Παρά τις μεγάλες προσπάθειες που καταβάλλονται από ερευνητές σε διάφορα πεδία από την αρχή του περασμένου αιώνα για την μελέτη και καταπολέμηση του παράσιτου *Leishmania*, επιβεβαιώνεται η επανεμφάνιση ή/και η εξάπλωσή του σε νέες περιοχές. Κάποιες από αυτές είναι η Β. Ιταλία, η Κίνα, η Βραζιλία και το κεντρικό Ισραήλ (Arias, 1996; Gradoni, 2003; Guan, 2003; Nasereddin, 2005). Η οικονομική ανάπτυξη, οι κλιματολογικές και περιβαλλοντικές αλλαγές που ευνοούν την μετακίνηση των εντόμων - φορέων σε χώρες που μέχρι πρόσφατα δεν υπήρχαν, η αυξημένη μετανάστευση από ενδημικές χώρες αλλά και ο αυξημένος αριθμός ταξιδιωτών παγκοσμίως έχει συντελέσει στο φαινόμενο αυτό (Dujardin, 2008). Η ταυτόχρονη μόλυνση του ανθρώπου με το παράσιτο *Leishmania* και τον Ιό της Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας (Human Immunodeficiency Virus, HIV) εντείνει το πρόβλημα στις αναπτυγμένες αλλά και στις αναπτυσσόμενες χώρες (Desjeux,

2001; Wolday, 2001; Desjeux, 2004) αφού αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης σπλαχνικής λεϊσμανίασης 100 – 1000 φορές στα μολυσμένα με τον ιό άτομα (WHO, 2006) (Εικόνα 8).



Εικόνα 7: Η γεωγραφική διασπορά των 9 πιο σημαντικών για τη δημόσια υγεία ειδών *Leishmania* (www.icp.ucl.ac.be).



Εικόνα 8: Η γεωγραφική κατανομή παράλληλης μόλυνσης του HIV με το παράσιτο *Leishmania* (www.who.int).

1.2.1 Κλινικές Μορφές της νόσου

Οι κυριότερες κλινικές μορφές της ασθένειας σχετίζονται άμεσα με το είδος του παράσιτου, την γεωγραφική του κατανομή (Εικόνα 7) και την κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή, και είναι οι ακόλουθες:

1. Δερματική Λεϊσμανίαση (Cutaneous Leishmaniasis, CL) η οποία στη Μεσόγειο προκαλείται από το είδος *Leishmania tropica* και είναι ανθρωπονόσος, και από τα είδη *L. major, L. aethiopica* (Παλαιού Κόσμου) και *L. mexicana, L. amazonensis, L. paramensis, L. guyanensis, L. peruviana* και *L. braziliensis* (Νέου Κόσμου) τα οποία προκαλούν ζωονόσους, και ως φορείς του παράσιτου αναγνωρίζονται οι σκύλοι, τα τρωκτικά, τα ύραξ, οι βραδύποδες, τα οπόσσουμ και τα περιοικιστικά ζώα (Kettle, 1995). Επιπλέον, η *L. infantum* και η *L. donovani* μπορούν επίσης να προκαλέσουν εκδηλώσεις δερματικής μορφής αλλά λιγότερο συχνά. Φορείς του παράσιτου *L. infantum* αναγνωρίζονται οι σκύλοι, οι αλεπούδες και τα τσακάλια, ενώ φορείς του παράσιτου *L. donovani* αναγνωρίζονται οι άνθρωποι, τα τρωκτικά και τα κυνοειδή. Οι δερματικές λεϊσμανιάσεις μεταδίδονται με μολυσμένες σκνίπες του γένους *Phlebotomus* και *Lutzomyia* (Ashford, 2000; Lessa, 2007).
2. Βλεννογονοδερματική Λεϊσμανίαση (Mucocutaneous Leishmaniasis, MCL) η οποία προκαλείται κυρίως από το είδος *L. braziliensis* (Νέου Κόσμου), είναι ζωονόσος και απαντάται κυρίως στην Κεντρική και Νότια Αμερική. Σπανιότερα προκαλείται από τα είδη *L. paramensis* και *L. guyanensis.* Η μορφή αυτή εξαπλώνεται με τις σκνίπες του γένους *Lutzomyia* ενώ φορείς του παράσιτου αναγνωρίζονται τα τρωκτικά, τα

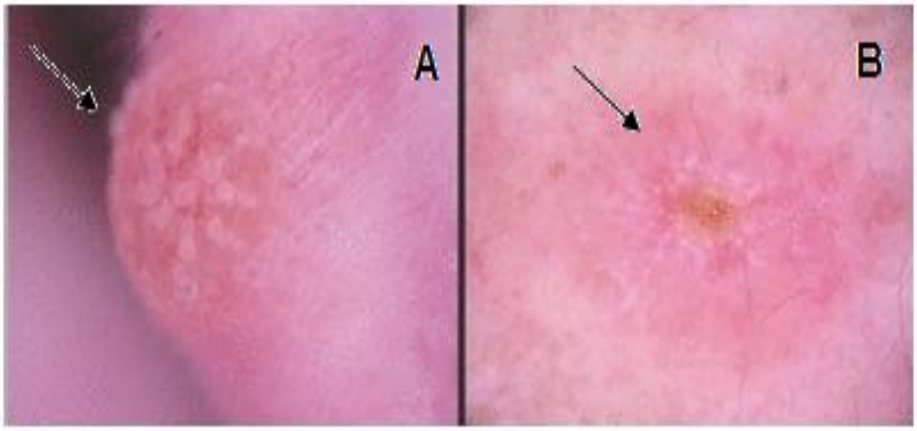
οπόσσουμ, οι βραδύποδες, οι μυρμηγκοφάγοι, τα περιοικιστικά ζώα και τα μαρσιποφόρα θηλαστικά του γένους *Didelphis* (Kettle, 1995; Ashford, 2000; Lessa, 2007).

3. Σπλαχνική Λεϊσμανίαση (Visceral Leishmaniasis, VL ή Kala Azar) η οποία προκαλείται από τα είδη *L. donovani* και *L. infantum* (Παλαιού Κόσμου) και απαντάται στην Μεσόγειο, την Μέση Ανατολή, την Α. Αφρική, την κεντρική Ασία, την Ινδία και την Κίνα, όπου εξαπλώνεται με τις σκνίπες του γένους *Phlebotomus*, (Ashford, 2000; Lessa, 2007) και από το είδος *L. chagasi (*η *L.infantum* του Νέου Κόσμου) το οποίο απαντάται στη Νότιο Αμερική, και κυρίως στη Βραζιλία, τη Βενεζουέλα και το Μεξικό, και εξαπλώνεται με τις σκνίπες του γένους *Lutzomyia* (http://martin.parasitology.mcgill.ca/Jimspage/Biol/Leish.htm; Lessa, 2007). Η *L. donovani* είναι ανθρωπονόσος αλλά σε κάποιες περιοχές της Αφρικής και της Μεσογείου έχουν αναγνωριστεί τρωκτικά και σκύλοι σαν φορείς. Αντίθετα η *L.infantum* έχει αναγνωριστεί ως ζωονόσος και φορείς του παράσιτου θεωρούνται οι σκύλοι, οι αλεπούδες, τα τσακάλια και τα μαρσιποφόρα (Kettle, 1995).

1.2.1.1 Δερματική Λεϊσμανίαση

Η νόσος ξεκινά με ένα μικρό κόκκινο εξάνθημα που εμφανίζεται στο σημείο του δήγματος ως συνέπεια της συσσώρευσης πλασματοκυττάρων, λεμφοκυττάρων και μακροφάγων (http://martin.parasitology.mcgill.ca/Jimspage/Biol/Leish.htm) (Εικόνα 9). Σταδιακά η πληγή εξαπλώνεται, συνήθως στο πρόσωπο, τα χέρια και τα

πόδια και απαρτίζεται από φυσαλίδες, οζίδια, κοκκιώματα ή έλκη με διογκωμένη περιφέρεια. Στις περισσότερες περιπτώσεις εμφανίζονται περισσότερες από μια αρχικές βλάβες δορυφορικά, και τοπική λεμφαδενίτιδα. Η βλάβη συνοδεύεται από ερυθρότητα, με ή χωρίς πόνο με τοπική αύξηση της θερμοκρασίας και δευτερογενείς μικροβιακές μολύνσεις (Εικόνα 10). Στις περιπτώσεις όπου παρουσιάζονται δευτερογενείς αλλοιώσεις, αυτές μπορεί να επεκταθούν και να προκαλέσουν δυσμορφίες, ιδίως όταν εμφανίζονται στην περιοχή του προσώπου (Εικόνα 11). Έπειτα από διάστημα 2 έως 24 μηνών, η πληγή μπορεί να επουλωθεί χωρίς θεραπεία και ο ξενιστής να αποκτήσει φυσική ανοσία (ανάλογα με το είδος του παράσιτου). Ο χρόνος επούλωσης ποικίλει ανάλογα με το είδος του παράσιτου, το σημείο και την έκταση της βλάβης. Σπλαχνικές βλάβες από είδη που προκαλούν δερματική λεϊσμανίαση δεν παρατηρούνται, εκτός από περιπτώσεις όπου το άτομο που μολύνεται βρίσκεται σε σοβαρή ανοσοκαταστολή (HIV, νεφρική ανεπάρκεια, κακοήθεια) (http://martin.parasitology.mcgill.ca/Jimspage/Biol/Leish.htm; Garcia, 1997; Ashford, 2000; W.H.O, 2000).



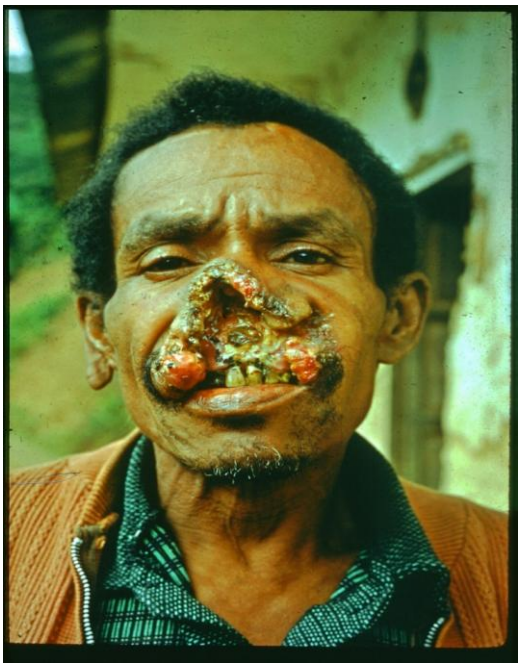
Εικόνα 9: Αρχικό στάδιο Δερματικής Λεϊσμανίασης με την εμφάνιση εξανθήματος στο σημείο του δήγματος(Α) και η εξέλιξη του εξανθήματος μερικές εβδομάδες μετά (Β). (Br J Dermatol, 2009, Blackwell Publishing).

Εικόνα 10: Ασθενής με δερματική λεϊσμανίαση όπου παρουσιάζεται έλκος, αποτέλεσμα της εξάπλωσης της πληγής (*L. major*) (http://bearspace.baylor.edu/Charles_Kemp).

Εικόνα 11: Ασθενής με δερματική λεϊσμανίαση όπου φαίνονται οι βλάβες στην περιοχή του προσώπου (*L. tropica*) (www.life.com).

1.2.1.2 Βλεννογονοδερματική Λεϊσμανίαση

Χαρακτηρίζεται από μια πληγή στο σημείο του δήγματος. Αρχικά οι αλλοιώσεις εμφανίζονται στο εκτεθειμένο δέρμα και είναι βλατιδώδεις, κατόπιν οζώδεις και αργότερα δημιουργούνται εξελκώσεις. Αφορά κυρίως στους βλεννογόνους της ρινικής και της στοματικής κοιλότητας, προκαλόντας καταστροφή των μαλακών μορίων της μύτης, του στόματος και των χειλιών (Εικόνα 12). Είναι δυνατόν να ακολουθήσει εκτεταμένη καταστροφή των χόνδρινων ιστών του λάρυγγα και του φάρυγγα εξ' αιτίας της διασποράς του παράσιτου μέσω των αιμοφόρων αγγείων ή των λεμφαγγείων (http://microbiology.wustl.edu/training/Med/Micpath99/11beverley; Lessa, 2007). Η νόσος δεν αυτοιάται και αν δεν δοθεί έγκαιρα θεραπεία, προκαλεί προοδευτικά εκτεταμένες παραμορφωτικές αλλοιώσεις (Pearson, 1983).



Εικόνα 12: Ασθενής με βλεννογονοδερματική λεϊσμανίαση όπου φαίνεται η καταστροφή των μαλακών μορίων της ρινικής και της στοματικής κοιλότητας (*L. braziliensis*) (http://wiz2.pharm.wayne.edu).

1.2.1.3 Σπλαχνική Λεϊσμανίαση

Από την στιγμή που το παράσιτο θα ενοφθαλμιστεί στο δέρμα, ξεκινάει η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος με την διαδικασία της φαγοκυττάρωσης προκειμένου να καταπολεμήσει τον εισβολέα. Όσα από τα παράσιτα επιβιώσουν, εξελίσσονται μέσα στα μακροφάγα στην αμαστιγωτή μορφή και πολλαπλασιάζονται στα φαγοσώματα των μακροφάγων με απλή διαίρεση. Τα μολυσμένα κύτταρα εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και όταν ο αριθμός των παράσιτων στο κύτταρο-ξενιστή αυξηθεί το κύτταρο ρήγνυται, τα παράσιτα ελευθερώνονται και μολύνουν γειτονικά κύτταρα και ιστούς (σπλήνα, ήπαρ, λεμφαδένες, μυελός των οστών). Μετά από την περίοδο επώασης, η οποία κυμαίνεται από 1 εβδομάδα έως 9 χρόνια (συνήθως 2 μέχρι 4 μήνες), η νόσος αρχίζει να εκδηλώνεται με πυρεξία (αργά αναπτυσσόμενο και χαμηλό πυρετό), διόγκωση του σπλήνα και του ήπατος, στα οποία οφείλεται το προεξέχων υπογάστριο, προοδευτική απώλεια βάρους, καχεξία, αναιμία και γενική αδιαθεσία (Εικόνα 13). Μέχρι πρόσφατα η σπλαχνική λεϊσμανίαση αποτελούσε πρόβλημα υγείας σε άτομα με αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα, όπως μικρά παιδιά και ηλικιωμένους. Οι ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς, όπως οι φορείς του AIDS, είναι επίσης ομάδα υψηλού κινδύνου. Εντούτοις, ο τρόπος ζωής, το άγχος και ο υποσιτισμός, έκαναν τον άνθρωπο πιο ευάλωτο στη λεϊσμανίαση, γεγονός που έχει αλλάξει την επιδημιολογία της νόσου, η οποία αναπτύσσεται και σε άτομα των οποίων το ανοσοποιητικό σύστημα θεωρείται ικανό. Σε περίπτωση που δεν διαγνωστεί και δεν χορηγηθεί έγκαιρα θεραπεία, η ΣΛ μπορεί να επιφέρει το θάνατο στο 75 – 90% των περιπτώσεων εντός 6 μηνών (σε πιο οξείες μορφές) έως 3 ετών (σε λιγότερο οξείες μορφές)

(http://martin.parasitology.mcgill.ca/Jimspage/Biol/Leish.htm). Μερικές φορές, και έπειτα από πλήρη και επιτυχή θεραπευτική αγωγή, άτομα μπορεί να αναπτύξουν δερματικές αλλοιώσεις εντός 2 ετών από την ολοκλήρωση της θεραπείας. Η δερματική αυτή μορφή της νόσου θεωρείται επιπλοκή της σπλαχνικής λεϊσμανίασης και είναι γνωστή ως Post - Kala Azar Dermal Leishmaniasis (Εικόνα 14) (Pearson, 1983; Ashford, 2000), και προκαλείται από το είδος *L. donovani* και εμφανίζεται στην Ινδία και την Αφρική (Σουδάν).

Εικόνα 13: Ασθενής με σπλαχνική λεϊσμανίαση όπου διακρίνεται το προεξέχων υπογάστριο (*L. donovani*) (http://wiz2.pharm.wayne.edu).

Εικόνα 14: Ασθενής με Post - Kala Azar Dermal Leishmaniasis (*L. donovani*) (http://img.medscape.com).

1.2.2 Διάγνωση

Η διάγνωση της λεϊσμανίασης, και στις 3 βασικές μορφές (Δερματική, Βλεννογονοδερματική, Σπλαχνική), βασίζεται αρχικά στην κλινική εξέταση του ασθενούς. Διαφοροδιάγνωση όμως απαιτείται μιας και η ασθένεια μοιάζει στην κλινική εικόνα με αυτήν της Ελονοσίας, της Σαλμονέλλωσης, της Φυματίωσης, του AIDS, της Ηπατίτιδας και της Λευχαιμίας. Η επιβεβαίωση της διάγνωσης επέρχεται με την ανίχνευση αμαστιγωτών μορφών του παράσιτου στα κύτταρα μολυσμένου ιστού του ατόμου. Τα υλικά βιοψίας αφορούν κυρίως ιστούς δέρματος (ΔΛ, ΒΔΛ) και κύτταρα μετά από αναρρόφηση σπλήνα, μυελού των οστών ή λεμφαδένων (ΣΛ). Σε αυτά πραγματοποιείται άμεσος ανοσοφθορισμός του παρασκευάσματος σε αντικειμενοφόρο πλάκα, *in vitro* και *in vivo* καλλιέργειες (http://microbiology.wustl.edu/training/Med/Micpath99/11beverley). Επίσης, μπορούν να ανιχνευθούν οι αμαστιγωτές μορφές του παράσιτου στο εσωτερικό των μακροφάγων σε δείγματα αίματος, μυελού των οστών ή αποτυπωμάτων ιστού σπλήνα, λεμφαδένα ή δέρματος μετά από χρώσεις, όπως η Giemsa ή η Diff Quick (http://martin.parasitology.mcgill.ca/Jimspage/Biol/Leish.htm). Ορολογικά, η ανίχνευση των ειδικών αντισωμάτων στον ορό του ασθενή πραγματοποιείται με την ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA (Burns, 1993), τον έμμεσο ανοσοφθορισμό (IFAT) (Pappas, 1983), την χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων (Sinha, 1992), την χρήση ανασυνδιασμένων μορίων του παράσιτου (Badaro, 1986) και την μέθοδο ανοσοαποτύπωσης των πρωτεϊνών σε φύλλα νιτροκυτταρίνης (Western Blotting) (Cardenosa, 1995). Τέλος, μοριακές μέθοδοι όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), έχουν

αναπτυχθεί για την ανίχνευση γενετικού υλικού (DNA) του παράσιτου σε βιολογικά δείγματα μετά από ενίσχυσή του (Ashford, 2000). Για την διαφοροποίηση μεταξύ των στελεχών του συμπλέγματος *L*. *donovani* πραγματοποιείται η μοριακή τεχνική τυποποίησης, K26 PCR - RFLP (Haralambous, 2008). Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ενίσχυση του γονιδίου *K26*, το οποίο εμφανίζει μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ ειδών του συμπλέγματος *L. donovani*. Άλλες μέθοδοι αφορούν στο Sequencing (Mauricio, 2006) και στα μονοκλωνικά αντισώματα (Rodriguez, 1994; Wilson, 1995).

1.2.3 Θεραπεία

Η θεραπεία της λεϊσμανίασης είναι χρονοβόρα, αρκετά υψηλού κόστους και απαιτεί τη νοσηλεία του ασθενούς. Τα φάρμακα πρώτης γραμμής είναι ενώσεις αλάτων πεντασθενούς αντιμονίου, όπως το sodium antimony gluconate (Pentostam) και το meglumine antimoniate (Glucantime) (http://microbiology.wustl.edu/training/Med/Micpath99/11beverley; Ashford, 2000). Η θεραπεία με πεντασθενές αντιμόνιο ανακαλύφθηκε περίπου έναν αιώνα πριν, έχει σοβαρές παρενέργειες και απαιτεί μακράς διάρκειας θεραπεία. Ανησυχητικό είναι το γεγονός ότι το παράσιτο *Leishmania* έχει αναπτύξει αντοχή στα αντιμονιούχα φάρμακα (Singh, 2006). Τα τελευταία χρόνια, έχουν ανακαλυφθεί φάρμακα και σχήματα τα οποία προσφέρουν βελτιωμένη θεραπεία (Murray, 2004). Η 1^{ης} γραμμής θεραπεία περιλαμβάνει επίσης την χρήση της λιποσωμικής Αμφοτερικίνης Β (AmB) η οποία, παρά την υψηλή αποτελεσματικότητά της, μπορεί να παρουσιάσει και σοβαρές παρενέργειες όπως πυρετό, νεφρική ανεπάρκεια, έμετους ή ακόμα και καρδιακή ανακοπή, οξεία ηπατική ανεπάρκεια, σπασμούς και άλλα, παράγοντες που καθιστούν αναγκαία την χορήγησή της σε νοσοκομείο. Η θεραπεία 2^{ης} γραμμής περιλαμβάνει την αλλοπουρινόλη, την πενταμιδίνη ή παραμομυκίνη (Aminosidine) και την αζόλη (Ketaconazole) σε διάφορους συνδυασμούς (http://microbiology.wustl.edu/training/Med/Micpath99/11beverley; Ashford, 2000). Επιπρόσθετα, μια νέα δραστική ουσία, η hexadecyl phosphocholine (Miltefosine), ανακαλύφθηκε στο Ινστιτούτο Max Planck στο Gottingen και εξελίχθηκε σε φάρμακο για τον άνθρωπο από την Aeterna Zentaris σε συνεργασία με τον WHO. Η αντιλεϊσμανιακή δράση της περιγράφηκε για

πρώτη φορά *in vitro* και *in vivo* το 1987, ενώ η από το στόμα (*per os*) χορήγησή της σε ποντίκια με σπλαχνική λεϊσμανίαση αναφέρθηκε το 1992. Οι πρώτες αναφορές από κλινικές μελέτες για τη θεραπεία της σπλαχνικής λεϊσμανίασης ήταν το 1998, στην Ινδία, και η Μιλτεφοσίνη (Miltefosine) αναγνωρίστηκε ως φάρμακο για τη θεραπεία της σπλαχνικής λεϊσμανίασης του ανθρώπου στην Ινδία (στην περιοχή Bihar όπου το παράσιτο είναι ανθεκτικό στο Glucantime) το Μάρτιο του 2002, και στη Γερμανία το 2004 (www.virbac.gr). Το Miltefosine παρά το μεγάλο κόστος και την τερατογόνο δράση του, αντιπροσωπεύει τον πρώτο αναγνωρισμένο αντι-λεϊσμανιακό παράγοντα με αποτελεσματική χορήγηση *per os* (χορήγηση από το στόμα) (www.virbac.gr; Sundar, 2002) γεγονός που το καθιστά πολύτιμο μιας και η θεραπεία με το σκεύασμα αυτό δεν απαιτεί νοσοκομειακή περίθαλψη.

Δεδομένων των προβλημάτων τοξικότητας, της ανάγκης για παραμονή και παρακολούθηση στον χώρο του νοσοκομείου, το υψηλό κόστος και την ανάπτυξη αντοχής σε κάποια από τα μέχρι σήμερα διαθέσιμα φάρμακα (Glucantime), είναι απαραίτητη η ανάπτυξη νέων και πιο βελτιωμένων φαρμακευτικών ουσιών που θα αντικαταστήσουν τις ήδη υπάρχουσες.

1.2.4 Ομοιότητες και διαφορές μεταξύ L. infantum και L. donovani

Η σπλαχνική λεϊσμανίαση είναι η πιο σοβαρή από τις μορφές της νόσου. Μπορεί να προκληθεί από την *L. infantum* ή την *L. donovani* από την οποία διαφέρει στην εκδήλωση της ασθένειας, στους μεταβιβαστές ξενιστές, στην γεωγραφική κατανομή αλλά και στους σπονδυλωτούς ξενιστές που χρησιμοποιεί (Lukes, 2007). Η *L. infantum* συναντάται σε χώρες της λεκάνης της Μεσογείου, στην Μέση Ανατολή, στην Κίνα, στην κεντρική Ασία και στην Νότια Αμερική. Είναι υπεύθυνη για ζωονόσους και έχει σαν ξενιστή παρακαταθήκη το σκύλο. Η *L. donovani* είναι υπεύθυνη για ανθρωπονόσους αλλά και ζωονόσους και προκαλεί σπλαχνική λεϊσμανίαση και post – kala azar δερματική λεϊσμανίαση. Η *L. donovani* συναντάται κυρίως σε χώρες της Ανατολικής Αφρικής (Σουδάν, Κένυα, Αιθιοπία), στην Βοριοανατολική Ινδία, στο Μπαγκλαντές, στο Νεπάλ και στην Κίνα. Στην Ινδία, κυρίως στο Bihar και στο Varanasi, ένα μεγάλο ποσοστό (περίπου 70%) των περιστατικών της σπλαχνικής λεϊσμανίασης που οφείλεται στην *L. donovani*, παρουσιάζει αντοχή στην θεραπεία με πεντασθενές αντιμόνιο (Olliaro, 2005; Croft, 2006; Singh, 2006). Οι ασθενείς αυτοί θεραπεύτηκαν επιτυχώς με τη χορήγηση Αμφοτερικίνης Β (Singh, 2006).

1.3 Μηχανισμοί Πολλαπλής Αντοχής στα Φάρμακα

Το φαινόμενο της πολλαπλής αντοχής στα φάρμακα (Multi-Drug Resistance, MDR), ορίζεται ως η ικανότητα που έχει ένα ζωντανό κύτταρο να εμφανίζει ανθεκτικότητα σε μια μεγάλη ποικιλία από δομικά και λειτουργικά ανόμοια σκευάσματα. Πριν την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών παραγόντων, είναι σημαντική η διερεύνηση των πιθανών μηχανισμών αντοχής του κυττάρου - στόχου. Αυτοί μπορεί να περιλαμβάνουν: α) την μετατροπή του φαρμάκου σε μια αδρανοποιημένη μορφή από ένα ένζυμο, β) την τροποποίηση μιας ευαίσθητης περιοχής του φαρμάκου, γ) την αυξημένη εκροή ή μειωμένη εισροή του φαρμάκου, δ) ένα εναλλακτικό μονοπάτι που θα αναστείλει την δράση του φαρμάκου, ε) την αυξημένη ποσότητα ενός ενζυμικού υποστρώματος το οποίο μπορεί να συναγωνιστεί το φάρμακο, στ) την αποτυχία της ενεργοποίησης του φαρμάκου κ.α. (Singh, 2006).

Το φαινόμενο MDR αποτελεί εμπόδιο στη θεραπεία όχι μόνο της λεϊσμανίασης αλλά και άλλων ασθενειών και καρκίνων και η κατανόηση του φαινόμενου αυτού θα βοηθήσει στην καλύτερη φαρμακευτική αντιμετώπισή τους. Στα θηλαστικά, καρκίνοι οι οποίοι αρχικά παρουσιάζουν ευαισθησία σε κυτταροτοξικούς παράγοντες, συχνά αναπτύσσουν αντοχή σε ένα ευρύ φάσμα από ανόμοια φαρμακευτικά σκευάσματα. Καρκινικές κυτταρικές σειρές που έχουν αναπτυχθεί σε καλλιέργειες στο εργαστήριο και διάφορα παράσιτα (*Leishmania spp, Plasmodium falciparum, Entamoeba hystolytica*), που εμφανίζουν το φαινόμενο της πολλαπλής αντοχής στα φάρμακα, φαίνεται να υπερεκφράζουν μια διαμεμβρανική αντλία εκροής για ένα μεγάλο αριθμό λιποφιλικών ουσιών που συμπεριλαμβάνουν πολλά φάρμακα και φθορίζουσες χρωστικές ουσίες όπως η Rhodamine 123 (Rhod - 123)

(Riordan, 1985; Preet, 1992). Αποτέλεσμα του φαινόμενου αυτού είναι η μειωμένη συσσώρευση του φαρμάκου στο σώμα του παράσιτου/κυττάρου και έτσι αυτό να μην θανατώνεται. Η διαμεμβρανική αυτή αντλία είναι μια γλυκοπρωτεΐνη, η P-γλυκοπρωτεΐνη (Pgp), που εκφράζεται από το *MDR1* (Multi-Drug Resistance 1 gene) και έχει βάρος 170 kDa (Pgp - 170). Οι Pgps αποτελούν μέλη της υπεροικογένειας των ABC – μεταφορέων (ATP – binding cassette) και στον άνθρωπο σχετίζονται με 2 γονίδια, ένα εκ των οποίων είναι το *MDR1*. Ένας ABC – μεταφορέας λειτουργεί σαν μια αντλία ανταλλαγής ουσιών διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης (Riordan, 1985).

Μελέτες σε μολυσμένα με λεϊσμανίαση σκυλιά έχουν δείξει ότι, μετά από μη επιτυχημένη θεραπεία, ο πληθυσμός του παράσιτου που παραμένει έχει μεταξύ 8 - 41 φορές περισσότερη αντοχή στα φάρμακα από το αρχικό στέλεχος (wild type). Το συμπέρασμα των μελετών αυτών είναι ότι «η θεραπεία της λεϊσμανίασης στα σκυλιά είναι επιδημιολογικά επικίνδυνη. Αφενός, στις περισσότερες περιπτώσεις, δεν εξολοθρεύει τα παράσιτα αφετέρου από ευαίσθητα τα καθιστά ανθεκτικά στα αντιλεϊσμανιακά φάρμακα με κίνδυνο να δημιουργηθεί ένα μόνιμο απόθεμα παράσιτων ανθεκτικών στα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της σπλαχνικής λεϊσμανίασης στον άνθρωπο και στον σκύλο» (Gramiccia, 1992).

1.4 Στόχος της μελέτης

Στόχος της μελέτης ήταν η σύγκριση 10 στελεχών *Leishmania*, 5 «ανθεκτικών» και 5 «ευαίσθητων» (χαρακτηρισμός που προέκυψε από μελέτη με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής και της χρωστικής Rhod – 123) με σκοπό τον εντοπισμό διαφορών ως προς τα βιολογικά και δομικά χαρακτηριστικά τους και την αντοχή τους στα φάρμακα.

Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε η σύγκριση των 10 στελεχών του παράσιτου, *in vitro,* με τη μελέτη:

1) Βιολογικών χαρακτηριστικών της προμαστιγωτής μορφής του παράσιτου, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωσή του και που ενδεχομένως καθορίζουν την μολυσματική ικανότητα και την παθογόνο δράση του: α) ο ρυθμός πολλαπλασιασμού του κάθε στελέχους, β) η μολυσματική του ικανότητα και γ) ο χρόνος μετατροπής της προμαστιγωτής μορφής σε αμαστιγωτή και αντίστροφα.

2) Αντοχής των προμαστιγωτών μορφών στα φάρμακα: μελετήθηκε η ικανότητα επιβίωσης των προμαστιγωτών μορφών του παράσιτου σε περιβάλλον που περιείχε διαφορετικές συγκεντρώσεις 3 φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της νόσου (Glucantime, Amphotericin B και Miltefosine), μετά από έκθεση τους σε αυτά για διαφορετικά χρονικά διαστήματα.

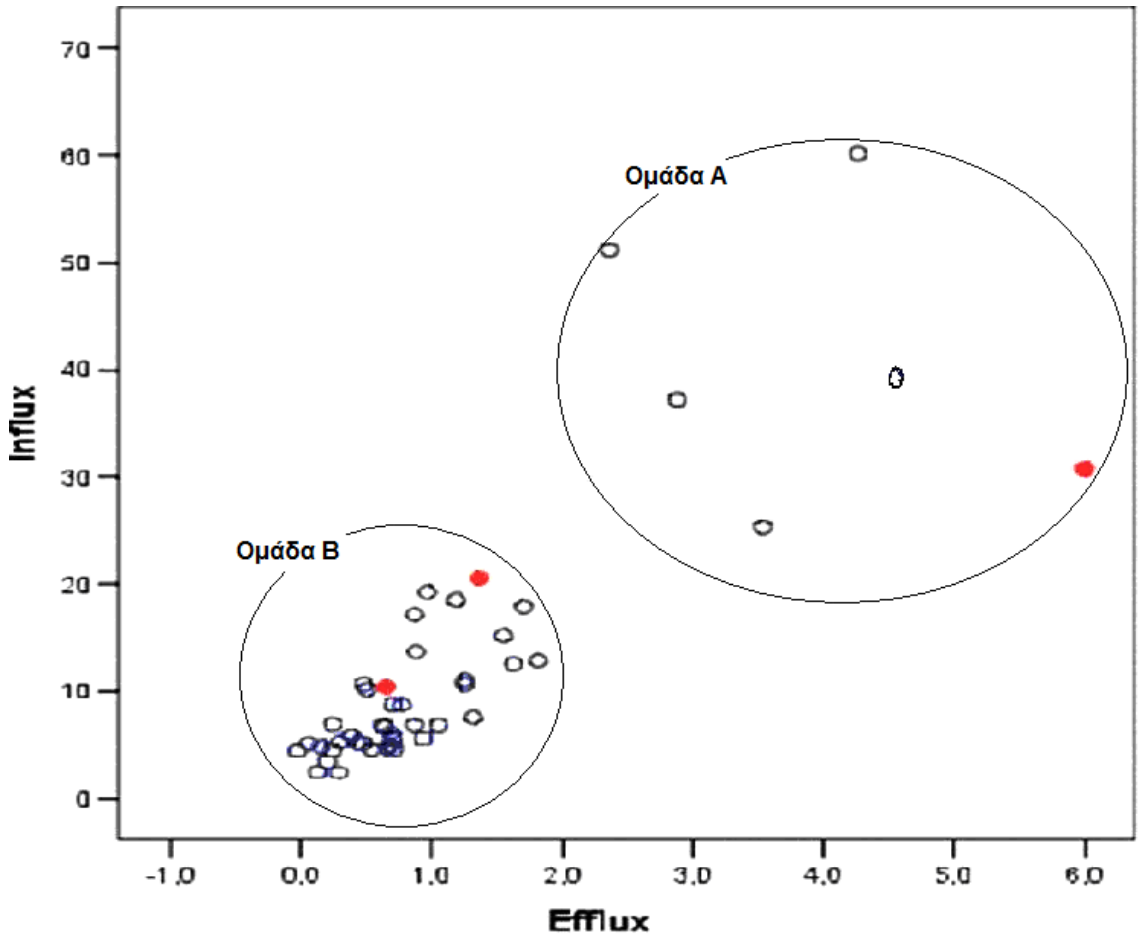
3) Των πρωτεϊνικών διαφορών των 10 στελεχών.

4) Της παρουσίας της Γλυκοπρωτεΐνης - αντλίας εκροής, Pgp - 170 (που είναι η έκφραση του γονιδίου mdr), στις προμαστιγωτές μορφές των 10 στελεχών του παράσιτου με την μέθοδο του Western Blotting (WB) και τη χρήση ενός μονοκλωνικού και ενός πολυκλωνικού αντισώματος.

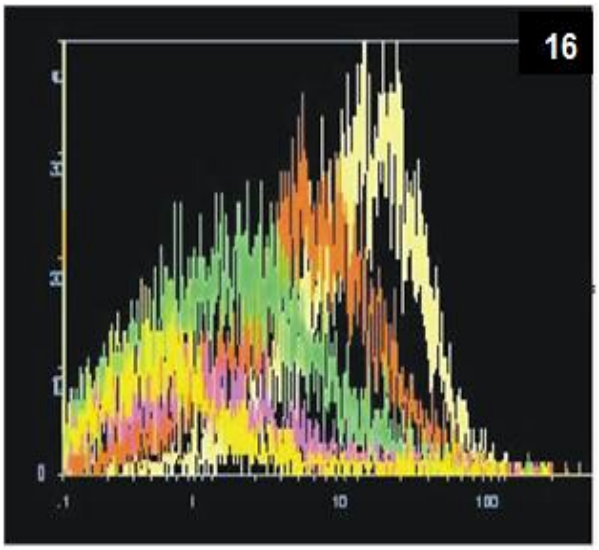
1.5 Προκαταρκτικές Μελέτες

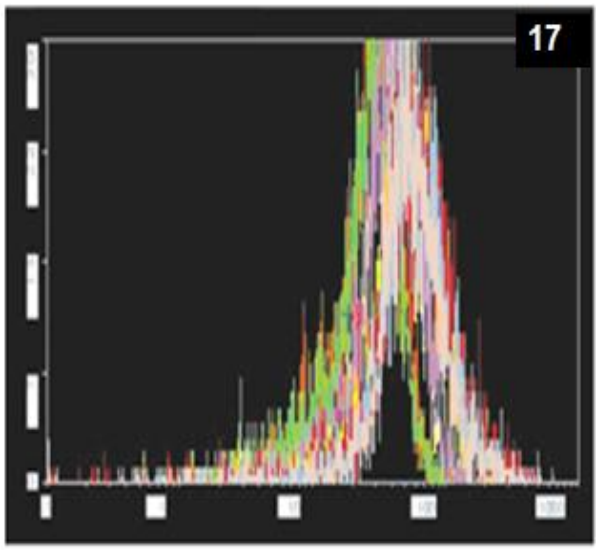
Κατά τη διάρκεια επιδημιολογικής μελέτης στην Κύπρο, για τη διερεύνηση της λεϊσμανίασης, πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες, την περίοδο 2005 – 2006, από ανθρώπους και σκυλιά από τις ελεύθερες περιοχές του νησιού. Στα πλαίσια της μελέτης αυτής απομονώθηκαν 62 στελέχη *L. infantum* MON-1 από σκυλιά και 5 στελέχη *L. donovani* MON- 37 από ασθενείς (Mazeris, 2010; Μαζέρης, Διδακτορική Διατριβή).

Σε όλα τα στελέχη μελετήθηκε ο ρυθμός εκροής της Rhod – 123, με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής, στο προμαστιγωτό στάδιο του παράσιτου, και υπολογίστηκε το slope α (το οποίο υποδηλώνει το ρυθμό με τον οποίο αποβάλλεται το φάρμακο/χρωστική από το σώμα του κυττάρου) (Πίνακας 1), παράγοντας που σχετίζεται με την αντοχή του στελέχους στα φάρμακα μιας και εξαρτάται από τον αριθμό των αντλιών Pgp - 170 που διαθέτει το κάθε στέλεχος. Όπως φαίνεται στο καρτεσιανό διάγραμμα (Εικόνα 15), το κάθε στέλεχος χαρακτηρίστηκε ανάλογα με το ρυθμό εκροής της Rhod – 123 που επέδειξε, σε «ανθεκτικό» και «ευαίσθητο» (slope α, για ανθεκτικά στελέχη: 2,36 – 6, για ευαίσθητα στελέχη: 0,16 – 1,83). Έξι από τα 67 στελέχη έδειξαν υψηλό ρυθμό εκροής της Rhod - 123 και χαρακτηρίστηκαν ως «ανθεκτικά» (Χριστοδούλου Β. Διδακτορική Διατριβή σε εξέληξη) (Ομάδα Α όπως φαίνεται στις Εικόνες 15 - 16). Από τα 6 «ανθεκτικά» στελέχη επιλέχθηκαν τα 5 για να συγκριθούν με 5 (τυχαία) «ευαίσθητα» στελέχη, τα οποία έδειξαν χαμηλό βαθμό εκροής της Rhod - 123 (Ομάδα Β όπως φαίνεται στις Εικόνες 15 - 17).



Εικόνα 15: Καρτεσιανό διάγραμμα στο οποίο διακρίνονται τα «ανθεκτικά» (Ομάδα Α) και τα «ευαίσθητα» στελέχη (Ομάδα Β) βάση του ρυθμού εκροής (efflux) και εισροής (influx) της Rhod – 123 που επέδειξε το κάθε στέλεχος. Τα κόκκινα σημεία αντιπροσωπεύουν τα *L. donovani* στελέχη που απομονώθηκαν από ασθενείς και τα μπλε σημεία, τα *L. infantum* στελέχη που απομονώθηκαν από σκυλιά.





Εικόνα 16 - 17: Υψηλός (Εικ 16) και χαμηλός (Εικ 17) ρυθμός εκροής της Rhod – 123 σε χρόνο 0-120 min με μετρήσεις κάθε 30 min, όπως παρουσιάζεται σε «ανθεκτικό» και «ευαίσθητο» στέλεχος αντίστοιχα. Το κάθε χρώμα υποδεικνύει την χρωστική που παραμένει στο σώμα του παράσιτου σε κάθε μέτρηση.

Κεφάλαιο 2

Υλικά και Εργαστηριακές Δοκιμασίες

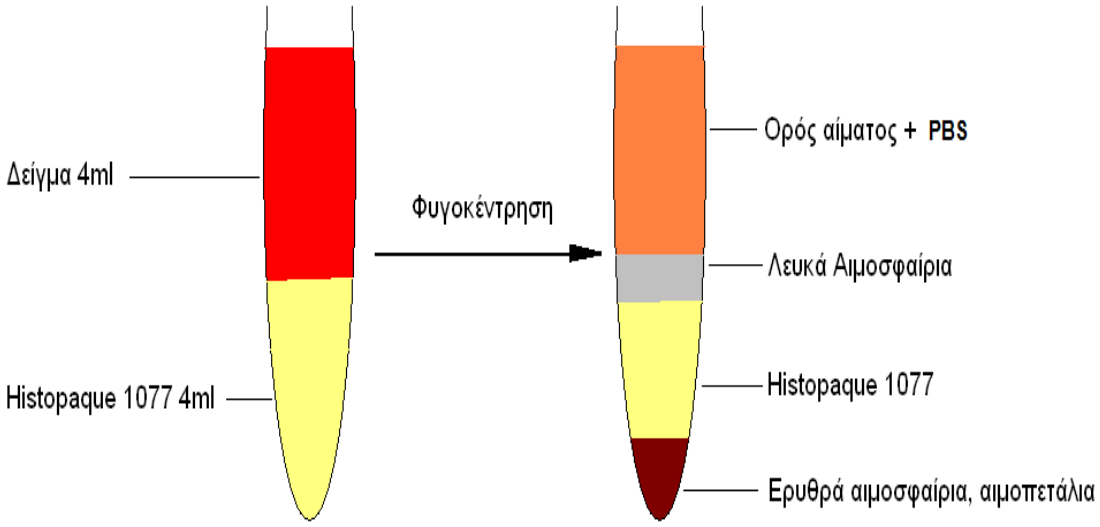
2. Υλικά και Εργαστηριακές Δοκιμασίες

2.1 Παράσιτα και κυτταρικές σειρές

2.1.1 Απομόνωση και καλλιέργεια του παράσιτου Leishmania

Δείγμα αίματος με ή χωρίς EDTA από ανθρώπους και σκυλιά (Παράρτημα 4.1, 4.2) ή μυελού των οστών από ανθρώπους (Παράρτημα 4.3) χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του παράσιτου, πριν την έναρξη θεραπείας. Το δείγμα αραιώθηκε 1:1 σε PBS, (Phosphate Buffer Saline, 0.01M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων, 0.145M NaCl, pH 7.2) και το δείγμα επιστρώθηκε σε ίσο όγκο Histopaque 1077 (Sigma Aldrich, Inc, St Louis, MO). Μετά από φυγοκέντρηση σε 800 x g, για 30 min, συλλέχθηκε ο δακτύλιος των λευκών αιμοσφαιρίων με την χρήση γυάλινης πιπέττας Pasteur (Εικόνα 18). Στην συνέχεια, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS, pH 7.2, σε 700 x g, για 10 min και τοποθετήθηκαν σε δύο διαφορετικά καλλιεργητικά υλικά: α) στο μονοφασικό καλλιεργητικό υλικό RPMI 1640 (GibcoBRL, UK) (Εικόνα 19, Παράρτημα 4.4), εμπλουτισμένο με 2 mM L-glutamine, 20 MM Hepes Buffer, 10% αποσυμπληρωμένο ορό εμβρύου βοδιού (FBS, Foetal Bovine Serum), 100 u/ml Πενικιλλίνη και 100 mg/ml Στρεπτομυκίνη (στο εξής θα αποκαλείται καλλιεργητικό υλικό RPMI 1640), (Lightner, 1983; Lemesre, 1988) σε πλαστικές αποστειρωμένες φιάλες όγκου 25 cm^3 (Nunc, Denmark) και στο διφασικό καλλιεργητικό υλικό NNN (Novy – MacNeaL – Nicolle) (Ozbilgin, 1995) αποτελούμενο από 14 g/l Agar (plain, Non-nutrient), 6 g/l NaCl και 150 ml/l απινωδογονωμένου αίματος προβάτου σε αποστειρωμένα πλαστικά σωληνάρια τύπου Falcon και όγκου 15 ml

(Sarstedt, Germany) (Εικόνα 20, Παράρτημα 4.5). Στα καλλιεργητικά υλικά προστέθηκαν φιλτραρισμένα ούρα (5%), τα οποία ενισχύουν την ανάπτυξη του παράσιτου στους 26°C (Singh, 2000).



Εικονα 18: Σχηματική αναπαράσταση της πορείας του βιολογικού δείγματος πριν και μετά από τη φυγοκέντρησή του, μετά από επίστρωσή του σε Histopaque 1077.

Οι καλλιέργειες σε RPMI παρακολουθούνταν καθημερινά σε ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο (x40). Οι καλλιέργειες στο καλλιεργητικό υλικό NNN παρακολουθούνταν κάθε 3 ημέρες με την λήψη μιας σταγόνας από το υλικό, τοποθέτησή της σε αντικειμενοφόρο πλάκα, κάλυψη της σταγόνας με καλυπτρίδα και μικροσκόπηση της σταγόνας σε οπτικό μικροσκόπιο (x40). Τα 10 στελέχη εμφανίστηκαν σε καλλιέργεια μετά από διαφορετικά χρονικά διαστήματα που κυμαίνονταν από 3 - 17 ημέρες (Πίνακας 1). Μετά την ανάπτυξη των καλλιεργειών, τα παράσιτα ανακαλλιεργήθηκαν με την λήψη 1 x 10^{6} παράσιτων από την αρχική καλλιέργεια και προσθήκη φρέσκου καλλιεργητικού υλικού RPMI 1640, σε πλαστικές αποστειρωμένες φιάλες

όγκου 75 cm^3 (Nunc, Denmark). Τα παράσιτα φυλάχτηκαν στους -80 ^oC σε καλλιεργητικό υλικό RPMI 1640 που περιείχε 20% γλυκερόλη (Παράρτημα 4.6), και σε υγρό άζωτο σε καλλιεργητικό υλικό RPMI 1640 που περιείχε 8% DMSO (Παράρτημα 4.7) (Raether and Seidenath, 1977).

Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τις *in vitro* μελέτες, ήταν: 2 ανθρώπινα *L. donovani* (1 «ανθεκτικό» και 1 «ευαίσθητο») και 8 *L. infantum* τα οποία απομονώθηκαν από σκυλιά (4 «ανθεκτικά» και 4 «ευαίσθητα»). Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, ο τόπος και η χρονολογία απομόνωσής τους καθώς και κλινικά και εργαστηριακά τους στοιχεία, αναφέρονται στον Πίνακα 1. Τα στελέχη αυτά βρίσκονται στο Εθνικό Κέντρο αναφοράς για την *Leishmania* (Centre National de Référence des *Leishmania*, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Montpellier, France) όπου έγινε και η τυποποίηση τους βάση της μεθόδου MLEE (Multi-Locus Enzyme Electrophoresis) που αναδεικνύει το Ισοενζυμικό προφίλ του κάθε στελέχους (Πίνακας 1). Τα παράσιτα ξεπαγώθηκαν (Παράρτημα 4.8) και χρησιμοποιήθηκαν για κάθε φάση της μελέτης στον ίδιο αριθμό ανακαλλιέργειας (passage 3 - 4).

Το στέλεχος απομονώθηκε από	Κωδικός Στελέχους	Κωδικός Αναφοράς*	Τύπος Στελέχους (Ισοένζυμο)	Slope (όπως προέκυψε από τις προκαταρκτικές μελέτες)	Ημέρες καλλιέργειας μέχρι την απομόνωση	Κλινικά στοιχεια	Τόπος αιμοληψίας
Άνθρωπο	H1	MHOM/CY/2006/CH34	*L. donovani* MON - 37	1.36	3	Δερματικά έλκη	Αμαριέτη Πάφου Κύπρος
	H2	MHOM/CY/2006/CH33		6	3	Παρατεινόμενο εμπύρετο, Σπληνομεγαλία	Μακούντα Πάφου Κύπρος
Σκύλο	D1	MCAN/CY/2006/CD87	*L. infantum* MON - 1	1.83	6	Δερματικά έλκη	Σούσκιου Πάφου Κύπρος
	D2	MHOM/CY/2005/CD45		0.16	17	Ασυμπτωματικός	Αναρίτα Πάφου Κύπρος
	D3	MHOM/CY/2006/CD80		4.26	3	Ονυχογρύπωση	Μούταλος Πάφου Κύπρος
	D4	MHOM/CY/2006/CD85		3.53	8	Διόγκωση λεμφαδένων	Μαθια Λευκωσίας Κύπρος
	D5	MHOM/CY/2006/CD83		2.36	4	Απώλεια βάρους, απώλεια ενεργητικότητας, διόγκωση λεμφαδένων, ονυχογρύπωση	Γιέρη Λευκωσίας Κύπρος
	D6	MHOM/CY/2005/CD40		1.55	3	Απώλεια βάρους, απώλεια ενεργητικότητας, διόγκωση λεμφαδένων, ονυχογρύπωση, δερματικά έλκη, πυώδεις εκκρίσεις από τα μάτια	Αναρίτα Πάφου Κύπρος
	D7	MHOM/CY/2005/CD57		0.87	3	Απώλεια βάρους, απώλεια ενεργητικότητας, διόγκωση λεμφαδένων, ονυχογρύπωση, δερματικά έλκη	Λευκωσία Κύπρος

* Centre National de Référence des Leishmania, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Montpellier, France

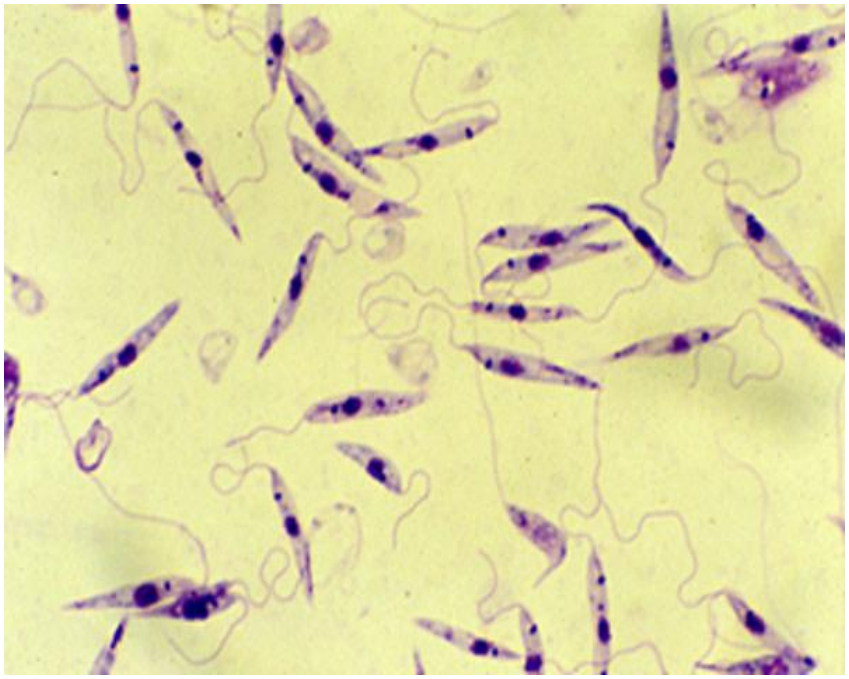
Πίνακας 1: Συγκεντρωτικός πίνακας με στοιχεία που αφορούν στα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν.

Στις *in vitro* μελέτες χρησιμοποιήθηκαν και τα 2 στάδια της ζωής του παράσιτου:

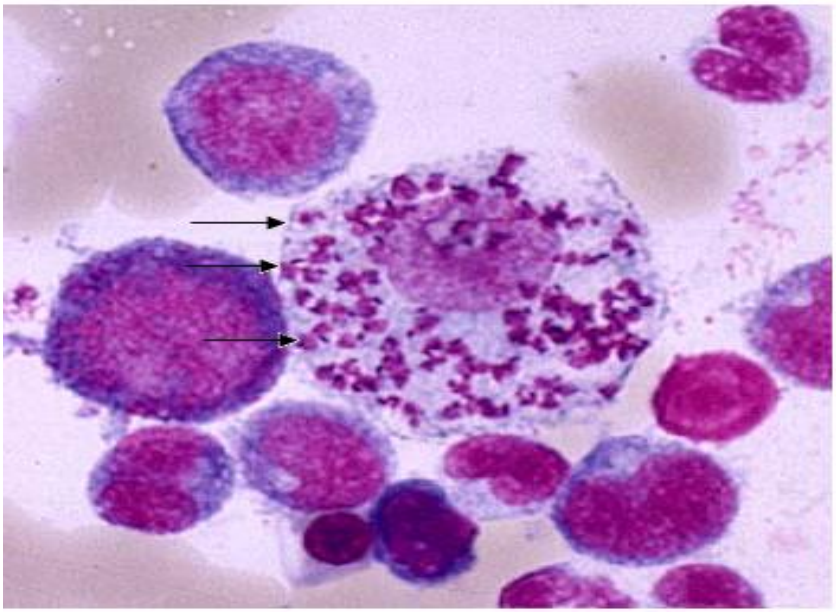
α. Η προμαστιγωτή μορφή, η οποία είναι και η μολυσματική μορφή για τον άνθρωπο. Στην μορφή αυτή το παράσιτο απαντάται μέσα στο σώμα της σκνίπας και στις καλλιέργειες στους 26 ^{o}C, απουσία κυττάρων (Εικόνα 21),

β. ι) Η ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή, η οποία ζει και πολλαπλασιάζεται στο κυτταρόπλασμα μακροφάγων θηλαστικών (Εικόνα 22),

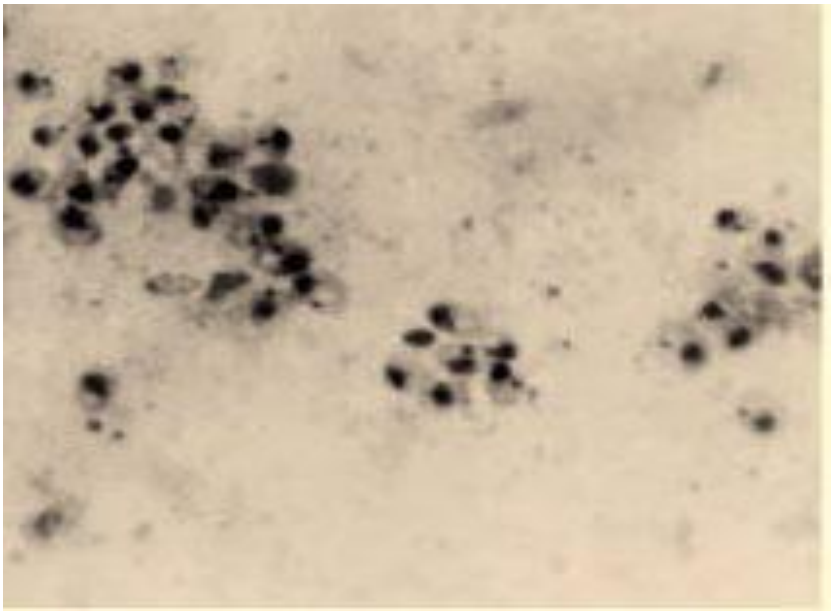
ιι) αλλά επίσης και η αξενική αμαστιγωτή μορφή – μετά από μετασχηματισμό της προμαστιγωτής μορφής, *in vitro,* χωρίς την παρουσία κυττάρων (Εικόνα 23).



Εικόνα 21: Προμαστιγωτή μορφή του παρασίτου στο οπτικό μικροσκόπιο μετά από χρώση May Grunwalds – Giemsa (x100).



Εικόνα 22: Ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή του παρασίτου όπως φαίνεται μετά από χρώση με May Grunwalds – Giemsa σε οπτικό μικροσκόπιο (x100).



Εικόνα 23. Αξενική αμαστιγωτή μορφή του παρασίτου μετά από χρώση με DiffQuick Panoptic σε οπτικό μικροσκόπιο (x100).

2.1.2 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς THP-1

Τα κύτταρα THP-1 (Sigma-Aldrich, UK) χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της μολυσματικής ικανότητας των προμαστιγωτών μορφών των 10 στελεχών *Leishmania, in vitro*. Είναι ανθρώπινα μονοκύτταρα που προήλθαν από αγόρι ηλικίας ενός έτους με οξεία μονοκυτταρική λευχαιμία. Τα κύτταρα αυτά διαθέτουν Fc και C3b υποδοχείς ενώ στερούνται επιφανειακών και κυτταροπλασματικών ανοσοσφαιρινών. Είναι αιωρούμενα (δεν προσκολλώνται στο τοίχωμα της φιάλης που χρησιμοποιείται για την καλλιέργειά τους) και διατηρούνται σε καλλιεργητικό υλικό RPMI 1640 (Παράρτημα 4.4) σε πλαστικές αποστειρωμένες φιάλες όγκου 75 cm^3 στους 37 ^oC, παρουσία 5% CO_2 και σχετικής υγρασίας >80%.

Καλλιέργειες που είχαν ανακαλλιεργηθεί πάνω από 10 φορές (> 10 passage), φυλάσσονταν στους - 80 ^oC σε καλλιεργητικό υλικό RPMI 1640 και 20% γλυκερόλη, και σε υγρό άζωτο σε καλλιεργητικό υλικό RPMI 1640 και 8% DMSO, και ξεπαγώνονταν για χρήση τους στην μελέτη. Τα στάδια παγώματος και ξεπαγώματος των κυττάρων καθώς και οι συνθήκες καλλιέργειάς τους στο εργαστήριο έγιναν σύμφωνα με τις οδηγίες της Sigma-Aldrich και της European Collection of Cell Culture (www.ecacc.org) (Παράρτημα 4.4).

2.2 Εργαστηριακές Δοκιμασίες

2.2.1 Μελέτη της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των προμαστιγωτών μορφών των 10 στελεχών Leishmania

2.2.1.1 Εισαγωγή

Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των προμαστιγωτών μορφών του κάθε στελέχους ορίζει τον αριθμό των μολυσματικών παρασίτων που θα παραχθούν στη σκνίπα και θα μολύνουν το σπονδυλωτό ξενιστή. Το παρασιτικό αυτό φορτίο, καθώς και η μολυσματική του ικανότητα, ενδεχομένως παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιθετικότητα του στελέχους, άρα και στην παθογένειά του. Καμία συγκριτική μελέτη δεν έχει γίνει μέχρι σήμερα για τον ποσοτικό ή/και ποιοτικό προσδιορισμό της πολλαπλασιαστικής ικανότητας στο προμαστιγωτό στάδιο στελεχών της *Leishmania*.

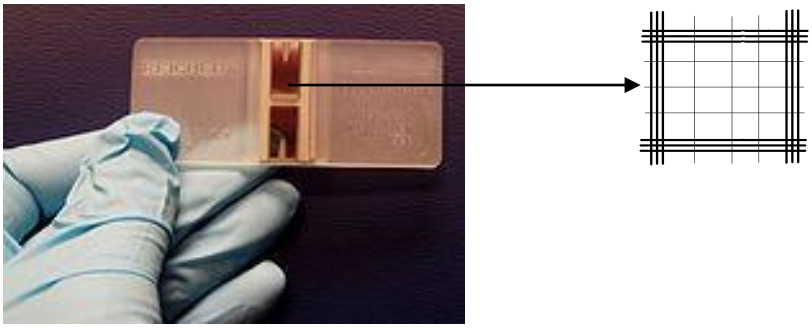
Σκοπός της μελέτης ήταν ο *in vitro* προσδιορισμός και η σύγκριση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των 10 στελεχών *Leishmania,* στο προμαστιγωτό στάδιο, με 2 μεθόδους: α) με τον ποσοτικό προσδιορισμό της αύξησης του αριθμού των προμαστιγωτών μορφών, στην μονοφασική καλλιέργεια κάθε μέρα για 6 ημέρες, που πραγματοποιήθηκε με την καθημερινή μέτρηση του αριθμού των παράσιτων/ml στο μικροσκόπιο με τη χρήση του αιμοκυτταρόμετρου, και β) με τον ποιοτικό προσδιορισμό της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των 10 στελεχών με την χρήση της κυτταρομετρίας ροής και της φθορίζουσας χρωστικής CFSE (Cardoxy-Fluorescein diacetate Succinimidyl Ester). Με την μέθοδο αυτή παρακολουθήθηκε, καθημερινά, η πολλαπλασιαστική πορεία των παράσιτων που απάρτιζαν την καλλιέργεια, για κάθε στέλεχος.

2.2.2 Ποσοτικός προσδιορισμός της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των προμαστιγωτών μορφών των 10 στελεχών με την χρήση της μικροσκοπίας και του **αιμοκυτταρόμετρου.**

2.2.2.1 Εισαγωγή

Το *αιμοκυτταρόμετρο* είναι μια γυάλινη αντικειμενοφόρος πλάκα, με διαβαθμίσεις, (Εικόνα 24) η οποία σχεδιάστηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό κυττάρων του αίματος (ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια). Πλέον χρησιμοποιείται για την μέτρηση και άλλων κυττάρων ή μικροσκοπικών δομών που βρίσκονται σε εναιώρημα. Αποτελείται από δυο κατάλληλα επεξεργασμένες λείες επιφάνειες, σε κάθε μια από τις οποίες διακρίνεται μια διαγράμμιση σε μορφή τετραγωνισμένου πλέγματος, το οποίο αποτελείται από 16 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1 mm (συνεπάγεται ότι το εμβαδόν του τετραγώνου είναι 1 mm^2).

Το καθένα από αυτά τα τετράγωνα ορίζεται από τρεις παράλληλες γραμμές που χρησιμεύουν για τον καθορισμό της θέσης των κυττάρων (το αν αυτά βρίσκονται μέσα ή έξω από το πλέγμα). Το κάθε τετράγωνο εμφανίζει διαβαθμίσεις (χωρίζεται σε μικρότερα τετράγωνα) που εξυπηρετούν στην ευκολότερη μέτρηση των κυττάρων (Εικόνα 25).



Εικόνα 24: Αιμοκυτταρόμετρο. Διακρίνεται το πεδίο όπως εμφανίζεται σε ένα στο μικροσκόπιο (x40).

Το αιμοκυτταρόμετρο εμφανίζει δυο ίσου μεγέθους, λείες, προεξέχουσες επιφάνειες, με επίπεδο παράλληλο με τις διαγραμμισμένες, που ονομάζονται «ράχες», και στις οποίες στηρίζεται η καλυπτρίδα. Οι διαγραμμισμένες επιφάνειες βρίσκονται 0,1 mm χαμηλότερα από τις «ράχες». Μεταξύ της εξωτερικής πλευράς κάθε τετραγωνισμένης γυαλισμένης επιφάνειας και των σημείων όπου στηρίζεται η καλυπτρίδα υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια (αυλάκωση). Στην κοίλη αυτή επιφάνεια τοποθετείται το κυτταρικό εναιώρημα, το οποίο απλώνεται στην τετραγωνισμένη επιφάνεια (Εικόνα 25).

Ο όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος που θα καλύπτει τα 16 τετράγωνα είναι 0,1 mm^3 (1,0 mm^2 x 0,1 mm) ή 1 x 10^{-4} ml. Έτσι, η συγκέντρωση των κυττάρων στο αρχικό εναιώρημα (σε κύτταρα / ml) είναι:

Μέτρηση στο ένα από τα κύρια τετράγωνα x 10^4.

Εικόνα 25: Τοποθέτηση του κυτταρικού εναιωρήματος πριν την μικροσκόπηση για την μέτρηση των κυττάρων ή των παράσιτων.

2.2.2.2 Μεθοδολογία

Η αριθμητική αύξηση του πληθυσμού κάθε στελέχους μελετήθηκε στο προμαστιγωτό στάδιο κατά τη λογαριθμική φάση της ανάπτυξής του (στάδιο κατά το οποίο τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται με γρήγορο ρυθμό). Για το σκοπό αυτό, προμαστιγωτά σε αρχικό πληθυσμό 1 x 10^6 /ml, ανακαλλιεργήθηκαν σε 5 ml καλλιεργητικού υλικού RPMI 1640 (Παράρτημα 4.4) στους 26 ± 1 ^oC, σε στείρες καλλιεργητικές πλάκες 6 πηγαδιών (6 - well plates) (Costar, Corning Incorporation, USA). Το καλλιεργητικό υλικό αντικαθίστατο με φρέσκο υλικό ίσου όγκου, μετά από φυγοκέντρηση των 6 - well plates, κάθε $2^η$ μέρα, σε θερμοκρασία δωματίου στα 700 x g για 10 min, χωρίς φρένο. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις στο μικροσκόπιο με τη χρήση του αιμοκυτταρόμετρου για κάθε στέλεχος (σε 3 επαναλήψεις), κάθε ημέρα, για 6 συνεχόμενες ημέρες, σε θερμοκρασία δωματίου για να προκύψει ένας μέσος όρος παρασίτων/ml/ημέρα στην καλλιέργεια, για κάθε στέλεχος. Για το σκοπό αυτό, 0.1 ml από την καλλιέργεια αραιωνόταν 1/10 σε διάλυμα φορμαλδεΰδης 10% (Scharlau Chemie S.A., Spain) σε PBS, pH 7.2, προκειμένου να ακινητοποιηθούν τα παράσιτα και να γίνει ευκολότερη η μέτρησή τους, ενώ στο ήδη αραιωμένο με την φορμαλδεΰδη δείγμα πραγματοποιήθηκε επιπλέον αραίωση ½ με Trypan Blue (0.4 mg /ml). Το Trypan Blue, είναι μια χρωστική η οποία ενσωματώνεται στις μεμβράνες των νεκρών και αποπτωτικών κυττάρων προκειμένου να ληφθούν υπόψη στις μετρήσεις μόνο τα ζωντανά.

Ο συνολικός αριθμός των προμαστιγωτών μορφών στην καλλιέργεια με τη χρήση του αιμοκυτταρόμετρου υπολογιζόταν σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

Αριθμός κυττάρων /ml = Αριθμός κυττάρων (στα 16 τετράγωνα του αιμοκυτταρόμετρου) **x 10** (η αραίωση 1/10 που έγινε με την φορμαλδεΰδη 10%) **x 2** (η αραίωση που έγινε με το Trypan Blue) **x 10^4** (Σταθερή τιμή για το αιμοκυτταρόμετρο που αντιστοιχεί στον όγκο του κυτταρικού διαλύματος που καλύπτουν τα 16 τετράγωνα και είναι ίσος με 0.1 mm^3)

2.2.2.3 Αποτελέσματα και Συζήτηση

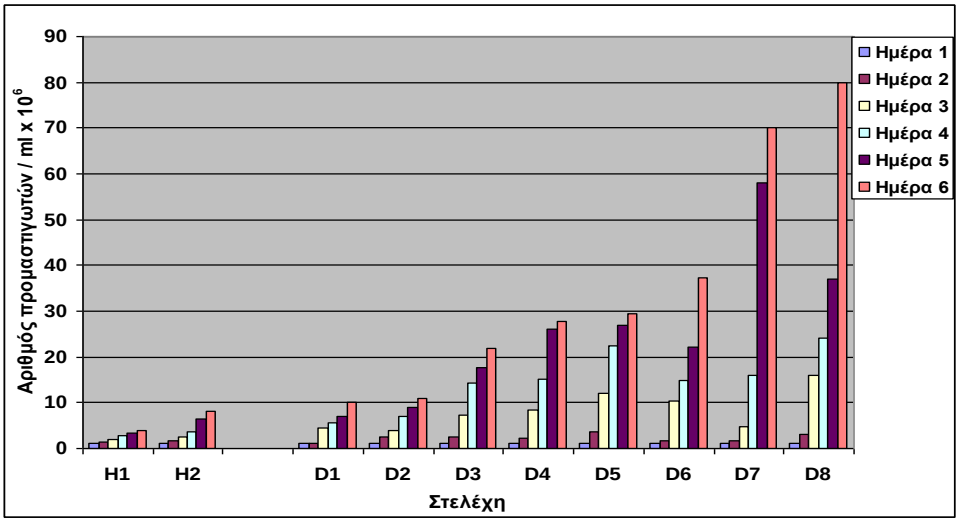
Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού, ο οποίος προσδιορίστηκε ποσοτικά με την χρήση του αιμοκυτταρόμετρου, ήταν διαφορετικός σε κάθε ένα από τα 10 στελέχη. Το μέγεθος του πληθυσμού, μετά από 6 ημέρες καλλιέργειας στους 26 ^oC ±1, από 1 x 10^6 παράσιτα /ml αρχικό πληθυσμό, έφτασε στα 4 x 10^6 έως τα 80 x10^6 παράσιτα /ml (Πίνακας 2, Γράφημα 1). Τα δύο στελέχη *L. donovani* είχαν το χαμηλότερο τελικό πληθυσμό, με 4 x 10^6 και 8 x 10^6 παράσιτα /ml αντίστοιχα.

Μετά από 6 ημέρες καλλιέργειας, ο αριθμός των προμαστιγωτών μορφών αυξήθηκε μεταξύ 300% και 7900% με τα στελέχη *L. donovani* να έχουν τη χαμηλότερη αύξηση (300% και 700% αντίστοιχα) (Πίνακας 2, Γράφημα 1). Ο μέσος όρος του ρυθμού πολλαπλασιασμού των στελεχών για τις 6 ημέρες κυμάνθηκε μεταξύ 32.35% και 168.08% με τα δύο στελέχη *L. donovani* να έχουν τους χαμηλότερους μέσους όρους (32.35% and 52.56% αντίστοιχα) (Πίνακας 3, Γράφημα 2).

Προκειμένου να μειωθούν στο ελάχιστο οι παράγοντες που μπορεί να επιβαρύνουν την πορεία της ανάπτυξης των παράσιτων για τις 6 ημέρες της καλλιέργειας, όπως η μείωση των διαθέσιμων θρεπτικών συστατικών και η ελάττωση του pH λόγω συσσώρευσης τοξινών, το καλλιεργητικό υλικό αντικαθίσταντω με φρέσκο κάθε δεύτερη ημέρα. Ο αριθμός των νεκρών παράσιτων, για όλα τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, κυμάνθηκε μεταξύ 0.3% και 2%, ενώ όλα τα στελέχη χρησιμοποιήθηκαν κατά την 3η - 4η ανακαλλιέργεια μετά από ξεπάγωμα από τους – 80 ^{o}C.

	Αριθμός προμαστιγωτών ανά ml x 10^5						Αύξηση του πληθυσμού κατά την καλλιέργεια 6 ημερών (%)
	Ημέρες καλλιέργειας						
Στέλεχος	1	2	3	4	5	6	
H1	1	1,4	2	2,7	3,5	4	300,00%
H2	1	1,6	2,4	3,6	6,4	8	700,00%
D1	1	1,2	4,4	5,5	7,1	10,1	910,00%
D2	1	2,4	4	7	9,1	11	1000,00%
D3	1	2,4	7,2	14,4	17,8	22	2100,00%
D4	1	2,3	8,4	15,2	26	27,8	2680,00%
D5	1	3,6	12	22,4	27	29,5	2850,00%
D6	1	1,6	10,4	14,8	22,1	37,2	3620,00%
D7	1	1,7	4,8	16	58	70	6900,00%
D8	1	3,2	16	24	37	80	7900,00%

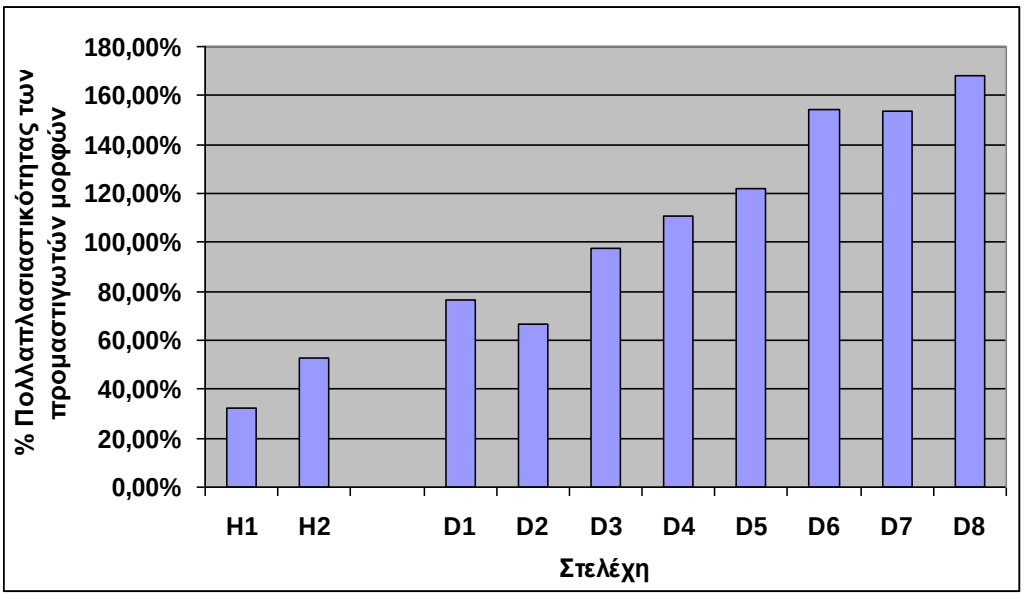
Πίνακας 2: Ο αριθμός προμαστιγωτών ανά ml καλλιέργειας σε καλλιεργητικό υλικο RPMI 1640 στους 26 ±1 ^{o}C, των 10 στελεχών, όπως αυτός προέκυπτε κάθε ημέρα κατά τη διάρκεια 6 ημερών καλλιέργειας και μέτρηση με την χρήση του αιμοκυτταρόμετρου.



Γράφημα 1: Ο αριθμός προμαστιγωτών ανά ml καλλιέργειας σε καλλιεργητικό υλικο RPMI 1640 στους 26 ±1 ^{o}C, των 10 στελεχών, όπως αυτός προέκυπτε κάθε ημέρα, κατά τη διάρκεια 6 ημερών καλλιέργειας και μετά από μέτρηση με την χρήση του αιμοκυτταρόμετρου.

Στέλεχος	Ημέρα 1-2	Ημέρα 2-3	Ημέρα 3-4	Ημέρα 4-5	Ημέρα 5-6	Μέσος όρος % μεταξύ των 6 ημερών
H1	40,00%	42,86%	35,00%	29,63%	14,29%	32,35%
H2	60,00%	50,00%	50,00%	77,78%	25,00%	52,56%
D1	20,00%	266,67%	25,00%	29,09%	42,25%	76,60%
D2	140,00%	66,67%	75,00%	30,00%	20,88%	66,51%
D3	140,00%	200,00%	100,00%	23,61%	23,60%	97,44%
D4	130,00%	265,22%	80,95%	71,05%	6,92%	110,83%
D5	260,00%	233,33%	86,67%	20,54%	9,26%	121,96%
D6	60,00%	550,00%	42,31%	49,32%	68,33%	153,99%
D7	70,00%	182,35%	233,33%	262,50%	20,69%	153,78%
D8	220,00%	400,00%	50,00%	54,17%	116,22%	168,08%

Πίνακας 3: Ο ποσοστιαίος ρυθμός πολλαπλασιασμού του κάθε στελέχους, ανά ml καλλιέργειας σε καλλιεργητικό υλικο RPMI 1640 στους 26 ±1 ^{o}C, όπως αυτός προέκυπτε κάθε ημέρα κατά τη διάρκεια 6 ημερών καλλιέργειας και μετά από μέτρηση με την χρήση του αιμοκυτταρόμετρου.

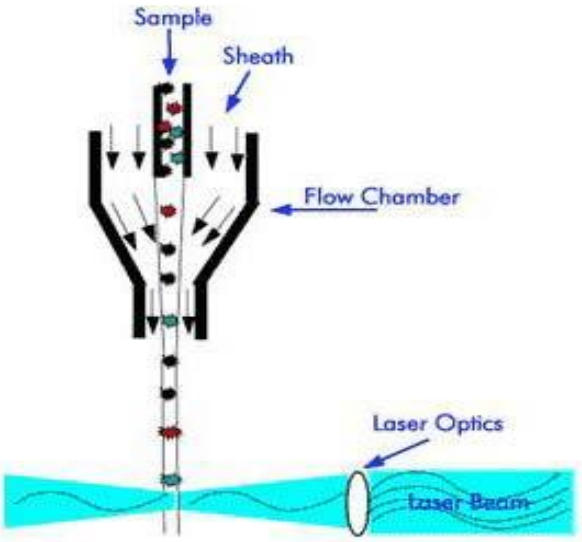


Γράφημα 2: Μέσος όρος του ποσοστιαίου ρυθμού πολλαπλασιασμού των προμαστιγωτών μορφών των 10 στελεχών όπως αυτός προέκυψε μετά απο 6 ημέρες καλλιέργειας σε καλλιεργητικό υλικο RPMI 1640 στους 26 ±1 ^{o}C.

2.2.3 Ποιοτικός προσδιορισμός της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των προμαστιγωτών μορφών των 10 στελεχών με την χρήση της κυτταρομετρίας ροής και της φθορίζουσας CFSE

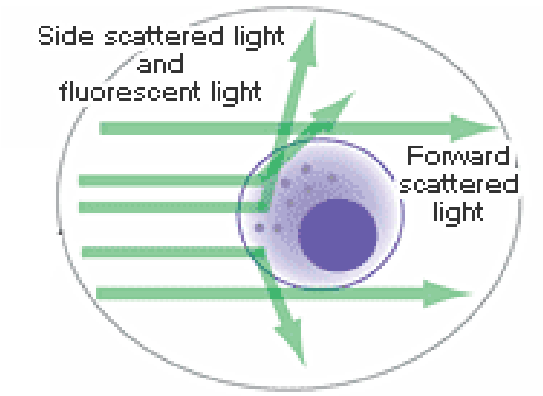
2.2.3.1 Εισαγωγή

Η κυτταρομετρία ροής είναι η τεχνολογία που επιτρέπει την ταυτόχρονη μέτρηση πολλαπλών φυσικοχημικών χαρακτηριστικών ενός κυττάρου ή άλλου στοιχείου (π.χ. κυτταρικών οργανιδίων, πρωτεϊνών, βακτηριδίων, πρωτόζωων κλπ) καθώς αυτό βρίσκεται σε ροή και περιβάλλεται από ένα σύστημα περιρροής (Εικόνα 26) και προσκρούει σε δέσμη ακτίνων LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) (Marti, 2001; Riley, 2002).



Εικόνα 26: Διάταξη της κυψελίδας ροής σε κυτταρομετρητή ροής. Διακρίνεται η κεντρική ροή του δείγματος (sample), η περιβάλλουσα ροή (sheath), η προερχόμενη από LASER φωτεινή δέσμη ακτινοβολίας και η σκέδαση της ακτινοβολίας (LASER beam) μετά από πρόσπτωση σε ένα κύτταρο.

Η ισχύς της δέσμης των LASER στους κυτταρομετρητές ροής κυμαίνεται από 0,5 mW – 5,0 W, ενώ το μήκος κύματος είναι 400 - 600 nm. Στο σημείο αυτό υπάρχει ένα σύστημα ανιχνευτών (βολταϊκές φωτοδίοδοι) που συλλέγουν την απόκλιση της φωτεινής δέσμης που προκαλείται από τη διέλευση στο κύτταρο. Έτσι έχουμε πληροφορίες για το μέγεθος του κυττάρου με τον ανιχνευτή απόκλισης (FSC – Forward Scatter) και για την κυτταροπλασματική κοκκίωση με τον ανιχνευτή κάθετης απόκλισης (SSC – Side Scatter) (Εικόνα 27).



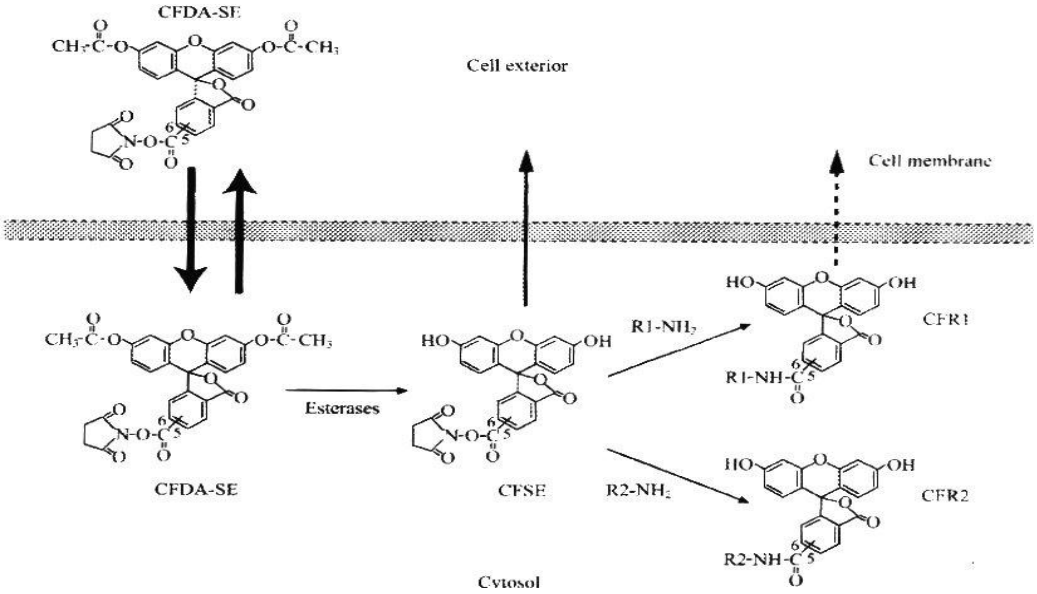
Εικόνα 27: Η απόκλιση της δέσμης LASER κατά την πρόσπτωσή της στο κύτταρο.

Η εφαρμογή των μεθόδων ανοσοφθορισμού για τον εντοπισμό ιστικών και κυτταρικών αντιγόνων, χρονολογείται κατά την δεκαετία του ’50 και του ’60, ενώ κατά την δεκαετία του ’70 άρχισαν να εφαρμόζονται και στην κυτταρομετρία ροής που είχε αναπτυχθεί σταδιακά με διάφορες ανακαλύψεις σε ποικίλες τεχνολογίες (Moldavan, 1934; Coulter, 1956). Η κυτταρομετρία ροής αναπτύχθηκε ουσιαστικά για να ενισχύσει την μικροσκοπική ανάλυση των κυττάρων με την χρήση φθορίζουσων ιχνηθετών και κατάλληλων

αντισωμάτων. Αρχικά αναπτύχθηκε με κύριο σκοπό τον κυτταρικό διαχωρισμό στον οποίο οφείλει και το όνομα FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) (Marti, 2001; Riley, 2002). Σήμερα αποτελεί ένα διαγνωστικό εργαλείο στα κλινικά εργαστήρια αλλά και μια εξαιρετικά χρήσιμη τεχνική στα ερευνητικά εργαστήρια.

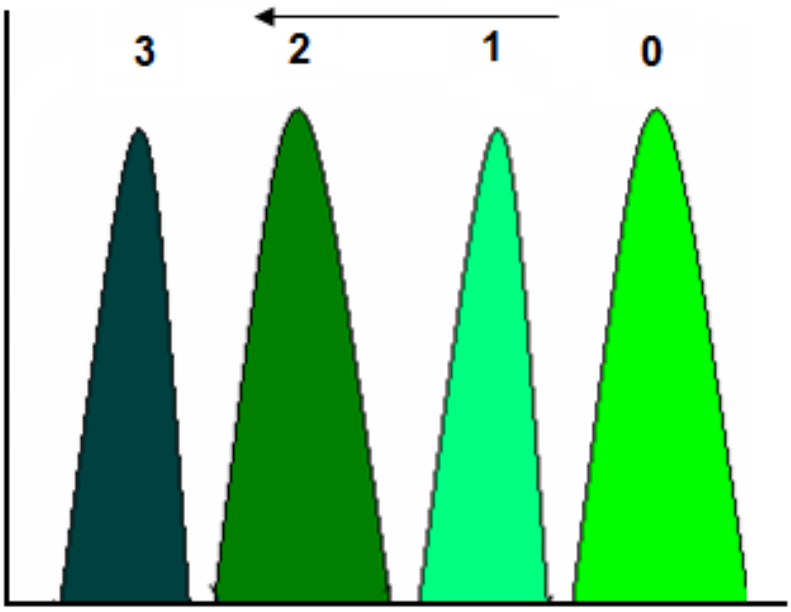
Η CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) είναι μια χρωστική η οποία έχει την ιδιότητα να προσκολλάται στην κυτταρική μεμβράνη και να επιτρέπει τη μελέτη ζωντανών κυττάρων με την χρήση της κυτταρομετρίας ροής.

Αρχικά, η CFDA - SE (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester), ένα λιποφιλικό μόριο το οποίο φθορίζει στο ελάχιστο, μεταφέρεται παθητικά εντός των κυττάρων (Lyons, 2000). Εκεί, ο εστέρας διαχωρίζει τις ακετυλομάδες δημιουργώντας την CFSE και τότε το μόριο φθορίζει στο μέγιστο (Graziano, 1998) (Εικόνα 28).



Εικόνα 28: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού που έχει σαν αποτέλεσμα τον φθορισμό των κυττάρων μετά από χρώση με CFDA-SE (Parish, 1999).

Η χρωστική αυτή έχει την ιδιότητα να μην μεταφέρεται στα γειτονικά κύτταρα αλλά να κατακρατείται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου στο οποίο προσδέθηκε χωρίς να επηρεάζει την λειτουργία του, ενώ σε κάθε κυτταρική διαίρεση, η σχετική ένταση της χρωστικής μειώνεται κατά 50%. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την μεταφορά του φθορισμού, μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση, στο αμέσως επόμενο αριστερό κανάλι, κάθε ένα από τα οποία αντιπροσωπεύει τον αριθμό των γενεών (1 κανάλι = 1 γενεά = ½ έντασης φθορισμού από το προηγούμενο) (Εικόνα 29) (http://facs.stanford.edu/sff/about-facs.html). Έτσι, είναι δυνατή η παρακολούθηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των μελών της καλλιέργειας που προσδίδει φθορισμό σε κάθε κανάλι, μέχρι και 10 γενεές, όταν η ένταση φθορισμού δεν είναι πλέον ανιχνεύσιμη.



Εικόνα 29: Μείωση της σχετικής έντασης του φθορισμού κατά 50% σε κάθε κυτταρική διαίρεση και μεταφορά του στο αμέσως επόμενο αριστερό κανάλι της κυτταρομετρίας ροής.

2.2.3.2 Μεθοδολογία

Ο ρυθμός ανάπτυξης του πληθυσμού κάθε στελέχους μελετήθηκε στο προμαστιγωτό στάδιο, κατά την λογαριθμική φάση της ανάπτυξής τους, παράλληλα με την ποσοτική ανάλυση (Ενότητα 2.2.2). Για το σκοπό αυτό, προμαστιγωτά, σε αρχικό πληθυσμό 1 x 10^6 /ml, ξεπλύθηκαν με PBS, pH 7.2, για την απομάκρυνση του καλλιεργητικού υλικού RPMI 1640 (Παράρτημα 4.4) το οποίο περιείχε 10% FBS, η παρουσία του οποίου έχει σαν αποτέλεσμα την απενεργοποίηση της χρωστικής. Στην συνέχεια, τα παράσιτα επωάστηκαν σε 10 μM CFSE (Molecular Probes, Eugene, OR) για 5 min, σε θερμοκρασία 25 ^oC ±1. Μετά την επώαση, η αντίδραση τερματίστηκε με φυγοκέντρηση των παράσιτων και ανασύσταση του ιζήματος σε FBS για την απενεργοποίηση της μη δεσμευμένης χρωστικής (Smirlis, 2006). Τα παράσιτα ξεπλύθηκαν 2 φορές με PBS, pH 7.2, και διατηρήθηκαν σε 5 ml καλλιεργητικού υλικού RPMI 1640 στους 26 ^oC ±1, σε στείρα 6 - well plates. Το καλλιεργητικό υλικό αντικαθίστατο, μετά από φυγοκέντρηση των παράσιτων στα 6 - well plates, με φρέσκο υλικό ίσου όγκου κάθε $2^η$ μέρα, μετά από φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου, στα 700 x g, για 10 min, χωρίς φρένο. Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού του κάθε στελέχους υπολογίστηκε με την κυτταρομετρία ροής (Epics Elite Coulter, Florida, USA), όπου μελετήθηκαν 100,000 παράσιτα (σε 3 επαναλήψεις) για κάθε στέλεχος, κάθε ημέρα, για 6 συνεχόμενες ημέρες, σε θερμοκρασία δωματίου, και προέκυψε ένας μέσος όρος της έντασης του φθορισμού για κάθε κανάλι, για κάθε στέλεχος. Με σκοπό την διαφοροποίηση των νεκρών και αποπτωτικών κυττάρων και την μέτρηση μόνο των ζωντανών, 2 μg/ml propidium iodide (PI) προστίθονταν στο εναιώρημα των παράσιτων πριν την ανάλυσή τους με την κυτταρομετρία ροής

(Kamau, 2000). Η δημιουργία των τρισδιάστατων (3D) γραφημάτων πραγματοποιήθηκε με το WinMDI 2.8.

Παράλληλα, έγιναν μετρήσεις του αριθμού των προμαστιγωτών από το κάθε well, στο μικροσκόπιο, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.2.2, για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των στελεχών.

2.2.3.3 Αποτελέσματα και Συζήτηση

Ο αριθμός των ζωντανών, μη αποπτωτικών, παράσιτων που διαιρούνταν κάθε ημέρα ήταν διαφορετικός στα 10 στελέχη, όπως υπολογίστηκε μετά τη χρώση με CFSE και την ανάλυση με την κυτταρομετρία ροής. Η κατανομή της έντασης του φθορισμού στα 5 κανάλια, σύμφωνα με την ένταση του φθορισμού των παράσιτων, ήταν κατά 50% ασθενέστερη σε κάθε νέα θυγατρική γενεά/κανάλι. Προκειμένου να μειωθούν στο ελάχιστο οι παράγοντες που μπορεί να επιβαρύνουν την πορεία της ανάπτυξης των παράσιτων για τις 6 ημέρες της καλλιέργειας, όπως η μείωση των διαθέσιμων θρεπτικών συστατικών και η ελάττωση του pH λόγω συσσώρευσης τοξινών, το καλλιεργητικό υλικό αντικαθίσταντω με φρέσκο κάθε δεύτερη ημέρα.

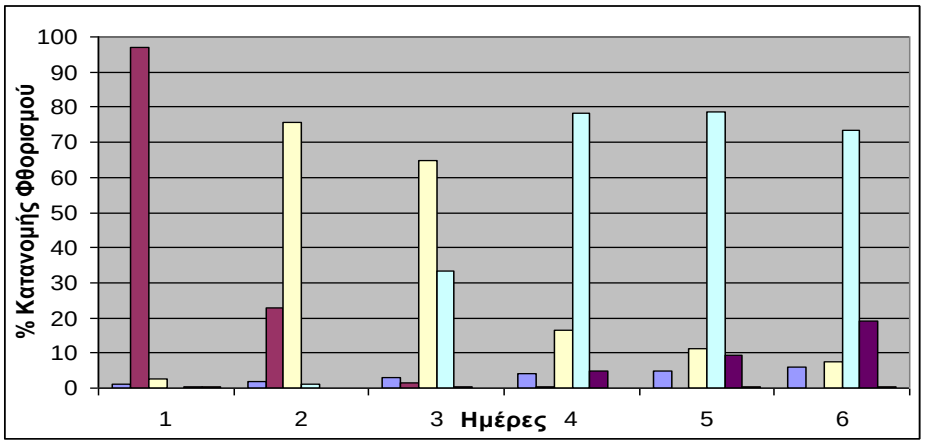
Κατά την $6^{η}$ ημέρα του πειράματος, το ποσοστό των παράσιτων που διαιρέθηκε τουλάχιστον 5 φορές (ο φθορισμός έφτασε στο $5^{ο}$ κανάλι), κυμάνθηκε μεταξύ 0,3% και 53,5%. Τα στελέχη *L. donovani* είχαν το μικρότερο ποσοστό παράσιτων που πολλαπλασιάστηκαν τουλάχιστον 5 φορές (0,3% και 1,9%) (Πίνακας 4, Ενδεικτικά Γραφήματα 3 - 5, 6 – 8, Όλοι οι πίνακες και τα γραφήματα που αφορούν στα αποτελέσματα και των 10

στελεχών παρουσιάζονται στα Παραρτήματα 5.1 – 5.3). Στις 6 ημέρες καλλιέργειας που ακολούθησαν την επώαση των παράσιτων με την φθορίζουσα χρωστική CFSE, ένα ποσοστό 0,1% και 4,1% των παράσιτων από τα 2 στελέχη *L. donovani* δεν έκανε ούτε μία κυτταρική διαίρεση, ενώ όλα τα μέλη των πληθυσμών των διαφορετικών στελεχών *L. infantum* χρειάστηκαν 2 ημέρες προκειμένου όλα τα μέλη του πληθυσμού να υποστούν τουλάχιστον μια διαίρεση ($3^{η}$ ημέρα του πειράματος) (Πίνακας 4, Ενδεικτικά Γραφήματα 3 - 5, 6 – 8, Όλοι οι πίνακες και τα γραφήματα που αφορούν στα αποτελέσματα και των 10 στελεχών παρουσιάζονται στα Παραρτήματα 5.1 – 5.3).

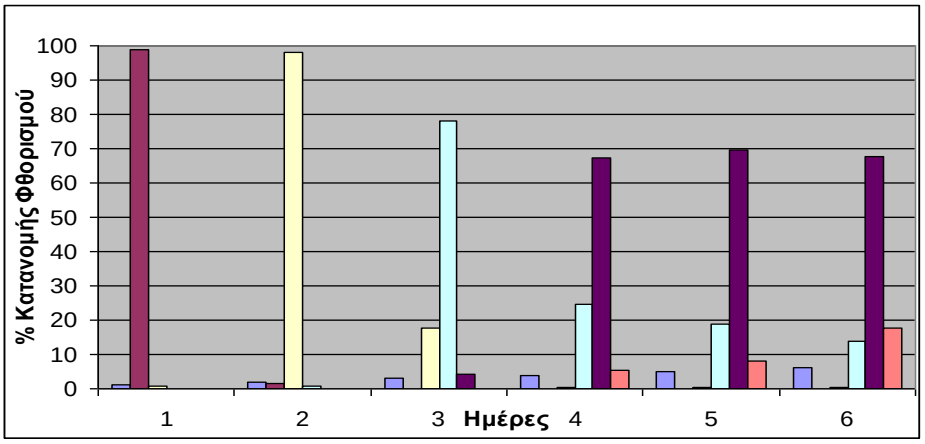
Παράλληλα με την χρήση της κυτταρομετρίας ροής, οι προμαστιγωτές μορφές σε κάθε καλλιέργεια μετρήθηκαν και με το αιμοκυτταρόμετρο, κάθε ημέρα για τις 6 ημέρες του πειράματος και τα αποτελέσματα ήταν συμβατά με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση του ποσοτικού προσδιορισμού (Ενότητα 2.2.2) καθώς και με τις μετρήσεις με την κυτταρομετρία ροής. Ο αριθμός των νεκρών παράσιτων για όλα τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν κυμάνθηκε όπως και κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό της πολλαπλασιαστικής ικανότητας (Ενότητα 2.2.2) μεταξύ 0.3% και 2% ενώ όλα τα στελέχη χρησιμοποιήθηκαν κατά την $3^{η}$ - $4^{η}$ ανακαλλιέργεια.

% Κατανομής Φθορισμού															
	Στέλεχος H1					Στέλεχος D3					Στέλεχος D8				
	Channels														
Ημέρα	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	97	2,6	0,1	0,2	0,2	98,9	0,9	0	0,1	0,1	98,7	0,5	0	0,1	0,1
2	22,9	75,7	1,2	0,1	0,1	1,4	97,9	0,6	0	0	3,5	60,6	31,6	3,9	0,4
3	1,5	64,9	33,3	0,2	0,1	0	17,8	77,9	4,1	0,1	0,4	3,4	81,6	14,2	0,5
4	0,3	16,4	78,2	5	0,1	0	0,4	24,6	67,2	5,3	0,1	0,3	13,4	72	14,2
5	0,1	11,4	78,8	9,4	0,3	0	0,2	19	69,8	8	0	0,2	5	73,8	15,6
6	0,1	7,4	73,3	19	0,3	0	0,4	14	67,8	17,8	0	0,1	1	45,5	53,5

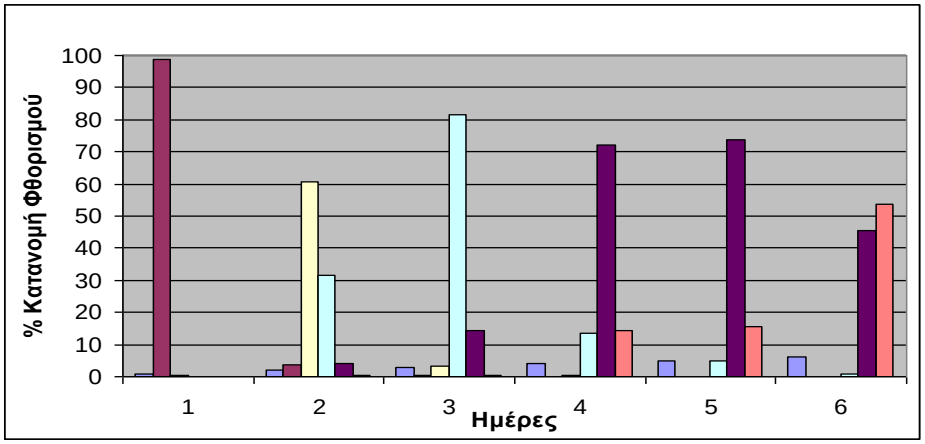
Πινάκας 4: Ποσοστιαία μεταφορά της έντασης του φθορισμού των προμαστιγωτών μορφών μεταξύ των καναλιών 1 – 5, όπως προέκυψαν στην κυτταρομετρία ροής. Παρουσιάζονται τα ποσοστά 3 αντιπροσωπευτικών στελεχών με τον ελάχιστο (H1), μεσαίο (D3) και μέγιστο ρυθμό πολλαπλασιασμού (D8). Όλοι οι πίνακες που αφορούν στα αποτελέσματα και των 10 στελεχών παρουσιάζονται στο Παράρτημα 5.1.



H1

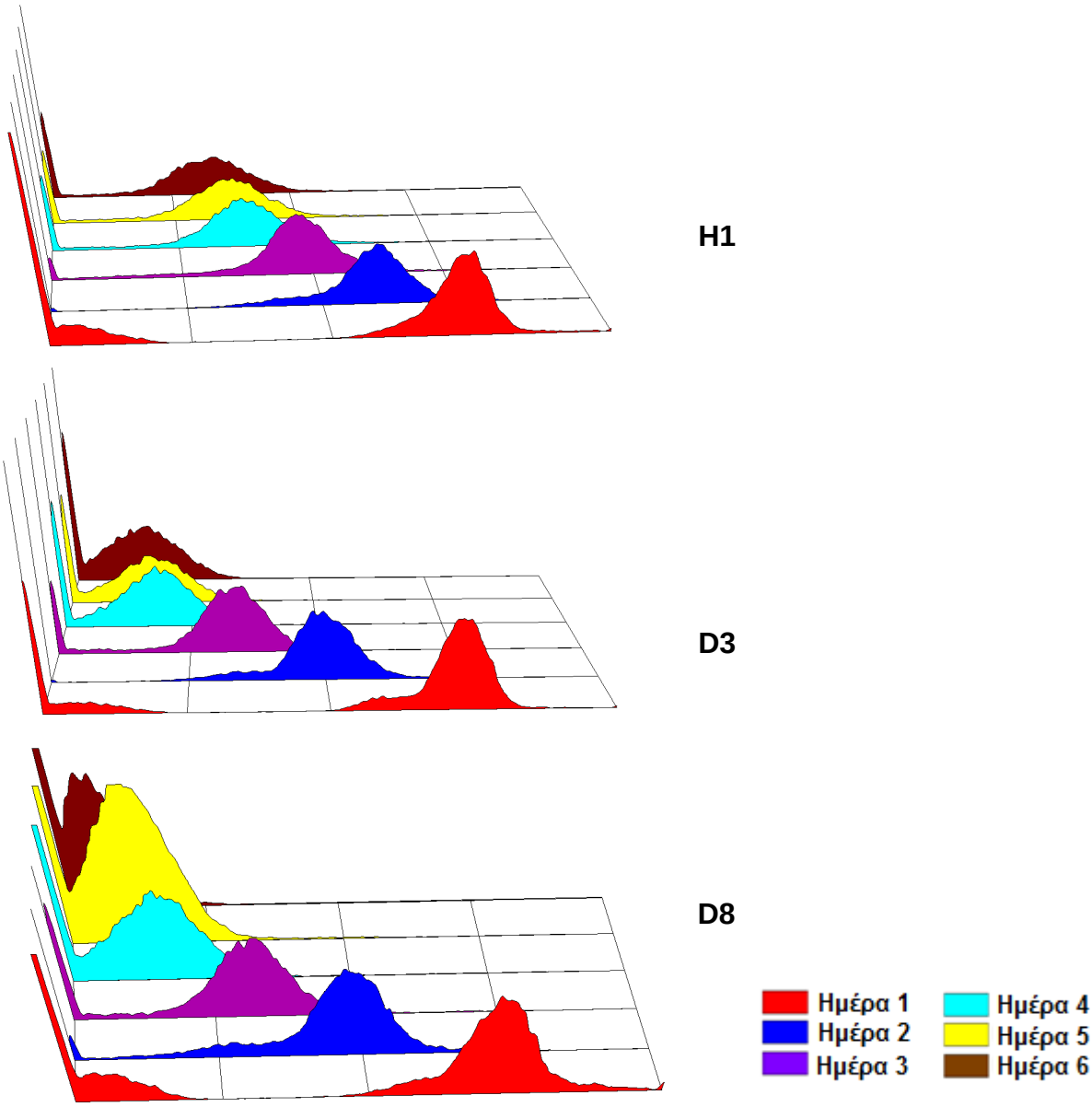


D3



D8

Γραφήματα 3 - 5: Ποσοστιαία μεταφορά της έντασης του φθορισμού των προμαστιγωτών μορφών μεταξύ των καναλιών 1 – 5, όπως προέκυψαν στην κυτταρομετρία ροής. Παρουσιάζονται τα ποσοστά 3 αντιπροσωπευτικών στελεχών με τον ελάχιστο (H1), μεσαίο (D3) και μέγιστο ρυθμό πολλαπλασιασμού (D8). Όλα τα γραφήματα που αφορούν στα αποτελέσματα και των 10 στελεχών παρουσιάζονται στο Παράρτημα 5.2.



Γραφήματα 6 - 8: Τρισδιάστατα (3D) ιστογράμματα μονής παραμέτρου που δείχνουν την ποσοστιαία μεταφορά της έντασης του φθορισμού των προμαστιγωτών μορφών μεταξύ των καναλιών 1 – 5, όπως προέκυψαν στην κυτταρομετρία ροής. Παρουσιάζονται τα ποσοστά 3 αντιπροσωπευτικών στελεχών με τον ελάχιστο (H1), μεσαίο (D3) και μέγιστο ρυθμό πολλαπλασιασμού (D8). Όλα τα γραφήματα που αφορούν στα αποτελέσματα και των 10 στελεχών παρουσιάζονται στο Παράρτημα 5.3.

2.2.4 Μελέτη της μολυσματικής ικανότητας των προμαστιγωτών μορφών των 10 στελεχών in vitro

2.2.4.1 Εισαγωγή

Η λεϊσμανίαση μεταδίδεται με έντομα-φορείς. Οι δύο ξενιστές, ο ασπόνδυλος και ο σπονδυλωτός, επιδρούν στον κύκλο ζωής του παράσιτου. Κατά την διάρκεια της ζωής στο σώμα του ασπόνδυλου ξενιστή, το παράσιτο μετατρέπεται σε μετακυκλική προμαστιγωτή μορφή. Η μορφή αυτή είναι η μολυσματική, η οποία μεταδίδεται παθητικά στο δέρμα του επόμενου σπονδυλωτού ξενιστή κατά την διάρκεια απομύζησης αίματος από το αιματοφάγο έντομο. Από εκεί, το παράσιτο εισέρχεται στα μακροφάγα με την διαδικασία της φαγοκυττάρωσης. Τα κύτταρα αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του παράσιτου μέσα στον ξενιστή και στην επιτυχή αποίκισή του. Ο σκοπός της μελέτης ήταν η σύγκριση της *in vitro* ικανότητας των προμαστιγωτών μορφών των 10 υπο μελέτη στελεχών του παράσιτου *Leishmania* να μολύνουν και να πολλαπλασιαστούν μέσα σε ανθρώπινα μακροφάγα.

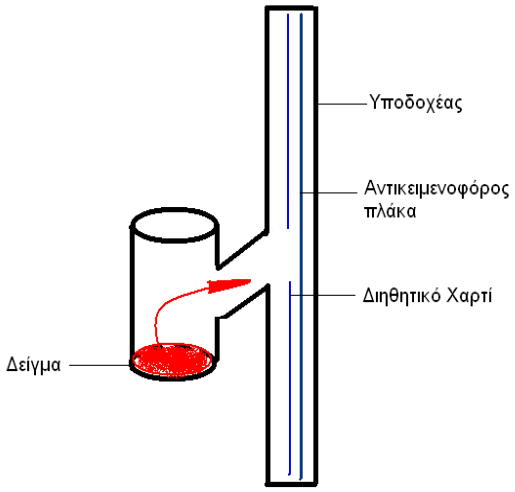
2.2.4.2 Μεθοδολογία

Για τη μελέτη της μολυσματικής ικανότητας του κάθε στελέχους χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη κυτταρική σειρά THP-1 και οι προμαστιγωτές μορφές του παράσιτου κατά την στατική φάση φάση της ανάπτυξής τους, στάδιο κατά το οποίο τα παράσιτα είναι πιο μολυσματικά. Η μόλυνση πραγματοποιήθηκε με την επώαση των μακροφάγων (5×10^5 /ml) με τα παράσιτα ($2,5 \times 10^6$ / ml) σε αναλογία 1:5, σε πλαστικές αποστειρωμένες

φιάλες όγκου 75 cm^3 (Nunc, Denmark) σε 10 ml καλλιεργητικό υλικό RPMI 1640 (Παράρτημα 4.4). Η επώαση των παράσιτων με τα THP-1 κύτταρα διήρκησε 3 hr στους 37 ^oC, παρουσία 5% CO_2 και σχετικής υγρασίας >80%.

Η καλλιέργεια των κυττάρων, μετά από επώασή τους με τα παράσιτα, επιστρώθηκε σε ίσο όγκο Histopaque 1077 (Παράρτημα 4.9) και φυγοκεντρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου σε 800 x g, για 30 min, χωρίς φρένο, προκειμένου να απομακρυνθούν οι εξωκυττάριες μορφές του παράσιτου (διαδικασία όπως περιγράφεται και στην Ενότητα 2.1.1). Στην συνέχεια, ο δακτύλιος που συλλέχθηκε και αποτελούταν από τα THP-1 κύτταρα (μολυσμένα και μη) ξεπλύθηκε δυο φορές με PBS, pH 7.2, και τοποθετήθηκε στο καλλιεργητικό υλικό RPMI 1640 μετά από προσαρμογή του πληθυσμού των κυττάρων σε 1 x 10^6 /ml. Τα κύτταρα αυτά επωάστηκαν για 24 hr στους 37 ^oC, παρουσία 5% CO_2 και σχετικής υγρασίας >80% προκειμένου να δοθεί χρόνος στις αμαστιγωτές μορφές του παράσιτου να πολλαπλασιαστούν. Ακολούθως, ένας αριθμός κυττάρων (0.1 x 10^6) τοποθετήθηκε σε ειδικούς υποδοχείς κυτταροφυγόκεντρου, οι οποίοι διέθεταν μια αντικειμενοφόρο πλάκα, πάνω στην οποία θα πραγματοποιούνταν η αποτύπωση των κυττάρων, και ένα διηθητικό χαρτί για την απορρόφηση του επιπλέον καλλιεργητικού υλικού (Εικόνα 30). Οι ειδικοί υποδοχείς φυγοκεντρήθηκαν στη κυτταροφυγόκεντρο, στα 100 x g, για 2 min. Τα αποτυπώματα των κυττάρων πάνω στις αντικειμενοφόρους πλάκες των υποδοχέων χρωματίστηκαν με την χρωστική Diff Quick Panoptic (QCA, Quimica Clinica Aplicada, S.A., Amposta, Spain, Παράρτημα 4.10) και ακολούθησε καταμέτρηση του αριθμού των μολυσμένων κυττάρων, καθώς και του αριθμού των αμαστιγωτών μορφών του παράσιτου σε κάθε μολυσμένο

κύτταρο. Για το σκοπό αυτό παρατηρήθηκαν, τυχαία, 100 κύτταρα σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα (3 αντικειμενοφόρες πλάκες για κάθε στέλεχος), και από τον μέσο όρο του αριθμού των μολυσμένων κυττάρων για τις 3 αντικειμενοφόρες πλάκες προέκυψε το ποσοστό μόλυνσης για το κάθε στέλεχος. Ο προσδιορισμός του αριθμού των αμαστιγωτών που αντιστοιχούν σε κάθε κύτταρο προέκυψε μετά από την καταμέτρησή των αμαστιγωτών στα 100 κύτταρα (όπως περιγράφεται ανωτέρω, σε 3 επαναλήψεις) και διαίρεση του αριθμού των παράσιτων με το 100 (τα κύτταρα στα οποία έγιναν οι μετρήσεις). Η μέτρηση έγινε με την χρήση του οπτικού μικροσκόπιου, με τον καταδυτικό φακό (x100) και την χρήση κεδρέλαιου.



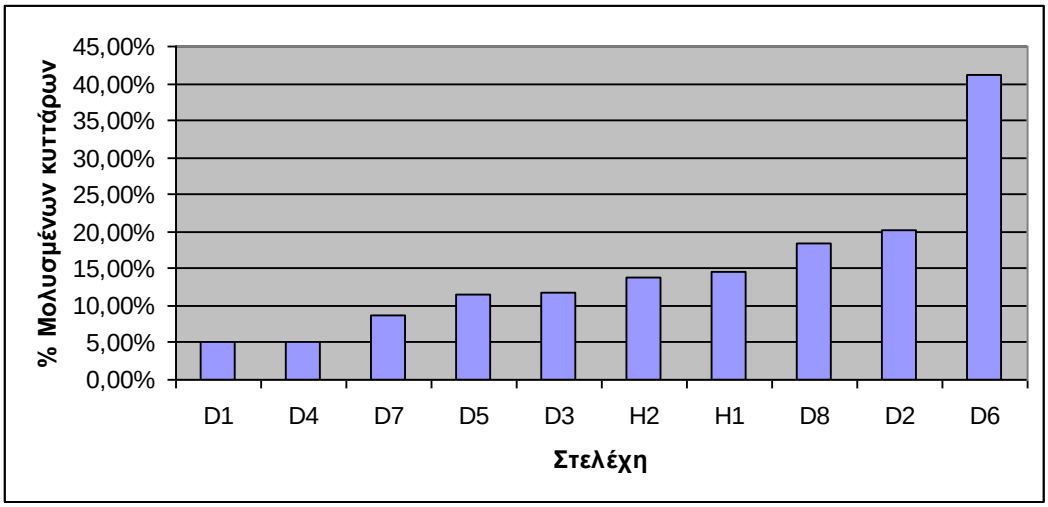
Εικόνα 30: Υποδοχέας κυτταροφυγόκεντρου. Το δείγμα τοποθετείται στο ειδικό διαμέρισμα του υποδοχέα και κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρησης τα κύτταρα εκτοξεύονται και αποτυπώνονται στην αντικειμενοφόρο πλάκα (όπως δείχνει το βέλος) ενώ το διηθητικό χαρτί απορροφά την περίσσια του υλικού ανασύστασης των κυττάρων.

2.2.4.3 Αποτελέσματα και Συζήτηση

Μετρήθηκαν συνολικά 300 κύτταρα για κάθε στέλεχος (100 κύτταρα / αντικειμενοφόρο πλάκα x 3 πλάκες) και προσδιορίστηκε το ποσοστό μολυσματικότητας και ο αριθμός των αμαστιγωτών που περιέχονταν ανά κύτταρο, για κάθε στέλεχος. Έτσι, η μολυσματικότητα, όπως προέκυψε 3 hr μετά την επώαση των κυττάρων με τις προμαστιγωτές μορφές του παράσιτου στην στατική τους φάση φαίνεται να διαφέρει μεταξύ των στελεχών (Πίνακας 5, Γράφημα 9). Από τα στελέχη που μελετήθηκαν, τα 2 στελέχη *L. donovani* που απομονώθηκαν από ασθενείς παρουσιάζουν ομοιότητα στο ποσοστό των κυττάρων που μόλυναν *in vitro* (13,70% - 14,70%) καθώς και στον αριθμό παράσιτων / κύτταρο (2 παράσιτα / κύτταρο). Αντιθέτως, τα 8 στελέχη *L. infantum* που απομονώθηκαν από σκυλιά παρουσίαζαν μια ποικιλομορφία στον αριθμό των κυττάρων που μόλυναν (από 5,20% μέχρι 41,20%) και στο πλήθος των αμαστιγωτών που ανιχνεύτηκε στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων (από 1 – 3 παράσιτα / κύτταρο). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι υπάρχει μια γενετική ποικιλομορφία όχι μόνο μεταξύ των υπογενών (*L. donovani* και *L. infantum*) αλλά και μεταξύ των στελεχών που ανήκουν στο ίδιο υπογένος και προκαλούν ίδιες κλινικές εκδηλώσεις. Η γενετική αυτή ποικιλομορφία είναι ένας σημαντικός παράγοντας που θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στη διερεύνηση της μετάδοσης και της παθογένειας της νόσου μιας που απ΄αυτήν εξαρτάται, ενδεχομένως, η εξέλιξη της νόσου στον ασθενή/σκύλο.

Στέλεχος	Μολυσματικότητα (%)	Αριθμός παρασίτων / 100 κύτταρα	Αριθμός παρασίτων / 100 μολυσμένα κύτταρα
H1	14,70%	2	7
H2	13,70%	2	7
D1	5,20%	1	5
D2	20,20%	2	7
D3	11,70%	2	7
D4	5,20%	1	5
D5	11,40%	2	7
D6	41,20%	3	8
D7	8,70%	1	5
D8	18,40%	2	7

Πίνακας 5: Ποσοστό μολυσματικότητας και μέσος όρος προμαστιγωτών ανά 100 κύτταρα και ανά μολυσμένο κύτταρο για τα 10 υπό μελέτη στελέχη, όπως προέκυψε μετά από επώαση των προμαστιγωτών μορφών με THP-1 κύτταρα, για 3 hr στους 37 ^{o}C, παρουσία 5% CO_2 και υγρασίας >80%.



Γράφημα 9: Ποσοστό μολυσματικότητας των 10 υπό μελέτη στελεχών, όπως προέκυψε μετά από επώαση των προμαστιγωτών μορφών με THP-1 κύτταρα, για 3 hr στους 37 ^{o}C, παρουσία 5% CO_2 και υγρασίας >80%.

2.2.5 Μελέτη του χρόνου μετασχηματισμού των προμαστιγωτών μορφών των 10 στελεχών σε αξενικές αμαστιγωτές μορφές in vitro και αντίστροφα

2.2.5.1 Εισαγωγή

Για τα 10 υπό μελέτη στελέχη υπολογίστηκε ο χρόνος που απαιτείται για τον *in vitro* μετασχηματισμό των προμαστιγωτών μορφών σε αξενικές αμαστιγωτές, το στάδιο του παράσιτου που αντιπροσωπεύει την ενδοκυττάρια μορφή μέσα στο φαγόσωμα των μακροφάγων του σπονδυλωτού ξενιστή. Η μορφή αυτή είναι δυνατόν να παραχθεί στο εργαστήριο με την υιοθέτηση συνθηκών θερμοκρασίας και pH που προσομοιάζουν στις αντίστοιχες συνθήκες του περιβάλλοντος στο φαγόσωμα (Zilberstein and Shapira, 1994).

Συγκεκριμένα, τα προμαστιγωτά υπόκεινται σε συνθήκες διαφοροποίησης, απουσία κυττάρου-ξενιστή, με αύξηση της θερμοκρασίας και μείωση του pH στο υλικό κυτταροκαλλιέργειας (Pan, 1993; Gupta, 2001). Μετά από 1 hr στις καινούργιες συνθήκες, τα παράσιτα εκφράζουν την χαρακτηριστική για τα αμαστιγωτά οικογένεια πρωτεϊνών A2, ενώ 4 - 6 hr αργότερα παρατηρείται διακοπή του κυτταρικού τους κύκλου στη G1 φάση (Barak, 2005). Μετά από 10 - 24 hr, τα παράσιτα αποκτούν στρογγυλό σχήμα, το μαστίγιο γίνεται ενδοκυτταρικό και δεν διαφέρουν από τα αμαστιγωτά που παρασιτούν εντός των μακροφάγων (Pan, 1993). Η διαφοροποίηση συνεχίζεται για 24 - 120 hr, καθώς τα παράσιτα ωριμάζουν βιοχημικά. Πρόσφατη πρωτεωμική μελέτη έδειξε αύξηση στα ένζυμα της γλυκονεογένεσης και του μεταβολισμού των αμινοξέων κατά τη διαφοροποίηση με ταυτόχρονη μείωση στα ένζυμα της

γλυκόλυσης, δηλαδή τα παράσιτα αλλάζουν την πηγή ενέργειας τους από τη γλυκόζη στα λιπαρά οξέα και τα αμινοξέα (Rosenzweig, 2008).Οι αξενικές αμαστιγωτές μορφές μπορούν να διαφοροποιηθούν ξανά σε προμαστιγωτές, είτε μετά από αραίωση της καλλιέργειας 1:10 σε καλλιεργητικό υλικό RPMI 1640 (Παράρτημα 4.4), εμπλουτισμένο με 10% FBS, είτε μετά από φυγοκέντρηση και ανασύσταση του ιζήματος σε καλλιεργητικό υλικό RPMI 1640 και διατήρηση στους 26 ^{o}C ±1. Η διαφοροποίηση επέρχεται εντός 24 ωρών και ολοκληρώνεται εντός 48 ωρών.

2.2.5.2 Μεθοδολογία

Για τη μετατροπή των παράσιτων από προμαστιγωτές σε αξενικές αμαστιγωτές μορφές *in vitro*, χρησιμοποιήθηκαν 1 x 10^6 /ml προμαστιγωτά κατά την στατική τους φάση, στάδιο κατά το οποίο τα παράσιτα έχουν πολύ μικρό ρυθμό πολλαπλασιασμού. Τα παράσιτα, μετά από φυγοκέντρησή τους σε θερμοκρασία δωματίου στις 700 x g για 10 min, μεταφέρθηκαν σε 10 ml καλλιεργητικού υλικού M199, pH 5.5 (Gibco, Invitrogen) (Παράρτημα 4.11) στους 37 ^{o}C, παρουσία 5% CO_2 και υγρασίας > 80%, σε στείρες πλαστικές φιάλες όγκου 25 cm^2. Το καλλιεργητικό υλικό αντικαθίστατο, μετά από φυγοκέντρηση, με φρέσκο ίδιας ποσότητας, κάθε $2^{η}$ μέρα. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις με τη χρήση του αιμοκυτταρόμετρου, κάθε μέρα για 6 συνεχόμενες ημέρες (σε 3 επαναλήψεις), για τον ακριβή υπολογισμό του αριθμού των παράσιτων που είχαν μετατραπεί σε αξενικά αμαστιγωτά για κάθε ένα από τα 10 στελέχη. Για την αντίστροφη μετατροπή τους, τα παράσιτα φυγοκεντρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου στις 700 x g

για 10 min και στην συνέχεια μεταφέρθηκαν σε 10 ml καλλιεργητικού υλικού RPMI 1640, pH 7.2, (Gibco, Invitrogen) (Παράρτημα 4.4) στους 26 ^{o}C ±1, σε στείρες πλαστικές φιάλες όγκου 25 cm^2. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις με τη χρήση του αιμοκυτταρόμετρου, κάθε 12 hr (σε 3 επαναλήψεις), για τον ακριβή υπολογισμό του αριθμού των παράσιτων που είχαν μετατραπεί από αξενικά αμαστιγωτά σε προμαστιγωτά για κάθε ένα από τα 10 στελέχη.

2.2.5.3 Αποτελέσματα και Συζήτηση

Μετά από έκθεση των προμαστιγωτών μορφών σε συνθήκες διαφοροποίησης (αλλαγή της θερμοκρασίας από τους 26 ^{o}C στους 37 ^{o}C και του pH του υλικού κυτταροκαλλιέργειας από 7.2 σε 5.5, απουσία κυττάρου-ξενιστή), τα παράσιτα χρειάστηκαν από 2 έως 5 ημέρες προκειμένου όλα ή το μεγαλύτερο μέρος των παράσιτων στην καλλιέργεια να μετατραπεί σε αξενικά αμαστιγωτά *in vitro*.

Η μελέτη έδειξε διαφορές στο χρόνο μετατροπής των προμαστιγωτών μορφών των 10 στελεχών σε αξενικά αμαστιγωτά, *in vitro,* μεταξύ των 2 υπογενών *L. donovani* και *L. infantum*. Τα στελέχη *L. infantum* χρειάστηκαν μικρότερο χρονικό διάστημα (2 – 3 ημέρες) προκειμένου όλα τα παράσιτα (100%) να μετατραπούν σε σχέση με αυτά του *L. donovani* που χρειάστηκαν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (4 – 5 ημέρες) προκειμένου σχεδόν όλος ο πληθυσμός τους (97 – 98%) να μετατραπεί σε αξενικά αμαστιγωτά (Πίνακας 6). Το φαινόμενο αυτό, η ιδιότητα δηλαδή κάποιων στελεχών να προσαρμόζονται πιο εύκολα στο σώμα των σπονδυλωτών ξενιστών, να χάνουν το εξωκυτταρικό μαστίγιό τους και να μετατρέπονται πιο γρήγορα σε

αμαστιγωτές μορφές, πιθανόν να σχετίζεται άμεσα με την μολυσματική ικανότητά τους. Έτσι, τα στελέχη που μετατρέπονται πιο γρήγορα από προμαστιγωτά σε αμαστιγωτά, πιθανόν να μολύνουν πιο γρήγορα/με μεγαλύτερη επιτυχία τα μακροφάγα του σπονδυλωτού ξενιστή και η εξέλιξη της ασθένειας από τέτοια στελέχη να είναι πιο ευδόκιμη. Επιπλέον, τα στελέχη *L. infantum* χρειάστηκαν μικρότερο χρονικό διάστημα (24 – 28 hr) προκειμένου όλα τα παράσιτα (100%) να μετατραπούν από αξενικά αμαστιγωτά σε προμαστιγωτά σε σχέση με αυτά του *L. donovani* που χρειάστηκαν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (38 – 48 hr) (Πίνακας 6). Αυτό μπορεί να σχετίζεται με την καλύτερη προσαρμογή των αμαστιγωτών μορφών του παράσιτου στο σώμα του ασπόνδυλου ξενιστή, με αποτέλεσμα την πιο γρήγορη μετατροπή του παράσιτου από την αμαστιγωτή μορφή στην προμαστιγωτή και έτσι και η μετάδοση των παράσιτων στους σπονδυλωτούς ξενιστές να είναι πιο επιτυχής.

Στέλεχος	Ημέρες που χρειάστηκαν τα προμαστιγωτά για να μετατραπούν σε αξενικά αμαστιγωτά	% παρασίτων που μετατράπηκε από προμαστιγωτά σε αξενικά αμαστιγωτά	Ώρες που χρειάστηκαν τα αξενικά αμαστιγωτά για να μετατραπούν ξανά σε προμαστιγωτά
H1	4	97%	38
H2	5	98%	48
D1	2	100%	24
D2	2	100%	24
D3	3	100%	28
D4	3	100%	28
D5	3	100%	28
D6	2	100%	24
D7	2	100%	24
D8	3	100%	28

Πίνακας 6: Ποσοστό των 10 υπό μελέτη στελεχών που μετατράπηκαν από προμαστιγωτές σε αξενικές αμαστιγωτές μορφές, *in vitro*. Παρουσιάζεται επίσης το χρονικό διάστημα που χρειάστηκαν οι προμαστιγωτές μορφές προκειμένου να μετατραπούν σε αξενικά αμαστιγωτά και αντίστροφα μετά από προσαρμογή της καλλιέργειας σε κατάλληλη θερμοκρασία και pH για κάθε περίπτωση.

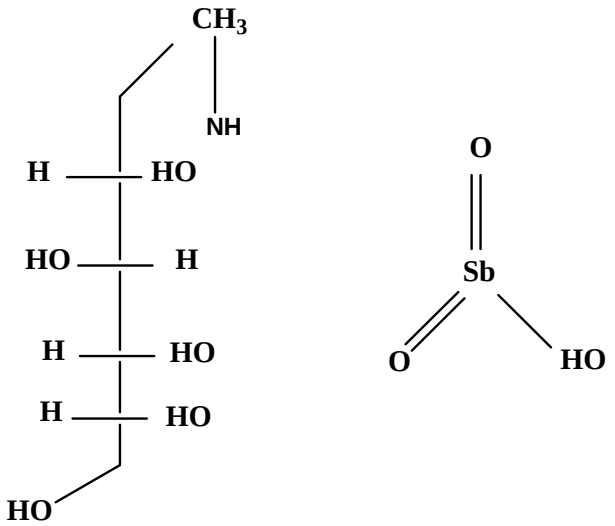
2.2.6 Μελέτη της επιβίωσης του παράσιτου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις των αντιλεϊσμανιακών φαρμάκων Glucantime, Amphotericin B και Miltefosine.

Μελετήθηκε η ικανότητα επιβίωσης των 10 στελεχών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις των 3 φαρμακευτικών σκευασμάτων που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της νόσου, για 6 ημέρες (IC_{50}, η συγκέντρωση του φαρμάκου που έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση του πληθυσμού των παράσιτων κατά 50%). Τα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν είναι: το Glucantime (Aventis – France), η Amphotericine B (Bristol – Myers Squibb – France) και το Miltefosine (Virbac – France).

2.2.6.1 Εισαγωγή

Το Glucantime (Aventis – France), (meglumine antimoniate, πεντασθενές αντιμόνιο) έχει ίδιες ιδιότητες με το Στιβογλυκονικό Νάτριο (Sodium Stibogluconate) (Reynolds, 1989). Ο μηχανισμός δράσης πιθανολογείται ότι σχετίζεται με την αναστολή της γλυκολυτικής δράσης και της οξείδωσης των λιπαρών οξέων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την μειωμένη αντιοξειδωτική άμυνα και την μειωμένη σύνθεση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), η οποία και παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για την επιβίωση του παράσιτου, έτσι ώστε η ελάττωση της παραγωγής ενέργειας είναι τελικά αυτό που πιθανόν οδηγεί στο θάνατο του παράσιτου (Berman, 1988). Ενώ το πεντασθενές αντιμόνιο (Εικόνα 31) παρουσιάζει ελαττωμένη *in vitro* δραστικότητα έναντι των προμαστιγωτών μορφών του παράσιτου, δεν έχει προσδιοριστεί ακόμα εάν έχει επιλεκτική δράση έναντι των αμαστιγωτών

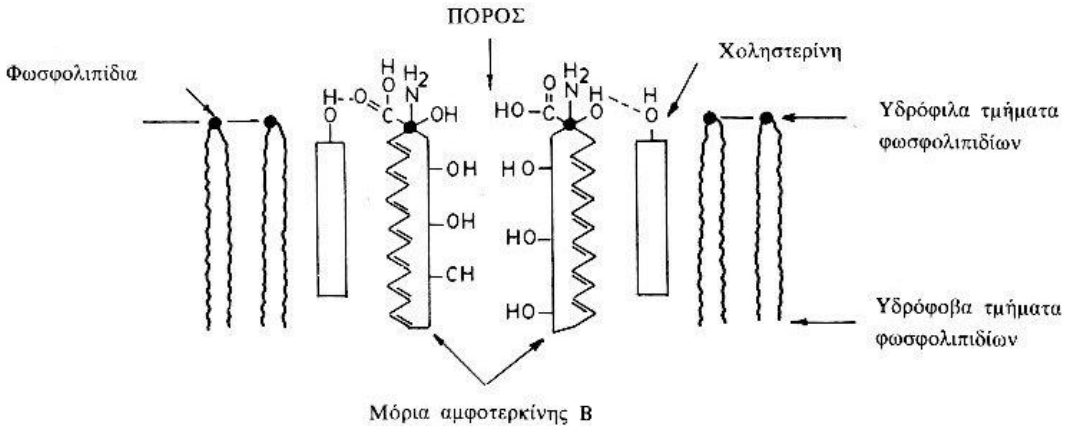
μορφών. Υπάρχουν όμως μελέτες που αποδεικνύουν την ενδοκυττάρια μετατροπή ποσότητας της χορηγούμενης δοσολογίας σε κάποιο πιθανό τρισθενή αναστολέα των γλυκολυτικών ενζύμων (W.H.O., 1990; Demicheli, 2002*;* Goodwin, 1995; Frézard, 2001*;* Lima, 2009).



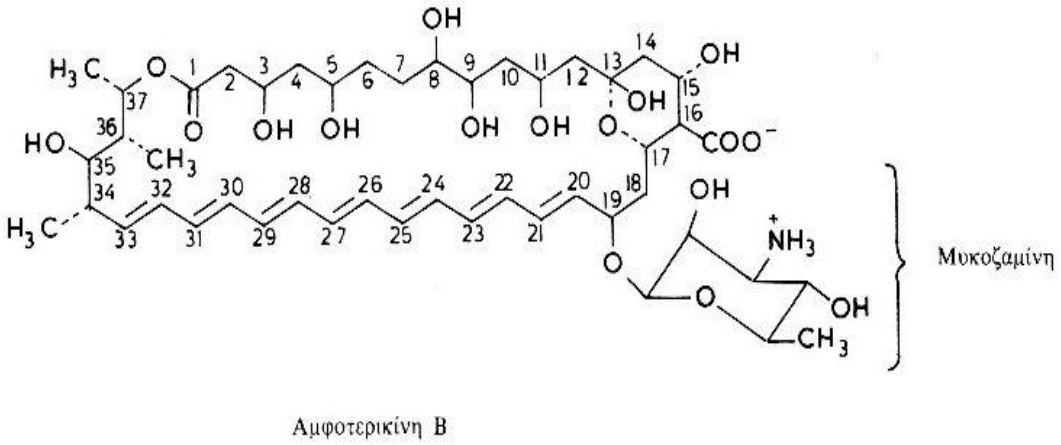
Εικόνα 31: Χημική δομή του μορίου του πεντασθενές αντιμονίου

Η Amphotericin B (Bristol – Myers Squibb – France) είναι ένα πολυενικό αντιμυκητιασικό φάρμακο. Παρά την τοξική του δράση χορηγείται ενδοφλέβια για την θεραπεία συστηματικών λοιμώξεων και θεωρείται φάρμακο 1^{ης} γραμμής στην θεραπεία της λεϊσμανίασης. Η χημική δομή του φαρμάκου χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη πολλών συζευγμένων διπλών δεσμών (πολυένια) σε ένα μακροκυκλικό λακτονικό δακτύλιο. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό στην δομή της Αμφοτερικίνης Β είναι η μυκοζαμίνη (Εικόνα 32). Η Αμφοτερικίνη Β είναι επαμφοτερίζουσα ουσία, που αντιδρά ως οξύ ή βάση, από όπου και η ονομασίας της. Όπως όλα τα πολυενικά αντιβιοτικά, είναι υδρόφοβη. Συνδέεται με ορισμένες στερόλες (κυρίως εργοστερόλη) της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του στόχου (Εικόνα 33). Τελικό αποτέλεσμα

της δράσης του φαρμάκου θεωρείται ο θάνατος του κυττάρου – στόχου που μέχρι πρόσφατα πιστευόταν ότι επέρχεται από τη διαταραχή της δομής και της λειτουργίας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Πλέον όμως θεωρείται ότι ο θάνατος του στόχου επέρχεται από πιο πολύπλοκες διαδικασίες. Για τη μείωση της τοξικότητας και τη δυνατότητα παρατεταμένης θεραπείας, χρησιμοποιείται η μορφή της Αμφοτερικίνης Β ενσωματωμένη σε λιποσώματα (Λιποσωμική Αμφοτερικίνη Β) (Χαλεβελάκης, 1994).



Εικόνα 32: Χημική δομή του μορίου της Αμφοτερικίνης Β.



Εικόνα 33: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης της Αμφοτερικίνης Β.

Το Miltefosine (Virbac – France), (hexadecylphosphocholine) (Εικόνα 34), είναι ένα νέο φάρμακο στη φαρέτρα των κλινικών γιατρών για την καταπολέμηση της λεϊσμανίασης και το πρώτο φάρμακο, κατά του παράσιτου *Leishmania*, που μπορεί να χορηγηθεί *per os*. Το Miltefosine είναι ένα ανάλογο φωσφολιπιδίου που συνίσταται από εστέρες με ποικίλες μακράς αλύσους από κεκορεσμένες και ακόρεστες αλκυλικές ομάδες. Έχει αποδειχτεί ότι έχει παρόμοια δομή με συστατικά που μεταβολίζονται από τη *Leishmania*. Πολλαπλές μελέτες δείχνουν ότι η Μιλτεφοσίνη εκδηλώνει την αντι-λεϊσμανιακή της δράση στοχεύοντας στις μεταβολικές οδούς των φωσφολιπιδίων στο παράσιτο (άμεση επίδραση στο μεταβολισμό της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης). Η Μιλτεφοσίνη είναι ελαφρώς λιπόφιλη και υδρόφοβη και επομένως μπορεί να διεισδύει στην κυτταρική μεμβράνη και να προκαλεί γρήγορο και έντονο μεταβολισμό των αιθερικών φωσφολιπιδίων στη *Leishmania* (Achterberg, 1987; Achterberg, 1987).

Εικόνα 34: Χημική δομή της Μιλτεφοσίνης

2.2.6.2 Μεθοδολογία

Η μελέτη της αντοχής των 10 στελεχών στα τρία φάρμακα έγινε στο στάδιο του προμαστιγωτού κατά την λογαριθμική φάση της ανάπτυξής του. Για το σκοπό αυτό προμαστιγωτά, σε αρχικό πληθυσμό 1 x 10^6 /ml, ανακαλλιεργήθηκαν σε 5 ml καλλιεργητικού υλικού RPMI 1640 (Παράρτημα

4.4) στους 26 ^{o}C ±1, σε στείρα 6 - well plates. Για κάθε στέλεχος χρησιμοποιήθηκαν παράλληλα 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις των 3 υπό μελέτη φαρμάκων και ένας μάρτυρας (Control) χωρίς την προσθήκη φαρμάκου. Προκειμένου να προσδιοριστεί το IC_{50} του κάθε στελέχους στα 3 φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν, η ελάχιστη συγκέντρωση του φαρμάκου στο πείραμα ήταν η ελάχιστη που συνίσταται από την κάθε εταιρία, για κάθε kg σωματικού βάρους, για τη θεραπεία της νόσου στον άνθρωπο. Για τους σκοπούς της μελέτης έγινε αναγωγή του kg σωματικού βάρους σε ml καλλιέργειας. Στην συνέχεια, η συγκέντρωση του φαρμάκου ανά ml καλλιέργειας αυξανόταν διαδοχικά από 2 έως 8 φορές (Πίνακας 7). Τρεις επαναλήψεις πραγματοποιήθηκαν ταυτόχρονα για κάθε στέλεχος και για κάθε φάρμακο, ξεχωριστά, κάτω από ίδιες συνθήκες, ενώ το καλλιεργητικό υλικό με τις ανάλογες αραιώσεις του φαρμάκου αντικαθίσταντο με φρέσκο κάθε 2^{η} μέρα, μετά από φυγοκέντρηση των well plates σε θερμοκρασία δωματίου στα 700 x g, για 10 min, χωρίς φρένο. Οι μετρήσεις των προμαστιγωτών στις καλλιέργειες, με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις των 3 φαρμάκων, καθώς και του μάρτυρα, για κάθε στέλεχος, πραγματοποιούνταν κάθε ημέρα, για 6 ημέρες, με την χρήση του αιμοκυτταρόμετρου και του οπτικού μικροσκοπίου (x40). Για το σκοπό αυτό, 0.1 ml από την καλλιέργεια αραιώθηκε 1/10 σε διάλυμα φορμαλδεΰδης 10% σε PBS προκειμένου να ακινητοποιηθούν τα παράσιτα και να είναι ευκολότερη η μέτρησή τους (Ενότητα 2.2.2.2).

	Φάρμακο		
Συγκέντρωση	Glucantime	Amphotericin B	Miltefosine
A	50μg/ml	0.75μg/ml	1.25μg/ml
B	100μg/ml	1.5μg/ml	2.5μg/ml
C	200μg/ml	3μg/ml	5μg/ml
D	400μg/ml	6μg/ml	10μg/ml
E	800μg/ml	12μg/ml	20μg/ml

Πίνακας 7: Οι συγκεντρώσεις φαρμάκου που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε σκεύασμα. Η ελάχιστη συγκέντρωση (A) που χρησιμοποιήθηκε ήταν εκείνη που συστήνεται από την κάθε εταιρία για κάθε kg ανθρώπινου σωματικού βάρους. Έγινε η αναγωγή του kg σωματικού βάρους σε ml καλλιέργειας και οι επόμενες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν αυξάνονταν διαδοχικά κατά 2 – 8 φορές.

2.2.6.3 Αποτελέσματα και Συζήτηση

Η επιβίωση των προμαστιγωτών μορφών των 10 στελεχών που εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις των 3 φαρμάκων, προσδιορίστηκε ανάλογα με τον πληθυσμό της καλλιέργειας που προέκυπτε κάθε ημέρα για 6 ημέρες, μετά από μέτρησή τους στο μικροσκόπιο με την χρήση του αιμοκυτταρόμετρου.

Κατά την *in vitro* μελέτη της αντοχής των 10 υπό μελέτη στελεχών στο Glucantime, προέκυψε ότι τα 9 από τα 10 στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν

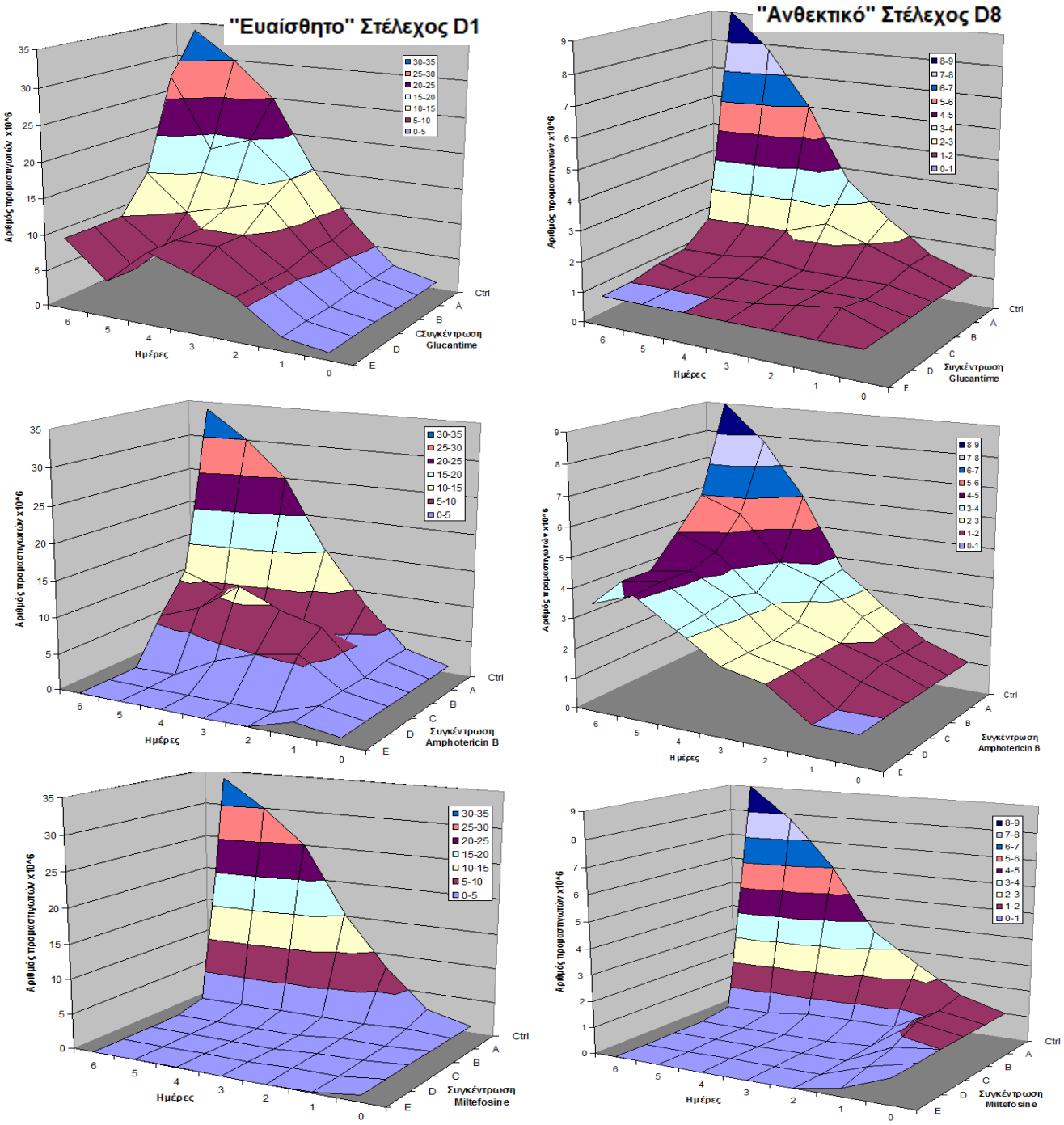
χρειάστηκαν πάνω 800 μg/ml Glucantime προκειμένου να μειωθεί κατά το 50% ο πληθυσμός τους (IC_{50}), ενώ 1 στέλεχος (D4) χρειάστηκε 400 μg/ml προκειμένου να μειωθεί ο πληθυσμός του κατά 50%. Σε παράλληλη μελέτη που έγινε στα 2 παράγωγα του φαρμάκου Glucantime, SbV (πεντασθενές αντιμόνιο) και SbIII (τρισθενές αντιμόνιο) (Εργαστήριο Μοριακής Παρασιτολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα), στα 5/10 στελέχη («ανθεκτικά»: H1, D3, D4, D5 και «ευαίσθητο»: H2), τα αποτελέσματα έδειξαν πώς η ποσότητα του φαρμάκου που χρειάστηκε για να μειωθεί κατά 50% ο πληθυσμός του κάθε στελέχους διέφερε αρκετά μεταξύ των «ανθεκτικών» και του «ευαίσθητου». Για τα «ανθεκτικά» στελέχη απαιτήθηκαν ≥ 40 μg/ml SbV και < 0,1 - > 2 μg/ml SbIII για το IC_{50}. Σε αντίθεση, για το μόνο ευαίσθητο στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε (H2) απαιτήθηκε < 3 μg/ml SbV και < 1 μg/ml SbIII για το IC_{50}. Τα αποτελέσματα του IC_{50} των 2 από τα 10 στελέχη («ευαίσθητο»: D1, «ανθεκτικό: D8), και η απόκρισή τους στο Glucantime φαίνονται ενδεικτικά στα Γραφήματα 10 και 11. Τα αποτελέσματα και των 10 στελεχών φαίνονται συγκεντρωτικά στα Παραρτήματα 5.4 – 5.5.

Η παρουσία της Amphotericin B οδήγησε σε σταδιακή μείωση του πληθυσμού των προμαστιγωτών μορφών και των 10 στελεχών. Η επίδραση του φαρμάκου ήταν εντονότερη στα «ευαίσθητα στελέχη». Στα 3 από τα 5 «ευαίσθητα» στελέχη (H1, D2, D7), ο πληθυσμός ελαττώθηκε σε ποσοστά 40 - 50% από την $2^{η}$ ημέρα, στη συγκέντρωση 1,5 μg/ml του φαρμάκου, ενώ στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ή μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα έφτασε στο 100%. Εξαίρεση παρουσίασε το στέλεχος D1 ο πληθυσμός του οποίου μειώθηκε κατά 50% την $5^{η}$ ημέρα στην συγκέντρωση 1,5 μg/ml, την 3 ημέρα στην συγκέντρωση 3 μg/ml, ενώ την 2 ημέρα στην συγκέντρωση 6 μg/ml όλος

ο πληθυσμός των παράσιτων εξαλείφθηκε. Εξαίρεση παρουσιάζει και το στέλεχος D6, ο πληθυσμός του οποίου παρόλο που μειώθηκε κατά 50% στην συγκέντρωση 6 μg/ml και 12 μg/ml τις ημέρες 4 και 3 αντίστοιχα, ο πληθυσμός των παράσιτων δε μειώθηκε σε ποσοστό 100% πριν απο την 6η ημέρα.

Όσον αφορά στα «ανθεκτικά» στελέχη, παρόλο που ο πληθυσμός τους μειώθηκε κατά 50% στις συγκεντρώσεις 1,5 – 3 μg/ml κατά την 3η και 4η ημέρα αντίστοιχα, ο πληθυσμός τους δε μειώθηκε σε ποσοστό 100% πριν την 6η ημέρα. Τα αποτελέσματα των 2 από τα 10 στελέχη («ευαίσθητο»: D1, «ανθεκτικό: D8) και η απόκρισή τους στο φάρμακο φαίνονται ενδεικτικά στα Γραφήματα 12 και 13. Τα αποτελέσματα και των 10 στελεχών φαίνονται συγκεντρωτικά στα Παραρτήματα 5.6 – 5.7.

Και τα 10 στελέχη, είτε παρουσίασαν αντοχή είτε ευαισθησία στο Glucantime και την Amphotericin B, έδειξαν εξίσου μεγάλη ευαισθησία σε όλες τις συγκεντρώσεις του νέου φαρμάκου Miltefosine (1,25 – 20 μg/ml), από την πρώτη κιόλας ημέρα. Τα αποτελέσματα των 2 από τα 10 στελέχη («ευαίσθητο»: D1, «ανθεκτικό: D8) και η απόκρισή τους στο φάρμακο αυτό, φαίνονται ενδεικτικά στα Γραφήματα 14 και 15. Τα αποτελέσματα και των 10 στελεχών φαίνονται συγκεντρωτικά στα Παραρτήματα 5.8 – 5.9.



Γραφήματα 10 -15: Ο ρυθμός ελάττωσης του πληθυσμού ενός αντιπροσωπευτικού «Ευαίσθητου» (D1) και «Ανθεκτικού» (D8) στελέχους μετά από έκθεσή τους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις 3 διαφορετικών φαρμάκων για 1-6 ημέρες. Όλα τα γραφήματα και οι πίνακες που αφορούν στα αποτελέσματα και των 10 στελεχών παρουσιάζονται στα Παραρτήματα 5.4 – 5.9.

Η αντοχή των 10 στελεχών στα φάρμακα εκτιμήθηκε με τον συνυπολογισμό των εξής παραμέτρων: τη συγκέντρωση του φαρμάκου, το χρονικό διάστημα των 6 ημερών και τον πληθυσμό των προμαστιγωτών μορφών του παράσιτου και για τις 6 ημέρες του πειράματος. Και οι 3 αυτοί παράμετροι συμπεριλήφθηκαν στον τύπο $r_d = s_d / s_o$ έτσι ώστε να προκύψει ένας αριθμός για κάθε στέλεχος ο οποίος να δηλώνει τον βαθμό αντοχής του στελέχους στο συγκεκριμένο φάρμακο. Έτσι, για κάθε συγκέντρωση φαρμάκου (r_d), υπολογίστηκε ο ρυθμός μεταβολής (S_d) του πληθυσμού ως προς το χρόνο (S_o) (Πίνακας 8). Για κάθε μια από τις 5 συγκεντρώσεις φαρμάκου που χρησιμοποιήθηκαν υπολογίστηκε ο λόγος του ρυθμού μεταβολής του πληθυσμού, για τη συγκέντρωση του φαρμάκου στην οποία προέκυψε το IC_{50}, ως προς το ρυθμό μεταβολής του πληθυσμού μάρτυρα την ίδια ημέρα. Ο λόγος αυτός χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του σημείου αναφοράς της αναστολής της ανάπτυξης του πληθυσμού, (ως ο ρυθμός μεταβολής του r_d ως προς d x (-10^3) και λαμβάνει υπόψιν όλους τους χρόνους και για όλες τις συγκεντρώσεις του φαρμάκου στις οποίες εμφανίστηκε IC_{50}).

Αυτό που προέκυψε μετά την ανάλυση των παραμέτρων, με τον παραπάνω τύπο, ήταν ότι όσο μικρότερο ήταν το σημείο αναφοράς της ανάπτυξης, τόσο μεγαλύτερη ήταν η αντοχή του στελέχους στο φάρμακο. Αυτό όμως δεν ίσχυε στην περίπτωση του Glucantime όπου, όσο μικρότερο ήταν το σημείο αναφοράς της ανάπτυξης, τόσο μικρότερη ήταν η αντοχή του στελέχους στο φάρμακο. Στην περίπτωση της Amphotericin B και του Miltefosine ο μέσος όρος των σημείων αναφοράς της ανάπτυξης για τα «ανθεκτικά» στελέχη ήταν 51,4 και 108,6 αντίστοιχα και για τα «ευαίσθητα» ήταν 100,2 και 120,6 αντίστοιχα. Αντίθετα, για το Glucantime, ο μέσος όρος των σημείων αναφοράς

της ανάπτυξης για τα «ανθεκτικά» στελέχη ήταν 90,8 και για τα «ευαίσθητα» 57. (Πίνακας 8).

							Μέσος όρος
Amphotericin B	Ανθεκτικά	D8	D5	D4	D3	H2	
		54	46	52	76	29	51,4
	Ευαίσθητα	D2	D7	D6	D1	H1	
		110	98	83	93	117	100,2
Miltefosine	Ανθεκτικά	D8	D5	D4	D3	H2	
		122	97	104	99	121	108,6
	Ευαίσθητα	D2	D7	D6	D1	H1	
		115	95	95	97	201	120,6
Glucantime	Ανθεκτικά	D8	D5	D4	D3	H2	
		91	90	91	90	92	90,8
	Ευαίσθητα	D2	D7	D6	D1	H1	
		40	83	75	69	18	57

Πίνακας 8: Βαθμός αντοχής του κάθε στελέχους στο φάρμακο. Προκειμένου να υπολογιστεί ο βαθμός αυτός, υπολογίστηκε ο ρυθμός μεταβολής του πληθυσμού των παράσιτων (s_d) ως προς το χρόνο (s_o) για κάθε συγκέντρωση (r_d) των 3 φαρμάκων ($r_d = s_d / s_o$).

2.2.7 Μελέτη των πρωτεϊνικών διαφορών μεταξύ των προμαστιγωτών μορφών 2 «ανθεκτικών» και 2 «ευαίσθητων» στελεχών του παράσιτου Leishmania

2.2.7.1 Εισαγωγή

Ο όρος ‘πρωτέωμα’ χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1994 από τον Marc Wilkins κατά την διάρκεια ενός συνεδρίου, για να περιγράψει ‘το σύνολο των **πρωτε**ϊνών (πρωτε..) που παράγεται από ένα γέν**ωμα** (…ωμα) σε μια χρονική στιγμή’ (Wasinger, 1995). Το ‘σε μια χρονική στιγμή’ είναι σημαντικό καθώς, ενώ τα κύτταρα ενός οργανισμού περιέχουν πανομοιότυπο γένωμα, το σύνολο των πρωτεϊνών που εκφράζουν είναι διαφορετικός ανάλογα με τον ιστό και τη χρονική στιγμή που μελετάται. Συνεπώς, το γένωμα είναι ένα και μοναδικό και παράγει πολλά πρωτεώματα ανάλογα με τα ερεθίσματα που λαμβάνει το κύτταρο, τη θέση που βρίσκεται στους ιστούς κτλ.

Πιο συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες είναι τα δομικά και λειτουργικά συστατικά του οργανισμού, ενώ το γονιδίωμα είναι το αρχείο πληροφοριών που ρυθμίζει τη σύσταση και την παραγωγή τους. Η γενεωμική ακολουθία δεν έχει τη δυνατότητα να μας πληροφορήσει πώς και ποιες πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ή να επισημάνει ποιες κυτταρικές πρωτεΐνες θα παραχθούν κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Έτσι, η πληροφορία που παίρνουμε από τη χαρτογράφηση του γονιδιώματος είναι περιορισμένη, μιας και οι πρωτεΐνες είναι εκείνες που θα καθορίσουν άμεσα τις κυτταρικές λειτουργίες. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση του ενδιαφέροντος στην κατανόηση της λειτουργίας των πρωτεϊνών και των πρωτεϊνικών συστημάτων (Fountoulakis and Takacs, 2001). Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της πρωτεωμικής είναι η

δυνατότητά της να ταυτοποιεί και να χαρακτηρίζει τις πρωτεΐνες, που είναι και το τελικό βιολογικό προϊόν. Το πλεονέκτημα αυτό είναι σημαντικό μιας και ο μεγαλύτερος όγκος των φαρμακευτικών παρεμβάσεων και η δημιουργία διαγνωστικών τεστ έχουν σαν στόχο τις πρωτεΐνες. Ο απώτερος στόχος της «πρωτεωμικής» είναι η χρησιμοποίηση των πειραματικών πορισμάτων για την παραγωγή αποτελεσματικότερων φαρμάκων, με λιγότερες παρενέργειες. Η πρωτεωμική χρησιμοποιείται σήμερα ευρέως στην κλινική διάγνωση, και εφαρμόζεται στην ανίχνευση μολυσματικών ασθενειών, καρκίνων και νευρολογικών ή καρδιακών νοσημάτων (Fountoulakis, 2004).

Η αλληλουχία του γονιδιώματος της *L. major* Friedlin (~ 33.6 Mb) είναι διαθέσιμη σήμερα και η πρωτεωμική είναι μια καλή μέθοδος για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών που παράγονται στα διάφορα στάδια της ανάπτυξης στελεχών του παράσιτου *Leishmania* (Thiel, 2001; El Fakhry, 2002; Nugent, 2004), που μπορεί να σχετίζονται με την πολλαπλασιαστική ή και την μολυσματική ικανότητά της, άρα και με την παθογένειά της (de Araujo Soares, 2003). Μερικές από αυτές τις πρωτεΐνες πιθανόν να είναι στόχοι για φάρμακα και μηχανισμούς αντοχής (Drummelsmith, 2003).

Η έννοια της πρωτεωμικής περιλαμβάνει:

1. Την ανίχνευση και ταυτοποίηση όλων των πρωτεϊνών που δύναται να παράγει ο οργανισμός,
2. Την εξακρίβωση του τρόπου αλληλεπίδρασης τους και την περιγραφή των δικτύων μεταγωγής μηνυμάτων που απαρτίζονται από πρωτεΐνες,
3. Την περιγραφή της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών.

Το πρωτέωμα είναι πιο περίπλοκο, σε σχέση με το γονιδίωμα. Τα γονίδια είναι γραμμικά (εκτός από το γονιδίωμα των πλασμιδίων και των χλωροπλαστών

που είναι κυκλικό) και αποτελούνται από DNA. Το αλφάβητο του DNA περιλαμβάνει τέσσερις αζωτούχες βάσεις, την αδενίνη (A), τη θυμίνη (T), τη γουανίνη (G) και την κυτοσίνη (C), η ακολουθία των οποίων καθορίζει την αλληλουχία των αμινοξέων, δηλαδή των 20 δομικών στοιχείων που απαρτίζουν μία πρωτεΐνη.

Εντούτοις, η γνώση της αμινοξικής αλληλουχίας δεν συνεπάγεται γνώση της τρισδιάστατης δομής μίας πρωτεΐνης, της λειτουργίας της και των αλληλεπιδράσεών της με άλλες πρωτεΐνες. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες τροποποιούνται μέσα στα κύτταρα με την προσθήκη σακχάρων και λιπιδίων. Η ανάπτυξη της πρωτεωμικής μπορεί να αποδοθεί στην ανάπτυξη της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (2D- SDS PAGE), της Φασματογραφίας Μάζας (MS, mass spectroscopy), των δυνατοτήτων των υπολογιστών και των λογισμικών, καθώς επίσης και στο πλήθος των πληροφοριών που αποκτήθηκαν μετά από την ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδιώματος πολλών οργανισμών (Foundoulakis; Aebersold and Mann, 2003).

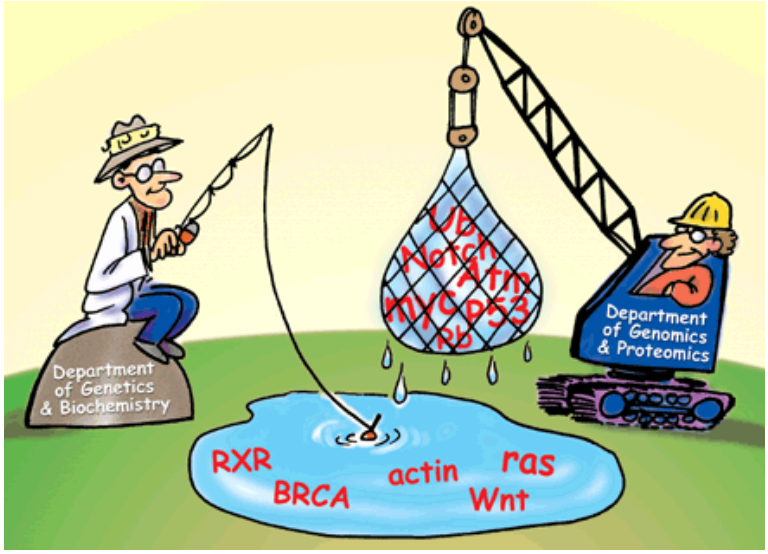
Η 2D ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων είναι μέθοδος ηλεκτροφόρησης που επιτυγχάνει τον διαχωρισμό μείγματος πρωτεϊνών με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο κατά την πρώτη διάσταση (1D) (IEF) και με βάση το μοριακό τους βάρος κατά την δεύτερη διάσταση (2D) σε SDS - PAGE (O'Farrell, 1975; Fountoulakis and Takacs, 2001).

Οι πρωτεΐνες μπορούν να σημανθούν πριν την ηλεκτροφόρηση με μεθόδους όπως η ενσωματωμένη ραδιενέργεια (^{32}P, ^{35}S, ^{14}C, κλπ) ή μετά την ηλεκτροφόρηση. Στην περίπτωση σήμανσης μετά την ηλεκτροφόρηση, οι πρωτεΐνες στα πηκτώματα πρέπει να μονιμοποιούνται και να εκτίθενται. Οι

μεθοδοι σήμανσης – χρώσης των πρωτεϊνών, καθώς και των περιορισμών που έχει η κάθε τεχνική μπορεί να γίνει με τις ακόλουθες μεθόδους ανάλογα με το επιθυμιτό αποτέλεσμα.

- Radioactive labeling: Λιγότερο από 1 pg πρωτεΐνης μπορεί να ανιχνευτεί. (Westermeier, 2005)
- Stable isotope labeling: Απαιτεί ζωντανά κύτταρα, συνεπώς δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε ιστό βιοψίας, σωματικά υγρά κλπ. (Westermeier, 2005)
- Coomassie brilliant Blue: Είναι συμβατή με MS αλλά δεν αποτελεί ευαίσθητη μέθοδο (απαιτείται >0,1 μg πρωτεϊνης/κηλίδα). (Westermeier, 2005)
- Negative staining. Περισσότερο ευαίσθητη μέθοδος (<15 ng) από την Coomassie Brilliant Blue και είναι συμβατή με MS (Matsui, 1997; Westermeier, 2005)
- Silver staining: Ανιχνεύει <0,2 ng. Είναι συμβατή με MS αλλά απαιτεί αρκετά στάδια (Westermeier, 2005)
- Fluorescence staining: Είναι λιγότερο ευαίσθητη μέθοδος (2 – 8 ng). Οι χρωστικές που χρησιμοποιούνται (πχ SYPRO Ruby) είναι αρκετά ακριβές και απαιτείται και ένας ειδικός σαρωτής (scanner) φθορισμού (Westermeier, 2005)
- Fluorescence labeling: Άλλες χρωστικές, όπως η Cyanine Dye, χρησιμοποιούνται για να σημάνουν πρωτεΐνες πριν το στάδιο της ισοηλεκτρικής εστίασης και έχουν παρόμοια ευαισθησία και δυναμικό εύρος με το Fluorescence staining (Westermeier, 2005).

Στόχος της μελέτης ήταν να προσδιοριστούν οι πρωτεϊνικές διαφορές 4 ενδεικτικών από τα 10 υπό μελέτη στελέχη (2 «ευαίσθητων» H1, D2 και 2 «ανθεκτικών» H2, D3) που πιθανόν να σχετίζονται με το φαινόμενο της αντοχής που παρουσιάζουν τα στελέχη στα φάρμακα (MDR).



Εικόνα 35: Η κυριότερη διαφορά της πρωτεωμικής από προηγούμενες τεχνικές ανάλυσης πρωτεϊνών είναι ότι η πρωτεωμική δεν αναλύει τις πρωτεΐνες μια προς μια αλλά εξετάζει ταυτόχρονα πάνω από 1800 πρωτεΐνες, σε ένα και μόνο πήκτωμα (Bobek and Situ, 2003).

2.2.7.2 Μεθοδολογία

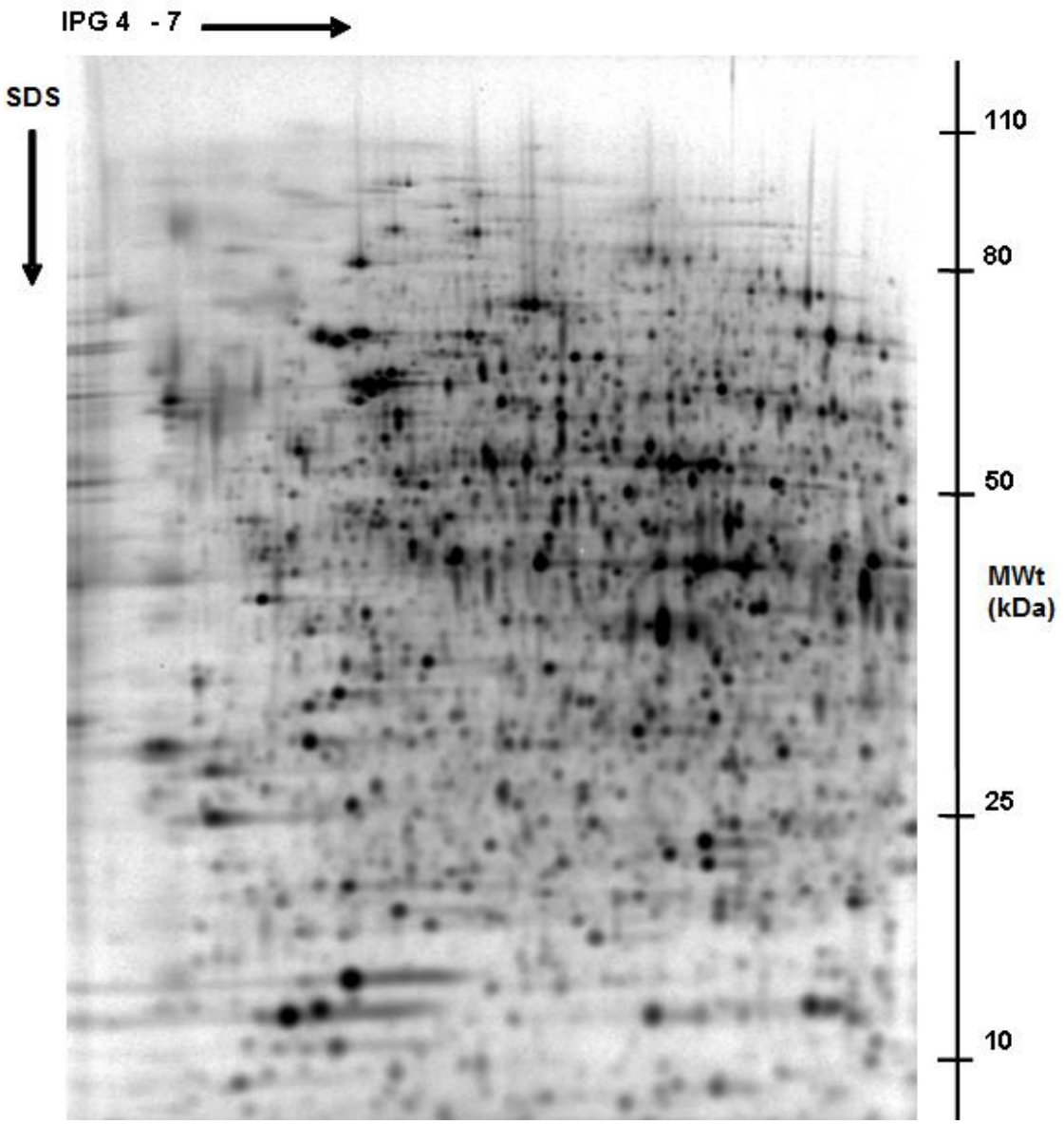
2.2.7.2.1 Πρωτεωμική ανάλυση - γενικά σημεία

Η μελέτη έγινε στο στάδιο του προμαστιγωτού κατά την λογαριθμική φάση της καλλιέργειας (Παράρτημα 4.4). Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες σε 4 (H1, H2, D2, D3) από τα 10 υπό μελέτη στελέχη συλλέχθηκαν μετά από υποκυτταρική κλασματοποίηση με τη χρήση Qiagen kit, και αναλύθηκαν σε ηλεκτροφορητικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης SDS – PAGE (sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis). Η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με το MALDI-TOF MS (Matrix - Assisted Laser Desorption / Ionisation Time – Of - Flight Mass Spectrometry), μια νέα μέθοδος για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών (http://microbiology.wustl.edu/training/Med/Micpath99/11beverley). Η πρωτεωμική ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Ιατρικής και Βιολογικής Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ), τομέα Βιοτεχνολογίας, υπό την καθοδήγηση της κυρίας Α. Βλάχου.

2.2.7.2.2 Προετοιμασία του δείγματος

Προμαστιγωτά των 4 στελεχών (H1, D2, H2, D3) καλλιεργήθηκαν σε καλλιεργητικό υλικό RPMI 1640 (Παράρτημα 4.4). Μετά την 7η ανακαλλιέργεια (passage), 1 x 10^8 παράσιτα από το κάθε στέλεχος φυγοκεντρήθηκαν σε θερμοκρασία 4 ^oC, σε 700 x g, για 10 min. Το ίζημα ξεπλύθηκε 2 φορές με PBS, pH 7.2, προκειμένου να αφαιρεθούν τα συστατικά του καλλιεργητικού υλικού (κυρίως οι πρωτεΐνες του ορού), πριν από την επεξεργασία τους για την συλλογή των πρωτεϊνών του παράσιτου. Στην συνέχεια ακολούθησε κλασματοποίηση των πρωτεϊνών (fractionation) (Παράρτημα 4.12), με τη χρήση του Qproteome Cell Compartment Kit, (Qiagen), και συλλογή των μεμβρανικών πρωτεϊνών για την ανάλυσή τους σε ηλεκτροφορητικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (2D SDS - PAGE). Το ίζημα αραιώθηκε σε 0.5 ml διαλύματος ανασύστασης του kit και ακολούθησε κατακρήμνιση των πρωτεϊνών με 1.5 ml ακετόνης, για 24 hr, στους -20 ^oC. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 16.000 x g, για 30 min, και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Έγινε ανασύσταση του ιζήματος σε 1 ml ακετόνης και ακολούθησε επώαση για 15 min στους -20 ^oC. Μετά από φυγοκέντρηση στις 16.000 x g, για 30 min, έγινε απομάκρυνση του υπερκείμενου και στέγνωμα του ιζήματος σε θερμοκρασία δωματίου, για 20 min. Το ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε 200 μl sample buffer το οποίο αποτελούταν από Urea (7M), Thiourea (2M), CHAPS (4%), DTE (1%), IPG (2%), PI (4%) και ίχνη ρητίνης (Παράρτημα 4.13) προκειμένου να συλλέξει τα παραπροϊόντα της Urea. Η τελική συγκέντρωση των πρωτεϊνών, όπως προέκυψε μετά από υπολογισμό με το Bradford Assay, ήταν 8 mg/ml διαλύματος ανασύστασης (sample buffer). Η υψηλή συγκέντρωση της Urea χρειάζεται για την μεταφορά

των υδρόφοβων πρωτεϊνών στο διάλυμα και για την αποφυγή αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών. Το CHAPS είναι ένα υψηλής καθαρότητας, συγκριτικά με το Triton X-100 και το Nonidet NP-40, απορρυπαντικό, το οποίο αυξάνει την δυνατότητα των υδρόφοβων πρωτεϊνών να εισχωρήσουν στο πήκτωμα. Οι αμφολύτες βελτιώνουν την διαλυτότητα των πρωτεϊνών. Δεν επηρεάζουν την IEF (Isoelectric Focusing, Ισοηλεκτρική εστίαση) γιατί μεταφέρονται στα ισοηλεκτρικά σημεία τους (pIs), όπου αποφορτίζονται. Πλέον όμως δεν χρησιμοποιούνται λόγω της αντικατάστασής τους από κλίμακες pH (Immobilized pH Gradient, IPG strips). Το στάδιο της προετοιμασίας του δείγματος είναι το κλειδί για την ποιότητα των αποτελεσμάτων. Οι υδρόφοβες πρωτεΐνες πρέπει να μεταφέρονται στο διάλυμα, οι πρωτεάσες να απομακρύνονται ή να αδρανοποιούνται και τα νουκλεϊκά οξέα, τα λιπίδια, τα άλατα και άλλα στέρεα συστατικά, θα πρέπει να απομακρύνονται (Berkelman, 1998). Τα νουκλεϊκά οξέα διαχωρίζονται επαρκώς με υπερήχους. Τα λιπίδια και τα άλατα απομακρύνονται με περίσσια απορρυπαντικού (>2%) με καθίζηση ή με καθίζηση και διάλυση αντίστοιχα, μέθοδοι απομάκρυνσης που οδηγούν όμως σε απώλειες πρωτεϊνών. Σε ειδικές περιπτώσεις, όπως στην περίπτωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών, απαιτείται η προσθήκη 2 mol/l Thiourea σε 7 mol/l Urea, αντί για 8 mol/l Urea (Rabilloud, 1998). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα μεγαλύτερο αριθμό διακριτών κηλίδων στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (Εικόνα 36).



Εικόνα 36: Ηλεκτροφορητικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης μετά από χρώση με Silver Nitrate κατά το οποίο φαίνονται διακριτές κηλίδες που αντιπροσωπεύουν τις πρωτεΐνες ταξινομημένες ανάλογα με το pH (οριζόντια) και το μοριακό τους βάρος (κάθετα) (www.uccc.info).

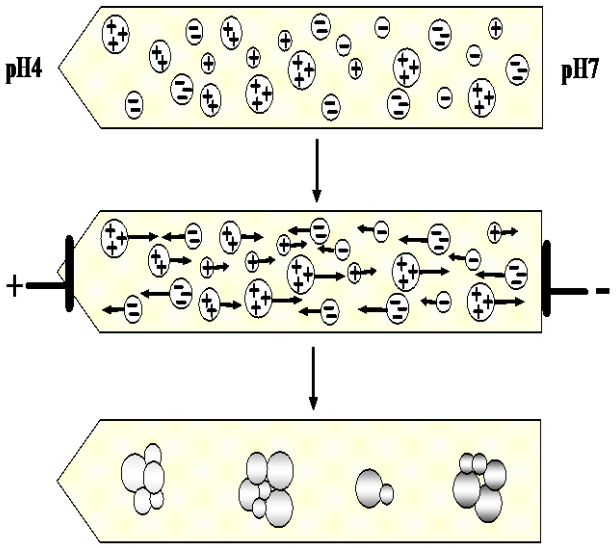
2.2.7.2.3 2D Ηλεκτροφόρηση και καταγραφή των πρωτεϊνών

2.2.7.2.3.a Immobilized pH gradient: η 1η Διάσταση (1D)

Χρησιμοποιήθηκαν IPG strips (ReadyStrip IPG Strip, BioRad) μήκους 17 cm, pH 4-7 και επικαλυμμένα με πήκτωμα πάχους 0,5mm (Gorg, 2000) τα οποία ενυδατωθήκαν σε 200 μl sample buffer που περιείχαν τις πρωτεΐνες οι οποίες συλλέχθηκαν κατά την κλασματοποίηση (Παράρτημα 4.12). Τα strips αυτά, είναι εύχρηστα, αρκετά αναπαραγωγικά, σταθερά και δεν υπόκεινται σε μετατροπές ανάλογα με την σύσταση του δείγματος (Blomberg, 1995). Τα strips τοποθετήθηκαν σε ειδικές θέσεις υποδοχέα με την επιφάνεια του πηκτώματος να αγγίζει τον πυθμένα της κάθε θέσης και έπειτα τοποθετήθηκε το sample buffer που περιείχε τις πρωτεΐνες, προσεκτικά για την αποφυγή φυσαλίδων (Εικόνα 37). Στην συνέχεια, μετά την απορρόφηση του δείγματος από τα strips (περίπου 1 hr) προστέθηκαν 2 ml Paraffin Oil πάνω από κάθε strip για την αποτροπή της εξάτμισης του δείγματος και την αποφυγή κρυσταλλοποίησης της Urea μετά από επαφή της με τον ατμοσφαιρικό αέρα. Το στάδιο της ενυδάτωσης διήρκησε 14 – 18 hr σε θερμοκρασία δωματίου, διότι μερικές πρωτεΐνες, μεγάλου μοριακού βάρους, χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να εισχωρήσουν στο strip και για να μην χαθούν οι υδρόφοβες πρωτεΐνες (Εικόνα 38).

Μετά την ολοκλήρωση της ενυδάτωσης τα strips μεταφέρθηκαν στο σύστημα IEF όπου η θερμοκρασία ήταν σταθερή στους 20 ^{o}C. Στο σημείο επαφής του ηλεκτρόδιου και του strip τοποθετήθηκαν κομμάτια υγρού διηθητικού χαρτιού (Electrode wicks, pre-cut, BioRad Laboratories, CA) προκειμένου να απορροφήσουν τα άλατα ή άλλα προϊόντα που τυχόν βρίσκονταν στο δείγμα

και μπορεί να επηρέαζαν την εικόνα του πηκτώματος (smear). Η εστίαση ξεκίνησε στα 250 V για 30 min, για την απομάκρυνση των αλάτων, και η τάση αυξήθηκε αργά στα 5000 V για 28 hr. Στη συνέχεια η τάση μειώθηκε στα 500 V για 10 hr, όπου συμπληρώθηκαν 112 kVh (για τη διαδικασία αυτή απαιτούνται τουλάχιστον 80 – 100 kVh).



Εικόνα 37: Όταν ένα μείγμα πρωτεϊνών τοποθετείται σε μία κλίμακα pH και ηλεκτροφορείται, κάθε πρωτεΐνη μεταφέρεται και ακινητοποιείται σύμφωνα με το ισοηλεκτρικό της σημείο.

Εικόνα 38: Το στάδιο της ενυδάτωσης των strips πραγματοποιήθηκε με την τοποθέτησή τους, ξεχωριστά, σε ειδικούς υποδοχείς για 14 – 18 hr.

2.2.7.2.3.b Εξισορρόπηση των IPG Strips

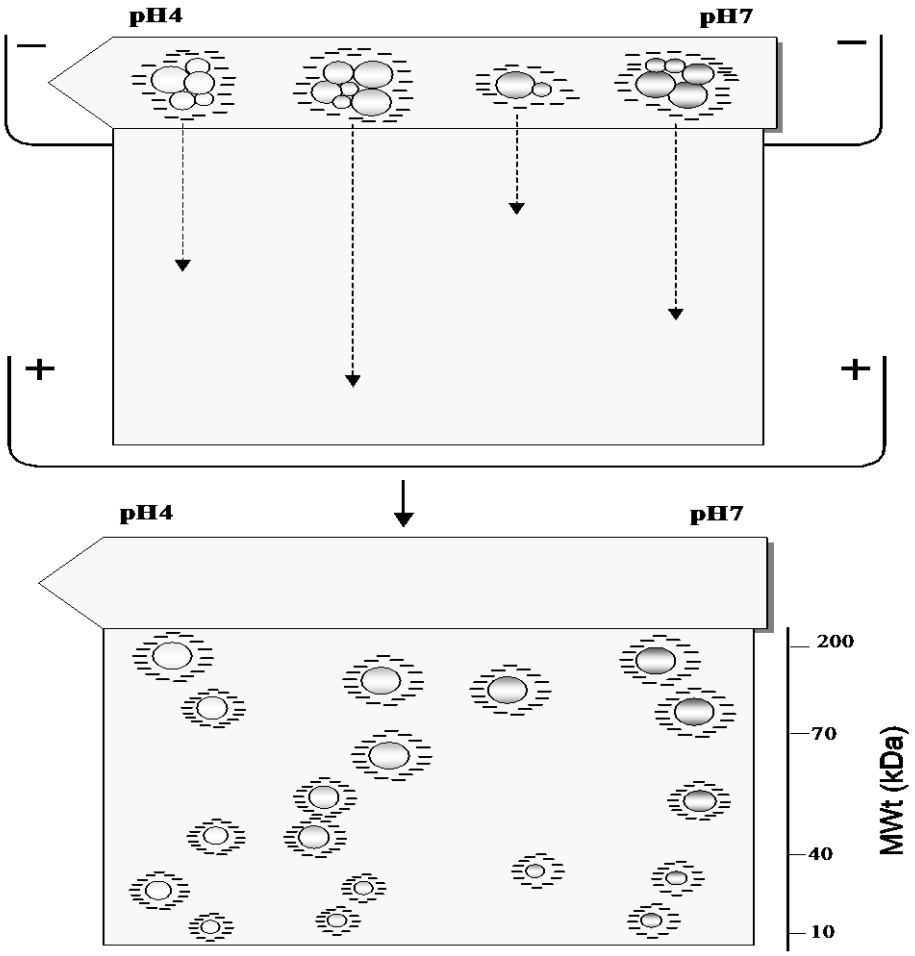
Μετά την ολοκλήρωση της ισοηλεκτρικής εστίασης, ακολούθησε η εξισορρόπηση των IPG strips σε 2 στάδια πριν την ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE ($2^{η}$ διάσταση). Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ίδιο με το ενυδατικό buffer και περιείχε επιπλέον DDT (Dichloro Diphenyl Trichloroethane) στο πρώτο στάδιο και IoA (Iodoacetamide) στο δεύτερο στάδιο. Μετά το τέλος της εστίασης, το Paraffin Oil απομακρύνθηκε και στα strips προστέθηκαν 100 ml από το διάλυμα εξισορρόπησης εμπλουτισμένο με 0,5% (w/v) DDT, στο $1^{ο}$ στάδιο, για 15 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Το στάδιο αυτό ήταν απαραίτητο προκειμένου να γίνει η αποδιάταξη των δισουλφιδικών δεσμών. Στο $2^{ο}$ στάδιο, τα strips επωάστηκαν για 15 min με 100 ml από το διάλυμα εξισορρόπησης εμπλουτισμένο με 4,32% (w/v) IoA, σε θερμοκρασία δωματίου. Στο στάδιο αυτό επήλθε και η αλκιλίωση ούτως ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα επαναδημιουργίας των δισουλφιδικών δεσμών.

2.2.7.2.4 Ηλεκτροφόρηση με βάση το μοριακό βάρος (SDS - PAGE): Η 2η Διάσταση (2D)

Μετά το στάδιο εξισορρόπησης, κατά το οποίο οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με βάση το pH, οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με βάση το μοριακό τους βάρος. Πρέπει να σημειωθεί ότι τουλάχιστον το 10 - 15% των πρωτεϊνών δεν καταλήγουν στο πήκτωμα. Πολύ βασικές πρωτεΐνες (pI >11) δεν αναλύονται εύκολα με 2D. Επίσης, υδρόφοβες ή μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεΐνες (>200 kDa) δεν εισχωρούν σε ένα 2D πήκτωμα. Όμως η τεχνική έχει βελτιωθεί με την ανάπτυξη των IPG stips, εύρους pH 3-12 (Gorg, 1999). Έτσι, κάθε πρωτεΐνη, χαρακτηρίζεται από το μέγεθος και το φορτίο της και παρουσιάζεται ως διακριτή κηλίδα (spot) στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

Στο στάδιο αυτό έγινε συναρμολόγηση της συσκευής (Ettan DALTtwelve System Separation Unit, Amersham Biosciences) για την προετοιμασία 12 πηκτωμάτων ακρυλαμίδης 12% (3 πηκτώματα για κάθε στέλεχος). Οι γυάλινες κασέτες (με ενσωματωμένα διαχωριστικά πάχους 1,5 mm), τοποθετήθηκαν στην συσκευή και ανάμεσά τους τοποθετήθηκε μια πλαστική μεμβράνη για να αποφευχθεί να κολλήσουν τα τζάμια μεταξύ τους. Κάθε πήκτωμα σημάνθηκε με ένα διαφορετικό αριθμό, τοποθετώντας χαρτί Whatman με τον αριθμό τυπωμένο επάνω, μέσα σε κάθε κασέτα, πριν την μεταφορά του διαλύματος ακρυλαμίδης 12%. Σε μία κωνική φιάλη τοποθετήθηκαν 400 ml ProtoGel (30% (w/v) acrylamide/PDA (Piperazine D-Acrylamide) (37,5 : 1)), 250 ml 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 5 ml 1 M Sodium Thiosulfate και 341.4 ml απιονισμένο νερό (Milli Q) (Παράρτημα 4.14). Στη συνέχεια, το μείγμα τοποθετήθηκε σε κενό, για περίπου 10 min υπό ανάδευση, προκειμένου να απομακρυνθεί ο παγιδευμένος αέρας που βρισκόταν στο διάλυμα. Αυτό συντελεί στον

καλύτερο πολυμερισμό της ακρυλαμίδης. Στην συνέχεια προστέθηκαν οι καταλύτες: 3 ml 10% ammonium persulfate (APS) και 0.6 ml TEMED (N,N, N'N'-tetramethylethylenediamine). Με την βοήθεια αντλίας το διάλυμα ακρυλαμίδης,12%, μεταφέρθηκε στη συσκευή. Στη συνέχεια, και πριν τα πηκτώματα πήξουν, τοποθετήθηκαν επάνω από κάθε πήκτωμα περίπου 1.5 – 2 ml Ισοβουτανόλης, για τουλάχιστον 1 hr, για τον πλήρη πολυμερισμό της ακρυλαμίδης. Έπειτα τα τζάμια καθαρίστηκαν πολύ καλά με απιονισμένο νερό για την απομάκρυνση υπολειμμάτων πολυακρυλαμίδης. Αμέσως μετά τοποθετήθηκαν στο πάνω μέρος των πηκτωμάτων τα εξισορροπημένα IPG strips (Εικόνα 39). Με στόχο την εξασφάλιση της πλήρους επαφής του strip με το πήκτωμα προστέθηκε ένα διάλυμα αγαρόζης 0.5%, 1X TGS Buffer (25 mM Tris, pH 8.3, 192 mM Glycine, 0,1% (w/v) SDS) και ίχνη Βρωμοφαινόλης Μπλε (Παράρτημα 4.15). Η αγαρόζη όχι μόνο διατηρεί το strip σε σταθερή θέση κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης αλλά εξασφαλίζει και τις καλύτερες δυνατές ηλεκτροφορητικές ιδιότητες μεταξύ του strip και του πηκτώματος. Μετά την στερεοποίηση της αγαρόζης ξεκίνησε η ηλεκτροφόρηση $2^{ης}$ διάστασης (2D) στα 75 V, με σύστημα ψύξης που διατηρούσε το διάλυμα ηλεκτροφόρησης στους 18 ^{o}C ώστε να αποφευχθεί η υπερθέρμανση, για 14 – 18 hr (Η χρωστική Βρωμοφαινόλη Μπλε χρησιμοποιήθηκε σαν μάρτυρας της πορείας και του σημείου που βρίσκονταν οι πρωτεΐνες κατά την ηλεκτροφόρηση).



Εικόνα 39: Διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος όπως προκύπτει σε SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS – PAGE). Το Sodium dodecyl sulfate (SDS) που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του πηκτώματος είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό το οποίο αποδιατάσσει τα πρωτεϊνικά μόρια χωρίς να σπάει τους πεπτιδικούς δεσμούς.

2.2.7.2.5 Χρώση και αποθήκευση των 2D πηκτωμάτων

Η χρωστική που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των πρωτεϊνών ήταν αρχικά η Coomassie Brilliant Blue ενώ έγινε επανάληψη της μεθόδου με την Silver Nitrate, χρωστικές συμβατές με MS.

2.2.7.2.5.α Χρώση με Coomassie Brilliant Blue και με Silver Nitrate

Αμέσως μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε η μονιμοποίηση των κηλίδων στο πήκτωμα για να αποτραπεί η διάχυσή τους. Το διάλυμα μονιμοποίησης περιείχε: 6 ml 85% H_3PO_4 (ortho-phosphoric acid), 50 ml CH_3OH (Methanol HPLC grade) και 44 ml απεσταγμένο νερό (Παράρτημα 4.16). Το κάθε πήκτωμα τοποθετήθηκε σε 100 ml διαλύματος μονιμοποίησης, σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση, για 2 hr. Μετά την μονιμοποίηση των πρωτεϊνών το κάθε πήκτωμα εμβαπτίστηκε σε 100 ml Coomassie Colloidal Blue Stain (Novex, Invitrogen) για 24 hr. Ελάχιστες κηλίδες εμφανίστηκαν μετά την χρώση αυτή. Ακολούθησε ξέπλυμα των πηκτωμάτων με απεσταγμένο νερό, για 24 hr, για τον αποχρωματισμό τους.

Σε μια δεύτερη προσπάθεια για καλύτερο αποτέλεσμα, τα πηκτώματα εμβαπτίστηκαν σε 100 ml Silver Nitrate Stain (SilverXpress Silver Staining Kit, Invitrogen), μιας πιο ευαίσθητης χρωστικής. Για την χρώση αυτή δεν πραγματοποιήθηκε στάδιο μονιμοποίησης, μιας και είχε ήδη διεκπεραιωθεί κατά την χρώση με την Coomassie Colloidal Blue. Ακολούθησαν δύο επωάσεις των 30 min, υπό ανάδευση, για κάθε πήκτωμα, για την ανίχνευση των κηλίδων με το διάλυμα ευαισθητοποίησης (sensitizer) (105 ml απιονισμένο νερό, 100 ml Methanol, 50 ml sensitizer) (SilverXpress Silver

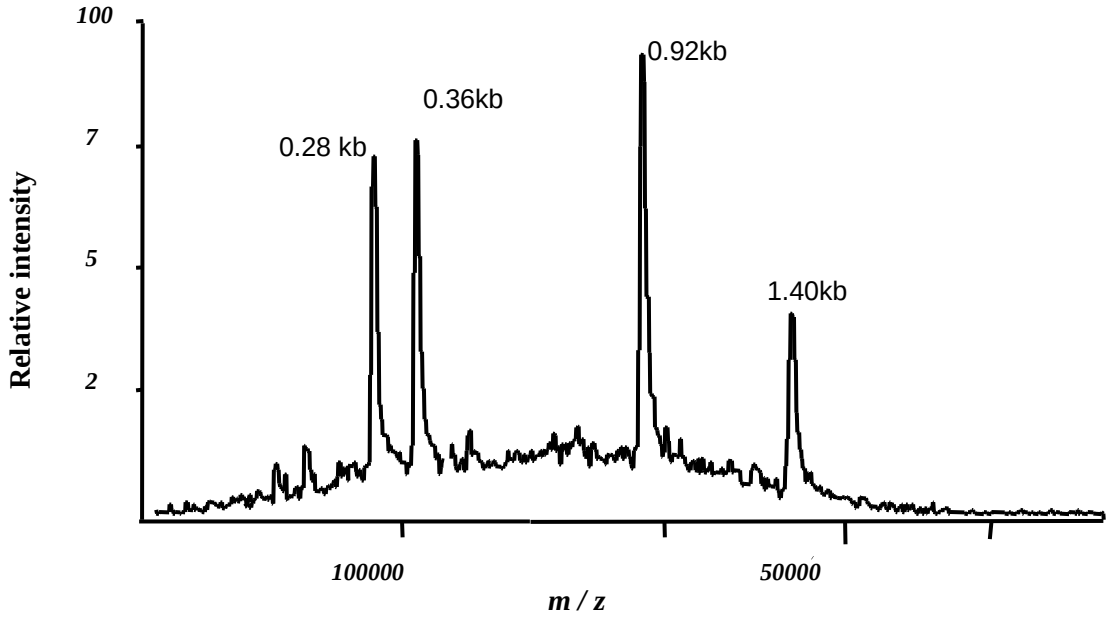
Staining Kit, Invitrogen). Ακολούθησαν δύο ξεπλύματα για κάθε πήκτωμα με 200 ml απιονισμένο νερό, για 10 min και χρώση με 100 ml διαλύματος χρώσης (5 ml από το Stainer A και Stainer B, και 90 ml απιονισμένο νερό) (SilverXpress Silver Staining Kit, Invitrogen), για 15 min, υπό ανάδευση. Μετά την χρώση ακολούθησαν δύο ξεπλύματα με 200 ml απιονισμένο νερό ανά πήκτωμα, για 10 min και εμβάπτισμα σε 100 ml εμφανιστικού υγρού (5 ml Developer, 95 ml απιονισμένο νερό) (SilverXpress Silver Staining Kit, Invitrogen), υπό ανάδευση. Η αντίδραση τερματίστηκε με την απευθείας προσθήκη 5 ml αναστολέα της χρώσης (Stopper) (SilverXpress Silver Staining Kit, Invitrogen) και ακολούθησαν δύο ξεπλύματα με 200 ml απιονισμένο νερό ανά πήκτωμα, υπό ανάδευση, για 10 min. Ένα τρίτο ξέπλυμα με 200 ml απιονισμένο νερό ακολούθησε, υπό ανάδευση, για 14 – 18 hr. Ακολούθησε ανίχνευση των κηλίδων στα πηκτώματα (Εικόνα 36), με το λογισμικό πρόγραμμα PD-Quest 6.1 (BioRad) μετά από σάρωση των πηκτωμάτων (scan).

2.2.7.2.6 Ανίχνευση των κηλίδων με την χρήση του λογισμικού PD-Quest 6.1

Η θέση που λαμβάνει μια κηλίδα στο πήκτωμα, σύμφωνα με το ισοηλεκτρικό της σημείο και το μοριακό της βάρος, δεν είναι αρκετή πληροφορία για την ταυτοποίηση μιας πρωτεΐνης. Η ανάλυση με MS έχει αναδειχθεί σε μια από τις καλύτερες μεθόδους για την μελέτη και τον χαρακτηρισμό πρωτεϊνών, μετρώντας την σχέση φορτίου/μάζας από ιονισμένα μόρια, όπως πρωτεΐνες ή πεπτίδια. Η MS χρησιμοποιεί μαγνήτες ή ηλεκτρικά πεδία για να επιτύχει το διαχωρισμό πρωτεϊνών με βάση τη μάζα των ατόμων από τα οποία αποτελούνται. Τα αποτελέσματα της MS αποτυπώνονται ως κορυφές σε γράφημα στο οποίο φαίνεται το εύρος της αφθονίας των πρωτεϊνών (Εικόνα 40). Ο συνδυασμός των μεθόδων διαχωρισμού με φασματογράφους μάζας επιτρέπει τον διαχωρισμό έως και φεμπτομορίων από βιομόρια. Η μικρή ποσότητα του απαιτούμενου βιομορίου, σε συνδυασμό με την γρήγορη ταυτοποίηση του, ήταν η αιτία για την καθιέρωση της πρωτεωμικής ως ένα από τα βασικά εργαλεία για την μελέτη των πρωτεϊνών (Link 1999).

Προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι πρωτεϊνες που ανιχνεύθηκαν, μετά την συλλογή τους, οι κηλίδες τοποθετήθηκαν σε ένα 96 well plate και πραγματοποιήθηκε πέψη των πρωτεϊνών με χοίρεια θρυψίνη (Promega) και ανάλυση με το MALDI – TOF – MS (Voyager – DE STR, Applied Biosystems). Τα επεξεργασμένα και στεγνά πλέον πεπτίδια επαναδιαλύθηκαν σε 5 μl 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) σε 50% acetonitrile (ACN). Ποσότητα 1 μl από τα επαναδιαλυμένα πεπτίδια τοποθετήθηκε στον στόχο του MALDI και αμέσως προστέθηκε 1 μl α-cyano-4-hydroxicinnamic acid (5 mg /ml σε 0.1% TFA σε 60% ACN). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε μετά από ρύθμιση του MALDI –

TOF σε εύρος μάζας 850 – 300000 Da. Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από τον φασματογράφο μάζας, δόθηκαν στην βάση δεδομένων - MASCOT (online), για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν από το κάθε πήκτωμα.



Εικόνα 40: Δυναμικό εύρος της αφθονίας των πρωτεϊνών μετά από ανάλυση με MS (www.biochem.mpg.de).

2.2.7.2.7 Σημεία στα οποία δόθηκε προσοχή κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης της μεθόδου, για καλύτερα αποτελέσματα

1. Όλα τα strips που χρησιμοποιήθηκαν είχαν τις ακόλουθες διαστάσεις: μήκος 178 mm, πλάτος 3.3 mm, πάχος του πηκτώματος μετά την ενυδάτωση 0.5 mm (περίπου), εύρος pH 4-7 και σύσταση του πηκτώματος 3% C, 4% T. Η ενυδάτωση του πηκτώματος είχε σαν αποτέλεσμα την μεγαλύτερη διόγκωσή του στο πιο αλκαλικό άκρο του strip.
2. Λόγω του μεγάλου φορτίου δείγματος που τοποθετείται στα strips ήταν απαραίτητη η χρήση διηθητικού χαρτιού στα σημεία που βρίσκονταν τα ηλεκτρόδια, για την συλλογή των πρωτεϊνών που ανήκαν σε pH εκτός των ορίων της κλίμακας που είχε τοποθετηθεί αλλά και για την συλλογή αλάτων.
3. Το Paraffin Oil προφυλάσσει τα strips από το στέγνωμα και την Urea / Thiourea από την κρυσταλλοποίηση. Επιπλέον, λειτουργεί σαν φραγμός και δεν επιτρέπει την είσοδο στο διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) που περιέχεται στην ατμόσφαιρα γιατί όταν το CO_2 εισχωρήσει στο πήκτωμα μπορεί να δράσει σαν ρυθμιστικό διάλυμα, pH 6.3, αλλάζοντας έτσι την κλίμακα του pH στο strip.
4. Τα 2 στάδια εξισορρόπησης πραγματοποιήθηκαν στον ίδιο δίσκο (tray) προκειμένου να μειωθούν οι πιθανότητες επιμόλυνσης.
5. Η προετοιμασία μεγάλου αριθμού πηκτωμάτων απαιτεί αρκετή εξάσκηση. Η ποσότητα των καταλυτών που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ελάχιστη δυνατή για την αποφυγή του πολύ γρήγορου πολυμερισμού που μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλη αύξηση της θερμοκρασίας της

συσκευής. Ο ιδανικός πολυμερισμός, που μπορεί να παρατηρηθεί στο σημείο κάτω από το στρώμα της ισοβουτανόλης, θα πρέπει να διαρκεί 30 – 60 min. Εάν κριθεί απαραίτητο, η ποσότητα των καταλυτών θα πρέπει να μπορεί να αυξηθεί κατά 10%.

6. Το υπόστρωμα αγαρόζης ήταν έτσι ώστε να μπορεί να διατηρείται σε υγρή μορφή σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες. Ίχνη Βρωμοφαινόλης Μπλε μπορούν να προστεθούν σαν χρωστική εντοπισμού της πορείας των πρωτεϊνών κατά την ηλεκτροφόρηση.
7. Ήταν σημαντική η τοποθέτηση του ηλεκτροφορητικού διαλύματος στην συσκευή Ettan DALTtwelve System Separation Unit πριν την έναρξη της ηλεκτροφόρησης για να αρχίσει η πτώση της θερμοκρασίας στους 15 – 18 ^{o}C.
8. Τα πηκτώματα είχαν την δυνατότητα να αποθηκευτούν στο ψυγείο, στους 4 ^{o}C, για αρκετούς μήνες χωρίς να αλλοιωθεί η ποσότητα και η ποιότητα των κηλίδων. Απαραίτητη όμως προϋπόθεση ήταν η προσθήκη 0.02% (w/v) sodium azide, για την αποφυγή ανάπτυξης βακτηριδίων και μυκήτων.

2.2.7.3 Αποτελέσματα και Συζήτηση

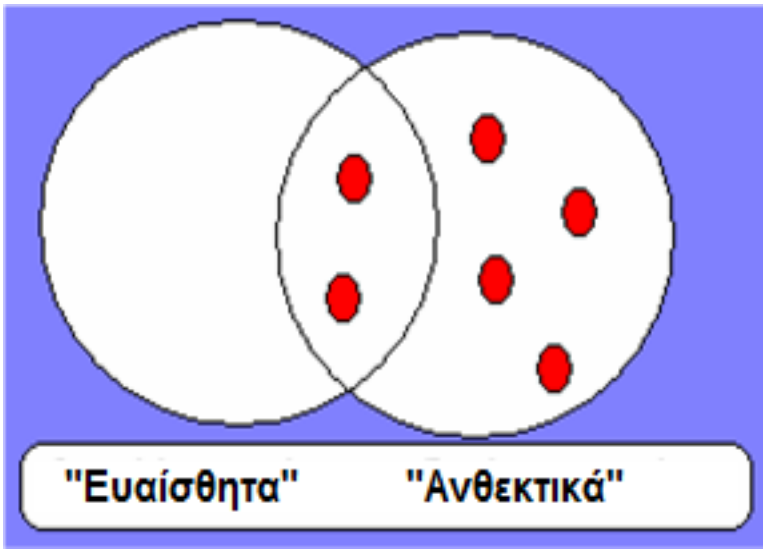
Κατά την πραγματοποίηση της πρωτεωμικής ανάλυσης στο IIBEAA, πραγματοποιήθηκαν 2 χρώσεις προκειμένου να επιτευχθεί ο καλύτερος δυνατός εντοπισμός των κηλίδων στα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης. Με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue μόνο οι κηλίδες αποτελούμενες από πρωτεΐνες που υπερκεφράζονταν ή ήταν μεγάλου μοριακού βάρους εντοπίστηκαν. Με τη χρωστική Silver Nitrate εντοπίστηκαν εκατοντάδες πρωτεΐνες στα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης. Συγκεκριμένα, 304 spots ανιχνεύτηκαν στα «ανθεκτικά» στελέχη (H2, D3) και 300 spots στα «ευαίσθητα» (H1, D2) στελέχη. Από τις πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν 6 ήταν εκείνες που παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των στελεχών. Από αυτές, οι 4 εντοπίστηκαν μόνο στα 2 «ανθεκτικά» στελέχη που μελετήθηκαν, ενώ οι άλλες 2 εντοπίστηκαν και στα 4 στελέχη αλλά παρουσίασαν υπερέκφραση στα «ανθεκτικά» στελέχη ($p < 0.05$) (Εικόνα 41). Από τις 6 αυτές πρωτεΐνες, μόνο 4 ταυτοποιήθηκαν τελικώς με το MALDI-TOF MS (Πίνακας 9). Οι 4 αυτές πρωτεΐνες ήταν εκείνες που εντοπίστηκαν μόνο στα «ανθεκτικά» στελέχη. Συγκεκριμένα, η Heat Shock Protein, μεγέθους 70 kDa (HSP 70) ήταν εκείνη με την μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης και σχετίζεται με την ανταπόκριση του οργανισμού του παράσιτου σε κατάσταση stress (Stress response/chaperone protein) (Brochu 2004). Η HSP 70 είναι ένας μοριακός «συνοδός» και εκφράζεται υπό φυσιολογικές συνθήκες για να διατηρεί την ομοιόσταση στο σώμα του παράσιτου. Οι HSP 70 πρωτεΐνες αποσκοπούν στην προστασία του κυττάρου στο οποίο εκφράζονται από θερμικούς και οξειδωτικούς παράγοντες (όπως είναι τα φάρμακα). Από τις πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν, η μία ήταν πρωτεΐνη πλήρους μεγέθους 70kDa

(HSP 70) και ανιχνεύτηκε στο ανθεκτικό στέλεχος *L. donovani* (H2), ενώ οι άλλες δύο ήταν πρόδρομες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες και συγγενικές με την HSP 70 (~70kDa) οι οποίες ανιχνεύτηκαν στο ανθεκτικό στέλεχος *L. infantum* (D3). Μια επιπλέον πρωτεΐνη, θεωρούμενη ως μη χαρακτηρίσιμη ανιχνεύτηκε στο ανθεκτικό στέλεχος *L. infantum* (D3) (~40kDa).

Ο λόγος για τον οποίο δεν μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν όλες οι πρωτεΐνες οι οποίες εντοπίστηκαν ήταν: α) τα στελέχη του παράσιτου *L. donovani* και *L. infantum* δεν είναι πολύ καλά μελετημένα και μόνο ένα μικρό μέρος του γονιδιώματος των στελεχών αυτών υπάρχει στην «βιβλιοθήκη» (library), κάτι που δυσκολεύει την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών (Dea-Ayuela 2006), β) δεν παρήχθησαν αρκετά πεπτίδια κατά την διαδικασία πέψης με την θρυψίνη (πχ δεν υπήρχαν cut - sites της θρυψίνης) ή γ) η ποσότητα των πεπτιδίων που παρήχθησαν δεν ήταν αρκετή λόγο αδυναμίας ιονισμού τους ή λόγω της ποσότητας της πρωτεΐνης.

Σύμφωνα με συνεχώς αυξανόμενα πειραματικά δεδομένα, οι HSP φαίνεται να έχουν μεγάλη σημασία, για τα κύτταρα που τις εκφράζουν, σε σχέση με την αντοχή τους στα φάρμακα. Σε παλαιότερες μελέτες είχε βρεθεί ότι η ταυτόχρονη επίδραση υπερθερμίας και χημειοθεραπευτικών αυξάνει το ρυθμό εξάλειψης νεοπλασματικών κυττάρων. Εν τούτοις, αν πριν από την χορήγηση χημειοθεραπευτικών επιδράσει στα κύτταρα θερμικό ερέθισμα (ή έκθεση σε κάδμιο ή αιθανόλη) τότε επάγεται η σύνθεση των HSP και η δράση των χημειοθεραπευτικών γίνεται λιγότερο αποτελεσματική (Wallner, 1986). Σε μελέτη ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων μαστού βρέθηκε ότι η HSP 27 και σε μικρότερο βαθμό η HSP 70 σχετίζονται με αυξημένη αντοχή έναντι της δοξορουβισίνης (Ciocca, 1992), η οποία αναστέλλεται όταν στα κύτταρα αυτά

εισαχθούν αντιπαράλληλα ολιγονουκλεοτίδια των αντίστοιχων HSP (εισαγωγή / επιμόλυνση των κυτταρικών σειρών με ένα αντικωδικόνιο) (Oestereich, 1993). Από τις παρατηρήσεις αυτές, φαίνεται επομένως ότι οι HSP εμπλέκονται στην αντοχή στα φάρμακα, γεγονός που έχει ιδιαίτερη κλινική σημασία δεδομένου ότι η γνώση της έκφρασης ή μη των παραγόντων αυτών σε διάφορους, για παράδειγμα, τύπους όγκων θα μπορούσε να συμβάλλει στην καλύτερη πρόβλεψη της ανταπόκρισης και να επιτρέψει πλέον επιτυχείς θεραπευτικές επεμβάσεις. Επιπλέον, παρόλο που ο ρόλος των HSPs στην αντοχή της *Leishmania* δεν έχει διερευνηθεί εκτενώς, υπάρχουν μελέτες που αποδεικνύουν την αυξημένη έκφραση των HSPs διαφόρων μοριακών βαρών (HSP 18, HSP 22, HSP 45, HSP 54, HSP 56, HSP 70, HSP 74, HSP 78, HSP 88, HSP 94) μετά από έκθεση των παράσιτων σε AsIII (Sodium Arsenite) (Lawrence and Robert-Gero, 1985).



Εικόνα 41: Από τις 6 πρωτεΐνες που ανιχνεύτηκαν, 2 εντοπίστηκαν σε όλα τα στελέχη (H1, D2, H2, D3) αλλά υπερεκφράζονταν στα «ανθεκτικά» (H2, D3), ενώ 4 εντοπίστηκαν μόνο τα «ανθεκτικά» στελέχη (H2, D3).

Title	Protein MW
Heat shock 70 kDa protein - *L. donovani* (H2)	71410.00
Heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor - *L. infantum* (D3)	68915.00
Heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor - *L. infantum* (D3)	68915.00
Putative uncharacterized protein - *L. infantum* (D3)	36576.00

Πίνακας 9: Από τις 6 πρωτεΐνες που ανιχνεύτηκαν, μόνο οι 4 που ανιχνεύτηκαν στα «ανθεκτικά» στελέχη (H2, D3) μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν.

2.2.8 Δοκιμασία Western Blotting για την ανίχνευση της Pgp - 170

2.2.8.1 Εισαγωγή

Ο ανθρώπινος οργανισμός διαθέτει ομοιοστατικούς μηχανισμούς που του επιτρέπουν να διατηρεί σταθερές τις συνθήκες του εσωτερικού του περιβάλλοντος παρά τις εξωτερικές μεταβολές (ρύθμιση της θερμοκρασίας, διατήρηση του pH στο 7.4, ρύθμιση της γλυκόζης στο αίμα, ρύθμιση των επιπέδων CO_2 στον οργανισμό) . Ένας ιδιαίτερος ομοιοστατικός μηχανισμός είναι και το ανοσοβιολογικό σύστημα το οποίο παράγει κύτταρα και κυτταρικά προϊόντα (ανοσοσφαιρίνες - αντισώματα) για την αντιμετώπιση κάθε ξένου αντιγόνου. Τα αντισώματα έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν και να προσδένονται σε έναν αντιγονικό καθοριστή (επίτοπο) και διακρίνονται σε πρωτογενή και δευτερογενή. Αντιγόνο ονομάζεται οποιαδήποτε ξένη προς τον οργανισμό ουσία που μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή κυττάρων (Τ- και Β- λεμφοκύτταρα) και κυτταρικών προϊόντων (ανοσοσφαιρίνες - αντισώματα), με στόχο την ολοκληρωτική καταστροφή του από το ανοσοποιητικό σύστημα. Σαν αντιγόνο μπορεί να δράσει ένας παθογόνος παράγοντας, πχ ένας μικροοργανισμός, κάποιο τμήμα ή οι τοξικές ουσίες του, ή κάποιος μη παθογόνος παράγοντας του περιβάλλοντός, όπως είναι τα αλλεργιογόνα (γύρη, συστατικά τροφών, διάφορες φαρμακευτικές ουσίες, ορός ή κύτταρα από άλλους ανθρώπους ή ζώα κ.α.).

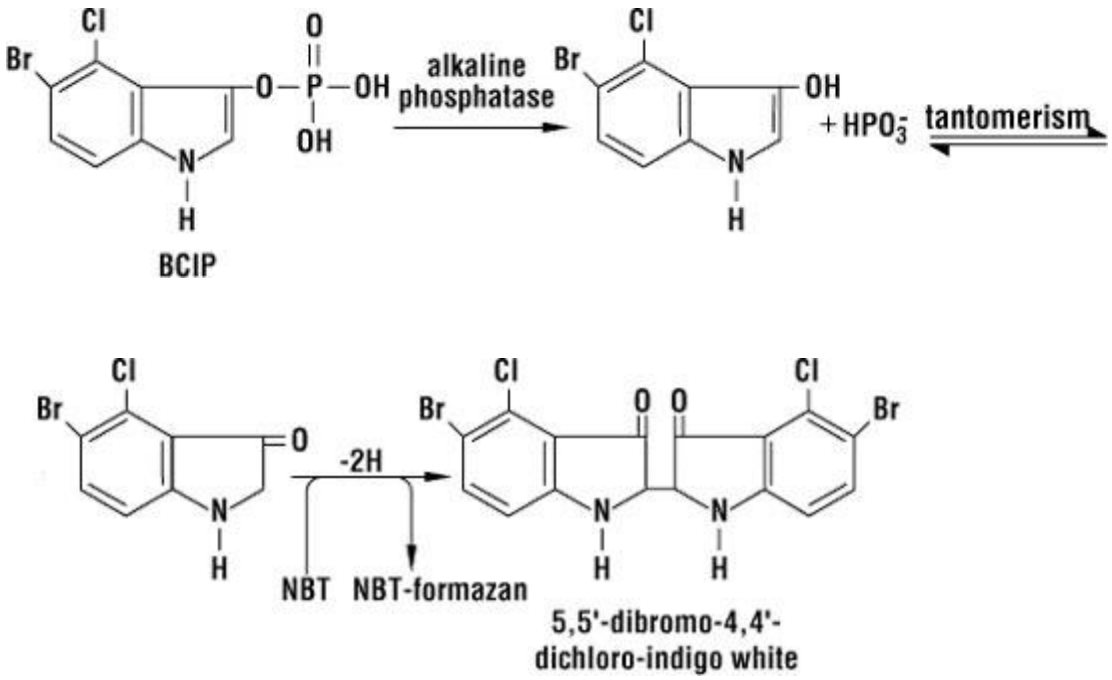
Πρωτογενή ονομάζονται τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται για την ειδική σύνδεσή τους με την προς ανίχνευση πρωτεΐνη - αντιγόνο, δημιουργώντας ένα σύμπλοκο (complex). Σαν πρωτογενή αντισώματα

λειτουργούν στοιχεία από τον ορό ή άλλο βιολογικό υγρό (ΕΝΥ, αμνιακό υγρό, οφθαλμικό υγρό, κ.α) ανθρώπου ή ζώου ή ένα μονοκλωνικό ή πολυκλωνικό αντίσωμα (τα οποία προέρχονται κυρίως από ζώα). Οι Kohler και Milstein (Kohler, 1975) ανέπτυξαν την τεχνική της παραγωγής των μονοκλωνικών αντισωμάτων με την βοήθεια των οποίων εντοπίζονται, μεταξύ άλλων, μόρια όπως ένζυμα, ορμόνες, καθώς και λεμφοκύτταρα, νευρικά κύτταρα κ.α. Ο πολυκλωνικός αντιορός, που προέρχεται από ανοσοποιημένο οργανισμό, περιέχει αντισώματα διαφορετικών ισοτύπων, ειδικότητας και συγγένειας τα οποία ανταγωνίζονται ως προς την σύνδεσή τους με κάθε επίτοπο.

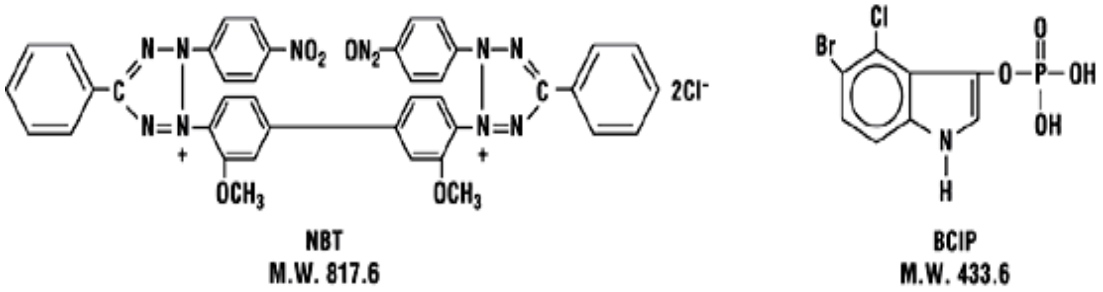
Το WB είναι μια τεχνική κατά την οποία καθίσταται δυνατός ο ποιοτικός προσδιορισμός των ανοσοσφαιρινών ενός ατόμου, έναντι ενός αντιγόνου. Και οι δύο τύποι αντισωμάτων (μονοκλωνικό - πολυκλωνικό) δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα στο WB. Τα μονοκλωνικά έχουν καλύτερη εξειδίκευση, καθαρότητα και σύσταση δίνοντας λιγότερη παρεμβολή ανεπιθύμητου φόντου. Τα πολυκλωνικά έχουν χαμηλότερο κόστος και ευκολότερη διαδικασία παραγωγής έχοντας συχνά πολύ καλή πρόσδεση με το αντιγόνο.

Δευτερογενή ονομάζονται τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται έναντι των πρωτογενών. Αυτό σημαίνει ότι το δευτερογενές αντίσωμα θα προσδεθεί επάνω στο πρωτογενές το οποίο δέσμευσε την πρωτεΐνη – αντιγόνο. Το αντι-ισοτυπικό αντίσωμα είναι συζευγμένο με ένα ένζυμο (Alkaline Phosphatase, AP ή Horse Radish Peroxidase, HRP). Η Alkaline Phosphatase (AP), μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 140 kDa, καταλύει την υδρόλυση των φωσφορικών ομάδων από ένα υπόστρωμα πρωτεϊνών (Εικόνα 42). Το αποτέλεσμα είναι ο χρωματισμός ή ο φθορισμός του προϊόντος. Μιας και ο ρυθμός της αντίδρασής της είναι γραμμικός, η ανίχνευση μπορεί να ενισχυθεί

με την επέκταση του χρόνου επώασης με το ένζυμο. Χρωμογόνες ουσίες όπως το NBT (nitro-blue tetrazolium chloride, MW 817.6) (Εικόνα 43$^{\alpha}$) και το BCIP (5 – bromo – 4 – chloro - 3΄ - indolylphosphate *p* -toluidine salt, MW 433.6) (Εικόνα 43$^{\beta}$) χρησιμοποιούνται γιατί όταν έρθουν σε επαφή με το ένζυμο AP, μετατρέπονται σε αδιάλυτα, χρωματισμένα προϊόντα στην μεμβράνη και έτσι μπορούν να ανιχνευτούν.

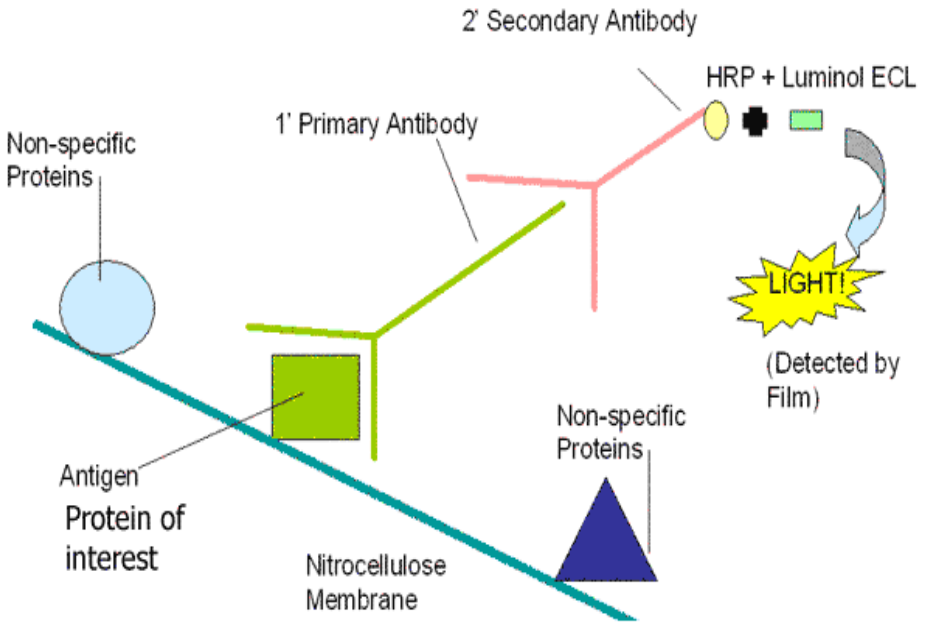


Εικόνα 42: Υδρόλυση του BCIP από την Alkaline Phosphatase για την δημιουργία μιας ένωσης η οποία παράγει χρωστική. Στην συνέχεια το NBT σε NBT-formazan από δύο αναγωγικά ισοδύναμα που παράγονται από τον διμερισμό.



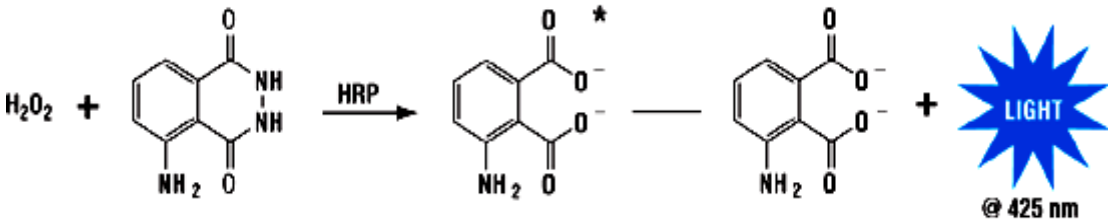
Εικόνα 43[α,β]: Χημική δομή και μοριακό βάρος των NBT και BCIP αντίστοιχα.

Η Horse Radish Peroxidase (HRP), μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 40kDa, καταλύει την οξείδωση του υποστρώματος με το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Το αποτέλεσμα είναι η εκπομπή φωτός του παραπροϊόντος, μετά από επώαση με υπόστρωμα χημειοφωταύγειας (Chemilluminesence) (Εικόνα 44).



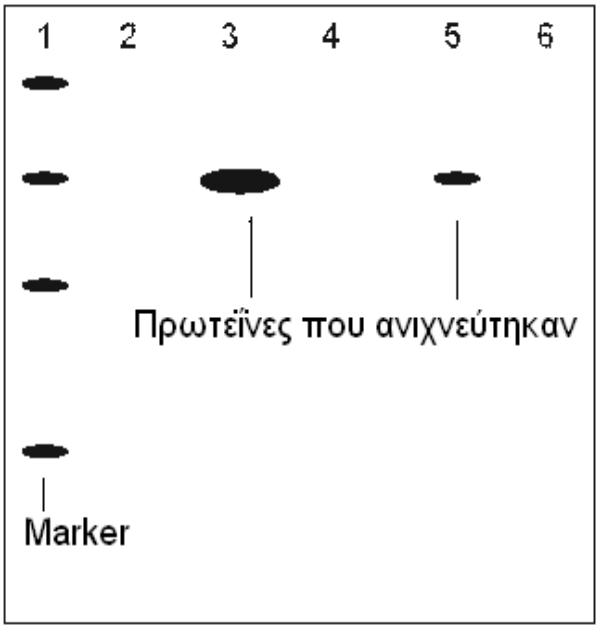
Εικόνα 44: Χημειοφωταύγεια που προκαλείται λόγω χημικής αντίδρασης, όταν ενέργεια σε μορφή φωτός εκπέμπεται από ένα υπόστρωμα.

Ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια χημειοφωταύγειας είναι η Luminol, και η οξείδωσή της από το υπεροξείδιο έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ενός προϊόντος που ονομάζεται 3 - aminophthalate (σημειώνεται με * στην Εικόνα 45). Το προϊόν αυτό εκφυλίζεται, παράγοντας φωτόνια (Εικόνα 45).



Εικόνα 45: Οξείδωση της Luminol παρουσίας της Horseradish Peroxidase και του υπεροξείδιου του υδρογόνου για την δημιουργία φωτεινού σήματος (3-aminophthalate*). Το 3-aminophthalate* εκπέμπει λάμψη στα 425 nm.

Ο όρος “blotting” αναφέρεται στην μεταφορά πρωτεϊνών που έχουν εκχυλιστεί από βιολογικά δείγματα από ένα πήκτωμα σε μια μεμβράνη, και η μετέπειτα ανίχνευσή τους στην επιφάνεια της μεμβράνης με την βοήθεια αντισωμάτων συζευγμένων με κάποιο ένζυμο (Towbin, 1979). Εφόσον υπάρχουν οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες στην μεμβράνη, έναντι των αντισωμάτων που προστίθενται, δεσμεύονται με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ειδικών ζωνών (bands) (Εικόνα 46).



Εικόνα 46: Σχηματική αναπαράσταση της ταινίας νιτροκυτταρίνης, όπως εμφανίζεται μετά από ανοσοενζυμική ανίχνευση. Διακρίνονται η κλίμακα μοριακού βάρους – Marker (1) και 2 πρωτεΐνες ίδιου μοριακού βάρους αλλά διαφορετικής έκφρασης (3, 5).

Στόχος της δοκιμασίας ήταν η αναζήτηση της Pgp - 170, μιας ενεργειακά (ATP) – εξαρτώμενης διαμεμβρανικής αντλίας εκροής λιποφιλικών ουσιών, οι οποίες περιλαμβάνουν αρκετά φάρμακα και φθορίζουσες χρωστικές.

2.2.8.2 Μεθοδολογία

2.2.8.2.1 Καλλιέργεια παράσιτων και Συλλογή Πρωτεϊνών

Τα παράσιτα των 10 υπό μελέτη στελεχών καλλιεργήθηκαν σε καλλιεργητικό υλικό RPMI 1640 (Παράρτημα 4.4). Ένας αριθμός προμαστιγωτών (1 x 10^7), κατά την λογαριθμική φάση ανάπτυξης, συλλέχθηκαν από το κάθε στέλεχος μετά την $4^η$ ανακαλλιέργεια (passage). Τα παράσιτα ξεπλύθηκαν με 0,9% NaCl, 3 φορές μετά από φυγοκέντρηση στις 700 x g, για 10 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Σκοπός των πλύσεων ήταν η αφαίρεση συστατικών του καλλιεργητικού υλικού (κυρίως πρωτεΐνες του ορού), τα οποία μπορεί να λειτουργήσουν σαν ανασταλτικός παράγοντας για την δοκιμασία. Ακολούθησε ανάδευση του ιζήματος και ανασύσταση σε 10 μl Urea Cracking Buffer (10 mM NaH_2PO_4, 1% SDS, 1% β-Mercaptoethanol, 5 M Urea, pH 7.0) (Παράρτημα 4.17) ανά 10^7 παράσιτα. Πραγματοποιήθηκε επώαση για 15 min στους 37 ºC και προσθήκη ίσου όγκου Urea - Laemmly buffer 2X (2M TrisHCl pH 6.8, 10% SDS, 10% β-mercaptoethanol, 20% Glycerol, 0.2% Bromophenol Blue, 8 M Urea) (Παράρτημα 4.18). Ακολούθησε επώαση των πρωτεϊνών για επιπλέον 15 min στους 37 ºC.

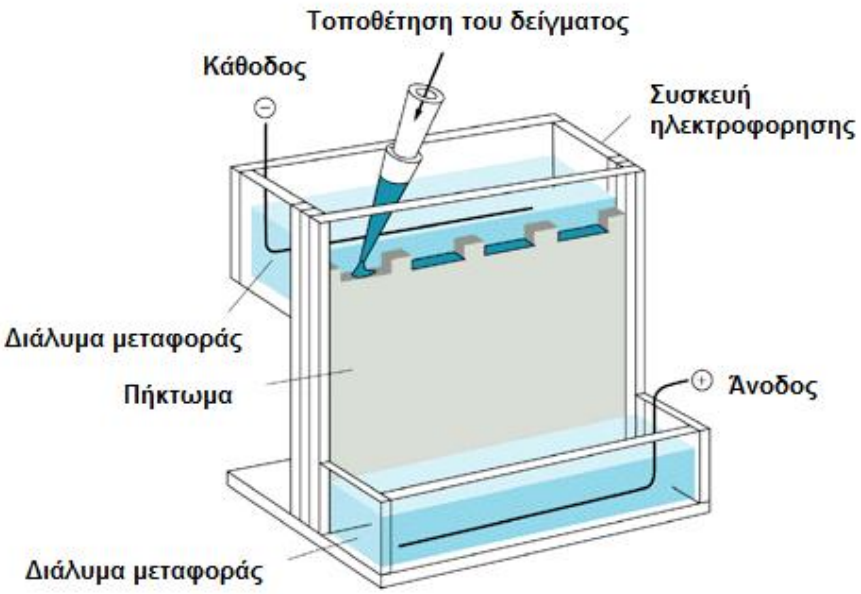
2.2.8.2.2 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών (Παράρτημα 4.19)

Μετά από πλύσιμο των τζαμιών της συσκευής ηλεκτροφόρησης με 10% SDS και έπειτα με 70% αιθανόλη, έγινε συναρμολόγηση της συσκευής για την παρασκευή πηκτωμάτων. Παρασκευάστηκε ηλεκτροφορητικό πήκτωμα ανάλυσης (SDS – PAGE) με πυκνότητα 8% (Παράρτημα 4.20), το οποίο πολυμερίστηκε για 30 min με επίστρωση 200 μl ισοβουτανόλης στην επιφάνειά του, πριν την πήξη του. Μετά τον πολυμερισμό, η ισοβουτανόλη ξεπλύθηκε και έγινε προσθήκη πηκτώματος συμπύκνωσης, με πυκνότητα 5% (Παράρτημα 4.21), και τοποθέτηση της ειδικής χτένας για την δημιουργία 2 πηγαδιών (1 πηγάδι για τον Marker και 1 για το αντιγόνο). Σε θερμοκρασία δωματίου, τα πηκτώματα πολυμερίστηκαν για 1 hr. Στην συνέχεια έγινε αφαίρεση της χτένας, πλύση των πηγαδιών με απεσταγμένο νερό και τοποθέτηση των πηκτωμάτων στην συσκευή ηλεκτροφόρησης με την προσθήκη 1X διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Electrode buffer 1X) (25 mM Tris, 0.192 M Glycine και 0.1% SDS, διαλυμένα σε απεσταγμένο νερό) (Παράρτημα 4.22). Το επωασμένο δείγμα και ο μάρτυρας πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Marker) προστέθηκαν στις αντίστοιχες ειδικές υποδοχές που είχε δημιουργήσει η χτένα. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε τάση 75 - 80 V μέχρι ο Marker και το αντιγόνο να περάσουν το πήκτωμα συμπύκνωσης (5%) και έπειτα σε τάση 130 V στο πήκτωμα ανάλυσης (8%), για περίπου 1 hr.

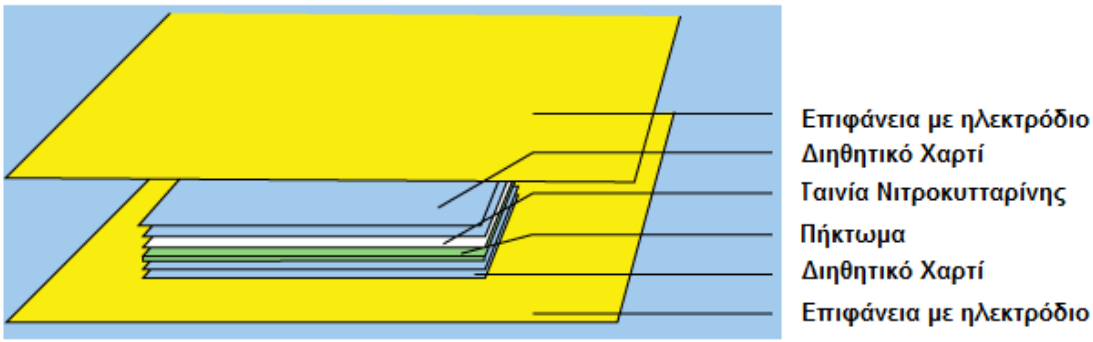
2.2.8.2.3 Ανοσοαποτύπωση (Παράρτημα 4.23)

Μετά την ηλεκτροφόρηση, τα πηκτώματα συμπύκνωσης (5%) και ανάλυσης (8%) εμβαπτιστήκαν, χωρίς να διαχωριστούν (γιατί μερικές φορές οι ABC transporters συσσωρεύονται και παραμένουν στο πήκτωμα συμπύκνωσης), σε διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer) (Tris 25 mM pH 7.7-8.3 και Glycine 0.7 M, διαλυμένα σε απεσταγμένο νερό) (Παράρτημα 4.24) για 10 min για την απελευθέρωση του διαλύματος φόρτωσης. Έπειτα, το πήκτωμα αποτυπώθηκε σε νιτροκυτταρίνη με διάμετρο πόρων 0.45 μm (Hoefer Scientific Instruments, USA), με την χρήση συσκευής μεταφοράς πρωτεϊνών (semi-dry transfer apparatus, Hoefer Scientific Instruments, USA) (Εικόνα 47). Η συσκευή αυτή περιλαμβάνει δυο ηλεκτρόδια τα οποία δημιουργούν ένα «sandwitch» και δεσμεύουν 3 φύλλα διηθητικού χαρτιού, 1 φύλλο νιτροκυτταρίνης, το πήκτωμα και από πάνω άλλα 3 φύλλα διηθητικού χαρτιού προκειμένου να μεταφερθούν ο πρωτεΐνες από το πήκτωμα στην ταινία νιτροκυτταρίνης (Εικόνα 48). Πριν το στάδιο της ηλεκτροφόρησης, οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης εμβαπτιστήκαν σε διάλυμα μεταφοράς για την απομάκρυνση παγιδευμένου αέρα. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος σε ένταση 0,8 mA/cm^2 (διαστάσεις νιτροκυτταρίνης: ύψος x πλάτος x 0.8) για 1.5 hr. Κατά την ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες μεταναστεύουν από το πήκτωμα προς την μεμβράνη όπου δεσμεύονται και δεν μπορούν να ξεφύγουν. Επομένως, η μεμβράνη που προκύπτει είναι ένα αντίγραφο που φτιάχνεται με μήτρα το πήκτωμα. Στην συνέχεια ακολούθησε εμβάπτισμα της νιτροκυτταρίνης σε 0.1% διαλύματος Ponceau S (2 g Ponceau S, 30 g Trichloroacetic acid και 30 g Sulfosalycilic acid, διαλυμένα σε απεσταγμένο νερό) (Παράρτημα 4.25). Μετά από 10 min, η μεμβράνη

ξεπλύθηκε 3 φορές με απεσταγμένο νερό και έπειτα με πλυστικό διάλυμα 1X (για 10X: 50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl και 0.01% Triton, διαλυμένα σε απεσταγμένο νερό) (Παράρτημα 4.26). Το εμβάπτισμα της νικτοκυτταρίνης σε Ponceau S είναι χρήσιμο, αφενός για να επιβεβαιωθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών στη νιτροκυτταρίνη, αφετέρου για να εντοπιστούν οι ζώνες των πρωτεϊνών σε σχέση με τον Marker που χρησιμοποιήθηκε.



Εικόνα 47: Συσκευής μεταφοράς πρωτεϊνών (semi-dry transfer apparatus, Hoefer Scientific Instruments, USA).



Εικόνα 48: Συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών.

2.2.8.2.4 Ακινητοποίηση μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντιγόνων στις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης

Στο WB, μετά την μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στην ταινία νιτροκυτταρίνης, είναι σημαντικό να ακινητοποιηθούν οι μη ενεργές θέσεις του αντιγόνου στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για να μειωθούν οι μη ειδικές δεσμεύεις των πρωτεϊνών κατά την διάρκεια της διαδικασίας της μεθόδου. Η χρήση δεσμευτικού διαλύματος (blocking buffer) βελτιώνει την ευαισθησία της μεθόδου ελαχιστοποιώντας την παρεμβολή ανεπιθύμητου φόντου με την ειδική δέσμευση των πρωτεϊνών.

Το δεσμευτικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε περιείχε 2% αποβουτυρωμένη σκόνη γάλακτος προκειμένου να επιτευχθεί ή δέσμευση και 0.01% anti-foam A προκειμένου να αποφευχθεί η δημιουργεία φυσαλίδων, διαλυμένα σε πλυστικό διάλυμα 1X (Παράρτημα 4.27).

2.2.8.2.5 Ανοσοενζυμική ανίχνευση των πρωτεϊνών

Έγινε προσπάθεια ανίχνευσης των πρωτεϊνών και με τους δύο τύπους πρωτογενών αντισωμάτων (μονοκλωνικό και πολυκλωνικό) και με δευτερογενή αντισώματα σημασμένα με AP και HRP.

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα C219 έναντι της Pgp - 170 (Alexis Biochemicals, UK) σε αραίωση 1:50 (w/v) σε 1% δεσμευτικού διαλύματος και οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης που περιείχαν τις πρωτεΐνες για τα 10 στελέχη επωάστηκαν για 3 hr, στους 4 ^{o}C, με συνεχή ανάδευση. Ακολούθησαν τρεις διαδοχικές πλύσεις με πλυστικό διάλυμα (10 min / πλύση υπό ανάδευση). Στην συνέχεια ακολούθησε επώαση της μεμβράνης με

δευτερογενές αντίσωμα σημασμένο με AP (DACO, Denmark) για 1 hr σε αραίωση 1:1000 σε (w/v) 5% δεσμευτικού διαλύματος, στους 4 ^{o}C, με συνεχή ανάδευση. Οι μεμβράνες ξεπλύθηκαν ξανά τρεις φορές με 5% (w/v) δεσμευτικό διάλυμα (10 min / πλύση, στους 4 ^{o}C, με συνεχή ανάδευση) και στην συνέχεια ακολούθησε επώαση σε ρυθμιστικό διάλυμα εμφάνισης υποστρώματος (Alkaline phosphate buffer: 100 mM NaCl, 1 M $MgCl_2$ και 100 mM Tris pH 9.5, διαλυμένα σε απεσταγμένο νερό) (Παράρτημα 4.28), για 10 min, στους 4 ^{o}C, με συνεχή ανάδευση. Για την ανίχνευση των πρωτεϊνών με γυμνό μάτι, οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης επωάστηκαν για 10 min, στους 4 ^{o}C, με συνεχή ανάδευση με την χρήση των χρωμογόνων ουσιών NBC / BTIP, (Pierce, USA).

Το WB με τη χρήση του μονοκλωνικού αντισώματος C219, πραγματοποιήθηκε ξανά με την χρήση διαλύματος που περιείχε ως υπόστρωμα για το ένζυμο της υπεροξειδάσης την Luminol (*o* - Aminophthaloyl hydrazide, $C_8H_7N_3O_2$) (Pierce, USA). Η Luminol οξειδώνεται παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), από το ένζυμο της υπεροξειδάσης και παράγει ένα έντονο μπλε φωτισμό. Η συγκέντρωση του αντι - αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1:10,000 (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., USA). Με τον τρόπο αυτό οι ζώνες των πρωτεϊνών που έχουν προσδέσει ειδικά το αντίσωμα, και κατ' επέκταση και το αντι - ισοτυπικό αντίσωμα, εμφανίζονται μετά από λίγα λεπτά και μπορούν να γίνουν ορατές σε X-rays μέσα από ψυχώμενες CCD cameras ή phosphorimagers που ανιχνεύουν χημειοφωταύγεια.

Το Πολυκλωνικό αντίσωμα, το οποίο παράχθηκε στο Ινστιτούτο Παρασιτολογίας και Βιοϊατρικής "Lopez – Neyra" και μας παραχωρήθηκε από

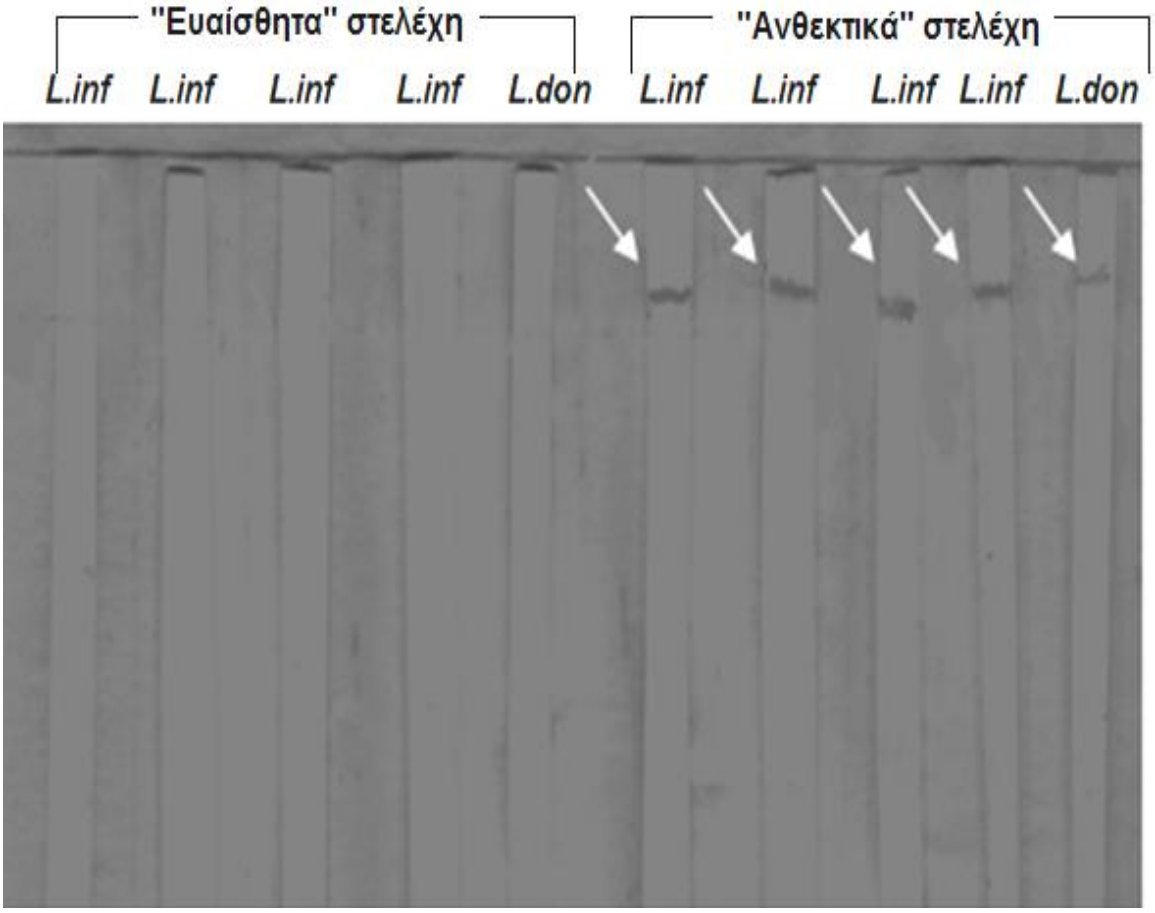
τον καθηγητή Gamarro F (Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Armilla, Granada, Spain), χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των πρωτεϊνών με την χρήση της AP και της HRP. Η συγκέντρωση του πολυκλωνικού αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1:1000, ενώ τα επόμενα βήματα έγιναν όπως περιγράφονται παραπάνω.

2.2.8.3 Αποτελέσματα και Συζήτηση

Η δοκιμασία του WB η οποία πραγματοποιήθηκε με το πολυκλωνικό αντίσωμα και το δευτερογενές αντίσωμα σημασμένο με την AP ή την HRP, δεν εντόπισε την Pgp - 170 σε κανένα από τα 10 στελέχη που μελετήθηκαν. Επίσης, με το Μονοκλωνικό αντίσωμα C219 και την χρήση του δευτερογενούς αντισώματος σημασμένου με HRP δεν εντοπίστηκε η Pgp - 170 σε κανένα στέλεχος. Αντίθετα, με το Μονοκλωνικό αντίσωμα C219 και την χρήση δευτερογενούς αντισώματος σημασμένου με AP ανιχνεύτηκε η Pgp - 170 στα 5 στελέχη (H2, D3, D4, D5, D8) τα οποία ήταν τα 5 στελέχη τα οποία είχαν χαρακτηριστεί ως «ανθεκτικά» με την κυτταρομετρία ροής. Η ένταση του σήματος ήταν μεγαλύτερη στα 4 στελέχη που απομονώθηκαν από σκυλιά (*L. infantum*; D3, D4, D5, D8) και μικρότερη στο στέλεχος που απομονώθηκε από άνθρωπο (*L. donovani,* H2) (Εικόνα 49).

Το γεγονός ότι η αντλία εκροής Pgp - 170 ανιχνεύτηκε στα 5 «ανθεκτικά» στελέχη αποδεικνύει την αυξημένη αντοχή τους στα φάρμακα σε σχέση με τα στελέχη που την υποεκφράζουν ή δεν την εκφράζουν καθόλου. Αυτό γιατί, η

αυξημένη έκφραση της Pgp - 170 αντιπροσωπεύει την δυνατότητα που έχουν τα στελέχη να απομακρύνουν το φάρμακο από το σώμα τους με αποτέλεσμα την αποφυγή των βλαβερών επιπτώσεων του φαρμάκου με αποτέλεσμα την επιβίωσή τους. Η έκφραση της Pgp - 170 σε ένα κύτταρο ή μονοκυττάριο οργανισμό, όπως η *Leishmania*, οφείλεται στην παρουσία του γονιδίου υπεύθυνου για το φαινόμενο της πολλαπλής αντοχής στα φάρμακα (MDR).



Εικόνα 49: Η ανίχνευση της Pgp - 170 έγινε και στα 5 «ανθεκτικά» στελέχη, με μικρότερη ένταση στο στέλεχος που απομονώθηκε από τον άνθρωπο. Με βέλος παρουσιάζεται η Pgp - 170.

Το στέλεχος απομονώθηκε από	Κωδικός Στελέχους	Slope (όπως προέκυψε από τις προκαταρκτικές μελέτες)	Αύξηση του πληθυσμού των παρασίτων κατά την καλλιέργεια 6 ημερών	Μολυσματική ικανότητα των στελεχών	Ημέρες που χρειάστηκαν τα προμαστιγωτά για να μετατραπούν σε αξενικα αμαστιγωτά	Ώρες που χρειάστηκαν τα αξενικά αμαστιγωτά για να μετατραπούν σε προμαστιγωτά	Ρυθμός Μεταβολής του πληθυσμού των προμαστιγωτών (όπως προέκυψε από την μελέτη της αντοχής στα φάρμακα)			Ανίχνευση HSP 70 με Proteomics	Ανίχνευση Pgp - 170 με WB	Κλινικά στοιχεια	Τόπος αιμοληψίας
							Glucantime	Amphotericin B	Miltefosine				
Άνθρωπο	H1	1.36	300%	14.7%	4	38	18	117	201	2 x Unidentified*		Παρατεινόμενο εμπύρετο, Σπληνομεγαλία	Αμαριέτη Πάφου Κύπρος
Σκύλο	D1	1.83	910%	5.2%	2	24	69	93	97			Δερματικά έλκη	Σούσκιου Πάφου Κύπρος
Σκύλο	D2	0.16	1000%	20.2%	2	24	40	110	115	2 x Unidentified*		Ασυμπτωματικός	Αναρίτα Πάφου Κύπρος
Σκύλο	D6	1.55	3620%	41.2%	2	24	75	83	95			Απώλεια βάρους, απώλεια ενεργητικότητας, διόγκωση λεμφαδένων, ονυχογρύπωση, δερματικά έλκη, πυώδεις εκκρίσεις από τα μάτια	Αναρίτα Πάφου Κύπρος
Σκύλο	D7	0.87	6900%	8.7%	2	24	83	98	95			Απώλεια βάρους, απώλεια ενεργητικότητας, διόγκωση λεμφαδένων, ονυχογρύπωση, δερματικά έλκη	Λευκωσία Κύπρος
Άνθρωπο	H2	6	700%	13.7%	5	48	92	29	121	1 x HSP 70 2 x Not - identified*	Pgp - 170	Δερματικά έλκη	Μακούντα Πάφου Κύπρος
Σκύλο	D3	4.26	2100%	11.7%	3	28	90	76	99	2 x HSP 70 - related 1 x uncharacterised 2 x Unidentified*	Pgp - 170	Ονυχογρύπωση	Μούταλος Πάφου Κύπρος
Σκύλο	D4	3.53	2680%	5.2%	3	28	91	52	104		Pgp - 170	Διόγκωση λεμφαδένων	Μαθια Λευκωσίας Κύπρος
Σκύλο	D5	2.36	2850%	11.4%	3	28	90	46	97		Pgp - 170	Απώλεια βάρους, απώλεια ενεργητικότητας, διόγκωση λεμφαδένων, ονυχογρύπωση	Γιέρη Λευκωσίας Κύπρος
Σκύλο	D8	2.88	7900%	18.4%	3	28	91	54	122		Pgp - 170	Απώλεια βάρους, απώλεια ενεργητικότητας, διόγκωση λεμφαδένων, ονυχογρύπωση, δερματικά έλκη, πυώδεις εκκρίσεις από τα μάτια	Λεμεσσός Κύπρος

* Οι 2 "Not - identified" πρωτείνες, ανιχνεύθηκαν και στα 4 στελέχη που μελετήθηκαν (H1, H2, D3, D4) αλλά υπερεκφράζονταν μόνο στα "ανθεκτικά" (H2, D3)

"Ευαίσθητα" Στελέχη

"Ανθεκτικά" Στελέχη

Πίνακας 10: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των 10 στελεχών

Κεφάλαιο 3

Συζήτηση

3. Συζήτηση

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η σύγκριση 10 στελεχών *Leishmania* (2 *L. donovani* και 8 *L. infantum*) με σκοπό τον εντοπισμό διαφορών ως προς τα βιολογικά και δομικά χαρακτηριστικά τους σε σχέση με την αντοχή τους στα φάρμακα.

Τα στελέχη αυτά απομονώθηκαν στο Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης, από ασθενείς και σκυλιά από την Κύπρο και χαρακτηρίστηκαν σαν «ανθεκτικά», 5, και «ευαίσθητα», 5, (1 *L. donovani* και 4 *L. infantum* σε κάθε κατηγορία) κατά την διάρκεια προκαταρκτικής μελέτης. Η κατηγοριοποίηση αυτή των στελεχών προέκυψε βάσει του ρυθμού εκροής της χρωστικής Rhod - 123 από την προμαστιγωτή μορφή του στελέχους με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής. Η υπόθεση που ετέθη για διερεύνηση, ήταν ότι ο ρυθμός εκροής της Rhod - 123 εξαρτάται από τον αριθμό των αντλιών που υπάρχουν σε κάθε στέλεχος για την απομάκρυνση της χρωστικής/φαρμάκου από το σώμα του παράσιτου, με αποτέλεσμα την αποτυχία της χημειοθεραπείας για την νόσο. Έτσι η μελέτη είχε σαν στόχο την αναζήτηση πρωτεϊνών, που ενέχονται στην αντοχή του παράσιτου στα φάρμακα, στα 10 στελέχη.

Αρχικά μελετήθηκαν οι διαφορές των 10 στελεχών ως προς την πολλαπλασιαστική και μολυσματική ικανότητα των προμαστιγωτών τους μορφών καθώς και ο χρόνος που χρειάζονται οι προμαστιγωτές μορφές για να μετατραπούν σε αξενικές αμαστιγωτές και αντίστροφα. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι σημαντικά και αφορούν στην μολυσματικότητα και στην παθογένεια του στελέχους. Σκοπός της μελέτης ήταν να δημιουργηθεί το προφίλ του κάθε

στελέχους, σαν μολυσματικού παράγοντα, και στη συνέχεια να αναζητηθεί η σχέση μεταξύ αυτού του προφίλ και της αντοχής των στελεχών στα φάρμακα. Η μελέτη της πολλαπλασιαστικής ικανότητας κατέδειξε ομοιότητες και διαφορές μεταξύ των στελεχών, και τα αποτελέσματα ήταν συγκρίσιμα και με τις δύο μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν (ποιοτική και ποσοτική καταμέτρηση της αύξησης του πληθυσμού *in vitro* για 6 ημέρες). Μετά από 6 ημέρες καλλιέργειας, ο αριθμός των προμαστιγωτών που προέκυψε για τα 10 στελέχη ήταν μεταξύ 4 x 10^6 και 80 x 10^6 καθώς όλα τα μέλη ή μέρος του πληθυσμού πολλαπλασιάστηκε (Πίνακας 2). Τα στελέχη τα οποία παρουσίασαν την μικρότερη αύξηση στον πληθυσμό τους ήταν τα δύο *L. donovani* στελέχη που απομονώθηκαν από τους ασθενείς. Τα 2 *L. donovani* στελέχη αύξησαν τον πληθυσμό τους κατά 300 και 700% (Πίνακας 2, 4, Γράφημα 1 - 8, Παράρτημα 5.1 - 5.3) και στα στελέχη αυτά υπήρξε ένα ποσοστό παράσιτων, που κυμάνθηκε μεταξύ 0.1% και 4.1%, το οποίο δεν πραγματοποίησε καμία κυτταρική διαίρεση στις 6 ημέρες καλλιέργειας, ενώ μόνο το 0.3% και το 1.9% αντίστοιχα πραγματοποίησε 5 κυτταρικές διαιρέσεις μετά από 6 ημέρες. Αντίθετα, τα 8 στελέχη *L. infantum* κατάφεραν να αυξήσουν τον πληθυσμό τους κατά 910 - 7900%. Όλος ο πληθυσμός των παράσιτων κατάφερε να κάνει τουλάχιστον μια διαίρεση ενώ ένα ποσοστό των στελεχών αυτών, που κυμάνθηκε μεταξύ 1.4% και 53.5%, πραγματοποίησε 5 κυτταρικές διαιρέσεις (Πίνακας 2, 4, Γράφημα 1 - 8, Παράρτημα 5.1 - 5.3). Η χρήση της κυτταρομετρίας ροής υπέδειξε ότι ο φθορισμός από την χρωστική CFSE για τα δύο *L. donovani* στελέχη μεταφέρεται μεταξύ των 5 καναλιών με χαμηλότερο ρυθμό από ότι στα στελέχη *L. infantum.* Η μεταφορά του φθορισμού και η ανίχνευσή του στο

αμέσως επόμενο κανάλι αντιπροσωπεύει τις κυτταρικές διαιρέσεις/γενεές, στην κάθε μια από τις οποίες οφείλεται η μείωση της σχετικής έντασης του φθορισμού κατά 50% (http://facs.stanford.edu/sff/about-facs.html). Έτσι, ο μέσος όρος πολλαπλασιασμού των 10 στελεχών για κάθε ημέρα, κατά την διάρκεια της καλλιέργειας των 6 ημερών, κυμάνθηκε από 32,35% μέχρι 168,08%, με τα 2 στελέχη *L. donovani* να έχουν τον χαμηλότερο ρυθμό (32.35% και 52.56%) σε σχέση με τα *L. infantum* (76.60% - 168.08%) (Πίνακας 3).

Η πολλαπλασιαστική ικανότητα των προμαστιγωτών μορφών αντιπροσωπεύει τον πολλαπλασιασμό των παράσιτων στο σώμα της σκνίπας και σχετίζεται με το παρασιτικό φορτίο το οποίο θα ενοφθαλμιστεί στον επόμενο σπονδυλωτό ξενιστή, άνθρωπο ή ζώο, κατά την διάρκεια του γεύματος της σκνίπας. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των προμαστιγωτών μορφών που θα παραχθεί, τόσο μεγαλύτερο θα είναι το παρασιτικό φορτίο που θα ενοφθαλμιστεί άρα και ο αριθμός των μακροφάγων του σπονδυλωτού ξενιστή που θα μπορούσε να μολυνθεί. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι προμαστιγωτές μορφές διαφορετικών στελεχών παρουσιάζουν μια ετερογένεια στην πολλαπλασιαστική τους ικανότητα, με τα στελέχη *L. donovani* να έχουν χαμηλότερο ρυθμό από τα *L. infantum*. Οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται στην γεωγραφική κατανομή, στο διαφορετικό στέλεχος του παράσιτου, στο διαφορετικό ξενιστή από τον οποίο απομονώθηκε το κάθε στέλεχος ή στο διαφορετικό είδος φλεβοτόμου σκνίπας (Diptera - Psychodidae) στο οποίο είχε αναπτυχθεί και το οποίο χρησιμοποιεί σαν διαβιβαστή ξενιστή. Ο *Phlebotomus tobbi* ενοχοποιείται για την διασπορά και των δύο *Leishmania spp.* στην Κύπρο (Antoniou, 2008; Antoniou, 2009; Leger

and Depaquit, 2008). Το ενδιαφέρον που προέκυψε από την ποιοτική μελέτη της πολλαπλασιαστικής ικανότητας του στελέχους, η οποία πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά, είναι η διαφορετική συμπεριφορά των μελών του πληθυσμού των προμαστιγωτών στο κάθε στέλεχος (Messaritakis, 2010). Αυτές οι διαφορές μπορεί να αντιπροσωπεύουν την ικανότητα των στελεχών να προσαρμόζονται στο σώμα της σκνίπας και να συγχρονίζουν τον πολλαπλασιασμό των μελών του πληθυσμού τους για την παραγωγή ενός αρκετά μεγάλου φορτίου το οποίο θα ενοφθαλμιστεί κατά την διάρκεια του γεύματος της σκνίπας.

Σε έναν πληθυσμό παράσιτων, πιθανόν να συνυπάρχουν 2 ή περισσότερα στελέχη/είδη *Leishmania* (Ravel, 2006; Volf , 2007; Chargui , 2009). Σε περίπτωση μεικτού πληθυσμού, τα παράσιτα μπορεί να προβούν σε ανταλλαγές γενετικού υλικού κατά την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους στο σώμα της σκνίπας, μεταδίδοντας έτσι τους "υβριδικούς" απογόνους στο σπονδυλωτό ξενιστή (Ravel, 2006; Volf , 2007; Akopyants, 2009; Chargui, 2009). Όπως περιγράφεται και από τον Ravel (2006), στελέχη *L. infantum* και *L. major* απομονώθηκαν από ανοσοκατασταλμένους ασθενείς από την Πορτογαλία και τα στελέχη αυτά, παρά την διαφορετική γεωγραφική κατανομή τους, την μετάδοσή τους από διαφορετικά είδη σκνίπας και τους διαφορετικούς ξενιστές παρακαταθήκη που χρησιμοποιούν, έδειξαν να διαθέτουν το γονιδίωμα και των δύο στελεχών. Τα υβρίδια αυτά ήταν πιο μολυσματικά από τα αρχέγονα στελέχη. Έτσι, τα χαρακτηριστικά που πιθανόν να προκύψουν από μια τέτοια διεργασία, μπορεί να σχετίζονται με την μολυσματική ικανότητα ή/και την αντοχή των υβριδίων στα φάρμακα.

Στα στελέχη που μελετήθηκαν δεν προέκυψε καμία συσχέτιση μεταξύ της πολλαπλασιαστικής ικανότητας και των κλινικών εκδηλώσεων των ασθενών ή των σκυλιών (Πίνακας 10). Πρέπει να τονιστεί ότι οι μελέτες έγιναν i*n vitro*, παράγοντας που πιθανόν να επηρεάζει την συμπεριφορά των στελεχών (Papadopoulou, 2006).

Η μολυσματική ικανότητα των 10 στελεχών, *in vitro,* με την χρήση THP-1 κυττάρων, ήταν διαφορετική όχι μόνο ανάμεσα στα δυο είδη αλλά και ανάμεσα στα στελέχη των δυο ειδών. Έτσι, ενώ τα 2 *L. donovani,* στελέχη που απομονώθηκαν από ασθενείς, μόλυναν το 13,7% και το 14,7% των THP-1 κυττάρων, τα 8 *L. infantum* στελέχη μόλυναν από 5,2% μέχρι και το 41,2% των κυττάρων μετά από επώαση 27 ωρών στους 37 ^{o}C. Ο αριθμός των παράσιτων ανά 100 τυχαία κύτταρα ήταν 2 παράσιτα/κύτταρο για τα στελέχη *L. donovani* και 1 - 3 παράσιτα/κύτταρο για τα *L. infantum*. Αντίστοιχα, ο αριθμός των παράσιτων ανά 100 μολυσμένα κύτταρα ήταν 7 παράσιτα/κύτταρο για τα στελέχη *L. donovani* και 5 – 8 παράσιτα/κύτταρο για τα *L. infantum*. (Πίνακας 5, Γράφημα 9). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η μολυσματική ικανότητα του κάθε στελέχους είναι ανεξάρτητη με την πολλαπλασιαστική ικανότητα των προμαστιγωτών μορφών του, όπως έδειξαν οι *in vitro* δοκιμασίες (Πίνακας 10). Η γενετική ποικιλομορφία είναι ένας σημαντικός παράγοντας που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη σε μελέτες πληθυσμών. Συγκεκριμένα, η ποικιλομορφία που επιδεικνύουν τα 10 στελέχη στην πολλαπλασιαστικότητα, τη μολυσματικότητα και τον τροπισμό των μελών τους, πιθανόν να έχει σημαντική επίδραση στην μετάδοση ή/και στην παθογένεια της ασθένειας, όπως περιγράφεται από τους Martinez, 2000 και De Lana, 2000, οι οποίοι μελέτησαν την δερματική λεϊσμανίαση που προκαλεί

η *L. guyanensis* στα hamsters και την Τρυπανοσωμίαση που προκαλεί το συγγενές με τη Λεϊσμάνια *Trypanosoma cruzi* στα ποντίκια, αντίστοιχα (de Lana, 2000; Martinez, 2000).

Παρά τη σημασία της ικανότητας μετατροπής των μετακυκλικών προμαστιγωτών μορφών του παράσιτου σε αμαστιγωτές, οι ιδανικές συνθήκες για την επιτυχή μετατροπή τους σε αξενικές αμαστιγωτές μορφές *in vitro* δεν έχουν προσδιοριστεί πλήρως. Διαφορετικά είδη *Leishmania* έχουν διαφορετικές απαιτήσεις προκειμένου να καλλιεργηθούν σαν αξενικά αμαστιγωτά (Pan, 1993). Μελέτες αναφέρουν ότι η μετατροπή των μετακυκλικών προμαστιγωτών μορφών του παράσιτου *Leishmania* σε αμαστιγωτά, χωρίς την παρουσία κυττάρων ξενιστών που θα πραγματοποιήσουν την φαγοκυττάρωση, μπορεί να πραγματοποιηθεί με την παρουσία ανθρώπινου ορού ή ενός μόνο συστατικού του ορού (CRP, C - αντιδρώσα πρωτεΐνη) (Mbuchi, 2006). Υπό συνθήκες αυξημένης θερμοκρασίας (37 ^{o}C) και ελαττωμένου pH (pH 5.5) ο ορός του ανθρώπου ή η CRP μπορούν να επιταχύνουν την διαδικασία μετατροπής, *in vitro* (Johner, 2006). Σε *in vivo* συνθήκες, η μετάδοση του παράσιτου υπό φυσιολογικές συνθήκες, γίνεται μετά από ενοφθαλμισμό των προμαστιγωτών μορφών στο δέρμα ανθρώπου ή ζώου κατά την διάρκεια του γεύματος της σκνίπας. Στη συνέχεια, τα παράσιτα αυτά θα φαγοκυτταρωθούν από τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα. Όσα από αυτά επιβιώσουν στο αφιλόξενο περιβάλλον του κυττάρου (φαγόσωμα), θα μεταφερθούν στην κυκλοφορία μαζί με τα μολυσμένα κύτταρα που τα φέρουν, θα εκτεθούν στον ορό και στα συστατικά του, συνθήκες αφιλόξενες για τα προμαστιγωτά, με αποτέλεσμα να μετατραπούν σε αμαστιγωτά (Bee, 2001). Κατά την παρούσα μελέτη, τα δυο

στελέχη *L. donovani* (H1, H2) χρειάστηκαν 4 και 5 ημέρες προκειμένου το 97% - 98% του πληθυσμού τους να μετατραπεί σε αξενικά αμαστιγωτά παράσιτα, με το "ανθεκτικό" στέλεχος (H2) να χρειάζεται τον περισσότερο χρόνο (5 ημέρες). Αντίθετα, τα στελέχη *L. infantum* (D1 - D8) χρειάστηκαν 2 - 3 ημέρες προκειμένου όλα τα παράσιτα να μετατραπούν από προμαστιγωτά σε αξενικά αμαστιγωτά, με τα "ανθεκτικά" στελέχη (D3, D4, D5, D8) να χρειάζονται τον περισσότερο χρόνο (3 ημέρες). Για την αντίστροφη μετατροπή τους, από αξενικά αμαστιγωτά σε προμαστιγωτά, τα παράσιτα των στελεχών *L. donovani* (H1, H2) χρειάστηκαν 38 και 48 hr, με το"ανθεκτικό" στέλεχος (H2) να χρειάζεται τον περισσότερο χρόνο (48 hr), ενώ τα παράσιτα στελεχών *L. infantum* (D1 - D8) χρειάστηκαν 24 - 28 hr με τα "ανθεκτικά" στελέχη (D3, D4, D5, D8) να χρειάζονται τον περισσότερο χρόνο (28 hr) (Πίνακας 6, 10). Το φαινόμενο αυτό της ετερογένειας που παρουσίασαν τα δύο υπογένη για να μετατρέψουν το εξωκυτταρικό μαστίγιό τους σε ενδοκυτταρικό και να μετατραπούν σε αμαστιγωτές μορφές πιθανόν να έχει αντίκτυπο στο χρονικό διάστημα που χρειάζονται στο σώμα του σπονδυλωτού ξενιστή για να μολύνουν τα κύτταρά του και να αρχίσουν να πολλαπλασιάζονται ενδοκυττάρια και στην παθογένεια της νόσου που αναπτύσσεται. Επιπλέον, η ετερογένεια που παρουσίασαν τα δύο υπογένη προκειμένου να μετατραπούν από αξενικά αμαστιγωτά σε προμαστιγωτά πιθανόν να έχει αντίκτυπο στο χρονικό διάστημα που χρειάζονται τα παράσιτα για να προσαρμοστούν στο σώμα της σκνίπας πριν αρχίσουν να πολλαπλασιάζονται. Περιορισμένος είναι ο αριθμός των μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί όσον αφορά στην μετατροπή των προμαστιγωτών μορφών του παράσιτου *Leishmania* σε αξενικά αμαστιγωτά. Το χρονικό διάστημα που χρειάστηκαν τα 10 στελέχη για

να μετατραπούν από προμαστιγωτά σε αξενικά συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες που χρησιμοποιούν στελέχη *L. donovani* και *L. infantum* (Prasad, 2004; Somanna, 2002). Όμως ο χρόνος αυτός διαφέρει σε άλλα είδη του παράσιτου (*L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. chagasi*) και σε άλλα καλλιεργητικά υλικά (π.χ. Schneider's *Drosophila* medium), όπου ο χρόνος μετατροπής των μορφών ήταν άλλοτε μικρότερος (*L. amazonensis*) και άλλοτε μεγαλύτερος (*L. braziliensis*, *L. chagasi*) (Teixeira, 2002).

Μελέτες που πραγματοποιούνται σε επιλεγμένα στελέχη - ανθεκτικά και ευαίσθητα στα φάρμακα -, αποτελούν ένα σημαντικό βήμα προς την κατανόηση του μηχανισμού της αντοχής στα φάρμακα της *Leishmania* και θα οδηγήσουν στην πρόληψη της ανάπτυξης αντοχής και της γεωγραφικής διασποράς της και μπορεί να συμβάλουν στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών ουσιών (Ouellette, 2001). Μελέτες αναφέρουν ότι η αντοχή που παρουσιάζουν τα παράσιτα στα φάρμακα είναι μια εκδήλωση που μπορεί να οφείλεται σε περισσότερους από έναν παράγοντες και μηχανισμούς. Σε αυτούς συγκαταλέγονται, μεταξύ άλλων, οι διαφορές που παρουσιάζουν οι μεμβράνες των παράσιτων στις στερόλες (Goad, 1984; Beach, 1988) και στα λιπίδια (Beach, 1979). Η αλόγιστη χρήση των αλάτων πεντασθενούς αντιμονίου (Glucantime) σε ενδημικές με λεϊσμανίαση περιοχές έχει αλλάξει την βιοχημική σύσταση της μεμβράνης των παράσιτων με αποτέλεσμα την δημιουργία ανθεκτικών στελεχών. Είναι γνωστό ότι εκτός από το πεντασθενές αντιμόνιο, άλλα φάρμακα που αλληλεπιδρούν με την κυτταροπλασματική μεμβράνη είναι η Αμφοτερικίνη Β και το Miltefosine (Goad, 1984; Rakotomanga, 2004). Προηγούμενες μελέτες αποδεικνύουν ότι κάποιοι κοινοί μηχανισμοί αντοχής, όπως οι μόνιμες αλλαγές που συμβαίνουν στις

μεμβράνες, μπορεί να συμβάλουν στο φαινόμενο της πολλαπλής αντοχής στα φάρμακα (Sereno, 2001; Lee, 2002; Verma, 2004; Kothari, 2007). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά την *in vitro* μελέτη της αντοχής που παρουσιάζουν τα 10 στελέχη στα τρία φαρμακευτικά σκευάσματα (Glucantime, Amphotericin B, Miltefosine) επιβεβαιώνουν προηγούμενες μελέτες που δείχνουν ότι στελέχη του παράσιτου *Leishmania* παρουσιάζουν αντοχή στο Glucantime (Sundar, 2000).

Έτσι, κατά την μελέτη της αντοχής των 10 στελεχών στην Αμφοτερικίνη Β, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα 3 από τα 5 στελέχη που χαρακτηρίστηκαν «ευαίσθητα» (H1, D2, D7), κατά τις προκαταρκτικές μελέτες ήταν ευαίσθητα στην Αμφοτερικίνη Β, 2 «ευαίσθητα» στελέχη (D3, D6) παρουσίασαν μικρό βαθμό αντοχής, ενώ τα «ανθεκτικά» στελέχη έδειξαν αντοχή. Έτσι, σε 3 από τα 5 «ευαίσθητα στελέχη» (H1, D2, D7) παρουσιάζεται ελάττωση του πληθυσμού, τόση ώστε στην 3^{η} ημέρα και στην συγκέντρωση του φαρμάκου 1,5 μg/ml, όλος ο πληθυσμός των παράσιτων να εξαλειφθεί. Όλα τα «ανθεκτικά» στελέχη έδειξαν μείωση του πληθυσμού τους σε συγκεντρώσεις 1,5 – 3 μg/ml, αλλά η εξάλειψη όλων των παράσιτων δεν επήλθε πριν από την 6^{η} ημέρα (Γράφημα 12 και 13, Παράρτημα 5.6 - 5.7). Ο ρυθμός μεταβολής του πληθυσμού των στελεχών αυτών που προέκυψε με τον συνυπολογισμό της συγκέντρωση του φαρμάκου, του χρονικού διαστήματος των 6 ημερών και του πληθυσμού των προμαστιγωτών μορφών του παράσιτου και για τις 6 ημέρες του πειράματος, ήταν 29 - 76 για τα «ανθεκτικά» στελέχη, 83 και 93 για τα στελέχη που εμφάνισαν μικρό βαθμό αντοχής, και 98 - 117 για τα «ευαίσθητα» στελέχη. Ο ρυθμός αυτός δηλώνει το βαθμό αντοχής των 10 στελεχών στα φάρμακα. Όσο μικρότερος είναι ο ρυθμός μεταβολής του

πληθυσμού, τόσο μεγαλύτερη είναι η αντοχή των στελεχών στα φάρμακα. Συνυπολογίζοντας την ανταπόκριση των στελεχών αυτών στην Αμφοτερικίνη Β για τις 6 ημέρες της καλλιέργειας και τον ρυθμό μεταβολής του πληθυσμού, θεωρήθηκε σαν "cut - off" το 93. Έτσι, όσα στελέχη παρουσίασαν ρυθμό μεταβολής ≤ 93 θεωρήθηκαν σαν "ανθεκτικά", ενώ όσα στελέχη παρουσίασαν ρυθμό μεταβολής > 93 θεωρήθηκαν σαν "ευαίσθητα" (Πίνακας 8). Κατά την μελέτη της αντοχής των στελεχών στο Glucantime απεδείχθει ότι και τα 10 στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν παρουσίασαν αντοχή στο Glucantime. Εννέα από τα 10 στελέχη χρειάστηκαν πάνω 800 μg/ml και 1 μόνο στέλεχος (D4 – «ανθεκτικό») χρειάστηκε 400 μg/ml, προκειμένου ο πληθυσμός τους να μειωθεί τουλάχιστον κατά 50% (IC_{50}) (Γράφημα 10 και 11, Παράρτημα 5.4 - 5.5). Ο ρυθμός μεταβολής του πληθυσμού των στελεχών αυτών ήταν 90 - 92 για τα "ανθεκτικά" στελέχη και 18 - 83 για τα "ευαίσθητα" στελέχη (≤ 93) (Πίνακας 8). Παράλληλα, κατά την μελέτη της αντοχής των 10 στελεχών στο Miltefosine, όλα τα στελέχη έδειξαν εξίσου μεγάλη ευαισθησία σε όλες τις συγκεντρώσεις του φαρμάκου (1,25 – 20 μg/ml), από την πρώτη κιόλας ημέρα και ρυθμό μεταβολής του πληθυσμού των προμαστιγωτών που κυμάνθηκε από 95 - 201 (> 93) (Γράφημα 14 και 15, Παράρτημα 5.8 - 5.9, Πίνακας 8).

Συμπερασματικά, το Glucantime, ένα φάρμακο που έχει την ιδιότητα να αναστέλλει τη γλυκόλυση και τη β – οξείδωση του παράσιτου μειώνοντας τα επίπεδα του ATP (Simões-Mattos, 2002) και χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα σαν φάρμακο 1^{ης} γραμμής σε ασθενείς και σκυλιά με λεϊσμανίαση, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη αντοχής σε αυτό από το παράσιτο με αποτέλεσμα να μην μπορεί πλέον να χρησιμοποιείται αποτελεσματικά. Ενδιαφέρον παρόλα αυτά, παρουσιάζει μια παράλληλη, με την παρούσα, μελέτη που

πραγματοποιήθηκε στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ (Εργαστήριο Μοριακής Παρασιτολογίας, Αθήνα) κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν 5 από τα 10 υπο μελέτη στελέχη *Leishmania* (1 «ευαίσθητο» *L. donovani*, 1 «ανθεκτικό» *L. donovani* και 3 «ανθεκτικά» *L. infantum*) για να ελεγχθεί η αντοχή τους στα 2 παράγωγα του φαρμάκου Glucantime, το SbV (πεντασθενές αντιμόνιο) και το SbIII (τρισθενές αντιμόνιο). Μελέτες υποστηρίζουν ότι το SbV δεν είναι τοξικό για την *Leishmania* αλλά μετατρέπεται μέσα στο κύτταρο ξενιστή από το ένζυμο γλουταθιόνη (GSH), στην τοξική του μορφή, το SbIII (Demicheli, 2002*;* Goodwin, 1995; Frézard, 2001*;* Lima, 2009). Σύμφωνα με την μελέτη αυτή, τα «ανθεκτικά» στελέχη χρειάστηκαν ≥ 40 μg/ml από το SbV και < 0,1 - > 2 μg/ml από το SbIII, προκειμένου το 50% των παράσιτων να μειωθεί (IC_{50}). Σε αντίθεση, το «ευαίσθητο» στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε (H2) χρειάστηκε < 3 μg/ml από το SbV και < 1 μg/ml από το SbIII για το IC_{50}. Συνεπώς, η μεμονωμένη χορήγηση των παραγώγων του φαρμάκου Glucantime, και κυρίως του SbV, έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην μείωση του πληθυσμού των προμαστιγωτών.

Όσον αφορά τη λιποσωμική Αμφοτερικίνη Β που έχει αντικαταστήσει το Glucantime σαν φάρμακο πρώτης γραμμής εναντίον της λεϊσμανίασης σε πολλές περιοχές, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι 2 από τα 5 "ευαίσθητα" στελέχη παρουσίασαν αντοχή σε χαμηλά επίπεδα. Συνεπώς, υπάρχει κίνδυνος σύντομα, τα παράσιτα να αποκτήσουν αντοχή και στην Αμφοτερικίνη Β, με πιθανή αιτία την αλόγιστη χρήση της, πιθανόν μέσω της αλληλεπίδρασής της με την κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων, παράγοντας που προκαλεί πολλαπλή αντοχή στα φάρμακα (Χαλεβελάκης, 1994). Τα αποτελέσματα με την χρήση του Miltefosine είναι ενθαρρυντικά

καθώς και τα 10 στελέχη που μελετήθηκαν, είτε παρουσίασαν αντοχή είτε ευαισθησία στο Glucantime και την Amphotericin B, έδειξαν εξίσου μεγάλη ευαισθησία σε όλες τις συγκεντρώσεις του νέου φαρμάκου Miltefosine (1,25 – 20 μg/ml), από την πρώτη κιόλας ημέρα. Το Miltefosine είναι ένα φάρμακο στο οποίο το παράσιτο *Leishmania* δεν έχει αναπτύξει αντοχή, κυρίως λόγω του μικρού χρονικού διαστήματος χρήσης του (Das, 2009). Η χρήση όμως του Miltefosine για την θεραπεία σκυλιών με ΣΛ σε πολλές χώρες (www.virbac.gr), μεταξύ αυτών και ευρωπαϊκές - συμπεριλαμβανομένης και της χώρας μας, θέτει σε κίνδυνο το μέλλον αυτού του φαρμάκου στην καταπολέμηση της σπλαχνικής λεϊσμανίασης στον άνθρωπο. Πρέπει συνεπώς να εμποδιστεί η ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών. Ο Perez-Victoria (2006) προτείνει κάποιους τρόπους δράσης προς το σκοπό αυτό, οι οποίοι μεταξύ άλλων περιλαμβάνουν: α) Χορήγηση του φαρμάκου μόνο μέσω του συστήματος δημόσιας υγείας, σε ενδημικές περιοχές: Το φάρμακο θα πρέπει να μην χορηγείται από ιδιωτικά ιατρεία και κλινικές προκειμένου να ελέγχεται η χορήγησή του, β) Συμμόρφωση στην θεραπεία: Τα συστήματα υγείας καθώς και οι γιατροί που τα αποτελούν θα πρέπει να παρακολουθούνται για την σωστή χρήση των οδηγιών, γ) Παρακολούθηση της αντοχής στα φάρμακα: Ιδανικότερος τρόπος είναι η μελέτη της αντοχής που παρουσιάζουν τα στελέχη στα φάρμακα, παρά της υποτροπής της νόσου, δ) Μετάδοση της νόσου: Αρχικά θα πρέπει να ελέγχεται ο πληθυσμός των εντόμων – φορέων, ε) Η θεραπεία των ασθενών θα πρέπει να είναι άμεση: με την εμφάνιση των συμπτωμάτων, στ) Σε περιοχές που τα σκυλιά θεωρούνται κύριοι ξενιστές παρακαταθήκη, η χρήση του Miltefosine για κτηνιατρική χρήση δεν συστήνεται, ζ) Αρκετές περιοχές έχουν αντικαταστήσει την μέχρι τώρα

θεραπεία της λεϊσμανίασης με το Miltefosine σαν θεραπεία 1ης γραμμής προκειμένου να εξαλείψουν την νόσο μέχρι το τέλος του 2015. Δυστυχώς όμως, το κόστος του (~ 150 $) το καθιστά απαγορευτικό για αρκετές περιοχές, όπως την Ινδία. Θα πρέπει λοιπόν να χορηγείται δωρεάν, κυρίως στις ενδημικές περιοχές (Pérez-Victoria, 2006).

Καμία συσχέτιση δεν προέκυψε με την πολλαπλασιαστική και μολυσματική ικανότητα, με την αντοχή των στελεχών στα φάρμακα ή με την γεωγραφική κατανομή και την κλινική εικόνα που παρουσίασαν οι ασθενείς ή τα σκυλιά (Πίνακας 10). Αντίθετα, τα "ανθεκτικά" στελέχη φάνηκε να χρειάζονται περισσότερο χρονικό διάστημα προκειμένου να μετατραπούν από προμαστιγωτά σε αξενικά αμαστιγωτά και αντίστροφα, σε σχέση με τα "ευαίσθητα".

Οι πρωτεΐνες καθορίζουν την λειτουργία των κυττάρων. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες παίζουν καθοριστικό ρόλο στην απομάκρυνση του φαρμάκου από το σώμα της *Leishmania* (ή άλλων πρωτόζωων και καρκινικών κυττάρων) και είναι και στόχοι για τους περισσότερους θεραπευτικούς παράγοντες (El Fadili, 2005; Legare, 2001). Έγινε μια προσπάθεια ανάλυσης του πρωτεώματος των μεμβρανικών πρωτεϊνών 4 ενδεικτικών στελεχών (2 "ανθεκτικών": H2, D3 και 2 "ευαίσθητων": H1, D2). Παρόλο που οι κλινικές εκδηλώσεις οφείλονται στο αμαστιγωτό στάδιο του παράσιτου, η πρωτεωμική ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο προμαστιγωτό στάδιο διότι το πρωτέωμα του παράσιτου παραμένει κατά 90 - 94% ποιοτικά αδιαφοροποίητο κατά τον κύκλο ζωής του παράσιτου (Cuervo, 2007). Παρά τον σχετικά μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών που ανιχνεύτηκαν (304 spots για τα «ανθεκτικά», 300 spots για τα «ευαίσθητα»), μερικές μόνο από αυτές έγινε δυνατόν να ταυτοποιηθούν.

Πιθανοί λόγοι που δεν μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν όλες οι πρωτεΐνες είναι: α) τα στελέχη του παράσιτου *L. donovani* και *L. infantum* δεν είναι πολύ καλά μελετημένα και μόνο ένα μικρό μέρος του γονιδιώματος των στελεχών αυτών υπάρχει στην «βιβλιοθήκη» (library) (Dea-Ayuela, 2006), β) δεν παρήχθησαν αρκετά πεπτίδια μετά από την διαδικασία της πέψης με την θρυψίνη (πχ δεν υπήρχαν cut-sites της θρυψίνης) ή η ποσότητα των πεπτιδίων δεν ήταν αρκετή λόγο αδυναμίας ιονισμού τους ή λόγω της ποσότητας της πρωτεΐνης. Από τις πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν, 6 παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως προς την έκφρασή τους (πάνω από 2-fold), 4 από τις οποίες εντοπίστηκαν μόνο στα «ανθεκτικά» (H2, D3) στελέχη (ποιοτικές διαφορές) ενώ 2 εντοπίστηκαν και στα 4 στελέχη (H1, H2, D2, D3) υπερεκφραζόμενες όμως στα «ανθεκτικά» στελέχη (ποσοτικές διαφορές) ($p < 0.05$, PD Quest 6.1) (Εικόνα 41, Πίνακας 10). Μόνο οι 4 πρωτεΐνες, που εντοπίστηκαν μόνο στα «ανθεκτικά» στελέχη, ταυτοποιήθηκαν με το MALDI - TOF MS (Πίνακας 9). Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης έδειξαν την Heat Shock Protein, μεγέθους 70 kDa (HSP 70), να έχει την μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης (3 από τις 4 που ταυτοποιήθηκαν): μία HSP 70 πλήρους μεγέθους (μεγέθους 70kDa), η οποία ανιχνεύτηκε στο "ανθεκτικό" στέλεχος *L. donovani* (H2), και δύο πρόδρομες μιτοχονδριακές και συγγενικές με την HSP 70 (μεγέθους ~70kDa), οι οποίες ανιχνεύθηκαν στο "ανθεκτικό" στέλεχος *L. infantum* (D3). Επιπλέον, μια πρωτεΐνη, θεωρούμενη ως μη χαρακτηρίσιμη, ανιχνεύτηκε στο "ανθεκτικό" στέλεχος *L. infantum* (D3) (μεγέθους ~40kDa). Ανάμεσα στις stress ή τις Heat Shock Proteins, η HSP 70 αποτελεί την πιο διαδεδομένη πρωτεΐνη μέχρι σήμερα (Gupta, 1993), παίζοντας σημαντικό ρόλο στην χυμική ανοσία έναντι διάφορων αυτοάνοσων νοσημάτων και μολυσματικών ασθενειών,

συμπεριλαμβανομένης και της λεϊσμανίασης (da Silva, 2010; Sachdeva, 2009). Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι παρά την μεγάλη ταύτιση της αλληλουχίας της HSP 70 μεταξύ του ξενιστή και της *Leishmania*, η ανοσοβιολογική απόκριση του ξενιστή που προκαλείται από την μόλυνση με το παράσιτο, στρέφεται κυρίως ενάντια συγκεκριμένων επίτοπων της HSP 70 της *Leishmania* (Requena, 2000). Παράλληλα, μεγάλος αριθμός αντισωμάτων έναντι της HSP 70 παράγονται στην αρχική φάση της ασθένειας, αποδεικνύοντας ότι η HSP 70 είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την πρώιμη διάγνωση της λεϊσμανίασης (Nieto, 1999). Αρκετές μελέτες συσχετίζουν την ανίχνευση ή την υπερέκφραση της HSP 70 με την αντοχή που παρουσιάζουν κάποια στελέχη σε φάρμακα που περιέχουν άλατα αντιμονίου (Brochu, 2004).

Με την ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στα 10 στελέχη με την μέθοδο του Western Blotting (WB) και τη χρήση του μονοκλωνικού αντισώματος C219 anti-PGP, η Pgp – 170 ανιχνεύτηκε μόνο στα 5 στελέχη που κατά τις προκαταρκτικές μελέτες είχαν χαρακτηριστεί ως «ανθεκτικά» και απομονώθηκαν από: τον ασθενή (*L. donovani,* H2) και από τα σκυλιά (*L. infantum*; D3, D4, D5, D8) (Εικόνα 49, Πίνακας 10). Η Pgp είναι μια διαμεμβρανική αντλία εκροής για ένα μεγάλο αριθμό φαρμάκων και άλλων ουσιών. Οι πρώτες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με σκοπό την κατανόηση του φαινόμενου της αντοχής της *Leishmania*, σχετίζουν την Pgp άλλοτε με την μειωμένη εισροή (Callahan, 1994) και άλλοτε με την αυξημένη εκροή του φαρμάκου (Singh, 1994). Η παρουσία και ο αριθμός των αντλιών εκροής, Pgp - 170, αντιπροσωπεύει την ικανότητα που έχουν τα "ανθεκτικά" στελέχη να απομακρύνουν το φάρμακο από το σώμα τους με αποτέλεσμα την αποφυγή της θανάτωσής τους. Με την χρήση του μονοκλωνικού αντισώματος

C219 και την πραγματοποίηση έμμεσου ανοσοφθορισμού και WB σε παλαιότερες μελέτες, επιβεβαιώνεται η παρουσία της Pgp – 170 σε ανθεκτικά στα άλατα αντιμονίου στελέχη του παράσιτου *Leishmania* (Glogl, 1991). Με την μέθοδο WB αλλά και με Northern Blot η Pgp – 170 ανιχνεύθηκε σε ανθεκτικά στελέχη *Leishmania* αλλά όχι σε ευαίσθητα, και από τον Anacleto (2003). Η συσχέτιση της αυξημένης έκφρασης της Pgp με την αντοχή στα φάρμακα φαίνεται σε πληθώρα μελετών σε ασθενείς με λεϊσμανίαση αλλά και άλλες παρασιτικές νόσους, και με καρκίνο (Nakagawa M, 1997; Perez – Victoria, 2006; Verma, 2007; Walker, 2006; Zhang; 2010).

Συμπερασματικά, με την μέθοδο της Πρωτεωμικής ανάλυσης και του WB τα 10 στελέχη χαρακτηρίστηκαν ως «ανθεκτικά, 5» και «ευαίσθητα, 5» με βάση την έκφραση της HSP 70 και της Pgp - 170 (πρωτεΐνες που σχετίζονται με την αντοχή του παράσιτου στα φάρμακα). Η κατηγοριοποίηση αυτή των 10 στελεχών συμπίπτει με την κατηγοριοποίηση που προέκυψε από την προκαταρκτική μελέτη με την κυτταρομετρία ροής, βάσει του ρυθμού εκροής της Rhod-123 (Πίνακας 10).

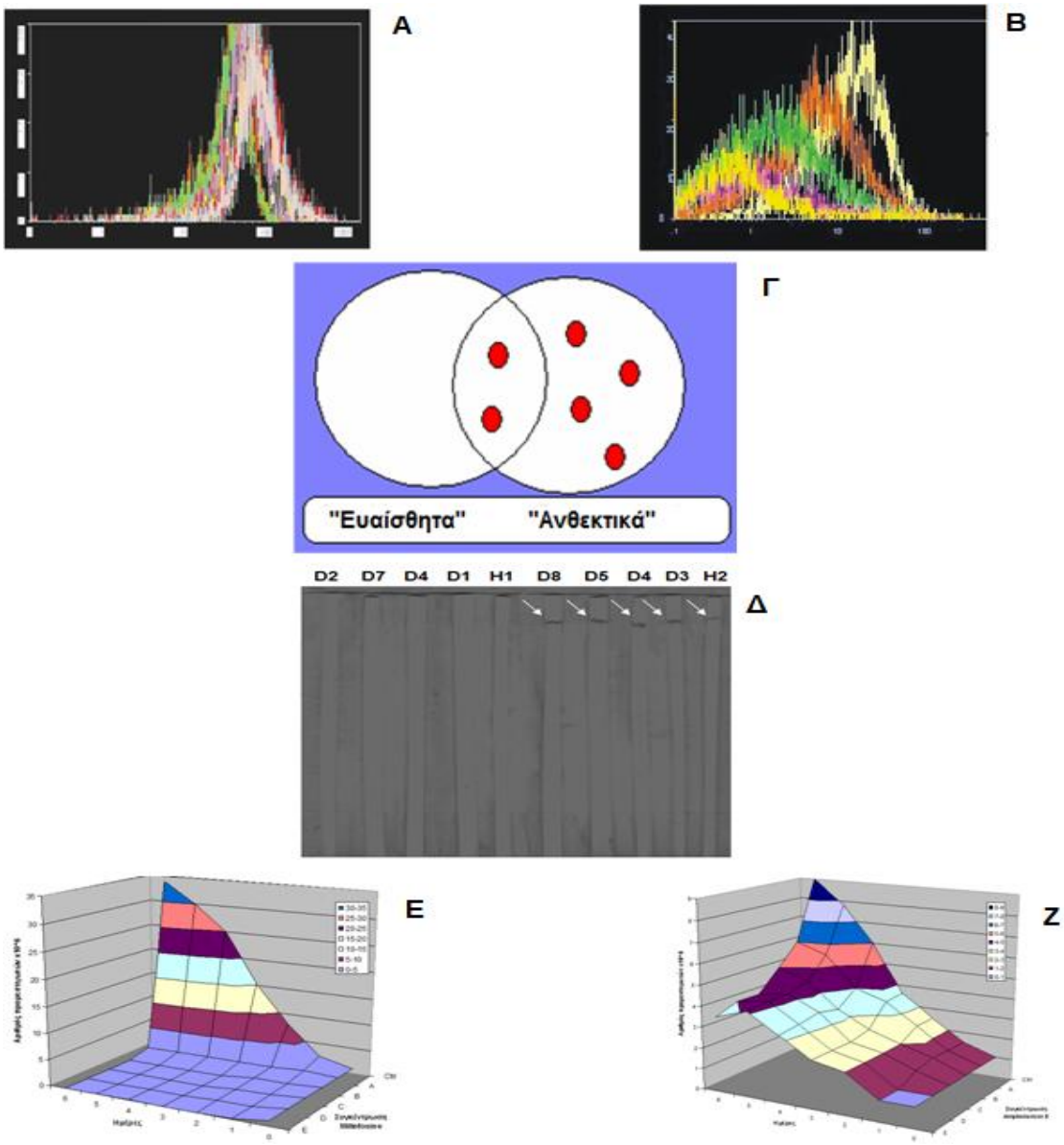
Η αντοχή στα φάρμακα είναι το κυριότερο εμπόδιο για την διαχείριση μολυσματικών ασθενειών και καρκίνων και θεωρείται η αιτία για την μη αποτελεσματική χημειοθεραπεία σε μεταστατικούς ασθενείς (Curt, 1984). Το φαινόμενο MDR (πολλαπλή αντοχή στα φάρμακα), που εμφανίζεται μετά από την έκθεση ενός πληθυσμού κυττάρων σε ένα φάρμακο, έχει μελετηθεί εκτεταμένα *in vitro*, όπως κατά την διάρκεια χημειοθεραπείας σε ασθενείς και ζώα (Bell, 1985; Kartner, 1985; Fojo, 1987; Pastan, 1987), ενώ υπάρχουν μελέτες που αποδεικνύουν το γεγονός αυτό και *in vivo* (Gramiccia, 1992). Η παρουσία της Pgp στα ανθεκτικά στα φάρμακα στελέχη παρασίτων, όπως η

Leishmania και το *Plasmodium*, επιβεβαιώνει την υπόθεση ότι η γλυκοπρωτεΐνη αυτή είναι ένας εξελικτικά συντηρημένος καθοριστής για την απομάκρυνση των χημειοθεραπευτικών παραγόντων – τοξικών ουσιών, όπως έχει περιγραφεί σε ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα (Glogl, 1991; Ponte – Sucre, 2003).

Συνεπώς: α) η χρήση της φθορίζουσας χρωστικής CFSE και της κυτταρομετρίας ροής, για τον προσδιορισμό της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των στελεχών συνιστούν μια γρήγορη, ευαίσθητη και σχετικά χαμηλού κόστους μέθοδο για την σύγκριση μεταξύ στελεχών, β) η πολλαπλασιαστική ικανότητα των στελεχών διαφέρει, με τα στελέχη *L. donovani* να έχουν χαμηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού σε σχέση με τα στελέχη *L. infantum*, γ) η μολυσματική ικανότητα ήταν όμοια μεταξύ των στελεχών *L. donovani* αλλά παρουσίαζε μεγάλη ετερογένεια μεταξύ των στελεχών *L. infantum* καθώς ήταν και ανεξάρτητη από την πολλαπλασιαστική ικανότητα, δ) τα στελέχη *L. donovani* χρειάζονται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα προκειμένου να μετατραπούν από προμαστιγωτά σε αξενικά αμαστιγωτά, και αντίστροφα, σε σχέση με τα στελέχη *L. infantum*. Επιπλέον, τα "ανθεκτικά" στελέχη χρειάζονται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα προκειμένου να μετατραπούν από προμαστιγωτά σε αξενικά αμαστιγωτά, και αντίστροφα, σε σχέση με τα "ευαίσθητα" στελέχη, γεγονός που πιθανόν να έχει αντίκτυπο στο χρονικό διάστημα που χρειάζεται το παράσιτο να προσαρμοστεί στο σώμα της σκνίπας, να πολλαπλασιαστεί και να μολύνει τα κύτταρα του σπονδυλωτού ξενιστή, ε) λόγω ανάπτυξης αντοχής (MDR) του παράσιτου, το Glucantime δεν μπορεί πλέον να χρησιμοποιείται σαν φάρμακο 1^{ης} γραμμής σε πολλές περιοχές, στ) η Αμφοτερικίνη Β παρουσίασε κάποιο

βαθμό αντοχής, *in vitro,* στο 70% των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν, ζ) το Miltefosine είναι πολύ αποτελεσματικό στην θεραπεία της λεϊσμανίασης. Σε περίπτωση όμως χρήσης του για την θεραπεία των σκυλιών με λεϊσμανίαση σε περιοχές που αυτά θεωρούνται οι κύριοι ξενιστές παρακαταθήκη για το παράσιτο, υπάρχει περίπτωση σύντομα να αποκτηθεί αντοχή και στο φάρμακο αυτό με αποτέλεσμα να μην μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την θεραπεία της νόσου στον άνθρωπο, η) με την ανίχνευση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αντοχή του παράσιτου στα φάρμακα, Pgp – 170 στα στελέχη H2, D3, D4, D5, D8 και HSP 70 στα στελέχη H2, D3 (5 στελέχη τα οποία είχαν χαρακτηριστεί με την κυτταρομετρία ροής σαν «ανθεκτικά») επιβεβαιώνεται ότι η κυτταρομετρία ροής μπορεί να δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα ως προς το βαθμό αντοχής του στελέχους θ) η κυτταρομετρία ροής έχει το πλεονέκτημα να ανιχνεύει την Pgp σε ένα σχετικά μικρό αριθμό παράσιτων (<100,000) σε σχέση με το WB για το οποίο χρειάζεται συλλογή πρωτεϊνών από μεγαλύτερο αριθμό, περισσότερος χρόνος και πολύπλοκη διαδικασία.

Τα παραπάνω δεδομένα επισημαίνουν την προσπάθεια που έχει πραγματοποιηθεί για την κατανόηση των παραγόντων που σχετίζονται με την αντοχή του παράσιτου *Leishmania* στα φάρμακα. Παρόλα αυτά, ας ελπίσουμε η γνώση των παραγόντων αυτών (όπως το slope που προέκυψε από το ρυθμό εκροής της Rhod 123, το MDR, την Pgp - 170, την HSP 70 και τη μετατροπή των στελεχών μεταξύ των 2 μορφών – προμαστιγωτά και αξενικά αμαστιγωτά -) να βοηθήσει στον προγραμματισμό της θεραπείας καθώς και στην παρακολούθηση του ασθενούς για την αποφυγή της αναζωπύρωσης της νόσου.



Εικόνα 50: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των δοκιμασιών στα 10 στελέχη *Leishmania*: Κατά τις προκαταρκτικές μελέτες, με την κυτταρομετρία ροής και τη χρήση της Rhod-123, τα 10 στελέχη κατηγοριοποιήθηκαν σε 5 «ευαίσθητα» (A) και 5 «ανθεκτικά» (B). Η κατηγοριοποίηση αυτή συμπίπτει: (i) με την ανίχνευση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αυξημένη αντοχή της *Leishmania* στα φάρμακα, των HSP 70 και Pgp – 170, μόνο στα «ανθεκτικά» στελέχη (Γ, Δ αντίστοιχα) και (ii) με το ρυθμό μεταβολής του πληθυσμού των στελεχών, ως προς το χρόνο και τη συγκέντρωση του φαρμάκου (E: «ευαίσθητα», Z: «ανθεκτικά»).

Κεφάλαιο 4

Παραρτήματα Α

4. Παραρτήματα Α

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται αναλυτικά όλα τα πρωτόκολλα και οι οδηγίες παρασκευής των διαφόρων διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη αυτή .

4.1 Απομόνωση *Leishmania spp* από δείγματα περιφερικού αίματος με EDTA

1. Συλλογή του αίματος (3 - 5 ml) σε στείρο σωληνάριο με EDTA
2. Εναπόθεση Histopaque 1077 σε σωληνάριο τύπου falcon των 15 ml
3. Ανάμειξη της ποσότητας του δείγματος αίματος με ίση ποσότητα στείρο PBS, pH 7.2, και εναποθέτησή του στην επιφάνεια της Histopaque-1077 (*αναλογία Histopaque : αραιωμένο αίμα, 1 : 2*) έτσι ώστε να επικαθήσει και να μην αναμειχθεί
4. Φυγοκέντρηση σε 800 x g, για 30 min, θερμοκρασία δωματίου, χωρίς φρένο. Απόρριψη του υπερκείμενου ορού με πιπέττα Pasteur, ώστε να μην αναταραχθεί η στοιβάδα των λευκών αιμοσφαιρίων
5. Συλλογή της στοιβάδας των λευκών αιμοσφαιρίων και μεταφορά τους σε 10 ml PBS, pH 7.2
6. Φυγοκέντρηση σε 800 x g, για 10 min, θερμοκρασία δωματίου, με φρένο. Απόρριψη του υπερκείμενου και επανάληψη της πλύσης με PBS άλλες 2 φορές
7. Ανασύσταση του ιζήματος σε 3 ml καλλιεργητικό υλικό RPMI 1640 (Παράρτημα 4.4)

8. Τοποθέτηση 0,5 ml δείγματος σε σωληνάριο με υλικό NNN και 5% φιλτραρισμένα ούρα. Επώαση της καλλιέργειας στους 26 ^{o}C και παρακολούθηση της πορείας της για 1 μήνα με την λήψη μιας σταγόνας με πιπέττα Pasteur και μικροσκόπιση του δείγματος σε μεγέθυνση x40.
9. Τοποθέτηση 2,5 ml δείγματος σε πλαστικές αποστειρωμένες φιάλες όγκου 25 cm^3. Επώαση της καλλιέργειας στους 26 ^{o}C και παρακολούθηση της πορείας της για 1 μήνα με την χρήση του ανάστροφου μικροσκοπίου και μεγέθυνση x40.

4.2 Απομόνωση *Leishmania spp* από δείγματα περιφερικού αίματος χωρίς EDTA

1. Συλλογή του αίματος (3 - 5 ml) σε στείρο σωληνάριο χωρίς EDTA
2. Φυγοκέντρηση του αίματος σε 800 x g, για 10 min, θερμοκρασία δωματίου
3. Απομάκρυνση του ορού του αίματος με πιπέττα pasteur
4. Τεμαχισμός του πήγματος σε τρυβλίο petri και συλλογή των απελευθερωμένων αιμοσφαιρίων με 4-5 ml στείρο PBS, pH 7.2
5. Εναπόθεση Histopaque 1077 σε σωληνάριο τύπου falcon των 15 ml
6. Εναποθέτησή του εναιωρήματος των αιμοσφαιρίων στην επιφάνεια της Histopaque - 1077 (*αναλογία Histopaque : αραιωμένο αίμα, 1 : 2*) έτσι ώστε να επικαθήσει και να μην αναμειχθεί
7. Φυγοκέντρηση σε 800 x g, για 30 min, θερμοκρασία δωματίου, χωρίς φρένο. Απόρριψη του υπερκείμενου ορού με πιπέττα Pasteur, ώστε να μην αναταραχθεί η στοιβάδα των λευκών αιμοσφαιρίων
8. Συλλογή της στοιβάδας των λευκών αιμοσφαιρίων και μεταφορά τους σε 10 ml PBS, pH 7.2
9. Φυγοκέντρηση σε 800 x g, για 10 min, θερμοκρασία δωματίου, με φρένο. Απόρριψη του υπερκείμενου και επανάληψη της πλύσης με PBS άλλες 2 φορές
10. Ανασύσταση του ιζήματος σε 3 ml καλλιεργητικό υλικό RPMI 1640 (Παράρτημα 4.4)
11. Τοποθέτηση 0,5 ml δείγματος σε σωληνάριο με υλικό NNN και 5% φιλτραρισμένα ούρα. Επώαση της καλλιέργειας στους 26 ^{o}C και

παρακολούθηση της πορείας της για 1 μήνα με την λήψη μιας σταγόνας με πιπέττα Pasteur και μικροσκόπιση του δείγματος σε μεγέθυνση x40.

12. Τοποθέτηση 2,5 ml δείγματος σε πλαστικές αποστειρωμένες φιάλες όγκου 25 cm^3. Επώαση της καλλιέργειας στους 26 ^oC και παρακολούθηση της πορείας της για 1 μήνα με την χρήση του ανάστροφου μικροσκοπίου και μεγέθυνση x40.

4.3 Απομόνωση *Leishmania spp* από δείγματα μυελού των οστών

1. Συλλογή του μυελού των οστών (1 - 3 ml) σε στείρο σωληνάριο
2. Τεμαχισμός του δείγματος σε τρυβλίο petri και συλλογή των απελευθερωμένων αιμοσφαιρίων με 4 - 5 ml στείρο PBS, pH 7.2
3. Εναπόθεση Histopaque 1077 σε σωληνάριο τύπου falcon των 15 ml
4. Εναποθέτησή του εναιωρήματος των αιμοσφαιρίων στην επιφάνεια της Histopaque - 1077 (*αναλογία Histopaque : αραιωμένο αίμα, 1 : 2*) έτσι ώστε να επικαθήσει και να μην αναμειχθεί
5. Φυγοκέντρηση σε 800 x g, για 30 min, θερμοκρασία δωματίου, χωρίς φρένο. Απόρριψη του υπερκείμενου ορού με πιπέττα Pasteur, ώστε να μην αναταραχθεί η στοιβάδα των λευκών αιμοσφαιρίων
6. Συλλογή της στοιβάδας των λευκών αιμοσφαιρίων και μεταφορά τους σε 10 ml PBS, pH 7.2
7. Φυγοκέντρηση σε 800 x g, για 10 min, θερμοκρασία δωματίου, με φρένο. Απόρριψη του υπερκείμενου και επανάληψη της πλύσης με PBS άλλες 2 φορές
8. Ανασύσταση του ιζήματος σε 3 ml καλλιεργητικό υλικό RPMI 1640 (Παράρτημα 4.4)
9. Τοποθέτηση 0,5 ml δείγματος σε σωληνάριο με υλικό NNN και 5% φιλτραρισμένα ούρα. Επώαση της καλλιέργειας στους 26 ^{o}C και παρακολούθηση της πορείας της για 1 μήνα με την λήψη μιας σταγόνας με πιπέττα Pasteur και μικροσκόπιση του δείγματος σε μεγέθυνση x40.

10. Τοποθέτηση 2,5 ml δείγματος σε πλαστικές αποστειρωμένες φιάλες όγκου 25 cm^3. Επώαση της καλλιέργειας στους 26 ^oC και παρακολούθηση της πορείας της για 1 μήνα με την χρήση του ανάστροφου μικροσκοπίου και μεγέθυνση x40.

4.4 Καλλιεργητικό υλικό RPMI 1640 10%

L-glutamine	2 mM
Hepes Buffer	20 MM
Αποσυμπληρωμένος ορός εμβρύου βοδιού (FBS, Foetal Bovine Serum)	10%
Πενικιλλίνη / Στρεπτομυκίνη	100 U / 10 mg

4.5 Διφασικό Καλλιεργητικό υλικό NNN

Agar (plain, Non-nutrient)	14 g/l
NaCl	6 g/l
Απινωδογονωμένο αίμα προβάτου	150 ml/l

4.6 Πάγωμα παράσιτων στους – 80 ^{o}C

1. Φυγοκέντρηση της καλλιέργειας σε 800 x g, για 10 min, θερμοκρασία δωματίου, με φρένο
2. Απόρριψη του υπερκείμενου και ανασύσταση του ιζήματος σε υλικό παγώματος το οποίο περιέχει 80% καλλιεργητικό υλικό RPMI 1640 (Παράρτημα 4.4) και 20% γλυκερόλη
3. Τοποθέτηση σε ειδικό κουτί σταδιακής μείωσης της θερμοκρασίας (Cryobox) και φύλαξη στους – 80 ^{o}C

4.7 Πάγωμα παράσιτων σε υγρό άζωτο

1. Φυγοκέντρηση της καλλιέργειας σε 800 x g, για 10 min, θερμοκρασία δωματίου, με φρένο
2. Απόρριψη του υπερκείμενου και ανασύσταση του ιζήματος σε υλικό παγώματος το οποίο περιέχει 92% καλλιεργητικό υλικό RPMI 1640 (Παράρτημα 4.4) και 8% DMSO
3. Φύλαξη σε υγρό άζωτο

4.8 Ξεπάγωμα παράσιτων από τους – 80 ^{o}C ή το υγρό άζωτο

1. Ξεπάγωμα της καλλιέργειας από στους – 80 ^{o}C ή το υγρό άζωτο, σε υδατόλουτρο για 2 min, στους 37 ^{o}C
2. Φυγοκέντρηση της καλλιέργειας σε 800 x g, για 10 min, θερμοκρασία δωματίου, με φρένο
3. Απόρριψη του υπερκείμενου και ανασύσταση του ιζήματος σε καλλιεργητικό υλικό RPMI 1640 (Παράρτημα 4.4) με προσθήκη 5% φιλτραρισμένα ούρα
4. Επώαση στους 26 ^{o}C

4.9 Μόλυνση κυτταρικής σειράς THP-1 με το παράσιτο *Leishmania*

1. Ανάδευση της καλλιέργειας THP-1
2. Λήψη 0.1 ml από την καλλιέργεια και ανάδευσή της με ίσο όγκο Trypan blue 0.4 mg/ml
3. Μέτρηση των ζωντανών κυττάρων με την χρήση του αιμοκυτταρόμετρου και υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων /ml καλλιέργειας
4. Λήψη 5 x 10^5 /ml από την καλλιέργεια και φυγοκέντρησή της σε 300 – 400 x g για 10 min
5. Απόρριψη του υπερκείμενου υλικού και ανασύσταση σε 10 ml καλλιεργητικού υλικού RPMI 1640 (Παράρτημα 4.4)
6. Μόλυνση των κυττάρων με το παράσιτο *Leishmania* (κατά την λογαριθμική του φάση) σε αναλογία 1 : 5
7. Επώαση για 3 hr στους 37 ^oC, παρουσία 5% CO_2 και σχετικής υγρασίας > 80%
8. Φυγοκέντρησή της καλλιέργειας σε 300 – 400 x g για 10 min και ανασύσταση του ιζήματος σε 4 ml καλλιεργητικού υλικού RPMI 1640
9. Εναπόθεση Histopaque 1077 σε σωληνάριο τύπου falcon των 15 ml
10. Εναποθέτησή της στην επιφάνεια της Histopaque-1077 (*αναλογία Histopaque : καλλιέργειας, 1 : 1*) έτσι ώστε να επικαθήσει και να μην αναμειχθεί

11. Φυγοκέντρηση σε 800 x g, για 30 min, θερμοκρασία δωματίου, χωρίς φρένο. Απόρριψη του υπερκείμενου ορού με πιπέττα Pasteur, ώστε να μην αναταραχθεί η στοιβάδα των κυττάρων
12. Συλλογή της στοιβάδας των κυττάρων και μεταφορά τους σε 10 ml PBS, pH 7.2
13. Φυγοκέντρηση σε 300 – 400 x g, για 10 min με φρένο. Απόρριψη του υπερκείμενου και επανάληψη της πλύσης με PBS, pH 7.2 άλλες 2 φορές
14. Ανασύσταση του ιζήματος με το καλλιεργητικό υλικό RPMI 1640 και προσαρμογή των κυττάρων σε 1 x 10^6 /ml
15. Λήψη 0.3 x 10^6 κύτταρα και τοποθέτησή τους σε 3 ειδικούς υποδοχείς κυτταροφυγοκέντρου (0.1 x 10^6 για κάθε υποδοχέα) οι οποίοι διαθέτουν μια αντικειμενοφόρο πλάκα για την αποτύπωση των κυττάρων και ένα διηθητικό χαρτί για την απορρόφηση του καλλιεργητικού υλικού
16. Φυγοκέντρηση των υποδοχέων σε 100 x g, θερμοκρασία δωματίου, για 2 min
17. Στέγνωμα των αντικειμενοφόρων πλακών σε θερμοκρασία δωματίου
18. Χρώση των κυττάρων με την χρωστική Diff Quick (Παράρτημα 4.10)
19. Μέτρηση του αριθμού των μολυσμένων κυττάρων με την χρήση του οπτικού μικροσκοπίου, με τον καταδυτικό φακό (x100) και την χρήση κεδρέλαιου

4.10 Χρώση Diff Quick Panoptic

1. Στέγνωμα των αντικειμενοφόρων πλακών σε θερμοκρασία δωματίου
2. Βύθισμα των πλακών στο διάλυμα Α για 30 sec για την μονιμοποίηση των κυττάρων (fixation). Στράγγιγμα σε διηθητικό χαρτί
3. Βύθισμα των πλακών στο διάλυμα Β, πριν στεγνώσουν οι πλάκες από το διάλυμα Α για 30 sec. Στράγγιγμα σε διηθητικό χαρτί
4. Βύθισμα των πλακών στο διάλυμαC, πριν στεγνώσουν οι πλάκες από το διάλυμα Β για 30 sec. Στράγγιγμα σε διηθητικό χαρτί
5. Βύθισμα των πλακών σε απεσταγμένο νερό, προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια χρωστικής
6. Στέγνωμα των αντικειμενοφόρων πλακών σε θερμοκρασία δωματίου
7. Μικροσκόπηση και μέτρημα των μολυσμένων κυττάρων καθώς και των αμαστιγωτών μορφών του παράσιτου που πιθανόν να περιέχονται στα κύτταρα με την χρήση του καταδυτικού φακού (x100) και την χρήση κεδρέλαιου

Παρατηρήσεις	
Χρωματίνη των λευκών αιμοσφαιρίων	Μωβ - Μπλε
Ηωσινοφιλικά κοκκία	Ανοιχτό ροζ
Ουδετεροφιλικά κοκκία	Μωβ
Ερυθρά αιμοσφαίρια	Γκρι
Πυρήνας	Μπλε - Μωβ
Κυτταρόπλασμα	Ροζ - Πορτοκαλί
Πυρήνας παρασιτικών πρωτοζώων	Κόκκινο – Ανοιχτό ροζ

4.11 Μετασχηματισμός προμαστιγωτών μορφών του παράσιτου *Leishmania* σε αξενικές αμαστιγωτές

1. Λήψη 1 x 10^6/ml παράσιτα από την καλλιέργεια (κατά την λογαριθμική τους φάση)
2. Φυγοκέντρηση της καλλιέργειας, για την απομάκρυνση του καλλιεργητικού υλικού RPMI 1640 (Παράρτημα 4.4), σε 800 x g, για 10 min, θερμοκρασία δωματίου, με φρένο
3. Απόρριψη του υπερκείμενου και ανασύσταση του ιζήματος σε φρέσκο καλλιεργητικό υλικό M199, εμπλουτισμένο με 10% FBS (βλ. τέλος της ενότητας για οδηγίες παρασκευής)
4. Επώαση στους 26 ^oC, για 4 ημέρες
5. Λήψη 5 x 10^6/ml παράσιτα από την καλλιέργεια (κατά την λογαριθμική τους φάση)
6. Φυγοκέντρηση της καλλιέργειας, σε 800 x g, για 10 min, θερμοκρασία δωματίου, με φρένο
7. Απόρριψη του υπερκείμενου και ανασύσταση του ιζήματος σε φρέσκο καλλιεργητικό υλικό M199, εμπλουτισμένο με 25% FBS (βλ. τέλος της ενότητας για οδηγίες παρασκευής)
8. Επώαση στους 37 ^oC, 5% CO_2, σχετική υγρασία > 80%
9. Διατήρηση των καλλιεργειών με αραίωση 1 : 3, μια φορά την εβδομάδα. Η μετατροπή των προμαστιγωτών σε αξενικές αμαστιγωτές αναμένεται να πραγματοποιηθεί εντός 120 hr.

M199 10%	
L-glutamine	2 mM
Hepes Buffer	20 MM
Αποσυμπληρωμένος ορός εμβρύου βοδιού (FBS, Foetal Bovine Serum)	10%
Πενικιλλίνη / Στρεπτομυκίνη	100 U / 10 mg

M199 25%	
L-glutamine	2 mM
Hepes Buffer	20 MM
Αποσυμπληρωμένος ορός εμβρύου βοδιού (FBS, Foetal Bovine Serum)	25%
Πενικιλλίνη / Στρεπτομυκίνη	100 U / 10 mg
Succinic Acid	0.3 g
Tris σε σκόνη	Μέχρι το pH να φτάσει στο 5.5

4.12 Κλασματοποίηση πρωτεϊνών με το kit της Qiagen

1. Λήψη 1 x 10^8 παράσιτα από την καλλιέργεια (κατά την λογαριθμική τους φάση)
2. Φυγοκέντρηση της καλλιέργειας, για την απομάκρυνση του καλλιεργητικού υλικού RPMI 1640 (Παράρτημα 4.4), σε 700 x g, για 10 min, θερμοκρασία 4 ^oC, με φρένο
3. Φυγοκέντρηση σε 700 x g, για 10 min, θερμοκρασία 4 ^oC, με φρένο.
4. Απόρριψη του υπερκείμενου και επανάληψη της πλύσης με PBS, pH 7.2, άλλες 2 φορές
5. Ξεπάγωμα του Protease Inhibitor Solution (100x) και των Extraction Buffers CE1, CE2, and CE3 τα οποία περιέχονται στο kit (Qproteome Cell Compartment Kit, Qiagen)
6. Καλή ανάδευση σε vortex και τοποθέτηση σε πάγο
7. Για κάθε κλασματοποίηση είναι απαραίτητη η προετοιμασία διαλυμάτων για κάθε στάδιο και περιγράφονται στον πίνακα που ακολουθεί

	Buffer CE1	**Buffer CE2**	**Buffer CE3**	**Buffer CE4**
Απαιτούμενη ποσότητα	1 ml	1 ml	0,5 ml	0,5 ml
Protease Inhibitor Solution (100x)	10 μl	10 μl	5 μl	-

8. Ανασύσταση του ιζήματος με το Extraction Buffer CE1, μεταφορά του σε σωληνάριο τύπου eppendorf και επώαση στους 4 °C, για for 10 min, υπό ανάδευση
9. Φυγοκέντρηση του eppendorf σε 1000 x *g,* για 10 min, 4 °C

10. Μεταφορά του υπερκείμενου (fraction 1) το οποίο περιέχει πρωτεΐνες διαλυτές στο κυτταρόπλασμα, σε ένα καθαρό eppendorf και τοποθέτηση σε πάγο
11. Ανασύσταση του ιζήματος με το Extraction Buffer CE2 και επώαση στους 4 °C, για for 30 min, υπό ανάδευση
12. Φυγοκέντρηση του eppendorf σε 6000 x *g,* για 10 min, 4 °C
13. Μεταφορά του υπερκείμενου (fraction 2) το οποίο περιέχει τις μεμβρανικές πρωτεΐνες, σε ένα καθαρό eppendorf και τοποθέτηση σε πάγο
14. Προσθήκη 7 μl Benzonase® Nuclease και 13 μl απεσταγμένο νερό στο ίζημα, απαλή ανάδευση με το χέρι και επώαση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου
15. Ανασύσταση του δείγματος με το Extraction Buffer CE3 και επώαση στους 4 °C, για for 10 min, υπό ανάδευση
16. Φυγοκέντρηση του eppendorf σε 6800 x *g,* για 10 min, 4 °C
17. Μεταφορά του υπερκείμενου (fraction 3) το οποίο περιέχει τις πρωτεΐνες του πυρήνα, σε ένα καθαρό eppendorf και τοποθέτηση σε πάγο
18. Ανασύσταση του ιζήματος με το Extraction Buffer CE4 και επώαση στους 4 °C, για for 10 min, υπό ανάδευση. Στο σημείο αυτό λαμβάνονται οι κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες

4.13 Sample Buffer

Urea	7M
Thiourea	2M
CHAPS	4%
DTE	1%
IPG	2%
PI	4%
Ρητίνη	Ίχνη

4.14 Ακρυλαμίδη 12%

ProtoGel (30% (w/v) acrylamide/PDA (Piperazine D-Acrylamide) (37,5 : 1))	400 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	250 ml
1 M Sodium Thiosulfate	5 ml
απιονισμένο νερό (Milli Q)	341.4 ml

4.15 Διάλυμα Αγαρόζης 0,5%

TGS Buffer (25 mM Tris, pH 8.3, 192 mM Glycine, 0,1% (w/v) SDS)	1X
Βρωμοφαινόλη Μπλε	Ίχνη

4.16 Διάλυμα Μονιμοποίησης (Fixation Buffer)

85% H_3PO_4 (ortho-phosphoric acid)	6 ml
CH_3OH (Methanol HPLC grade)	50 ml
Απεσταγμένο νερό	44 ml

4.17 Urea Cracking Buffer

NaH_2PO_4	10 mM
SDS	1%
β-Mercaptoethanol	1%
Urea, pH 7.0	5 M

4.18 Urea – Laemmly Buffer 2X

TrisHCl, pH 6.8	2 M
SDS	10%
β-mercaptoethanol	10%
Glycerol	20%
Bromophenol Blue	0.2%
Urea	8 M

4.19 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

1. Πλύση τζαμιών και χωρισμάτων με 10% SDS, μετά με 70% αιθανόλη και συναρμολόγηση της συσκευής.
2. Προσθήκη πηκτώματος ανάλυσης 8% (Παράρτημα 4.20) και επίστρωση με 200μl ισοβουτανόλης
3. Πολυμερισμός για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου
4. Ξέπλυμα ισοβουτανόλης με απεσταγμένο νερό και στέγνωμα με διηθητικό χαρτί
5. Προσθήκη πηκτώματος συμπύκνωσης 5% (Παράρτημα 4.21) και τοποθέτηση της ειδικής χτένας
6. Πολυμερισμός για 1 hr σε θερμοκρασία δωματίου
7. Αφαίρεση χτένας, ξέπλυμα των πηγαδιών με απεσταγμένο νερό και τοποθέτηση των γιέλων (gels) στην συσκευή ηλεκτροφόρησης με την προσθήκη 1X διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Electrode buffer 1X) (Παράρτημα 4.22)
8. Προσθήκη του επωασμένου δείγματος στην ειδική υποδοχή που έχει δημιουργήσει η χτένα, με το διάλυμα φόρτωσης σε αναλογία 1:1 (v/v)
9. Βρασμός για 3 min του Marker μαζί με το διάλυμα φόρτωσης και τοποθέτηση σε πάγο (25μl από τον Marker αναμειγνύονται με 25μl από την χρωστική φόρτωσης για τον βρασμό και έπειτα φόρτωση στα μικρά πηγαδάκια (10μl διαλύματος σε κάθε πηγαδάκι))
10. Ηλεκτροφόρηση σε τάση 75-80 V μέχρι ο Marker και το αντιγόνο περάσουν το πήκτωμα συμπύκνωσης (5%) και έπειτα σε τάση 130 V στο πήκτωμα ανάλυσης (8%) για περίπου 1 hr.

4.20 Ηλεκτροφορητικό Πήκτωμα Ανάλυσης 8%

30% Bis-Acryl.	13.3
1.5 M Tris pH 8.8	12.5
10% SDS	0.5
10% Ammon. Persulf.	0.5
TEMED	0.03
Απεσταγμένο νερό	23.2

4.21 Ηλεκτροφορητικό Πήκτωμα Συμπύκνωσης 5%

30% Bis-Acryl.	1.7
1.0 M Tris pH 6.8	1.25
10% SDS	0.1
10% Ammon. Persulf.	0.1
TEMED	0.01
Απεσταγμένο νερό	6.8

4.22 Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης 1X (Electrode Buffer)

Tris	25 mM
Glycine	0.192 M
SDS	0.1%
Απεσταγμένο νερό	Up to 500 ml

4.23 Ανοσοαποτύπωση

1. Εμβάπτισμα των πηκτωμάτων συμπύκνωσης (Παράρτημα 4.20) και ανάλυσης (Παράρτημα 4.21), χωρίς να διαχωριστούν (μερικές φορές οι ABC transporters συσσωρεύονται και παραμένουν στο πήκτωμα συμπύκνωσης), σε διάλυμα μεταφοράς (Παράρτημα 4.24) για την απελευθέρωση του διαλύματος φόρτωσης, για 10 min, υπό ανάδευση
2. Κόψιμο 1 φύλλου νιτροκυτταρίνης (0,45 μm) και 6 φύλλων διηθητικού χαρτιού στις ίδιες διαστάσεις με το πήκτωμα ή ελαφρώς μικρότερα
3. Εμβάπτισμα σε διάλυμα μεταφοράς, για 10 min, σε ξεχωριστό δοχείο από το πήκτωμα, για την απελευθέρωση του παγιδευμένου αέρα
4. Τοποθέτηση στη συσκευή μεταφοράς (semi-dry transfer) 3 φύλλα διηθητικού χαρτιού, 1 φύλλο νιτροκυτταρίνης, το πήκτωμα και από πάνω άλλα 3 φύλλα διηθητικού χαρτιού)
5. Απομάκρυνση του παγιδευμένου αέρα με καθαρή γυάλινη πιπέττα Pasteur και πίεση προς όλες τις κατευθύνσεις
6. Ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος σε ένταση 0,8 mA / cm^2 (διαστάσεις νιτροκυτταρίνης: ύψος x πλάτος x 0.8) για 1.5 hr
7. Εμβάπτισμα της νιτροκυτταρίνης σε 0,1% διαλύματος Ponceau S (Παράρτημα 4.25)
8. Πλύσιμο των νιτροκυτταρινών 1 φορά με απεσταγμένο H_2O και 1 φορά με πλυστικό διάλυμα 1X (Παράρτημα 4.26) για να εμφανιστούν οι μπάντες και έπειτα να κρυφτούν
9. Πλύσιμο των νιτροκυτταρινών 3 φορές x 10 min, σε δεσμευτικό διάλυμα
10. Πλύσιμο των νιτροκυτταρινών 3 φορές x 10 min, σε πλυστικό διάλυμα
11. Στέγνωμα της νιτροκυτταρίνης σε διηθητικό χαρτί και φύλαξη στους 4^oC

4.24 Διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer)

Tris, pH 7.7-8.3	25mM
Glycine	0.7M
Απεσταγμένο νερό	Up to 500 ml

4.25 Ponceau S

Ponceau S	2 g
Trichloroacetic acid	30 g
Sulfosalycilic acid	30 g
Απεσταγμένο νερό	Up to 100 ml

4.26 Πλυστικό διάλυμα 10X (Wash Buffer 10X)

Tris, pH 8.0	50 mM
NaCl	150 mM
Triton	0.01%
Απεσταγμένο νερό	Up to 500 ml

4.27 Δεσμευτικό διάλυμα (Blocking buffer)

Αποβουτυρωμένη σκόνη γάλακτος	2%
Anti-foam A	0.01%
Πλυστικό διάλυμα 1X	Up to 500 ml

4.28 Alkaline phosphate buffer

NaCl	100 mM
$MgCl_2$	1 M
Tris, pH 9.5	100 mM
Απεσταγμένο νερό	Up to 500 ml

Κεφάλαιο 5

Παραρτήματα Β

5. Παραρτήματα Β

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται αναλυτικά όλα τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά τις πειραματικές δοκιμασίες του ποιοτικού προσδιορισμού της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των προμαστιγωτών (CFSE). Επιπλέον παρουσιάζεται η ανταπόκριση που είχαν τα 10 στελέχη στα 3 διαφορετικά σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη.

5.1 % Κατανομής του φθορισμού των προμαστιγωτών των 10 στελεχών μεταξύ των καναλιών 1 - 5, μετά από χρώση με CFSE (Πίνακες)

Στέλεχος H1	**% Κατανομής φθορισμού**				
	Channels				
Ημέρα	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
1	97	2,6	0,1	0,2	0,2
2	22,9	75,7	1,2	0,1	0,1
3	1,5	64,9	33,3	0,2	0,1
4	0,3	16,4	78,2	5	0,1
5	0,1	11,4	78,8	9,4	0,3
6	0,1	7,4	73,3	19	0,3

% κατανομής φθορισμού του "ευαίσθητου" στελέχους H1 μεταξύ των καναλιών 1 - 5, μετά από χρώση των παράσιτων με CFSE και ανάλυσή τους με την κυτταρομετρία ροής.

Στέλεχος H2	% Κατανομής φθορισμού				
	Channels				
Ημέρα	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
1	91,8	7,6	0,4	0,1	0,1
2	64,5	30,5	4,3	0,5	0,1
3	29,9	52,7	14,7	2,4	0,3
4	10	38,9	37,6	12	1,4
5	4,1	31,4	45,9	16,7	1,7
6	4,1	25,4	45,7	22,4	1,9

% κατανομής φθορισμού του "ανθεκτικού" στελέχους H2 μεταξύ των καναλιών 1 - 5, μετά από χρώση των παράσιτων με CFSE και ανάλυσή τους με την κυτταρομετρία ροής

Στέλεχος D1	% Κατανομής φθορισμού				
	Channels				
Ημέρα	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
1	97	2,9	0	0,1	0
2	5,3	92,6	1,9	0,1	0,1
3	0,3	17,1	79,3	2,9	0,3
4	0,2	2,4	53	39,9	4,6
5	0,1	0,9	36,2	53,9	8,9
6	0	0,4	19,6	64,1	15,9

% κατανομής φθορισμού του "ευαίσθητου" στελέχους D1 μεταξύ των καναλιών 1 - 5, μετά από χρώση των παράσιτων με CFSE και ανάλυσή τους με την κυτταρομετρία ροής.

Στέλεχος D2	% Κατανομής φθορισμού				
	Channels				
Ημέρα	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
1	96,1	3,2	0,1	0,3	0,3
2	17,8	73,8	7,2	0,9	0,2
3	0,9	41,5	55,5	1,8	0,3
4	0,1	4,4	78,5	16,1	0,8
5	0	2,1	64,1	32,7	1,1
6	0,1	1,5	57,9	39,2	1,4

% κατανομής φθορισμού του "ευαίσθητου" στελέχους D2 μεταξύ των καναλιών 1 - 5, μετά από χρώση των παράσιτων με CFSE και ανάλυσή τους με την κυτταρομετρία ροής.

Στέλεχος D3	% Κατανομής φθορισμού				
	Channels				
Ημέρα	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
1	98,9	0,9	0	0,1	0,1
2	1,4	97,9	0,6	0	0
3	0	17,8	77,9	4,1	0,1
4	0	0,4	24,6	67,2	5,3
5	0	0,2	19	69,8	8
6	0	0,4	14	67,8	17,8

% κατανομής φθορισμού του "ανθεκτικού" στελέχους D3 μεταξύ των καναλιών 1 - 5, μετά από χρώση των παράσιτων με CFSE και ανάλυσή τους με την κυτταρομετρία ροής.

Στέλεχος D4	% Κατανομής φθορισμού				
	Channels				
Ημέρα	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
1	99,4	0,6	0	0	0
2	2,5	96,4	1	0,1	0
3	0,2	19,6	74,7	5,4	0,2
4	0,1	1,3	26,6	65,5	6,5
5	0	0,3	12,2	75,6	8,7
6	0	0,2	8,3	75,6	12

% κατανομής φθορισμού του "ευαίσθητου" στελέχους D4 μεταξύ των καναλιών 1 - 5, μετά από χρώση των παράσιτων με CFSE και ανάλυσή τους με την κυτταρομετρία ροής.

Στέλεχος D5	% Κατανομής φθορισμού				
	Channels				
Ημέρα	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
1	98,1	1,9	0	0	0
2	6,1	91,6	2,2	0	0
3	0,4	16,3	79,7	3,1	0,5
4	0,1	1	38,3	48,2	8,8
5	0,1	0,4	19,6	54,3	25,6
6	0,1	0,5	12,3	51,6	27,3

% κατανομής φθορισμού του "ανθεκτικού" στελέχους D5 μεταξύ των καναλιών 1 - 5, μετά από χρώση των παράσιτων με CFSE και ανάλυσή τους με την κυτταρομετρία ροής.

Στέλεχος D6	% Κατανομής φθορισμού				
	Channels				
Ημέρα	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
1	97,5	2,4	0	0	0,1
2	4,2	80,6	15	0	0,1
3	0,5	3,7	77	18,4	0,4
4	0,1	0,7	11,8	71,4	16
5	0,1	0,3	5,7	64,9	29,1
6	0	0,1	1,8	56,8	41,3

% κατανομής φθορισμού του "ευαίσθητου" στελέχους D6 μεταξύ των καναλιών 1 - 5, μετά από χρώση των παράσιτων με CFSE και ανάλυσή τους με την κυτταρομετρία ροής.

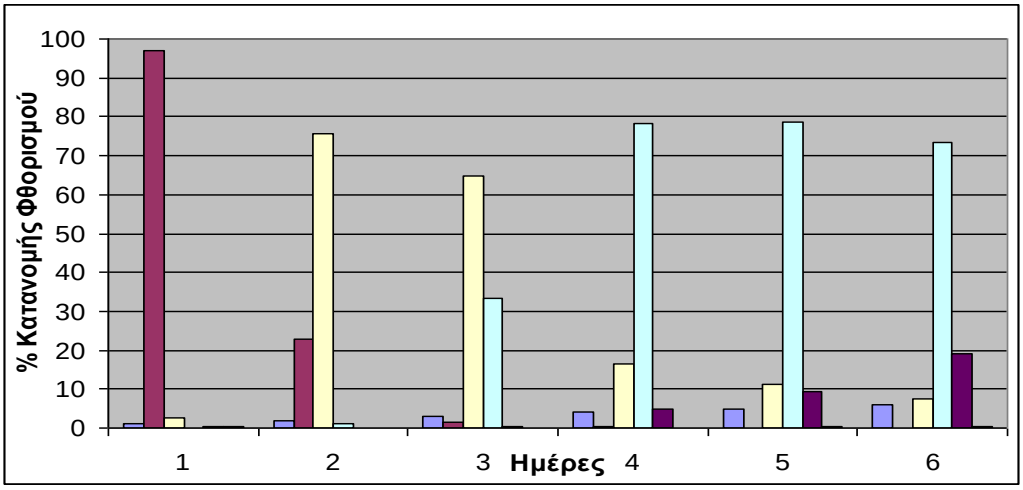
Στέλεχος D7	% Κατανομής φθορισμού				
	Channels				
Ημέρα	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
1	98,1	1,7	0	0	0
2	7,9	88,8	3,1	0,1	0,1
3	0,2	13,2	82,8	3,4	0,4
4	0	0,5	21,8	68,8	6
5	0	0,2	7,2	67,4	25,2
6	0	0	3,5	63,7	32,7

% κατανομής φθορισμού του "ευαίσθητου" στελέχους D7 μεταξύ των καναλιών 1 - 5, μετά από χρώση των παράσιτων με CFSE και ανάλυσή τους με την κυτταρομετρία ροής.

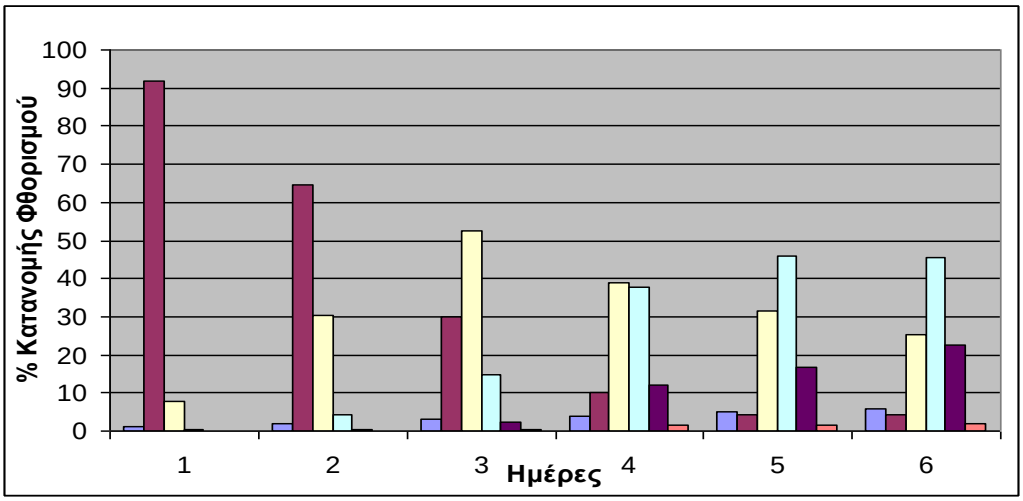
Στέλεχος D8	% Κατανομής φθορισμού				
	Channels				
Ημέρα	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
1	98,7	0,5	0	0,1	0,1
2	3,5	60,6	31,6	3,9	0,4
3	0,4	3,4	81,6	14,2	0,5
4	0,1	0,3	13,4	72	14,2
5	0	0,2	5	73,8	15,6
6	0	0,1	1	45,5	53,5

% κατανομής φθορισμού του "ανθεκτικού" στελέχους D8 μεταξύ των καναλιών 1 - 5, μετά από χρώση των παράσιτων με CFSE και ανάλυσή τους με την κυτταρομετρία ροής.

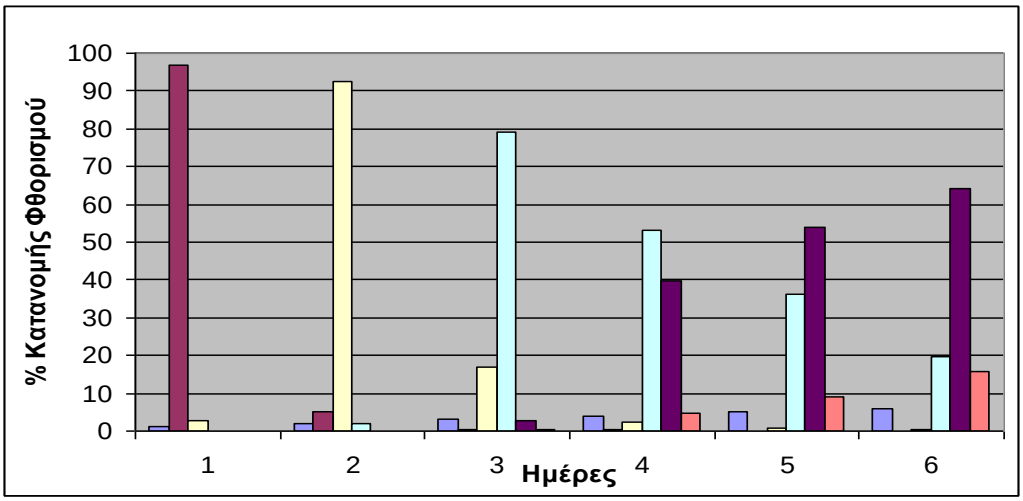
5.2 % Κατανομής του φθορισμού των προμαστιγωτών των 10 στελεχών μεταξύ των καναλιών 1 - 5, μετά από χρώση με CFSE (Γραφήματα)



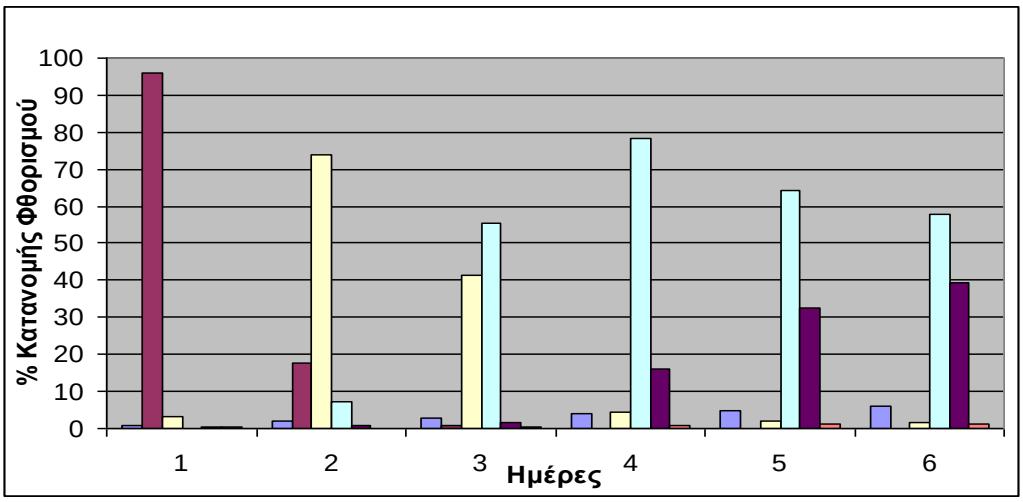
% κατανομής φθορισμού του "ευαίσθητου" στελέχους H1 μεταξύ των καναλιών 1 - 5, μετά από χρώση των παράσιτων με CFSE και ανάλυσή τους με την κυτταρομετρία ροής.



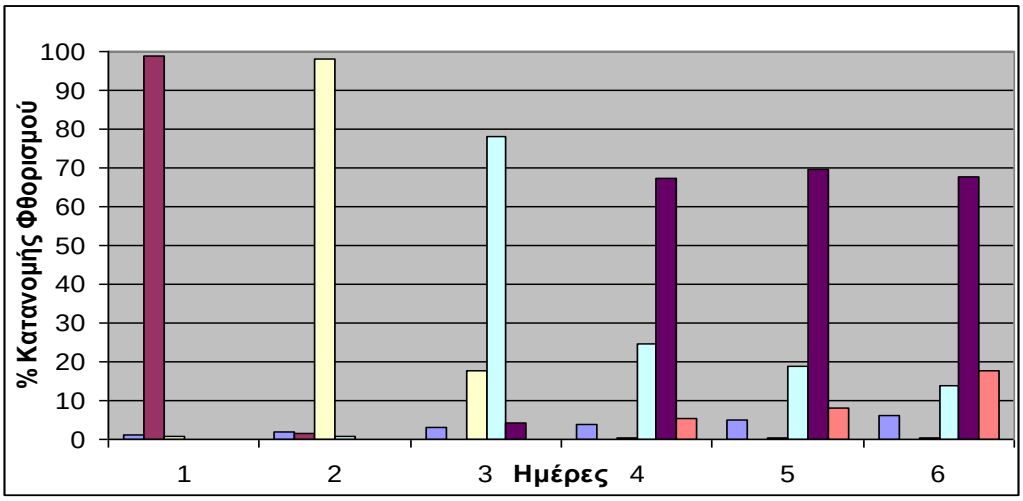
% κατανομής φθορισμού του στελέχους "ανθεκτικού" H2 μεταξύ των καναλιών 1 - 5, μετά από χρώση των παράσιτων με CFSE και ανάλυσή τους με την κυτταρομετρία ροής.



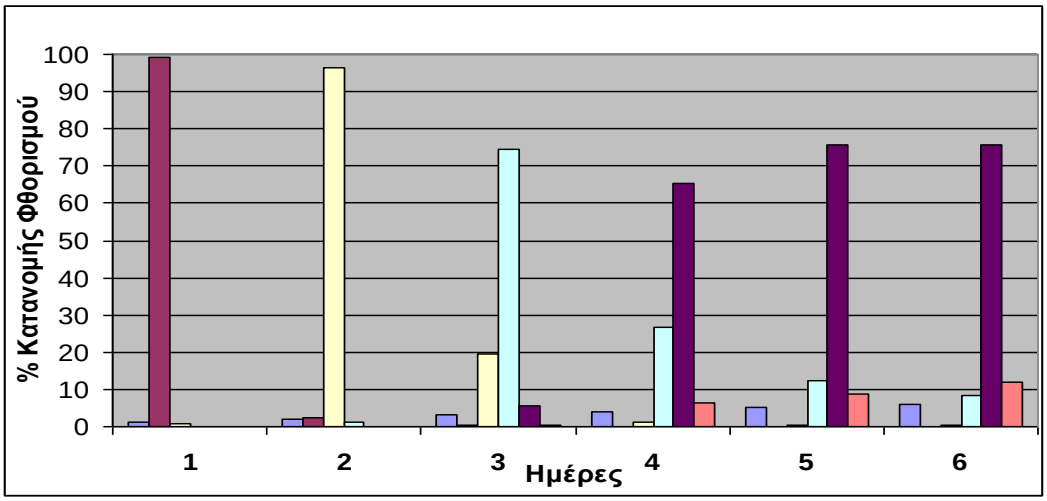
% κατανομής φθορισμού του "ευαίσθητου" στελέχους D1 μεταξύ των καναλιών 1 - 5, μετά από χρώση των παράσιτων με CFSE και ανάλυσή τους με την κυτταρομετρία ροής.



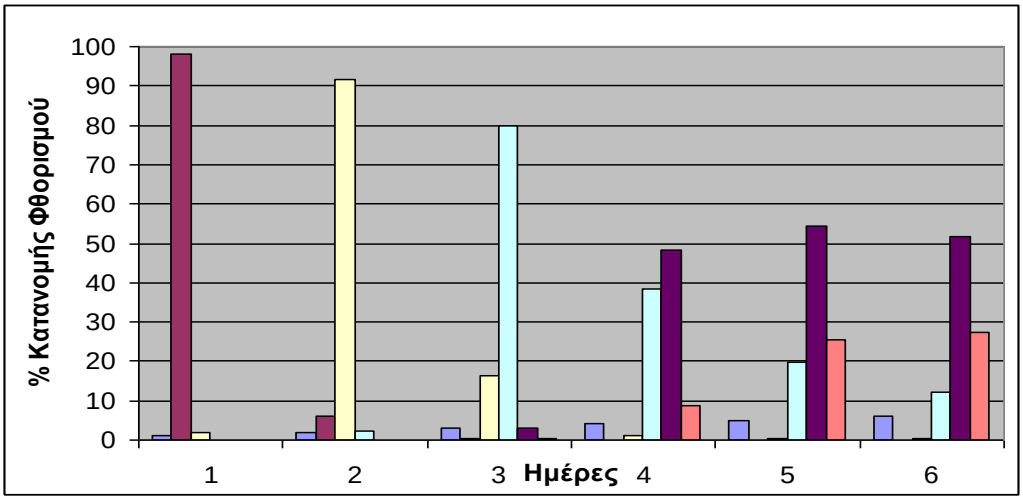
% κατανομής φθορισμού του "ευαίσθητου" στελέχους D2 μεταξύ των καναλιών 1 - 5, μετά από χρώση των παράσιτων με CFSE και ανάλυσή τους με την κυτταρομετρία ροής.



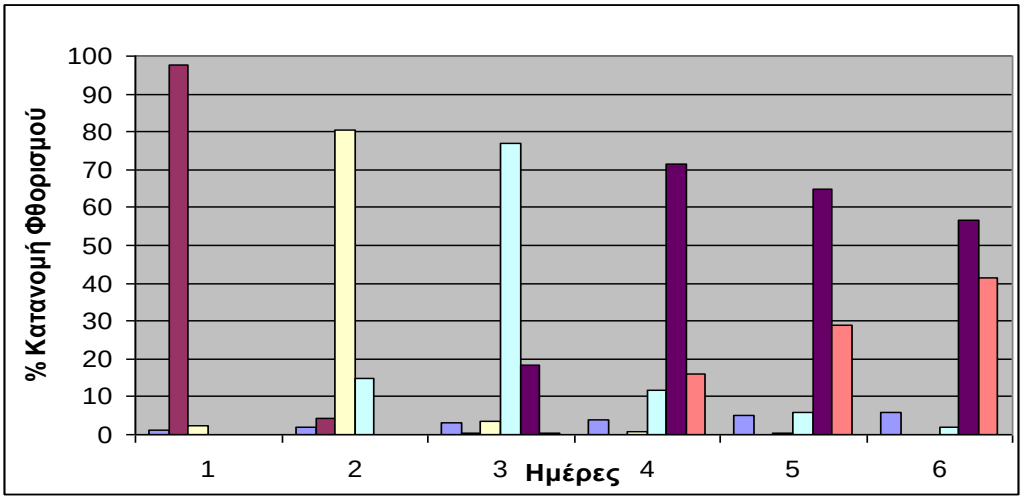
% κατανομής φθορισμού του "ανθεκτικού" στελέχους D3 μεταξύ των καναλιών 1 - 5, μετά από χρώση των παράσιτων με CFSE και ανάλυσή τους με την κυτταρομετρία ροής.



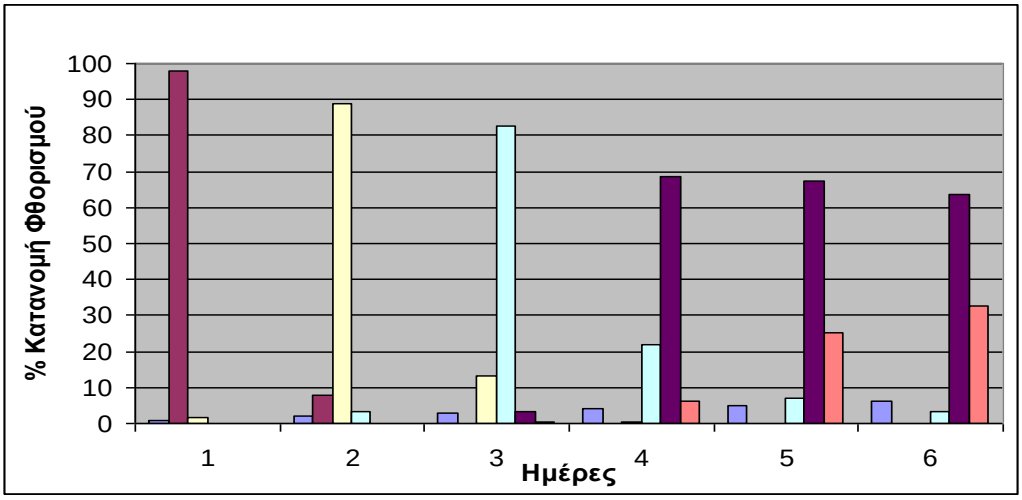
% κατανομής φθορισμού του "ευαίσθητου" στελέχους D4 μεταξύ των καναλιών 1 - 5, μετά από χρώση των παράσιτων με CFSE και ανάλυσή τους με την κυτταρομετρία ροής.



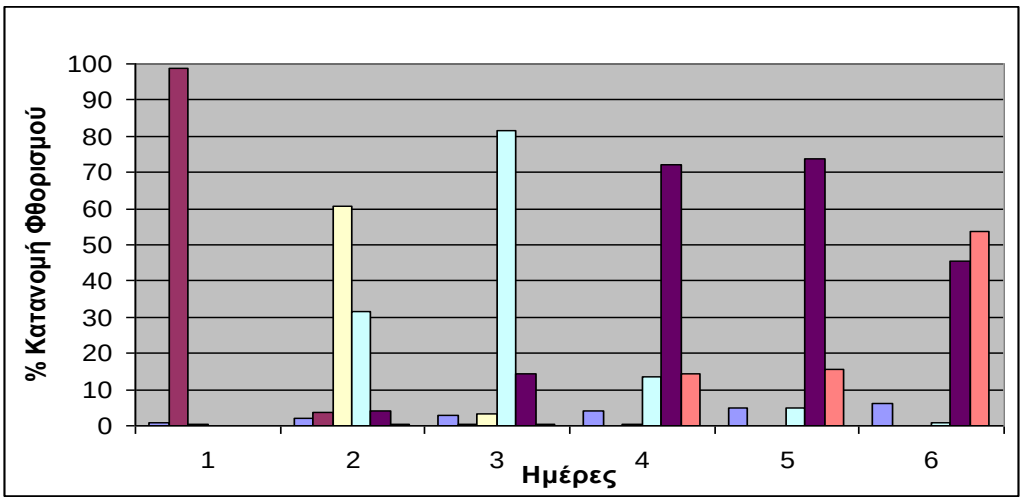
% κατανομής φθορισμού του "ανθεκτικού" στελέχους D5 μεταξύ των καναλιών 1 - 5, μετά από χρώση των παράσιτων με CFSE και ανάλυσή τους με την κυτταρομετρία ροής.



% κατανομής φθορισμού του "ευαίσθητου" στελέχους D6 μεταξύ των καναλιών 1 - 5, μετά από χρώση των παράσιτων με CFSE και ανάλυσή τους με την κυτταρομετρία ροής.

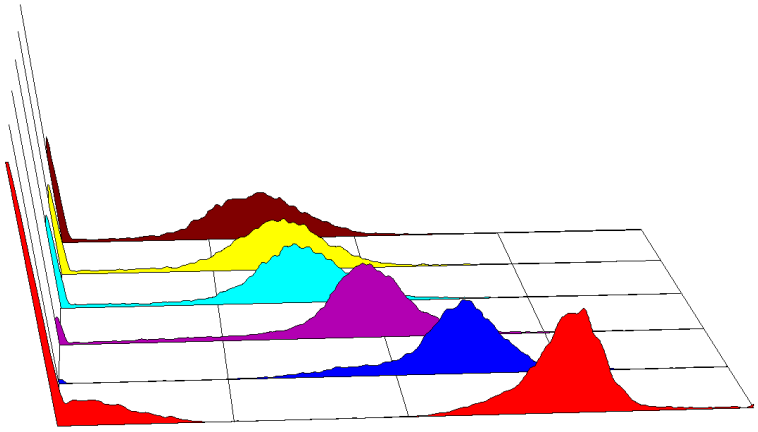


% κατανομής φθορισμού του "ευαίσθητου" στελέχους D7 μεταξύ των καναλιών 1 - 5, μετά από χρώση των παράσιτων με CFSE και ανάλυσή τους με την κυτταρομετρία ροής.

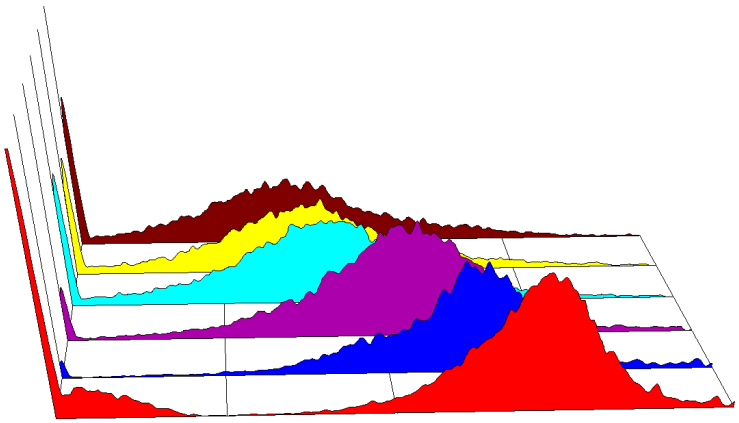


% κατανομής φθορισμού του "ανθεκτικού" στελέχους D8 μεταξύ των καναλιών 1 - 5, μετά από χρώση των παράσιτων με CFSE και ανάλυσή τους με την κυτταρομετρία ροής.

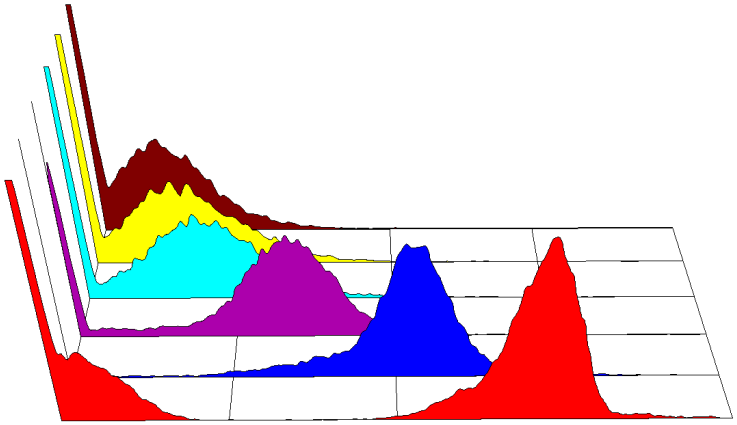
5.3 % Κατανομής του φθορισμού των προμαστιγωτών των 10 στελεχών μεταξύ των καναλιών 1 - 5, μετά από χρώση με CFSE (3D - Γραφήματα με το WinMDi 2.8)



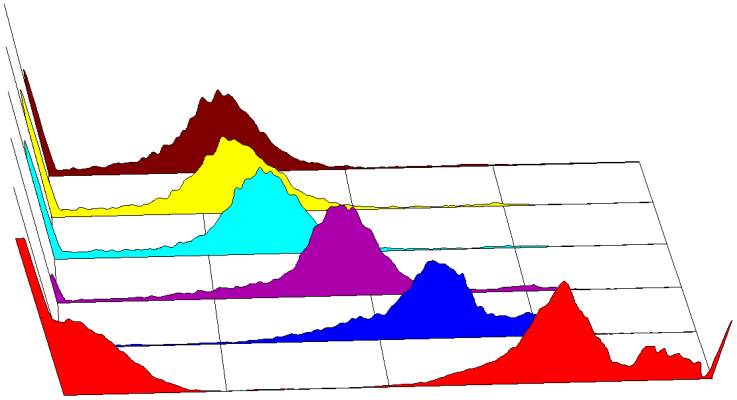
3D γράφημα ιστόγραμμα μονής παραμέτρου "Ευαίσθητου" στελέχους (H1)



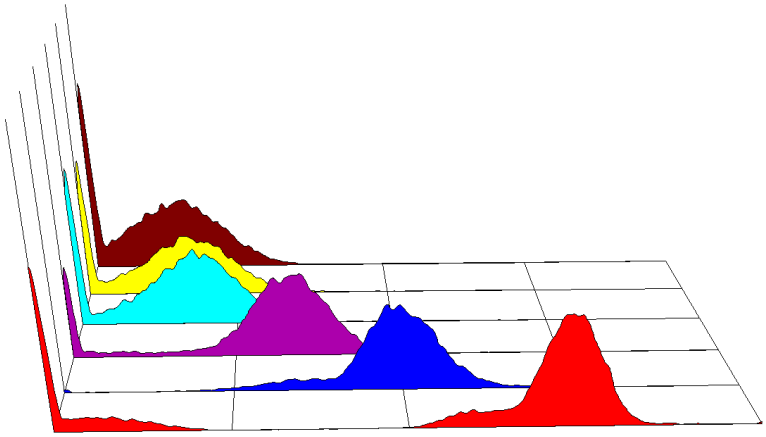
3D γράφημα ιστόγραμμα μονής παραμέτρου "Ανθεκτικού" στελέχους (H2)



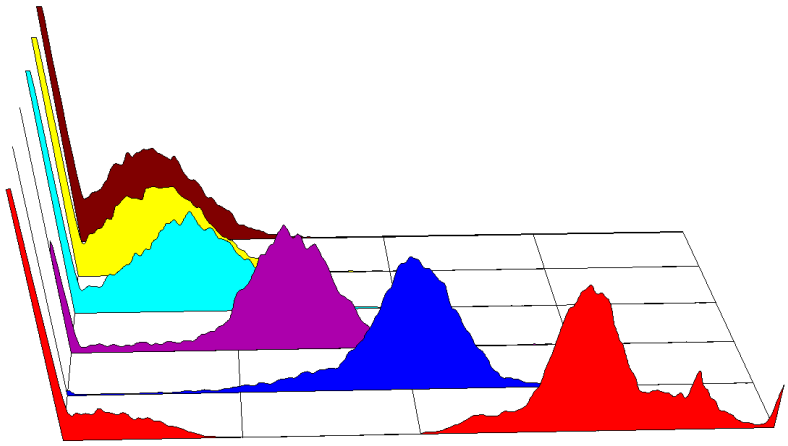
3D γράφημα ιστόγραμμα μονής παραμέτρου " Ευαίσθητου " στελέχους (D1)



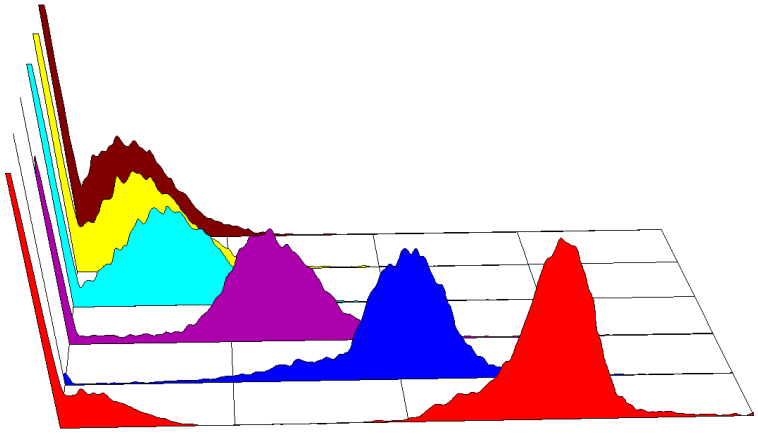
3D γράφημα ιστόγραμμα μονής παραμέτρου " Ευαίσθητου " στελέχους (D2)



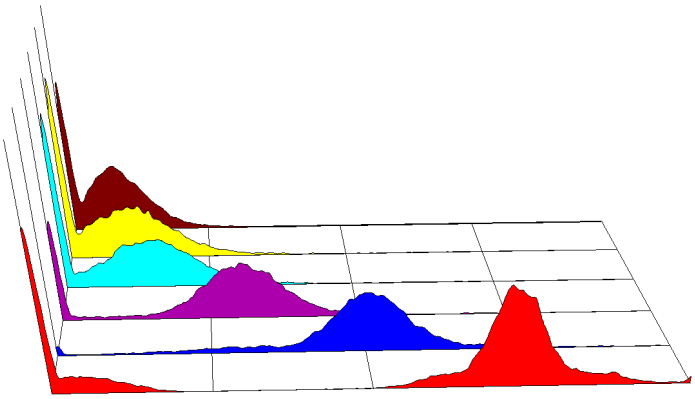
3D γράφημα ιστόγραμμα μονής παραμέτρου " Ανθεκτικού " στελέχους (D3)



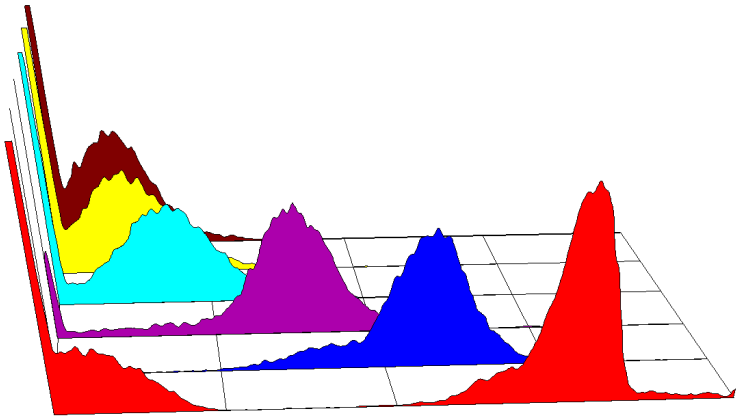
3D γράφημα ιστόγραμμα μονής παραμέτρου " Ευαίσθητου " στελέχους (D4)



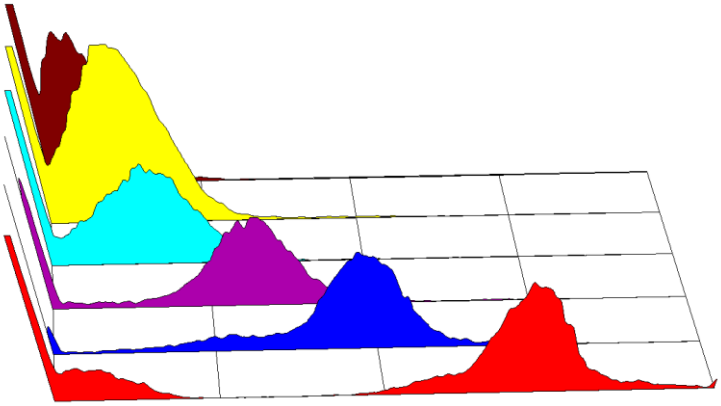
3D γράφημα ιστόγραμμα μονής παραμέτρου " Ανθεκτικού " στελέχους (D5)



3D γράφημα ιστόγραμμα μονής παραμέτρου " Ευαίσθητου " στελέχους (D6)



3D γράφημα ιστόγραμμα μονής παραμέτρου " Ευαίσθητου " στελέχους (D7)



3D γράφημα ιστόγραμμα μονής παραμέτρου "Ανθεκτικού" στελέχους (D8)

5.4 Ανταπόκριση των 10 στελεχών στο Glucantime (Πίνακες)

Οι αριθμοί που παρουσιάζονται αντιπροσωπεύουν τον πληθυσμό των προμαστιγωτών μορφών που καταμετρήθηκαν με την χρήση του αιμοκυτταρόμετρου ($x10^6$). Οι ενδείξεις Ctrl και A - E αντιπροσωπεύουν την απουσία και την κάθε συγκέντρωση του φαρμάκου Glucantime / ml καλλιέργειας αντίστοιχα (A: 50μg, B: 100μg, C: 200μg, D: 400μg, E: 800μg).

	Συγκέντρωση Glucantime / ml					
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	1,5	1,5	1,3	1,3	1,5	0,8
2	2,2	2	1,8	1,9	2	2
3	3	2,5	2,8	2,3	2,3	2,3
4	4	3,5	3,8	3,5	3,2	3
5	4,5	4	4	4	3,8	3,5
6	5	4,5	4,5	4,4	4,3	4

Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ευαίσθητου" στελέχους H1, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου Glucantime

Συγκέντρωση Glucantime / ml						
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	1,6	1	0,5	1	1,2	1
2	2,5	1,3	0,7	1,1	1,4	1,2
3	4	1,2	0,9	1,2	1,3	1,2
4	6,5	0,6	1	0,5	0,8	0,6
5	8	0,9	1,2	0,9	1,1	0,9
6	9	1	1,4	1	1	1

Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους H2, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου Glucantime

Συγκέντρωση Glucantime / ml						
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	2,5	2,4	2,4	2	2	1,8
2	8	7	7	6	6	6
3	15,2	15	13	10	10	8
4	25	20	11,5	10	10	10
5	30	18	10	6	5	5
6	34	28	15	10	10	10

Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ευαίσθητου" στελέχους D1, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου Glucantime

	Συγκέντρωση Glucantime / ml					
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	2,5	2,5	3	3	3,5	3
2	5	2,5	3	3,2	3,6	2,5
3	7,5	4	5	5	5,3	5
4	9	8	9	9	8,5	8
5	10	6	6	6,5	6	6,3
6	11,2	7	6,5	6,5	6	6,5

Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ευαίσθητου" στελέχους D2, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου Glucantime

	Συγκέντρωση Glucantime / ml					
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	2	1,2	1,2	0,7	1	1,3
2	6,5	1,2	0,9	1	0,9	0,7
3	15	1,5	0,9	1,2	1,2	1,3
4	20	1,8	2	1	1	0,9
5	25	2	1,6	1,6	1,5	1
6	32	2	1,6	1,6	1	1,3

Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους D3, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου Glucantime

Συγκέντρωση Glucantime / ml						
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	2	0,5	0,7	0,7	0,5	0,3
2	8	0,5	0,7	0,8	0,7	0,5
3	16	0,7	0,8	0,9	0,7	0,6
4	25	0,9	0,8	1	0,8	0,5
5	30	1	0,8	0,8	0,7	0,5
6	34	1	0,8	0,8	0,5	0,5

Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους D4, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου Glucantime

Συγκέντρωση Glucantime / ml						
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	3,3	0,7	1	0,5	0,5	0,8
2	11	1	1,5	1	1	1
3	20	2	1,5	1	1	1,1
4	30	2	1,7	1	1	1
5	33	4	1,5	1	1	1
6	35	4	1,3	1	1	1

Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους D5, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου Glucantime

Συγκέντρωση Glucantime / ml						
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	1,5	2	3	3	3,5	3,5
2	9	2	4,7	5	5,2	5,5
3	15	5	5,3	5	5,5	5,3
4	20	9	9	9	8	8
5	30	13	7	7,5	7	7
6	36	20	7	7	7	7,2

Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του " ευαίσθητου " στελέχους D6, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου Glucantime

Συγκέντρωση Glucantime / ml						
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	1,5	1,3	1	1	0,8	1
2	5	4	3	3,5	2,5	2
3	15	2	2	2,5	1,5	1
4	20	1,5	1,5	2,3	1	0,8
5	25	2,5	3	3	2,5	2,3
6	32	3	5	5	5,5	5

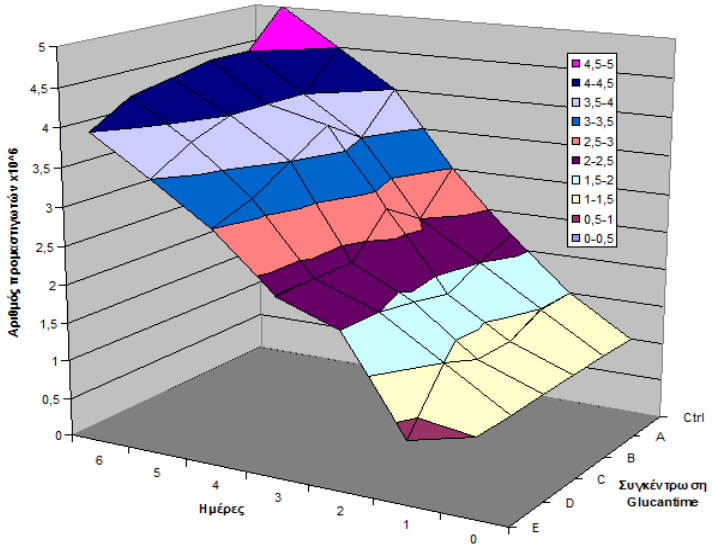
Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ευαίσθητου" στελέχους D7, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου Glucantime

	Συγκέντρωση Glucantime / ml					
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	1,5	1,5	1,3	1,3	1,5	1
2	2,5	2	1,3	1,3	1,3	1
3	3,6	2,5	1,3	1,2	1,1	1
4	6	2	1,5	1,2	1	1
5	7,8	2	1,3	1	1	1
6	9	2	1,3	1,2	1	1

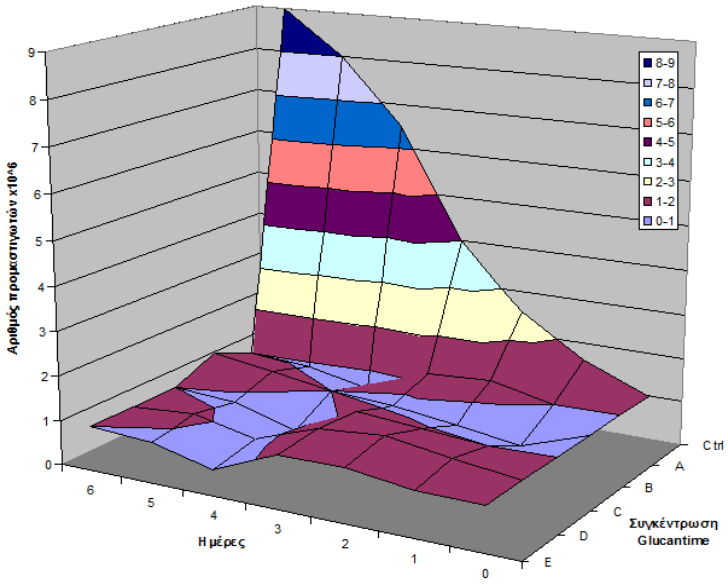
Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους D8, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου Glucantime

5.5 Ανταπόκριση των 10 στελεχών στο Glucantime (Γραφήματα)

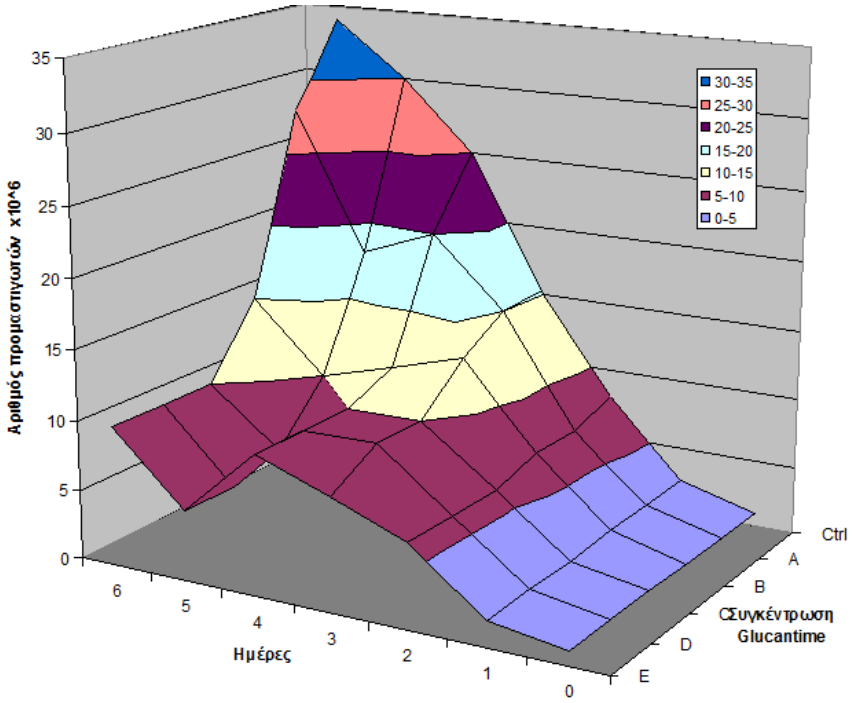
Στα παρακάτω γραφήματα, οι κλίμακες διαφέρουν μεταξύ του με σκοπό την ευκολότερη απεικόνιση των δεδομένων.



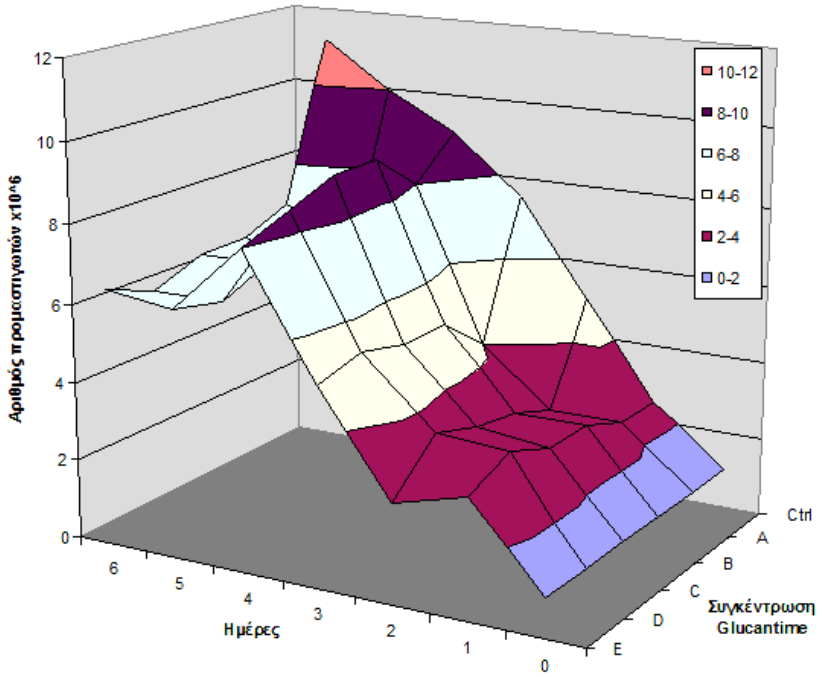
Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ευαίσθητου" στελέχους Η1, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου Glucantime



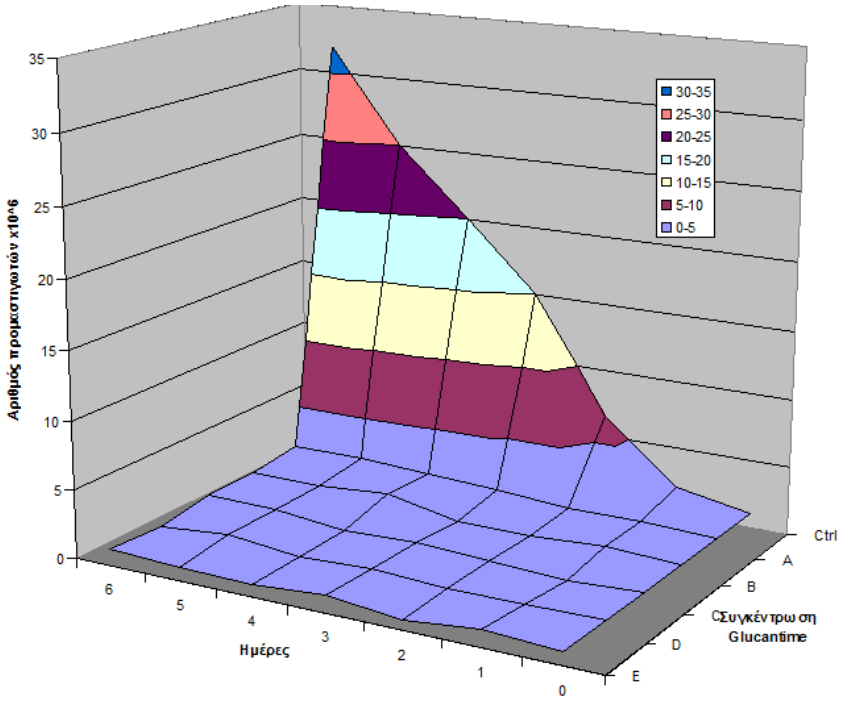
Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους Η2, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου Glucantime



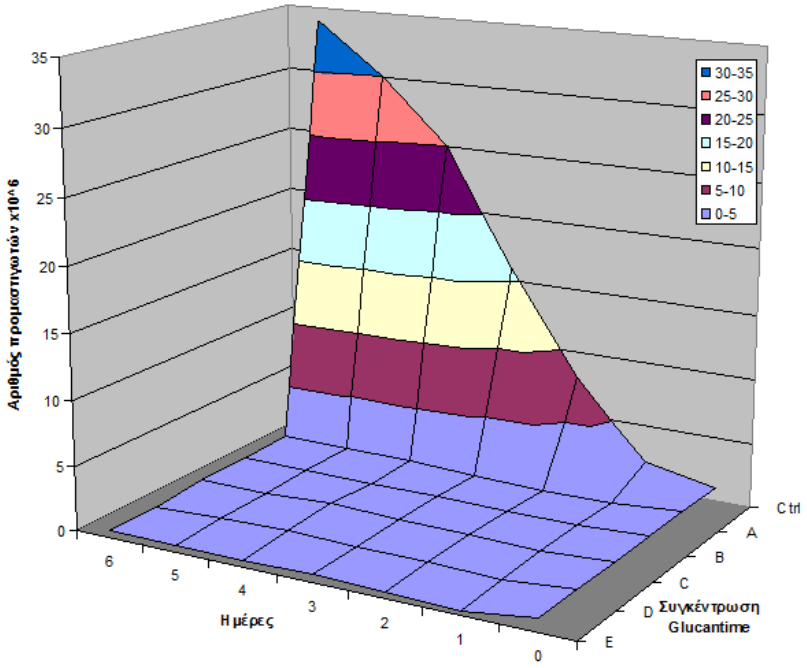
Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ευαίσθητου" στελέχους D1, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου Glucantime



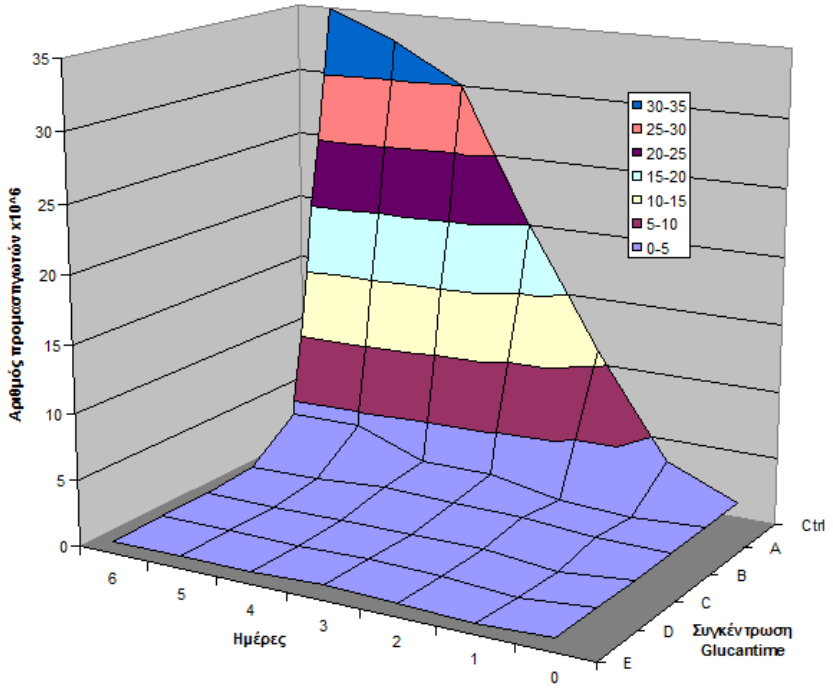
Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ευαίσθητου" στελέχους D2, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου Glucantime



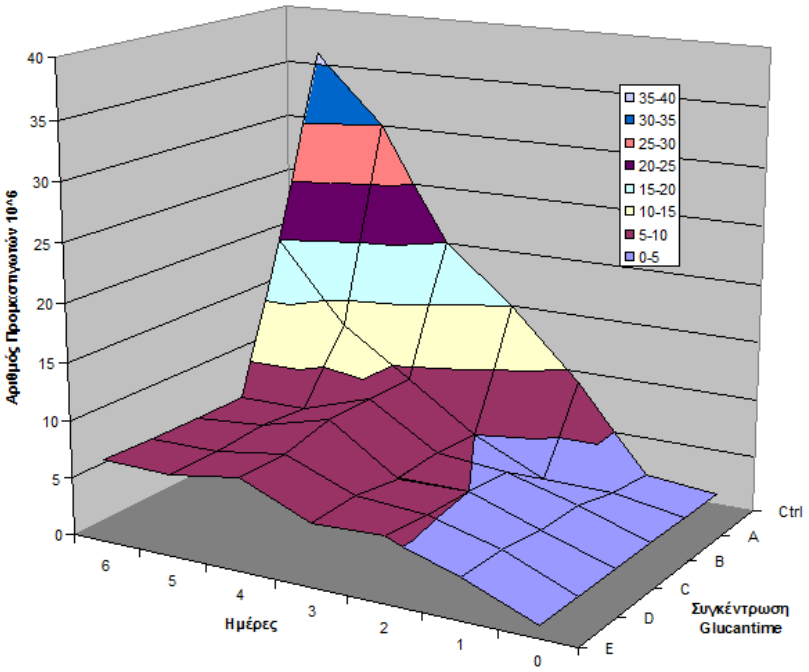
Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους D3, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου Glucantime



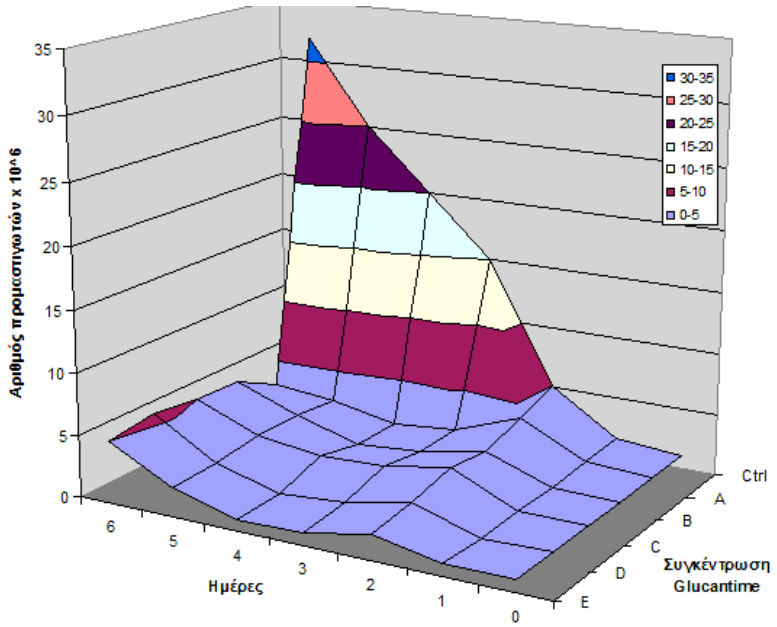
Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους D4, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου Glucantime



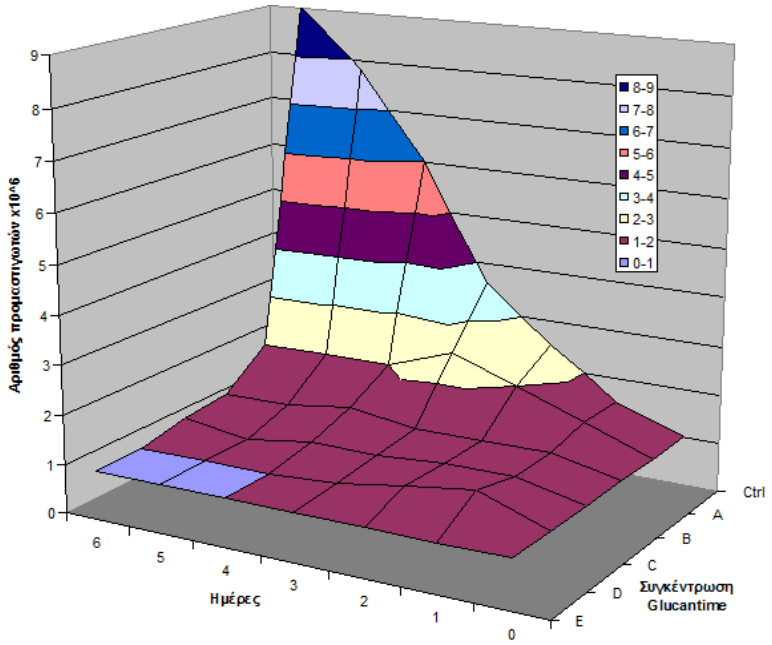
Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους D5, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου Glucantime



Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του " ευαίσθητου " στελέχους D6, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου Glucantime



Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ευαίσθητου" στελέχους D7, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου Glucantime



Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους D8, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου Glucantime

5.6 Ανταπόκριση των 10 στελεχών στην Amphotericin B (Πίνακες)

Οι αριθμοί που παρουσιάζονται αντιπροσωπεύουν τον πληθυσμό των προμαστιγωτών μορφών που καταμετρήθηκαν με την χρήση του αιμοκυτταρόμετρου ($x10^6$). Οι ενδείξεις Ctrl και A - E αντιπροσωπεύουν την απουσία και την κάθε συγκέντρωση του φαρμάκου Amphotericin B / ml καλλιέργειας αντίστοιχα (A: 0.75μg, B: 1.5μg, C: 3μg, D: 6μg, E: 12μg).

	Συγκέντρωση Amphotericin B / ml					
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	1,5	1,5	1,5	1,3	1	1
2	2,2	1,5	1,3	0,5	0,5	0,5
3	3	1,5	0,8	0,5	0,5	0
4	4	1	0	0	0	0
5	4,5	0	0	0	0	0
6	5	0	0	0	0	0

Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ευαίσθητου" στελέχους H1, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Amphotericin B

	Συγκέντρωση Amphotericin B / ml					
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	1,6	1,8	1,8	2	2	2
2	2,5	2,5	2	2	2,2	2,2
3	4	4,1	2	2	2,2	2,2
4	6,5	6,8	3	2,5	2,8	2,8
5	8	8	6	5	5	5
6	9	9	9	8	8	7,5

Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους Η2, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Amphotericin B

	Συγκέντρωση Amphotericin B / ml					
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	2,5	2,5	2	2	2	1,8
2	8	4	8	6	0	0
3	15,2	6	9,5	5	0	0
4	25	7	12	3	0	0
5	30	9	8	0	0	0
6	34	11	6	0	0	0

Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ευαίσθητου" στελέχους D1, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Amphotericin B

	Συγκέντρωση Amphotericin B / ml					
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	2,2	2	2	1,9	2	1,8
2	5	2,5	1	1	1	0,9
3	7,5	2	0	0	0	0
4	9	1,8	0	0	0	0
5	10	1,5	0	0	0	0
6	11,2	1	0	0	0	0

Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ευαίσθητου" στελέχους D2, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Amphotericin B

	Συγκέντρωση Amphotericin B / ml					
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	2	2	2	1,8	1,8	2
2	5	4	2	2,3	2	2
3	15	8	5	4,5	3,5	3
4	20	15	6	6	4	3,5
5	25	26	9	8	4	4
6	32	30	14	11	4	4

Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους D3, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Amphotericin B

	Συγκέντρωση Amphotericin B / ml					
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	2	2	2	1,8	1,5	1,5
2	8	6	6	5	5	5
3	16	10	7	7	7	6
4	25	15	12	12	11	11
5	30	20	15	13	13	12
6	34	28	17	16	16	15

Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους D4, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Amphotericin B

	Συγκέντρωση Amphotericin B / ml					
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	3,3	2,8	3	3	2,5	2,5
2	11	4	5	5	4	3
3	20	9	9	9	8	6
4	30	16	15	14	13	9,5
5	33	18	18	18	18	15
6	35	20	20	20	19	18

Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους D5, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Amphotericin B

	Συγκέντρωση Amphotericin B / ml					
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	1,5	1,5	1,3	1,5	1,2	1,2
2	9	5	5	4,8	4,5	4
3	15	8	8	7	4	3,5
4	20	10	9	8,5	4	3
5	30	12	10	9	3,2	2,8
6	36	13	10,5	10	2,5	2

Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ευαίσθητου" στελέχους D6, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Amphotericin B

	Συγκέντρωση Amphotericin B / ml					
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	1,5	1,2	0,7	0,5	0,5	0,3
2	5	1,3	0,5	0,2	0	0
3	15	1,5	0,3	0	0	0
4	20	1,5	0,1	0	0	0
5	25	1,7	0	0	0	0
6	32	2	0	0	0	0

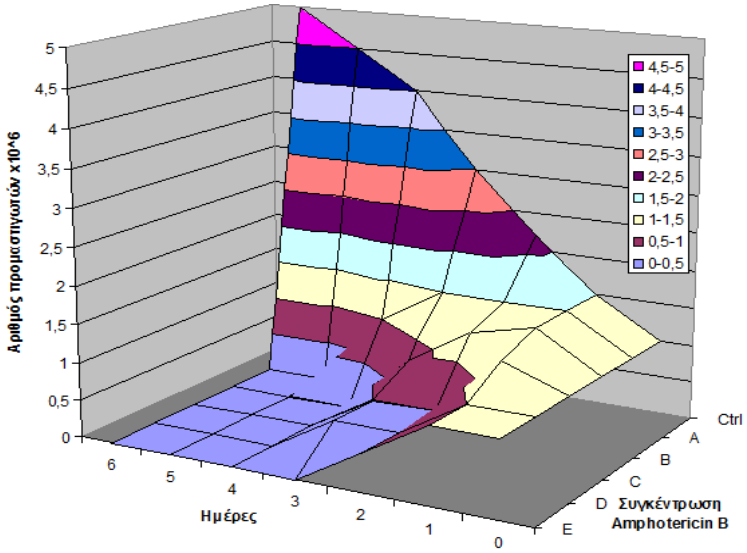
Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ευαίσθητου" στελέχους D7, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Amphotericin B

	Συγκέντρωση Amphotericin B / ml					
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	1,5	1,5	1,6	1,4	1	1
2	2,5	2,5	2	2	2	2
3	3,6	3,5	2,5	2,3	2,3	2,3
4	6	4	3,3	3,5	3,3	3,2
5	7,8	5,5	4,5	4,2	4,2	4,1
6	9	6	5	4	4	3,6

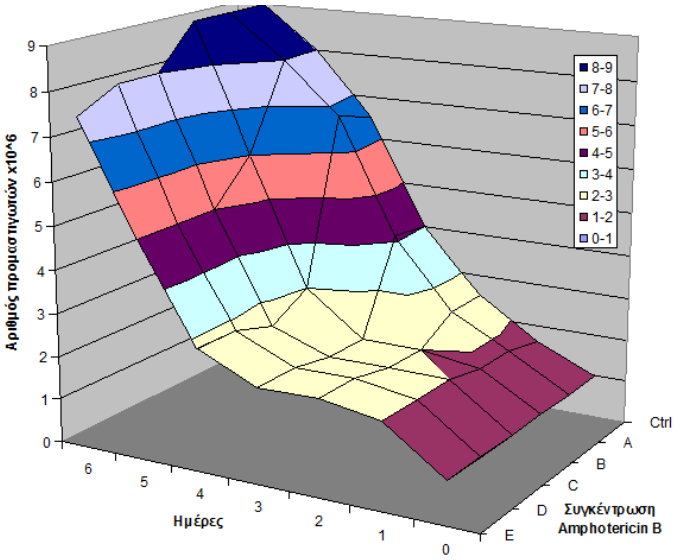
Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους D8, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Amphotericin B

5.7 Ανταπόκριση των 10 στελεχών στην Amphotericin B (Γραφήματα)

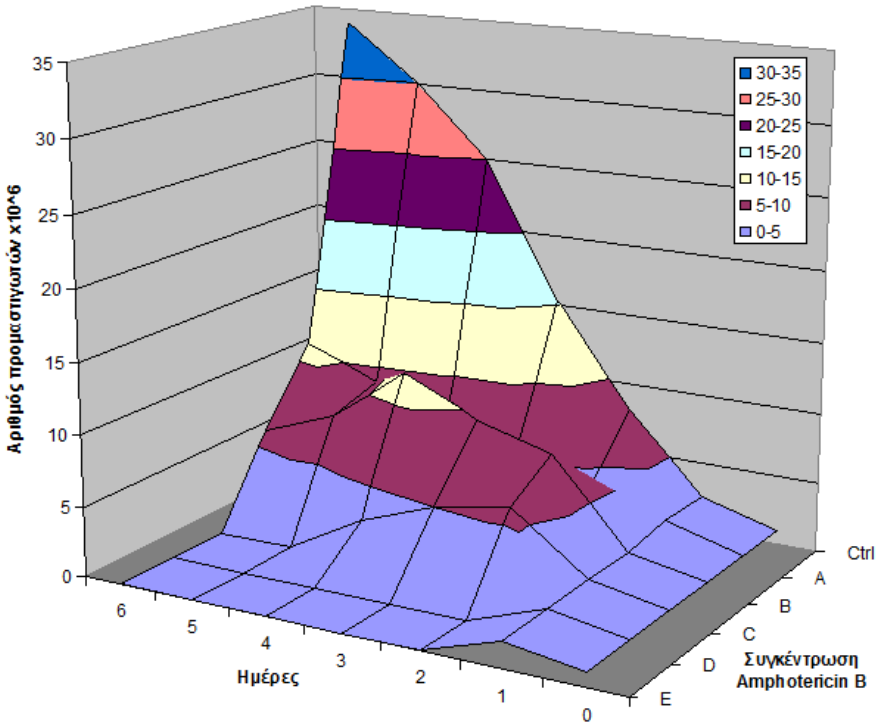
Στα παρακάτω γραφήματα, οι κλίμακες διαφέρουν μεταξύ του με σκοπό την ευκολότερη απεικόνιση των δεδομένων.



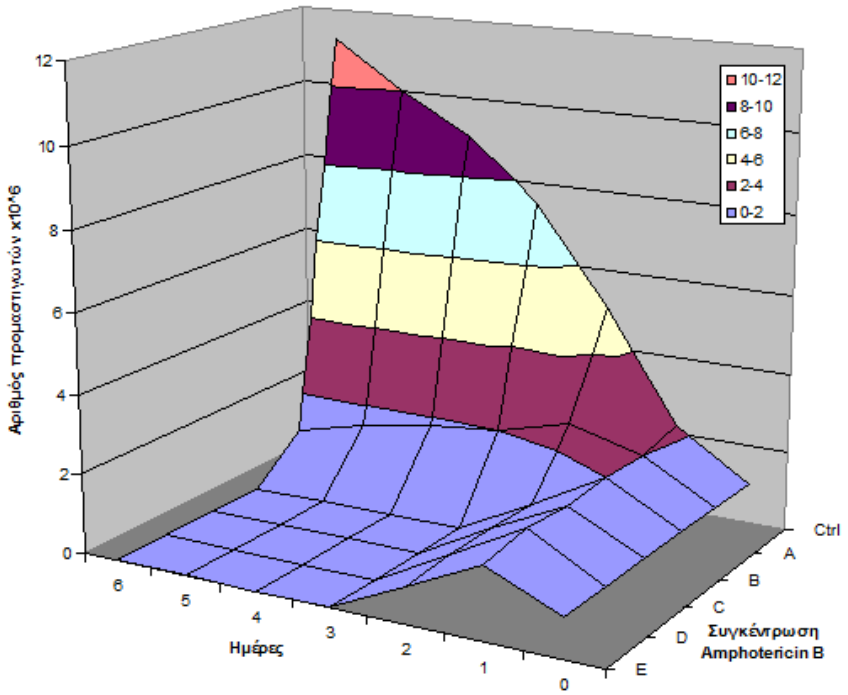
Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ευαίσθητου" στελέχους H1, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Amphotericin B



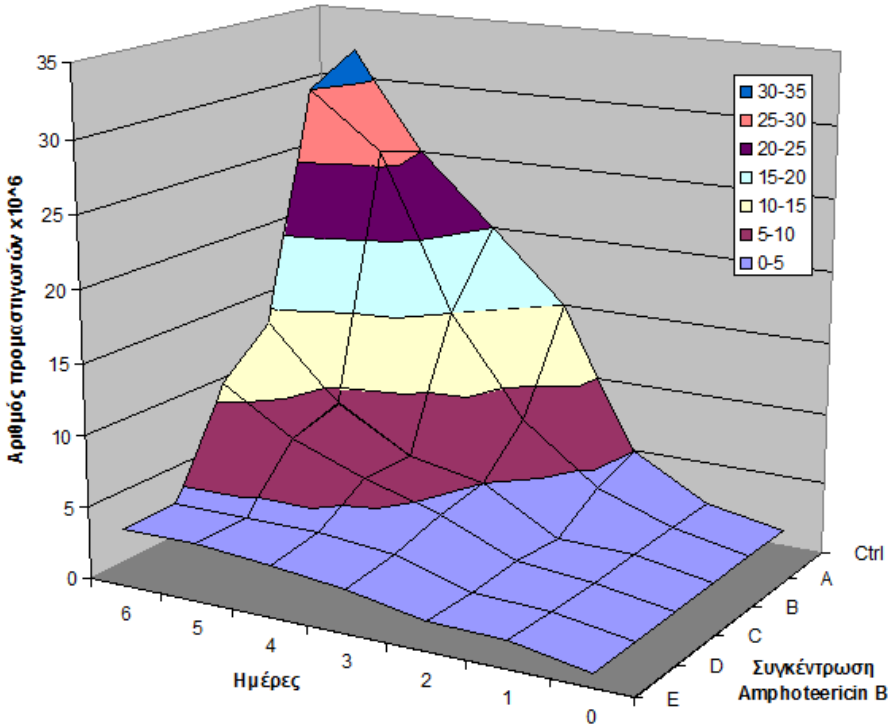
Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους H2, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Amphotericin B



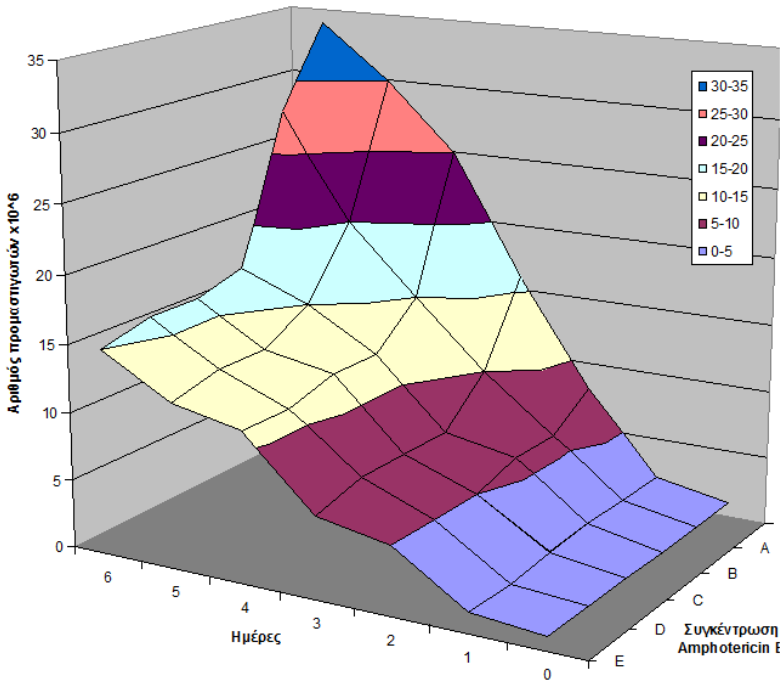
Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ευαίσθητου" στελέχους D1, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Amphotericin B



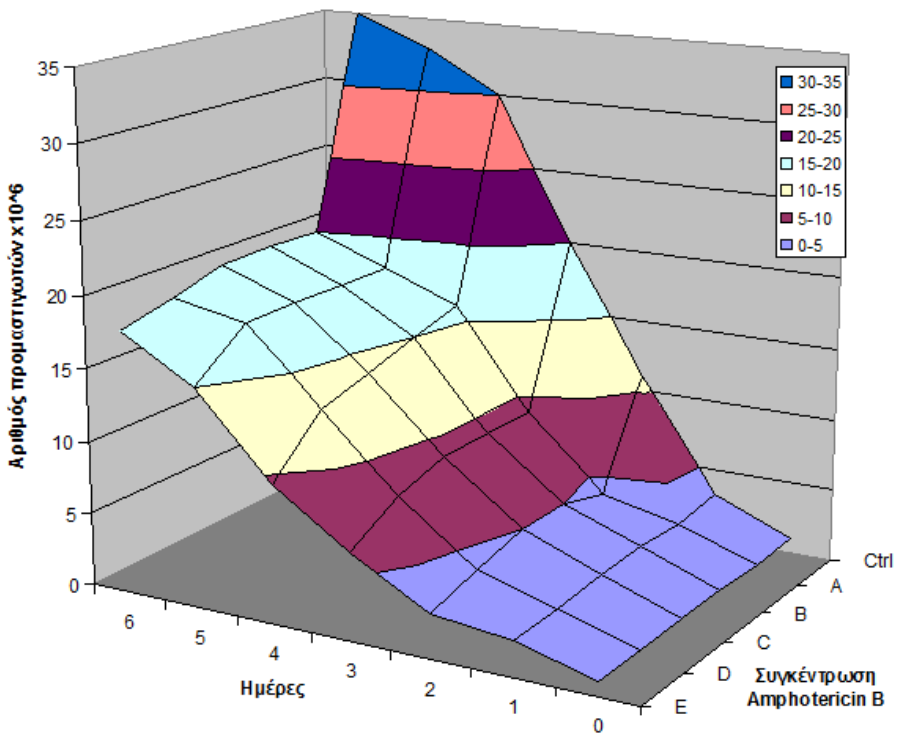
Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ευαίσθητου" στελέχους D2, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Amphotericin B



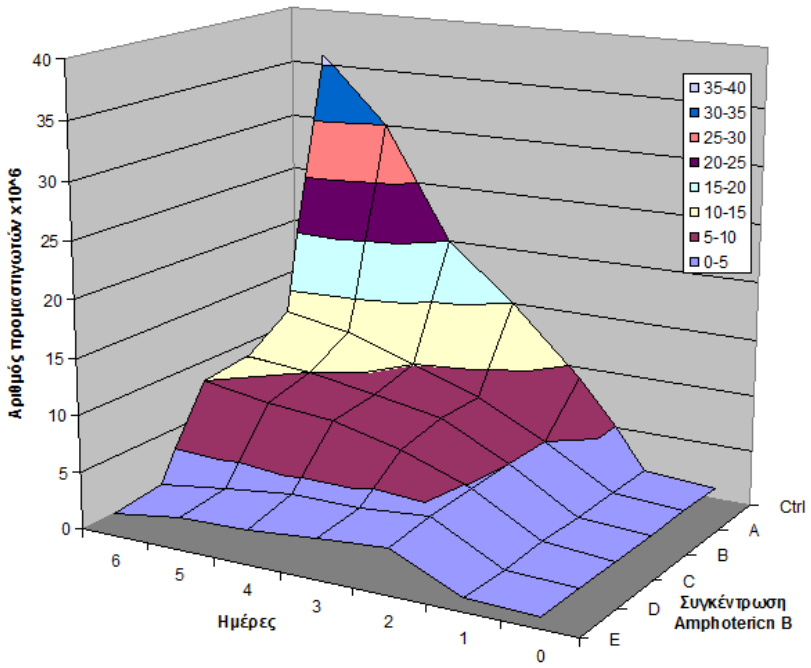
Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους D3, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Amphotericin B



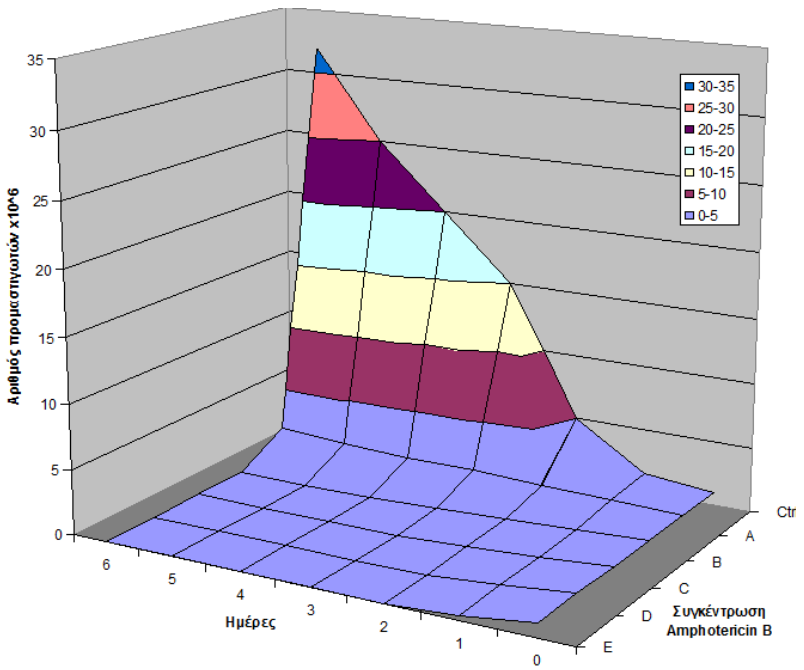
Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους D4, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Amphotericin B



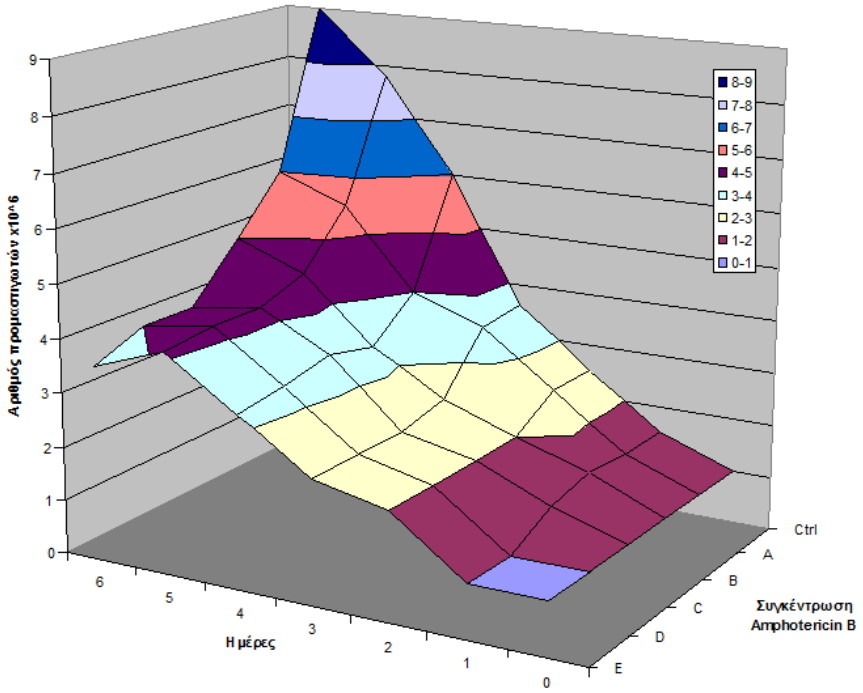
Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους D5, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Amphotericin B



Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ευαίσθητου" στελέχους D6, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Amphotericin B



Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ευαίσθητου" στελέχους D7, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Amphotericin B



Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους D8, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Amphotericin B

5.8 Ανταπόκριση των 10 στελεχών στο Miltefosine (Πίνακες)

Οι αριθμοί που παρουσιάζονται αντιπροσωπεύουν τον πληθυσμό των προμαστιγωτών μορφών που καταμετρήθηκαν με την χρήση του αιμοκυτταρόμετρου ($x10^6$). Οι ενδείξεις Ctrl και A - E αντιπροσωπεύουν την απουσία και την κάθε συγκέντρωση του φαρμάκου Miltefosine / ml καλλιέργειας αντίστοιχα (A: 1.26μg, B: 2.6μg, C: 6μg, D: 10μg, E: 20μg).

	Συγκέντρωση Miltefosine / ml					
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	1,5	0,7	0,4	0,1	0	0
2	2,2	0,5	0,4	0	0	0
3	3	0,4	0,4	0	0	0
4	4	0,4	0,2	0	0	0
5	4,5	0	0	0	0	0
6	5	0	0	0	0	0

Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ευαίσθητου" στελέχους H1, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου Miltefosine

	Συγκέντρωση Miltefosine / ml					
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	1,6	0,9	0,6	0,3	0,3	0,3
2	2,5	0,6	0,4	0	0	0
3	4	0,2	0	0	0	0
4	6,5	0,2	0	0	0	0
5	8	0,1	0	0	0	0
6	9	0	0	0	0	0

Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους Η2, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Miltefosine

	Συγκέντρωση Miltefosine / ml					
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	2,5	1,4	0,7	0,5	0,3	0,1
2	8	1	0,7	0,3	0,3	0
3	15,2	1,1	0,1	0	0	0
4	25	1,1	0	0	0	0
5	30	1	0	0	0	0
6	34	1	0	0	0	0

Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ευαίσθητου" στελέχους D1, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Miltefosine

	Συγκέντρωση Miltefosine / ml					
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	2,5	1,9	1,3	0,4	0,3	0
2	5	1	0,4	0,1	0	0
3	7,5	0,2	0	0	0	0
4	9	0	0	0	0	0
5	10	0	0	0	0	0
6	11,2	0	0	0	0	0

Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ευαίσθητου" στελέχους D2, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Miltefosine

	Συγκέντρωση Miltefosine / ml					
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	2	0,8	0,9	1,1	0,4	0,3
2	6,5	0,2	0	0,2	0	0
3	15	0,2	0	0	0	0
4	20	0,2	0	0	0	0
5	25	0,2	0	0	0	0
6	32	0,2	0	0	0	0

Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους D3, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Miltefosine

	Συγκέντρωση Miltefosine / ml					
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	2	1	0,2	0,1	0	0
2	8	0,4	0,1	0	0	0
3	16	0,5	0	0	0	0
4	25	0,3	0	0	0	0
5	30	0,1	0	0	0	0
6	34	0,1	0	0	0	0

Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους D4, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Miltefosine

	Συγκέντρωση Miltefosine / ml					
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	3,3	2	1,6	0,5	0,2	0,2
2	11	0,9	0,8	0,3	0	0
3	20	0,4	0,3	0	0	0
4	30	0,1	0	0	0	0
5	33	0,1	0	0	0	0
6	35	0	0	0	0	0

Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους D5, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Miltefosine

	Συγκέντρωση Miltefosine / ml					
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	1,5	1,3	1,4	1,1	0,9	0,7
2	9	0,6	0,4	0,2	0,2	0,2
3	15	0,4	0,4	0,2	0,1	0
4	20	0,2	0,2	0	0	0
5	30	0	0	0	0	0
6	36	0	0	0	0	0

Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ευαίσθητου" στελέχους D6, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Miltefosine

	Συγκέντρωση Miltefosine / ml					
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	1,5	0,7	0,3	0,3	0,1	0
2	5	0,5	0,3	0	0	0
3	15	0	0	0	0	0
4	60	0	0	0	0	0
5	72	0	0	0	0	0
6	85	0	0	0	0	0

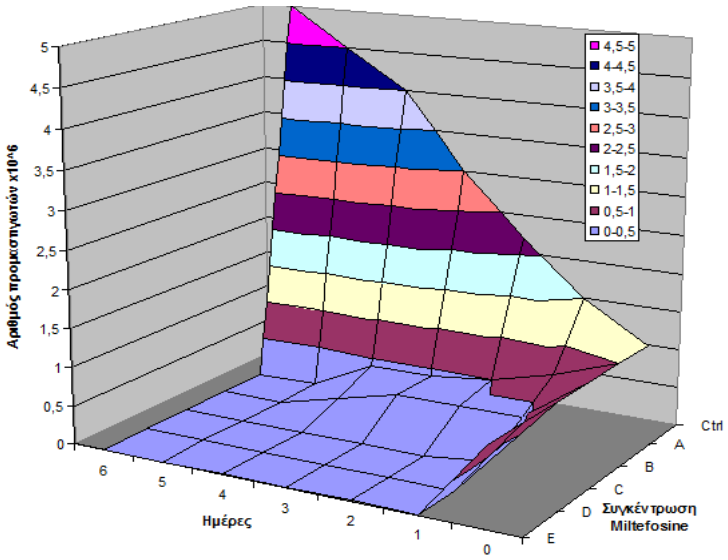
Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ευαίσθητου" στελέχους D7, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Miltefosine

	Συγκέντρωση Miltefosine / ml					
Ημέρα	**Ctrl**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0	1	1	1	1	1	1
1	1,5	1,3	1,3	0,8	0,6	0,3
2	2,5	0,4	0,1	0	0	0
3	3,6	0,4	0	0	0	0
4	6	0,4	0	0	0	0
5	7,8	0,2	0	0	0	0
6	9	0,2	0	0	0	0

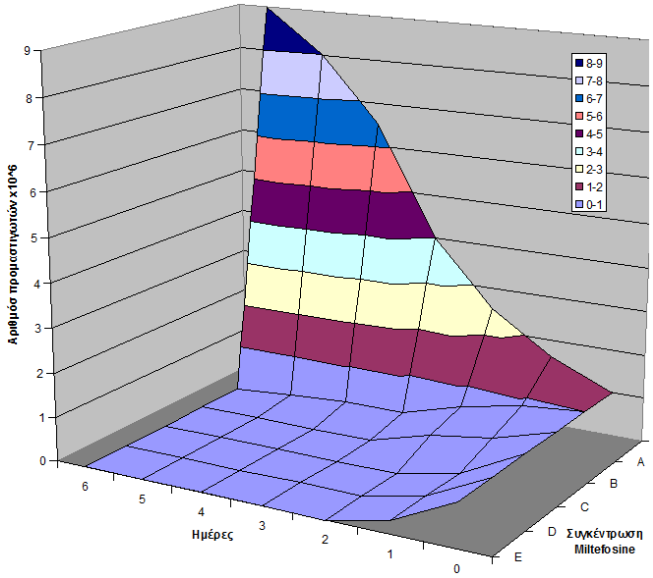
Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους D8, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Miltefosine

5.9 Ανταπόκριση των 10 στελεχών στο Miltefosine (Γραφήματα)

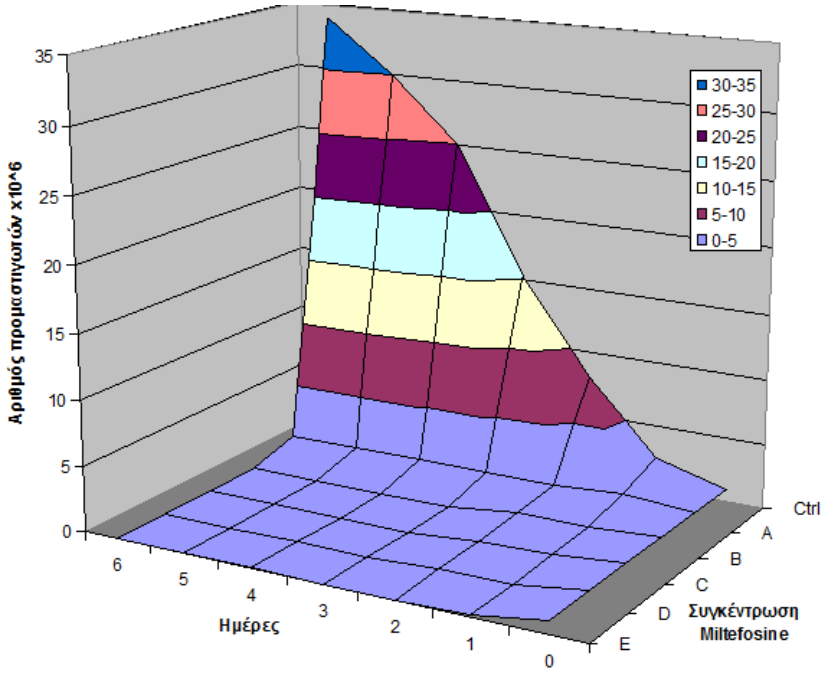
Στα παρακάτω γραφήματα, οι κλίμακες διαφέρουν μεταξύ τους με σκοπό την ευκολότερη απεικόνιση των δεδομένων.



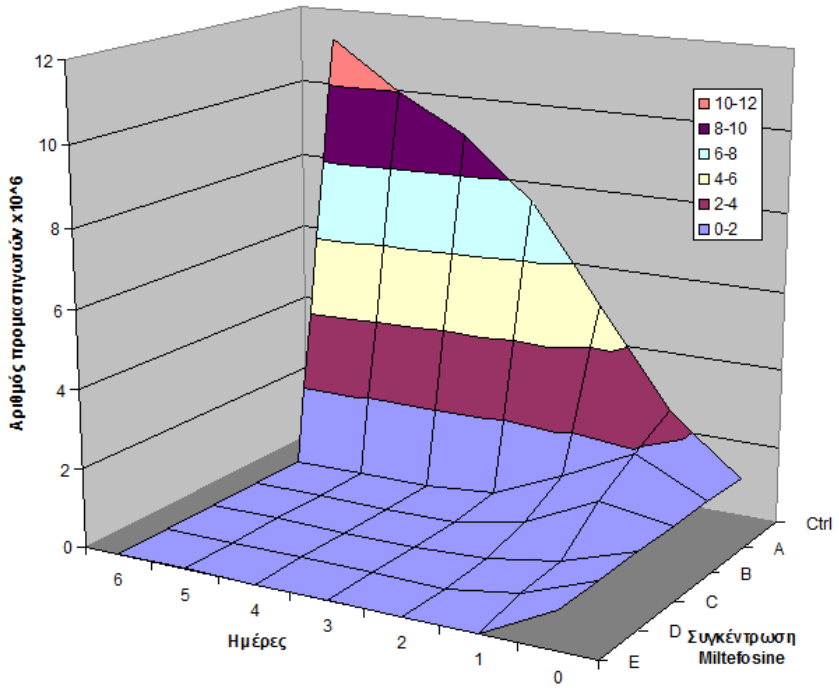
Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ευαίσθητου" στελέχους H1, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου Miltefosine



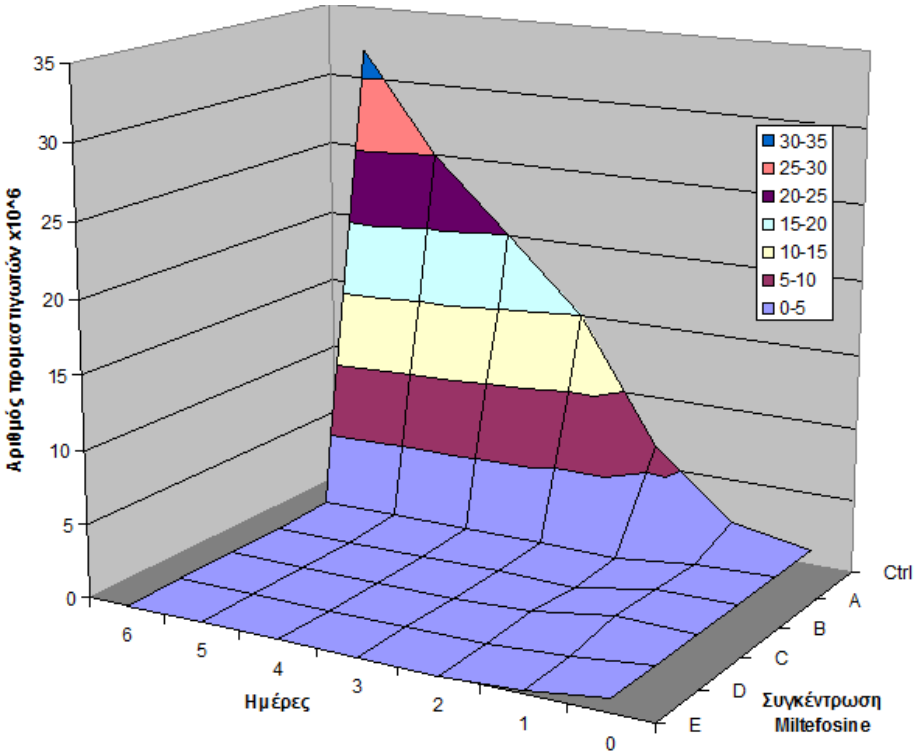
Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους H2, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Miltefosine



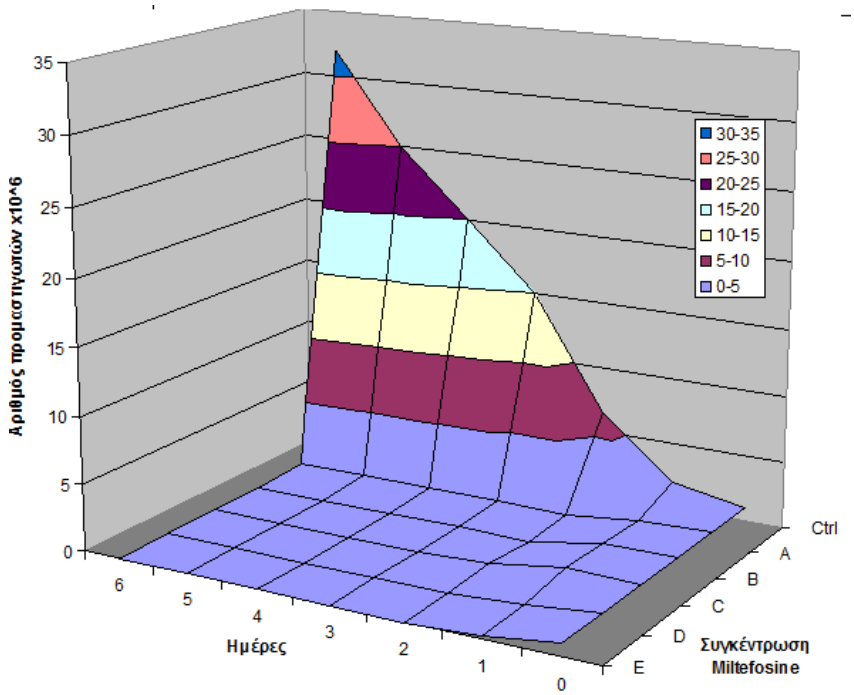
Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ευαίσθητου" στελέχους D1, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Miltefosine



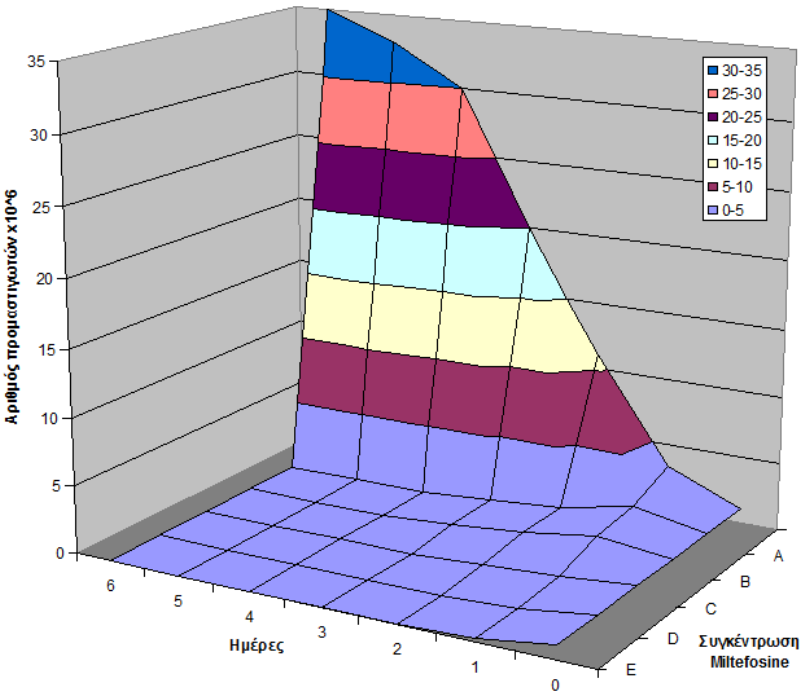
Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ευαίσθητου" στελέχους D2, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Miltefosine



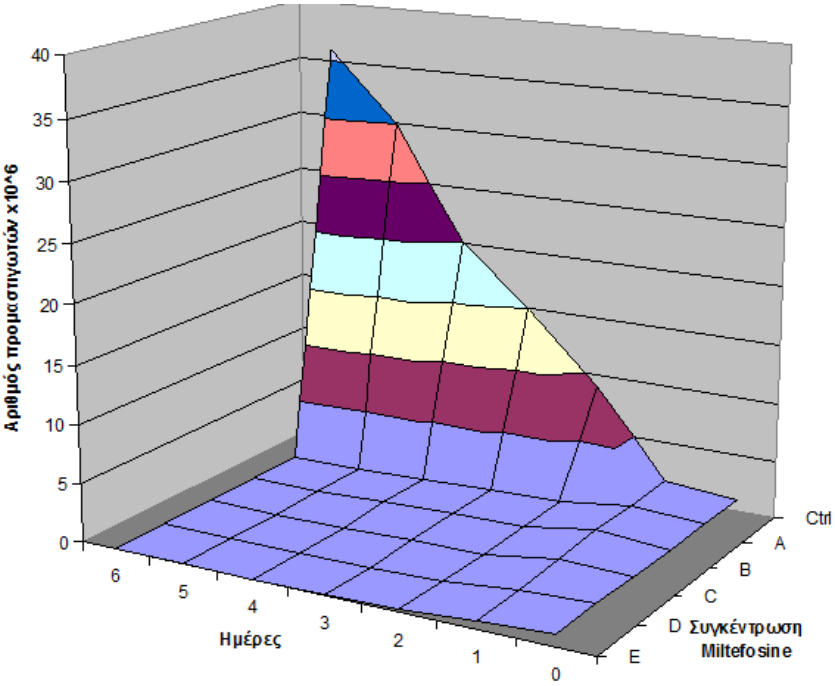
Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους D3, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Miltefosine



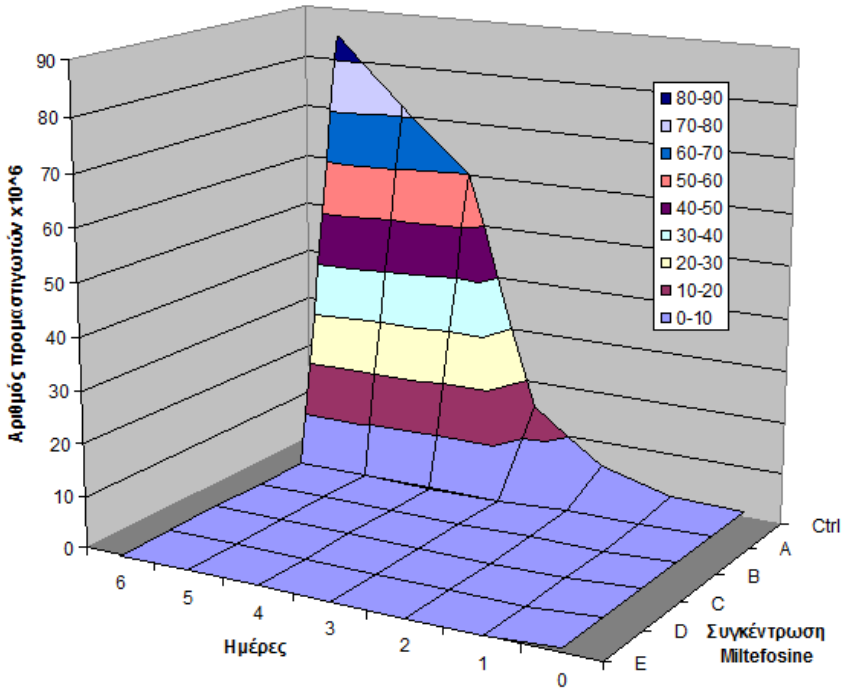
Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους D4, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Miltefosine



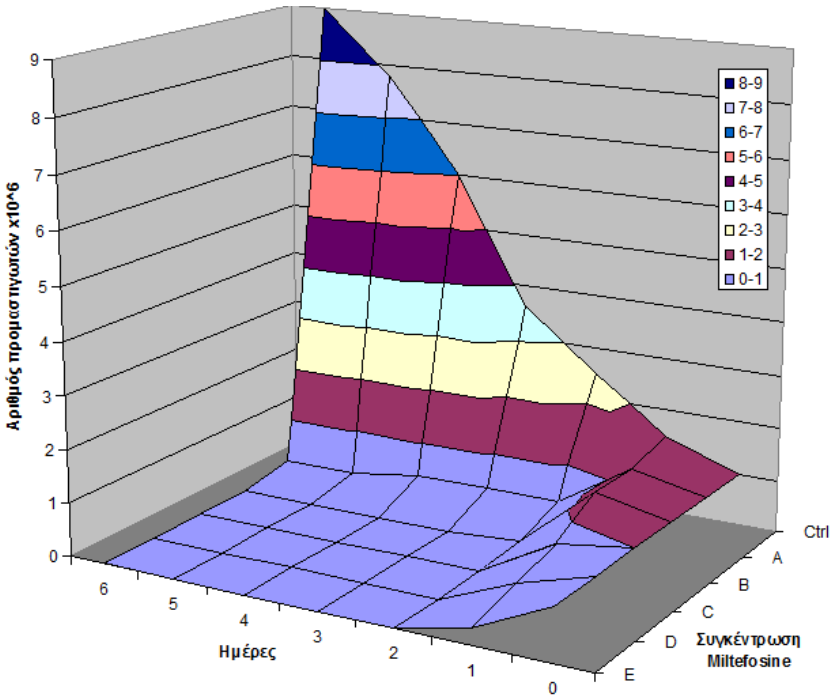
Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους D5, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Miltefosine



Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ευαίσθητου" στελέχους D6, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Miltefosine



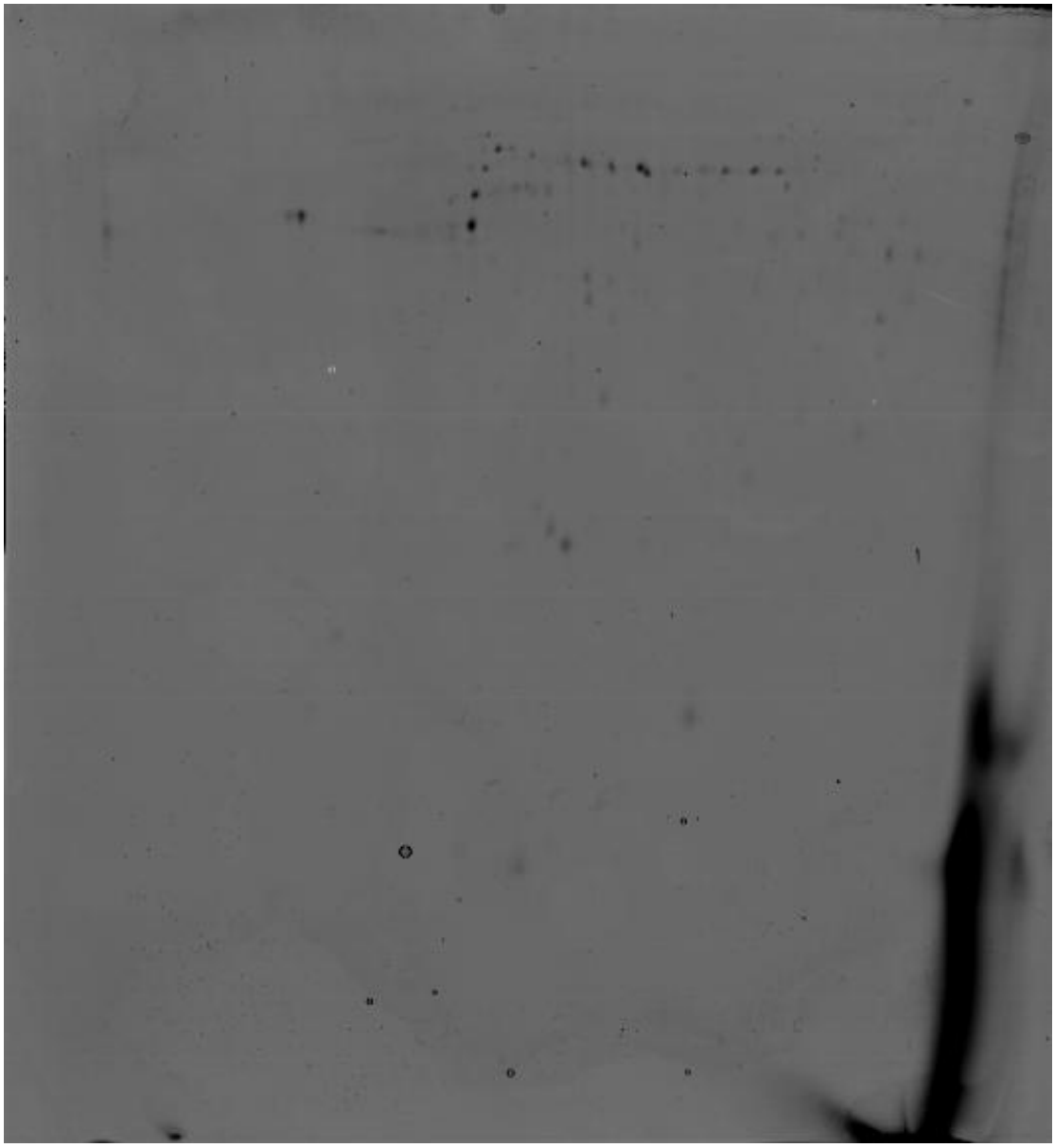
Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ευαίσθητου" στελέχους D7, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Miltefosine



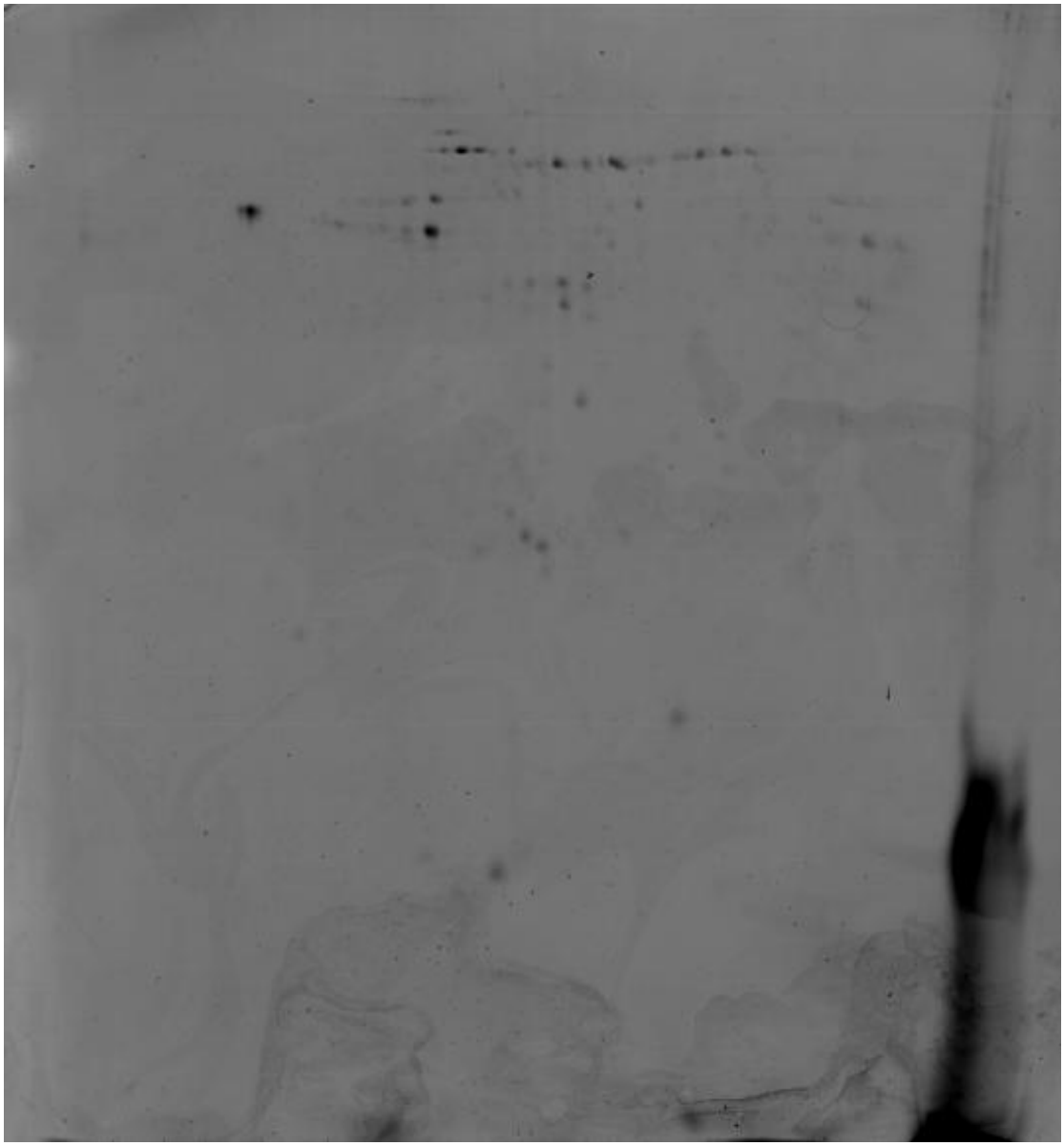
Πληθυσμός προμαστιγωτών μορφών του "ανθεκτικού" στελέχους D8, μετά από έκθεσή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της Miltefosine

5.10 Πηκτώματα πολυακρυλαμίδης μετά από χρώση με Colloidal Coomasie Blue

Παρουσιάζονται τα πηκτώματα 4 ενδεικτικών στελεχών (2 ανθεκτικών και 2 ευαίσθητων) τα οποία μελετήθηκαν με την πρωτεωμική ανάλυση.

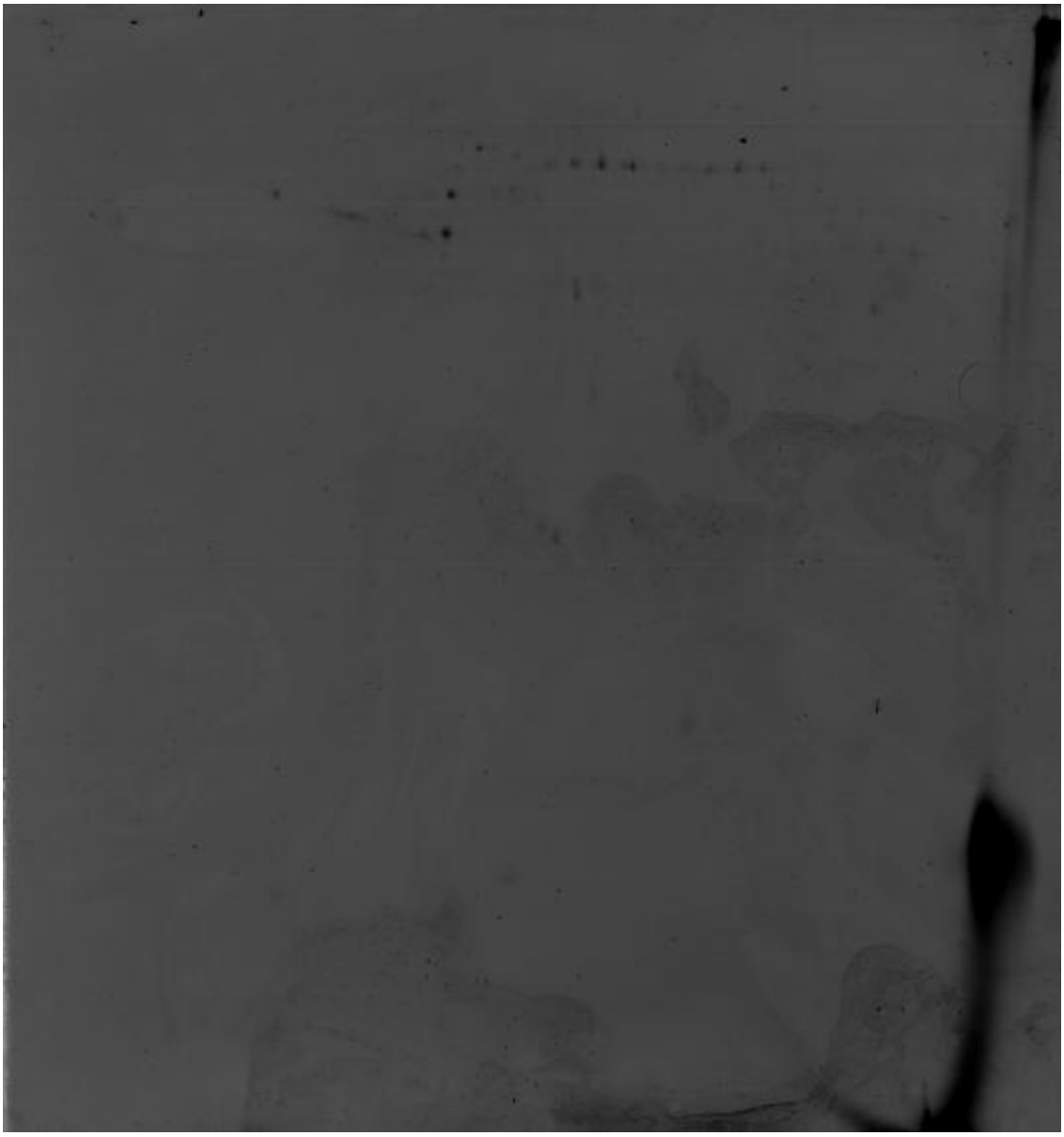


Μεμβρανικές πρωτεΐνες "ευαίσθητου" στελέχους D1 μετά από ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE.



Μεμβρανικές πρωτεΐνες "ανθεκτικού" στελέχους D2 μετά από ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE.

Μεμβρανικές πρωτεΐνες "ευαίσθητου" στελέχους D2 μετά από ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE.



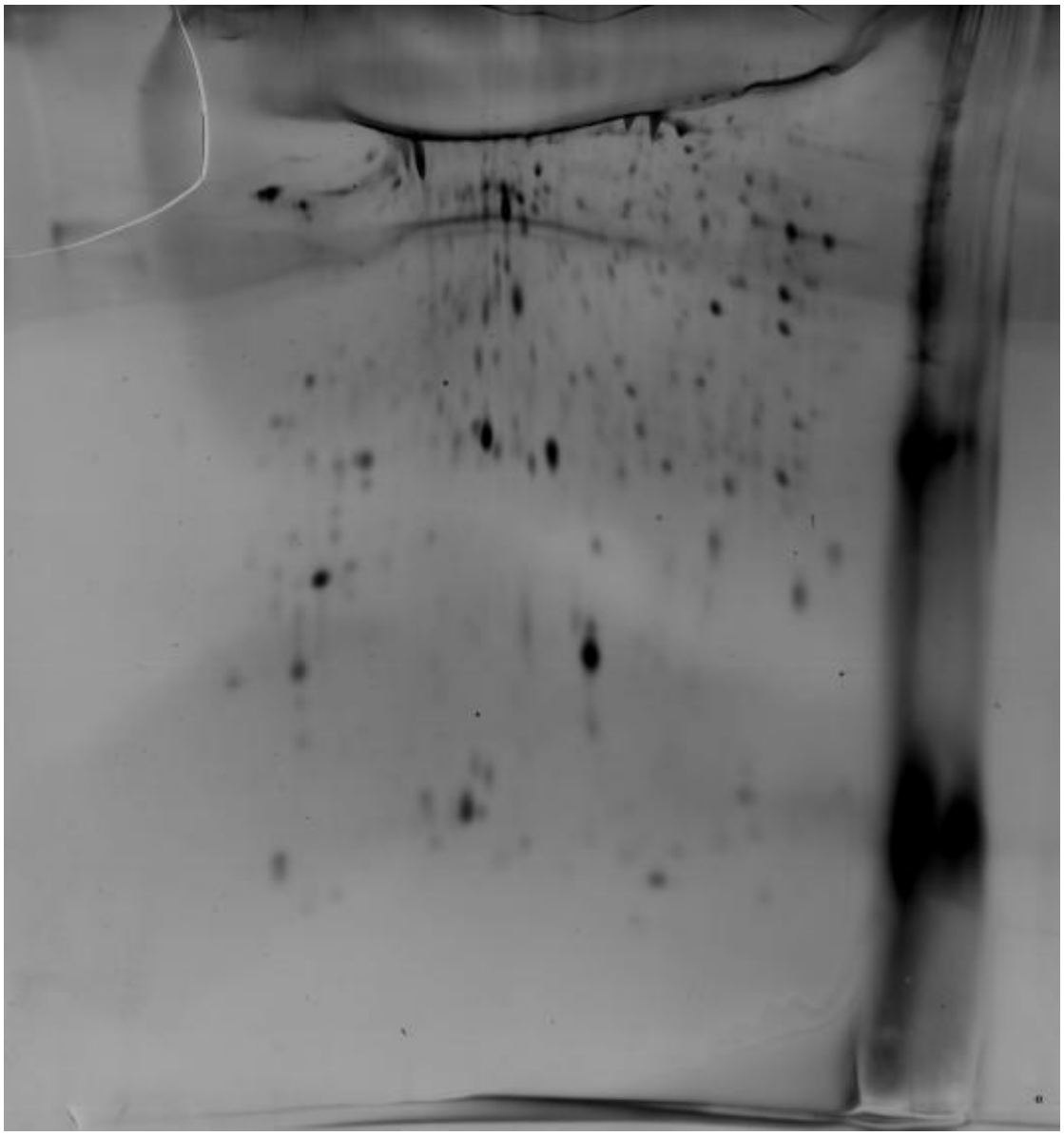
Μεμβρανικές πρωτεΐνες "ανθεκτικού" στελέχους D3 μετά από ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE.

5.11 Πηκτώματα πολυακρυλαμίδης μετά από χρώση με Silver Nitrate

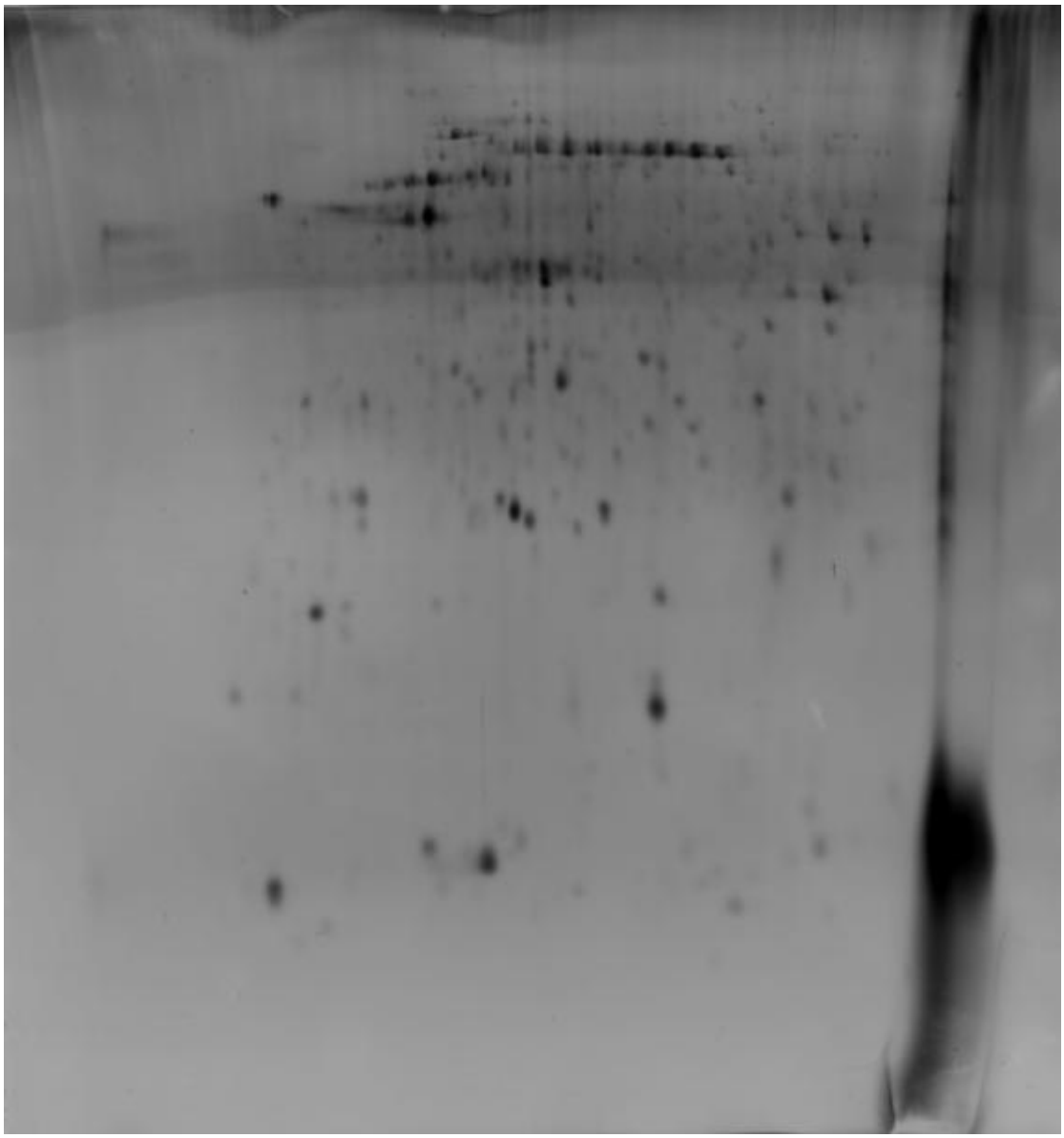
Παρουσιάζονται τα πηκτώματα 4 ενδεικτικών στελεχών (2 ανθεκτικών και 2 ευαίσθητων) τα οποία μελετήθηκαν με την πρωτεωμική ανάλυση.

Μεμβρανικές πρωτεΐνες "ευαίσθητου" στελέχους D1 μετά από ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE.

Μεμβρανικές πρωτεΐνες "ανθεκτικού" στελέχους D2 μετά από ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE.



Μεμβρανικές πρωτεΐνες "ευαίσθητου" στελέχους D2 μετά από ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE.



Μεμβρανικές πρωτεΐνες "ανθεκτικού" στελέχους D3 μετά από ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE.

Κεφάλαιο 6

Βιβλιογραφία

6. Βιβλιογραφία

Achterberg, V, Gercken, G. (1987). "Cytotoxicity of ester and ether lysophospholipids on Leishmania donovani promastigotes." Mol Biochem Parasitol. 23(2): 117-122.

Achterberg, V, Gercken, G. (1987). "Metabolism of ether lysophospholipids in Leishmania donovani promastigotes." Mol Biochem Parasitol. 26(3): 277-287.

Aebersold, R. and M. Mann (2003). "Mass spectrometry-based proteomics." Nature. 422(6928): 198-207.

Anacleto C, Abdo MCB, Ferreira AVB, Murta SMF, Romanha AJ, Fernandes AP, Moreira ESA. (2003). Structural and functional analysis of an amplification containing a PGPA gene in a glucantime-resistant Leishmania (Viannia) guyanensis cell line. Parasitol Res. 90: 110–118

Antoniou, M, Haralambous, C, Mazeris, A, Pratlong, F, Dedet, JP, Soteriadou, K. (2008). "Leishmania donovani leishmaniasis in Cyprus." Lancet Infect Dis. 8(1): 6-7.

Arias, J, Monteiro, PS, Zicker, F. (1996). "The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil." Emerg Infect Dis. 2(2): 145-146.

Ashford, RW. (2000). "The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses." Int J Parasitol. 30(12-13): 1269-1281.

Badaro, R., Reed, SG., Barral, A., Orge, G., Jones, TC. (1986). "Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in American visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses." Am J Trop Med Hyg. 35(1): 72-78.

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

Barak, E., Amin-Spector, S., Gerliak, E., Goyard, S., Holland, N., Zilberstein, D. (2005). "Differentiation of Leishmania donovani in host-free system: analysis of signal perception and response." Mol Biochem Parasitol. 141(1): 99-108.

Beach, DH., Goad, LJ., Holz, GG., Jr. (1988). "Effects of antimycotic azoles on growth and sterol biosynthesis of Leishmania promastigotes." Mol Biochem Parasitol. 31(2): 149-162.

Beach, DH., Holz, GG., Jr., Anekwe, GE. (1979). "Lipids of Leishmania promastigotes." J Parasitol. 65(2): 201-216.

Bee, A., Culley, FJ., Alkhalife, IS., Bodman-Smith, KB., Raynes, JG., Bates, PA. (2001). "Transformation of Leishmania mexicana metacyclic promastigotes to amastigote-like forms mediated by binding of human C-reactive protein." Parasitology. 122(Pt 5): 521-529.

Bell DR, Gerlach JH, Kartner N, Buick RN, Ling V. (1985). Detection of P-glycoprotein in ovarian cancer: a molecular marker associated with multidrug resistance. J Clin Oncol. 3:311-5.

Berkelman, T., Stenstedt, T. (1998). "Amersham Pharmacia Biotech Handbook." (80-6429-60).

Berman, JD. (1988). "Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies." Rev Infect Dis. 10(3): 560-586.

Blaineau, C., Bastien, P., Pages, M. (1992). "Multiple forms of chromosome I, II and V in a restricted population of Leishmania infantum contrasting with monomorphism in individual strains suggest haploidy or automixy." Mol Biochem Parasitol. 50(2): 197-204.

Blomberg, A., Blomberg, L., Norbeck, J., Fey, SJ., Larsen, PM., Larsen, M., Roepstorff, P., Degand, H., Boutry, M., Posch, A., et al. (1995). "Interlaboratory reproducibility of yeast protein patterns analyzed by immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis." Electrophoresis. 16(10): 1935-1945.

Bobek, LA. and Situ H. (2003). "MUC7 20-Mer: investigation of antimicrobial activity, secondary structure, and possible mechanism of antifungal action." Antimicrob Agents Chemother. 47(2): 643-652.

Bray, RS. (1974). "Leishmania." Annu Rev Microbiol. 28(0): 189-217.

Bray, RS. (1983). "Leishmania mexicana mexicana: attachment and uptake of promastigotes to and by macrophages in vitro." J Protozool. 30(2): 314-322.

Brochu, C., Haimeur, A., Ouellette, M. (2004). "The heat shock protein HSP 70 and heat shock cognate protein HSC70 contribute to antimony tolerance in the protozoan parasite leishmania." Cell Stress Chaperones. 9(3):294-303.

Burns, J., Jr. Shreffler, WG., Benson, DR., Ghalib, HW., Badaro, R., Reed, SG. (1993). "Molecular characterization of a kinesin-related antigen of Leishmania chagasi that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis." Proc Natl Acad Sci U S A. 90(2): 775-779.

Cardenosa, N., Riera, C., Cortes, P., March, F., Munoz, C., Portus, M., Prats, G. (1995). "Detection and characterization by immunoblot analysis of potentially diagnostic Leishmania infantum polypeptides in human visceral leishmaniasis." Parasite Immunol. 17(10): 509-516.

Chance, M., Peters, W., Shchory, L. (1974). "Biochemical taxonomy of Leishmania. I. Observations on DNA." Ann Trop Med Parasitol. 68(3): 307-316.

Chaniotis, B., Gozalo Garcia, G., Tselentis, Y. (1994). "Leishmaniasis in greater Athens, Greece. Entomological studies." Ann Trop Med Parasitol. 88(6): 659-663.

Chargui N, Amro A, Haouas N, Schönian G, Babba H, Schmidt S, Ravel C, Lefebvre M, Bastien P, Chaker E, Aoun K, Zribi M, Kuhls K. (2009). Population structure of Tunisian Leishmania infantum and evidence for the existence of hybrids and gene flow between genetically different populations. Int J Parasitol. 39(7):801-11.

Ciocca DR, Fuqua SA, Lock-Lim S, Toft DO, Welch WJ, McGuire WL. (1992) Response of human breast cancer cells to heat shock and chemotherapeutic drugs. Cancer Res. 52(13):3648-54.

Coulter, WH. (1956). "High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer." Proc Natl Electronic Conf 121034-1035.

Croft, SL., Sundar, S., Fairlamb, AH. (2006). "Drug resistance in leishmaniasis." Clin Microbiol Rev. 19(1): 111-126.

Cuervo, P., de Jesus, JB., Junqueira, M., Mendonça-Lima, L., González, LJ., Betancourt, L., Grimaldi, GJr., Domont, GB., Fernandes, O., Cupolillo,

E. (2007). "Proteome analysis of Leishmania (Viannia) braziliensis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry." Molecular Biochem Parasitol. 154(1):6-21.

Curt GA, Glendininn NJ, Chabner BA. (1984). Drug resistance in cancer. Cancer Treat Rep. 68:87-99

da Silva LA, de Sousa Cdos S, da Graça GC, Porrozzi R, Cupolillo E. (2010). Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying Leishmania species associated with human leishmaniasis in Brazil. Infect Genet Evol. 10(1):77-83

Das VN, Pandey K, Verma N, Lal CS, Bimal S, Topno RK, Singh D, Siddiqui NA, Verma RB, Das P. (2009). Short report: Development of post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) in miltefosine-treated visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 80(3):336-8.

de Araujo Soares, R., dos Santos, AL., Bonaldo, MC., de Andrade, AF., Alviano, CS., Angluster, J., Goldenberg, S. (2003). "Leishmania (Leishmania) amazonensis: differential expression of proteinases and cell-surface polypeptides in avirulent and virulent promastigotes." Exp Parasitol. 104(3-4): 104-112.

de Lana, M., da Silviera Pinto, A., Bastrenta, B., Barnabe, C., Noel, S., Tibayrenc, M. (2000). "Trypanosoma cruzi: infectivity of clonal genotype infections in acute and chronic phases in mice." Exp Parasitol. 96(2): 61-66.

Dea-Ayuela, M., Rama-Iniguez, S., Bolas-Fernandez, F. (2006). "Proteomic analysis of antigens from Leishmania infantum promastigotes." Proteomics. 6(14): 4187-4194.

Demicheli C, Frézard F, Lecouvey M, Garnier-Suillerot A. (2002). Antimony (V) complex formation with adenine nucleoside in aqueous solution. Bioch Biophys Acta 1570:192–193

Descoteaux, A. and Turco SJ. (1999). "Glycoconjugates in Leishmania infectivity." Biochim Biophys Acta. 1455(2-3): 341-352.

Desjardins, M. and Descoteaux A. (1998). "Survival strategies of Leishmania donovani in mammalian host macrophages." Res Immunol. 149(7-8): 689-692.

Desjeux, P. (2001). "The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide." Trans R Soc Trop Med Hyg. 95(3): 239-243.

Desjeux, P. (2004). "Leishmaniasis: current situation and new perspectives." Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 27(5): 305-318.

Drummelsmith, J., Brochu, V., Girard, I., Messier, N., Ouellette, M. (2003). "Proteome mapping of the protozoan parasite Leishmania and application to the study of drug targets and resistance mechanisms." Mol Cell Proteomics. 2(3): 146-155. Epub 2003 Mar 2015.

Dujardin, J., Campino, L., Canavate, C., Dedet, JP., Gradoni, L., Soteriadou, K., Mazeris, A., Ozbel, Y., Boelaert, M. (2008). "Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe." Emerg Infect Dis. 14(7): 1013-1018.

Dwyer, DM. (1980). "Isolation and partial characterization of surface membranes from Leishmania donovani promastigotes." J Protozool. 27(2): 176-182.

El Fadili K., Messier N., Leprohon P., et al. (2005). Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. Antimicrob Agents Chemother. 49:1988-93.

El Fakhry, Y., Ouellette, M., Papadopoulou, B. (2002). "A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in Leishmania infantum." Proteomics. 2(8): 1007-1017.

Englund, PT. (1981). Biology and Physiology of Protozoa. New York, Academic Press.

Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM,Pastan I. (1987). Expression of a multidrug resistance gene in human tumours and tissues. Proc Natl Acad Sci USA. 84:265-9.

Foundoulakis, M. (1999). Two-Dimensional electrophoresis. In: Encyclopedia of separation science, II/electrophoresis. London, Academic Press.

Fountoulakis, M. (2004). "Application of proteomics technologies in the investigation of the brain." Mass Spectrom Rev. 23(4): 231-258.

Fountoulakis, M. and Takacs B. (2001). "Effect of strong detergents and chaotropes on the detection of proteins in two-dimensional gels." Electrophoresis. 22(9): 1593-1602.

Frézard F, Demicheli C, Ferreira CS, Costa MA. (2001). Glutathione induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. Antimicrob Agents Chemother. 45:913–916

Fuge, H. (1968). "On the fine structure of the periplast and the flagellum of Trypanosoma brucei and Trypanosoma gambiense." Z Zellforsch Mikrosk Anat. 89(2): 201-211.

Garcia, LS, Bruckner, DA. (1997). Leishmaniasis. In diagnistic Medical Parasitology. Washington DC ASM Press.

Gibson, W. and Stevens J. (1999). "Genetic exchange in the trypanosomatidae." Adv Parasitol. 43: 1-46.

Goodwin, LG. (1995). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 89, 339–341

Grogl M, Martin RK, Oduola AM, Milhous WK, Kyle DE. (1991). Characteristics of multidrug resistance in Plasmodium and Leishmania: detection of P-glycoprotein-like components. Am J Trop Med Hyg. 45(1):98-111.

Goad, LJ., Holz, GG., Jr., Beach, DH. (1984). "Sterols of Leishmania species. Implications for biosynthesis." Mol Biochem Parasitol. 10(2): 161-170.

Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., Weiss, W. (2000). "The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients." Electrophoresis. 21(6): 1037-1053.

Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Weiss, W. (1999). "Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures." Electrophoresis. 20(4-5): 712-717.

Gradoni, L., Gramiccia, M., Scalone, A. (2003). "Visceral leishmaniasis treatment, Italy." Emerg Infect Dis. 9(12): 1617-1620.

Gramiccia, M., Gradoni, L., Orsini, S. (1992). "Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of Leishmania infantum isolated from dogs after several courses of drug treatment." Ann Trop Med Parasitol. 86(6): 613-620.

Graziano, M., St-Pierre, Y., Beauchemin, C., Desrosiers, M., Potworowski, E. F. (1998). "The fate of thymocytes labeled in vivo with CFSE." Exp Cell Res. 240(1): 75-85.

Guan, L., Zuo, XP., Yimamu. (2003). "Reemergence of visceral leishmaniasis in Kashi Prefecture, Xinjiang." Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi. 21(5): 285.

Gupta, N., Goyal, N., Rastogi, AK. (2001). "In vitro cultivation and characterization of axenic amastigotes of Leishmania." Trends Parasitol. 17: 150-153.

Gupta, RS., Golding, GB. (1993). "Evolution of HSP70 gene and its implications regarding relationships between archaebacteria, eubacteria, and eukaryotes." J Mol Evol. 37(6): 573-582.

Haralambous, C., Antoniou, M., Pratlong, F., Dedet, JP., Soteriadou, K. (2008). "Development of a molecular assay specific for the Leishmania donovani complex that discriminates L. donovani/Leishmania infantum zymodemes: a useful tool for typing MON-1." Diagn Microbiol Infect Dis. 60(1): 33-42. Epub 2007 Sep 2021.

http://facs.stanford.edu/sff/about-facs.html

http://martin.parasitology.mcgill.ca/Jimspage/Biol/Leish.htm

http://microbiology.wustl.edu/training/Med/Micpath99/11beverley

http://www.who.int/leishmaniasis_maps/en/index.html

Ivovic, V., Ivovic, M., Chaniotis, B., Tselentis, Y. (2007). "The establishment, maintenance and productivity of a laboratory colony of Phlebotomus similis Perfiliew, 1963 (Diptera, Psychodidae)." Parasitol Res. 101(1): 229-231. Epub 2007 Jan 2017.

Jeffrey, H. C., Leach, R.M. (1975). Atlas of medical helminthology and protozoology. Edinburgh, London and New York, Churchill Livingstone.

Johner A, Kunz S, Linder M, Shakur Y, Seebeck T. (2006). Cyclic nucleotide specific phosphodiesterases of Leishmania major. BMC Microbiol. 6:25

Kamau, S., Hurtado, M., Muller-Doblies, UU., Grimm, F., Nunez, R. (2000). "Flow cytometric assessment of allopurinol susceptibility in Leishmania infantum promastigote." Cytometry. 40(4): 353-360.

Kamau, SW., Nunez, R., Grimm, F. (2001). "Flow cytometry analysis of the effect of allopurinol and the dinitroaniline compound (Chloralin) on the viability and proliferation of Leishmania infantum promastigotes." BMC Pharmacol. 1: 1. Epub 2001 Apr 2005.

Kartner N, Evernden-Porelle D, Bradley G, Ling V. (1985). Monoclonal antibodies detecting P-glycoprotein in multidrug resistant cell lines. Nature. 1985;316:820-3.

Kettle, DS. (1995). Medical and veterinary entomology Wallingford, CAB International.

Killick-Kendrick, R. (1979). Biology of Kinetoplastidae. New York, Academic Press.

Killick-Kendrick, R. (1990). "Phlebotomine vectors of the leishmaniases: a review." Med Vet Entomol. 4(1): 1-24.

Killick-Kendrick, R. (1999). "The biology and control of phlebotomine sand flies." Clin Dermatol. 17(3): 279-289.

Kohler, G., Milstein, C. (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature. 256(5517): 495-497.

Kothari, H., Kumar, P., Sundar, S., Singh, N. (2007). "Possibility of membrane modification as a mechanism of antimony resistance in Leishmania donovani." Parasitol Int. 56(1): 77-80. Epub 2006 Dec 2012.

Kreutzer, RD. and Christensen HA. (1980). "Characterization of Leishmania spp. by isozyme electrophoresis." Am J Trop Med Hyg. 29(2): 199-208.

Lawrence F., Robert Gero M. (1985). Induction of heat shock and stress proteins in promastigotes of three Leishmania species. Proc Natl Acad Sci USA. 82(13):4414-7.

Lee, N., Bertholet, S., Debrabant, A., Muller, J., Duncan, R., Nakhasi, HL. (2002). "Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite Leishmania." Cell Death Differ. 9(1): 53-64.

Legare D., Cayer S., Singh AK., et al. (2001). ABC proteins of *Leishmania*. J Bioenerg Biomemb. 33:469-74.

Leger, N., Gramiccia, M., Gradoni, L., Madulo-Leblond, G., Pesson, B., Ferte, H., Boulanger, N., Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M. (1988). "Isolation and typing of Leishmania infantum from Phlebotomus neglectus on the island of Corfu, Greece." Trans R Soc Trop Med Hyg. 82(3): 419-420.

Lemesre, J., Darcy, F., Kweider, M., Capron, A., Santoro, F. (1988). "Requirements of defined cultivation conditions for standard growth of Leishmania promastigotes in vitro." Acta Trop. 45(2): 99-108.

Lemesre, JL., Darcy, F. et al. (1988). "Requirements of defined cultivation conditions for standard growth of Leishmania promastigotes in vitro." Acta Trop. 45(2): 99-108.

Lessa, MM., Lessa, HA., Castro, TW., Oliveira, A., Scherifer, A., Machado, P., Carvalho, EM. (2007). "Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects." Braz J Otorhinolaryngol. 73(6): 843-847.

Lianson, R., Shaw, JJ (1987). Evolution, classification and geograpfical distribution. In The leishmaniasis in biology and medicine. London, Academic Press.

Lightner, L., Chulay, JD., Bryceson, AD. (1983). "Comparison of microscopy and culture in the detection of Leishmania donovani from splenic aspirates." Am J Trop Med Hyg. 32(2): 296-299.

Lima MI, Arruda VO, Alves EV, de Azevedo AP, Monteiro SG, Pereira SR. (2009). Genotoxic effects of the antileishmanial drug glucantime((R)). Arch Toxicol. [Epub ahead of print]

Link, AJ., Eng, J., Schieltz, DM., Carmack, E., Mize, GJ., Morris, DR., Garvik, BM., Yates, JR., 3rd (1999). "Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry." Nat Biotechnol. 17(7): 676-682.

Lukes, J., Mauricio, IL., Schonian, G., Dujardin, JC., Soteriadou, K., Dedet, JP., Kuhls, K., Tintaya, KW., Jirku, M., Chocholova, E., Haralambous, C., Pratlong, F., Obornik, M., Horak, A., Ayala, FJ., Miles, MA. (2007).

"Evolutionary and geographical history of the Leishmania donovani complex with a revision of current taxonomy." Proc Natl Acad Sci U S A. 104(22): 9375-9380. Epub 2007 May 9321.

Lumsden, WH. (1974). "Letter: Biochemical taxonomy of Leishmania." Trans R Soc Trop Med Hyg. 68(1): 74-75.

Lyons, AB. (2000). "Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution." J Immunol Methods. 243(1-2): 147-154.

Mallinson, DJ. and GH. Coombs (1989). "Biochemical characteristics of the metacyclic forms of Leishmania major and L. mexicana mexicana." Parasitology. 98(Pt 1): 7-15.

Marti, GE., Stetler-Stevenson, M., Bleesing, JJH., Fleisher, TA. (2001). "Introduction to Flow Cytometry." Seminars in Hematology 38(2).

Martinez, J., Valderrama, L., Gama, V., Leiby, DA., Saravia, N G. (2000). "Clonal diversity in the expression and stability of the metastatic capability of Leishmania guyanensis in the golden hamster." J Parasitol. 86(4): 792-799.

Matsui, NM., Smith, DM., Clauser, KR., Fichmann, J., Andrews, LE., Sullivan, CM., Burlingame, AL., Epstein, LB. (1997). "Immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometric identification of cytokine-regulated proteins in ME-180 cervical carcinoma cells." Electrophoresis. 18(3-4): 409-417.

Mauel, J. (1984). "Mechanisms of survival of protozoan parasites in mononuclear phagocytes." Parasitology. 88(Pt 4): 579-592.

Mauricio, I., Yeo, M., Baghaei, M., Doto, D., Pratlong, F., Zemanova, E., Dedet, JP., Lukes, J., Miles, MA. (2006). "Towards multilocus sequence typing of the Leishmania donovani complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD)." Int J Parasitol. 36(7): 757-769.

Mazeris A, Soteriadou K, Dedet JP, Haralambous C, Tsatsaris A, Moschandreas J, Messaritakis I, Christodoulou V, Papadopoulos B, Ivovic V, Pratlong F, Loucaides F, Antoniou M. (2010). "Leishmaniases and the Cyprus Paradox." Am J Trop Med Hyg. 82(3):441-448.

Mazeris, A., Soteriadou, K., Dedet, J.P., Haralambous, C., Tsatsaris, A., Moschandreas, J., Messaritakis, I., Christodoulou, V., Papadopoulos B., Pratlong, F., Loucaides, F., Antoniou, M. (Accepted for publication). "Leishmaniases and the Cyprus paradox." Am J Trop Med Hyg.

Mbuchi M, Bates PA, Ilg T, Coe JE, Raynes JG. (2006). C-reactive protein initiates transformation of Leishmania donovani and L. mexicana through binding to lipophosphoglycan. Mol Biochem Parasitol. 146(2):259-64.

Messaritakis I, Mazeris A, Koutala E, Antoniou M. (2010). Leishmania donovani s.l.: Evaluation of the proliferation potential of promastigotes using CFSE staining and flow cytometry. Exp Parasitol. [Epub ahead of print]

Moldavan, A. (1934). "Photoelectric technique for the counting of microscopical cells." Science. 80: 188-190.

Molyneux, DH. (1977). "Vector relationships in the Trypanosomatidae." Adv Parasitol. 15: 1-82.

Murray, HW. (2004). "Progress in the treatment of a neglected infectious disease: visceral leishmaniasis." Expert Rev Anti Infect Ther. 2(2): 279-292.

Nakagawa M, Emoto A, Nasu N, Hanada T, Kuwano M, Cole SP, Nomura Y. (1997). Clinical significance of multi-drug resistance associated protein and P-glycoprotein in patients with bladder cancer. J Urol. 157(4):1260-4

Nasereddin, A., Baneth, G., Schonian, G., Kanaan, M., Jaffe, CL. (2005). "Molecular fingerprinting of Leishmania infantum strains following an outbreak of visceral leishmaniasis in central Israel." J Clin Microbiol. 43(12): 6054-6059.

Nieto, CG., Garcia-Alonso, M., Requena, JM., Miron, C., Soto, M., Alonso, C., Navarrete, I. (1999). "Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of Leishmania infantum: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis." Vet Immunol Immunopathol. 67(2): 117-130.

Nugent, P., Karsani, SA., Wait, R., Tempero, J., Smith, DF. (2004). "Proteomic analysis of Leishmania mexicana differentiation." Mol Biochem Parasitol. 136(1): 51-62.

O'Farrell, PH. (1975). "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins." J Biol Chem. 250(10): 4007-4021.

Oesterreich S, Weng CN, Qiu M, Hilsenbeck SG, Osborne CK, Fuqua SA. (1993). The small heat shock protein hsp27 is correlated with growth

and drug resistance in human breast cancer cell lines. Cancer Res. 53(19):4443-8.

Olliaro, P., Guerin, PJ., Gerstl, S., Haaskjold, AA., Rottingen, JA., Sundar, S. (2005). "Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004." Lancet Infect Dis. 5(12): 763-774.

Ouellette, M. (2001). "Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites." Trop Med Int Health. 6(11): 874-882.

Ozbilgin, A., Ozbel, Y., Alkan, M. Z., Atambay, M., Ozcel, M. A. (1995). "Cultivation of Leishmania sp. in nutrient broth." J Egypt Soc Parasitol. 25(2): 437-441.

Pan, AA., Duboise, M., Eperon, S., Rivas, L., Hodgkinsen, V., Traub-Cseko, Y., McMahon-Pratt, D. (1993). "Developmental lifecycle of Leishmania cultivation and characterization of cultured extracellular amastigotes." J. Eukaryot. Micobiol 40: 213-223.

Papadopoulou B., Drummelsmith J., Ouellette M. (2004). Proteomics to Explore Pathogenesis and Drug Resistance Mechanisms in Protozoan Parasites. Proteomics: Biomedical and Pharmaceutical Applications, 367–383. Kluwer Academic Publishers.

Pappas, M., McGreevy, PB., Hajkowski, R., Hendricks, LD., Oster, CN., Hockmeyer, WT. (1983). "Evaluation of promastigote and amastigote antigens in the indirect fluorescent antibody test for American cutaneous leishmaniasis." Am J Trop Med Hyg. 32(6): 1260-1267.

Parish, CR. (1999). "Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies." Immunol Cell Biol. 77(6): 499-508.

Pastan I, Gottesman M. (1987). Multidrug resistance in human cancer. N Engl J Med. 316:1388-93.

Pearson, R., Wheeler, DA., Harrison, LH., Kay, HD. (1983). "The immunobiology of leishmaniasis." Rev Infect Dis. 5(5): 907-927.

Pérez-Victoria FJ, Sánchez-Cañete MP, Seifert K, Croft SL, Sundar S, Castanys S, Gamarro F. (2006). Mechanisms of experimental resistance of Leishmania to miltefosine: Implications for clinical use. Drug Resist Updat. 9(1-2):26-39.

Ponte-Sucre A. (2003). Physiological consequences of drug resistance in Leishmania and their relevance for chemotherapy. Kinetoplastid Biology and Disease. 2:14. Review

Prasad A, Kaur S, Malla N, Ganguly NK, Mahajan RC. (2001). Ca2+ signaling in the transformation of promastigotes to axenic amastigotes of Leishmania donovani. Mol Cell Biochem. 224(1-2):39-44.

Pratt, DM., David JR. (1981). "Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of Leishmania." Nature. 291(5816): 581-583.

Rabilloud, T. (1998). "Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis." Electrophoresis. 19(5): 758-760.

Raether, W., Seidenath H. (1977). "Survival of Aegyptianella pullorum, Anaplasma marginale and various parasitic protozoa following prolonged storage in liquid nitrogen." Z Parasitenkd. 53(1): 41-46.

Rakotomanga, M., Loiseau, PM., Saint-Pierre-Chazalet, M. (2004). "Hexadecylphosphocholine interaction with lipid monolayers." Biochim Biophys Acta. 1661(2): 212-218.

Ravel C, Cortes S, Pratlong F, Morio F, Dedet JP, Campino L. (2006). First report of genetic hybrids between two very divergent Leishmania species: Leishmania infantum and Leishmania major. Int J Parasitol. 36(13):1383-8.

Requena, JM., Alonso, C., Soto, M. (2000). "Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during Leishmania infections." Parasitol Today. 16(6): 246-250.

Reynolds, J. (1989). The extra pharmacopeia. . London, The Pharmaceutical Press.

Riley, RS. (2002). "Hematology/Oncology Clinics in North America." Flow Cytometry and its Applications in Hematology and Oncology 16(2).

Riordan, JR., Deuchars, K., Kartner, N., Alon, N., Trent, J., Ling, V. (1985). "Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines." Nature. 316(6031): 817-819.

Rodriguez, N., Guzman, B., Rodas, A., Takiff, H., Bloom, BR., Convit, J. (1994). "Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization." J Clin Microbiol. 32(9): 2246-2252.

Rosenzweig, D., Smith, D., Opperdoes, F., Stern, S., Olafson, RW., Zilberstein, D. (2008). "Retooling Leishmania metabolism: from sand fly

gut to human macrophage." FASEB J. 22(2): 590-602. Epub 2007 Sep 2020.

Sachdeva R, Banerjea AC, Malla N, Dubey ML. (2009). Immunogenicity and efficacy of single antigen Gp63, polytope and polytopeHSP70 DNA vaccines against visceral Leishmaniasis in experimental mouse model. PLoS One. 2;4(12):e7880.

Sacks, DL. (1989). "Metacyclogenesis in Leishmania promastigotes." Exp Parasitol. 69(1): 100-103.

Sereno, D., Holzmuller, P., Mangot, I., Cuny, G., Ouaissi, A., Lemesre, JL. (2001). "Antimonial-mediated DNA fragmentation in Leishmania infantum amastigotes." Antimicrob Agents Chemother. 45(7): 2064-2069.

Simões-Mattos L, Teixeira MJ, Costa DC, Prata JR Jr, Bevilaqua CM, Sidrim JJ, Rocha MF. (2002). Evaluation of terbinafine treatment in Leishmania chagasi-infected hamsters (Mesocricetus auratus).Vet Parasitol. 103(3):207-16.

Singh, N. (2006). "Drug resistance mechanisms in clinical isolates of Leishmania donovani." Indian J Med Res. 123(3): 411-422.

Singh, S., Mohapatra, DP., Sivakumar, R. (2000). "Successful replacement of fetal calf serum with human urine for in vitro culture of Leishmania donovani." J Commun Dis. 32(4): 289-294.

Sinha, R., Arora, SK., Datta, U., Sehgal, S. (1992). "Detection of leishmania antigen in kala azar patients using monoclonal antibodies." Microbiol Immunol. 36(4): 391-400.

Smirlis, D., Bisti, SN., Xingi, E., Konidou, G., Thiakaki, M., Soteriadou, K. (2006). "Leishmania histone H1 overexpression delays parasite cell-cycle progression, parasite differentiation and reduces Leishmania infectivity in vivo." Mol Microbiol. 60(6): 1457-1473.

Somanna A, Mundodi V, Gedamu L. (2002). In vitro cultivation and characterization of Leishmania chagasi amastigote-like forms. Acta Trop. 83(1):37-42.

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

Sundar, S., Jha, TK., Thakur, CP., Engel, J., Sindermann, H., Fischer, C., Junge, K., Bryceson, A., Berman, J. (2002). "Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis." N Engl J Med. 347(22): 1739-1746.

Teixeira MC, de Jesus Santos R, Sampaio RB, Pontes-de-Carvalho L, dos-Santos WL. (2002). A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different Leishmania species. Parasitol Res. 88(11):963-8.

Thiel, M., Bruchhaus, I. (2001). "Comparative proteome analysis of Leishmania donovani at different stages of transformation from

promastigotes to amastigotes." Med Microbiol Immunol. 190(1-2): 33-36.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A. 76(9): 4350-4354.

Verma, N. K., Dey, C.S. (2004). "Possible mechanism of miltefosine-mediated death of Leishmania donovani." Antimicrob Agents Chemother. 48(8): 3010-3015.

Verma NK, Singh G, Dey CS. (2007). Miltefosine induces apoptosis in arsenite-resistant Leishmania donovani promastigotes through mitochondrial dysfunction. Exp Parasitol. 116(1):1-13.

Volf P, Benkova I, Myskova J, Sadlova J, Campino L, Ravel C. (2007). Increased transmission potential of Leishmania major/Leishmania infantum hybrids. Int J Parasitol. 37(6):589-93.

W.H.O. (2006). Control of Neglected Tropical Disease. Geneva, World Health Organization WHO/CDS/NTD/2006.2

W.H.O. (2000). Leishmaniasis and Leishmania/HIV co-infection.

W.H.O. (1990). Control of Leishmaniases. World Health Technical Reports Series. Geneva.

W.H.O. (1990). Model Prescribing Information: Drugs used in parasitic diseases. Geneva, World Health Organization 14-18.

Walker J, Vasquez JJ, Gomez MA, Drummelsmith J, Burchmore R, Girard I, Ouellette M. (2006). Identification of developmentally-regulated proteins in *Leishmania panamensis* by proteome profiling of

promastigotes and axenic amastigotes. Molecular & Biochemical Parasitology 147; 64–73

Wallner K, Li GC. (1986) Adriamycin resistance, heat resistance and radiation response in Chinese hamster fibroblasts. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 12(5):829-33.

Wasinger, VC., Cordwell, SJ., Cerpa-Poljak, A., Yan, JX., Gooley, AA., Wilkins, MR., Duncan, MW., Harris, R., Williams, KL., Humphery-Smith, I. (1995). "Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium." Electrophoresis. 16(7): 1090-1094.

Westermeier, R. (2005). Front Matter. Electrophoresis in Practice (Fourth Edition): i-xx.

Wilson, SM. (1995). "DNA-based methods in the detection of Leishmania parasites: field applications and practicalities." Ann Trop Med Parasitol. 89(Suppl 1): 95-100.

Wolday, D., Berhe, N., Akuffo, H., Desjeux, P., Britton, S. (2001). "Emerging Leishmania/HIV co-infection in Africa." Med Microbiol Immunol. 190(1-2): 65-67.

www.biochem.mpg.de

www.ecacc.org

www.icp.ucl.ac.be

www.life.com

www.uccc.info

www.vetmed.gr

www.virbac.gr

www.who.int

Zilberstein, D., Shapira, M. (1994). "The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites." Annu Rev Microbiol. 48: 449-470.

Zhang Z, Deng X, Ren X, Zhang B, Chen X, Yang J, Ding H, Sui J, Song X. (2010). Expression of mutant p53 and of the multidrug resistant proteins P-glycoprotein and glutathione S-transferase-pi correlated in colorectal adenocarcinoma. Scand J Gastroenterol. [Epub ahead of print]

Μαζέρης, Α. (2010). Έλεγχος και επιτήρηση της Λεϊσμανίασης στην Κύπρο. Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής. Διδακτορική Διατριβή. Ηράκλειο, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Χαλεβελάκης, ΓΕ., Λεγάκης, ΝΙ., Περογάμβρος, ΤΗ. (1994). Αντιβιοτικά και συνήθεις λοιμώξεις, Χριστοδουλία Χαλεβελάκη.

Χριστοδούλου, Β. (Σε εξέληξη). Μελέτη της μολυσματικότητας και της αντοχής στελεχών *Leishmania infantum*, από την Κρήτη, την Αθήνα και την Κύπρο, στα αντιλεϊσμανιακά φάρμακα και η γεωγραφική τους κατανομή βάση των χαρακτηριστικών τους. Ιατρική Σχολή, Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής. Διδακτορική Διατριβή. Ηράκλειο, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

«Μελετάμε ότι βλέπουμε, αυτό όμως

δεν σημαίνει πως ότι βλέπουμε υπάρχει»

Paulo Coelo