



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ,

Μ.Δ.Ε. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΑΠΟ ΦΥΚΗ ΚΑΙ ΦΥΤΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Βίβιαν Τσούβαλη

Επιβλέπων

Καθ. Γεώργιος Διαλλινάς

Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Αθήνα 2017

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ
ΑΠΟ ΦΥΚΗ ΚΑΙ ΦΥΤΑ»

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να απευθύνω θερμές ευχαριστίες στον επιβλέποντα Καθηγητή μου κύριο Γεώργιο Διαλλινά, με την καθοδήγη και αρωγή του οποίου ολοκλήρωσα την παρούσα Διπλωματική Εργασία. Επίσης, ευχαριστώ τον Δρ. Σωτήρη Αμίλλη για την άμεση και ουσιαστική βοήθεια που μου παρείχε, τόσο σε πρακτικό όσο και σε θεωρητικό επίπεδο. Θα ήθελα ακόμα, να ευχαριστήσω ιδιαίτερα για την συνεργασία, τον καθηγητή Βασίλειο Ρούσση, του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, καθώς και τον Επίκουρο Καθηγητή Ιωάννη Κωστάκη του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του τμήματος Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ. Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια κυρία Αμαλία Καραγκούνη και τον Επίκουρο Καθηγητή κύριο Δημήτρη Χατζηνικολάου, οι οποίοι με τίμησαν με τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή. Τέλος, δε μπορώ να μην αναφερθώ σε όλους τους συμφοιτητές μου, η βοήθεια των οποίων ήταν πολύτιμη, καθώς και στην οικογένεια μου που ήταν δίπλα μου σε κάθε μου βήμα. Οφείλω σε όλους ένα μεγάλο ευχαριστώ!

Περίληψη

Οι μύκητες αποτελούν μια ομάδα ευκαρυωτικών μικροοργανισμών που συναντώνται στο έδαφος, στον αέρα αλλά και στο νερό. Έχουν την ικανότητα να προσβάλλουν πλήθος φυτών, ζώων αλλά και τον άνθρωπο. Συγκεκριμένα η ασπεργίλλωση αποτελεί μια ευρέως διαδεδομένη ασθένεια, η οποία προκαλείται από είδη του γένους *Aspergillus*. Έχουν αναπτυχθεί φάρμακα με σκοπό την αντιμετώπιση των μολύνσεων που προέρχονται από τους μύκητες αυτούς. Η αλόγιστη όμως χρήση των αντιμυκητιακών φαρμάκων, σε συνδυασμό με την εγγενή ικανότητα ορισμένων μυκήτων να αντιμετωπίζουν τα σκευάσματα αυτά, οδήγησε στη δημιουργία ανθεκτικών μυκητιακών στελεχών. Η δημιουργία νέων σκευασμάτων τα οποία βασίζονται σε φυσικά ανάλογα φυτικής προέλευσης θα μπορούσε να αντιμετωπίσει το πρόβλημα της ανθεκτικότητας στα υπάρχοντα αντιμυκητιακά φάρμακα. Σκοπός της διπλωματικής αυτής είναι η ανακάλυψη νέων χημικών ουσιών φυτικής προέλευσης. Χρησιμοποιήθηκαν χημικές ουσίες από φύκη του γένους *Laurencia* και παρασκευάστηκαν χημικά ανάλογα της τυροσόλης, ουσία που βρίσκεται στο φυτό *Olea europaea*. Η δράση των ουσιών αυτών ελέγχθηκε σε συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες ώστε να διαπιστωθεί η τοξικότητά τους κυρίως σε στελέχη *A. nidulans*, *A. fumigatus* και *A. flavus*. Επίσης πραγματοποιήθηκε προκαταρκτική μελέτη του μηχανισμού δράσης τους μέσω μικροσκοπίας φθορισμού και κινητικών μετρήσεων. Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν πειράματα μεταλλαξιγένεσης προκειμένου να διαπιστωθεί η συχνότητα ανάκτησης ανθεκτικότητας προς τις ουσίες αυτές από μεταλλαγμένα στελέχη του *A. nidulans*. Τέλος πραγματοποιήθηκε πείραμα προσδιορισμού της τοξικότητας σε κύτταρα θηλαστικού, τα αποτελέσματα του οποίου είναι πολύ σημαντικά για την εξέλιξη του ερευνητικού έργου.

Summary

Fungi are a group of eukaryotic microorganisms found on the ground, in the air and in the water. They have the ability to infect many plants, animals but also humans. In particular, aspergillosis is a widespread disease caused by species of the genus *Aspergillus*. Drugs have been developed to treat infections caused from these fungi. The inappropriate use of antifungal drugs, combined with the inherent capacity of some fungi to resist these formulations, has led to the selection of resistant fungal strains. The production of new pharmacological formulations based on natural analogues of plant origin could address the problem of resistance to existing antifungal medicines. The purpose of the present thesis is the discovery of new chemical substances of plant origin with antifungal activity. Natural metabolites from the algae *Laurencia* and chemical analogues of tyrosol from *Olea europaea* were tested under controlled environmental conditions in order to examine their antifungal properties and to determine their toxicity specifically in strains of *A.nidulans*, *A.fumigatus* and *A.flavus*. Furthermore, in order to find the mechanism of action of selected active substances, fluorescence microscopy experiments and kinetic studies were performed. Additionally, mutagenesis experiments were carried out to ascertain how likely is the recovery of resistance to these substances in mutant strains of *A. nidulans*. Finally, an experiment was conducted to determine the toxicity in mammalian cells, the results of which are critical for the development of safe novel antifungals.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	2
Περίληψη	3
Summary	4
1. Εισαγωγή.....	2
1.1 Αντιμυκητιακοί παράγοντες στα φυτά	3
1.1.1 Φαινόλες	3
1.1.2 Φλαβονοειδή	4
1.1.3 Κουμαρίνες.....	5
1.1.4 Κινόνες	6
1.1.5 Σαπωνίνες	7
1.1.6 Ξανθόνες	8
1.1.7 Τερπενοειδή, τερπένια και αιθέρια έλαια.....	9
1.1.8 Αλκαλοειδή	10
1.1.9 Λεκτίνες και πολυπεπτίδια	11
1.2 Το πρόβλημα της ανθεκτικότητας στα αντιμυκητιακά φάρμακα	12
1.2.1 Ανθεκτικότητα στις αζόλες.....	12
1.2.2 Ανθεκτικότητα στις εχινοκανδίνες	14
1.2.3 Ανθεκτικότητα στα πολυένια	15
1.3 Η δομή, λειτουργία και παθογένεια ειδών <i>Aspergillus</i> σε φυτά και ζώα	17
1.3.1 Γενικό Μέρος.....	17
1.3.2 Η δομή και η λειτουργία του μύκητα <i>A. nidulans</i>	17
1.3.3 Η δομή και η λειτουργία του μύκητα <i>A. flavus</i>	18
1.3.4 Η δομή και η λειτουργία του μύκητα <i>A. fumigatus</i>	19
1.3.5 Μεταφορείς πουρινών και πυριμιδινών του μύκητα <i>A. nidulans</i>	20
1.3.6 Μόλυνση φυτών και ζώων από το γένος <i>Aspergillus</i>	22
1.4 Ο μύκητας <i>Candida albicans</i>	25
1.5 Φυσικά προϊόντα από φύκη και φυτά.....	26
1.5.1 Φυσικά προϊόντα από τα φύκη του γένους <i>Laurencia</i>	27
1.5.1.1 Σεσκιτερπένια	27
1.5.1.2 Διτερπένια.....	28
1.5.1.3 Τριτερπένια	28
1.5.1.4 C15-ακετογενίνες	28
1.6 Φυσικά προϊόντα από το φυτό <i>Olea europaea</i>	29

1.7.1 Φαινολικές αλκοόλες.....	30
1.7.2 Φαινολικά οξέα.....	31
1.6.3.3 Φλαβονοειδή	31
1.6.3.4 Σεκοϊριδοειδή.....	31
1.7 Σκοπός	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	34
2. Υλικά και Μέθοδοι	35
2.1 Στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη	35
2.4 Μέθοδοι	42
3. Αποτελέσματα.....	46
3.1 Δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φύκη του γένους <i>Laurencia</i>	46
3.1.1 Αύξηση των στελεχών των μηκύτων.....	46
3.1.2 Μορφολογική ανάλυση κυττάρων <i>A.nidulans</i>	49
3.1.3 Σχηματισμός μεταλλαγμένων ανθεκτικών στελεχών	51
3.2 Δευτερογενείς μεταβολίτες από το το φυτό <i>Olea europaea</i>	53
3.2.1 Αύξηση των στελεχών των μηκύτων.....	53
3.2.2 Μορφολογική ανάλυση κυττάρων <i>A.nidulans</i> με μικροσκοπία φθορισμού	61
3.2.3 Σχηματισμός μεταλλαγμένων ανθεκτικών μυκητιακών στελεχών.....	63
3.2.4 Μελέτη της κινητικής πρόσληψης των φυσικών υποστρωμάτων παρουσία του χημικού αναλόγου υδροξυτυροσόλης 515.....	64
3.2.5 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας του χημικού αναλόγου υδροξυτυροσόλης 515	65
4.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων των δευτερογενών μεταβολιτών από φύκη του γένους <i>Laurencia</i>	69
4.2 Ανάλυση αποτελεσμάτων των δευτερογενών μεταβολιτών από το το φυτό <i>Olea europaea</i>	70
4.3 Συμπεράσματα.....	71
4.4 Νέες προοπτικές	72

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Εισαγωγή

Οι μύκητες αποτελούν μια από τις πολυπληθέστερες ομάδες ευκαρυωτικών οργανισμών, με περισσότερα από 400,000 είδη και απαντώνται στο χώμα, στον αέρα, στο νερό αλλά και σε απόσυντιθέμενη ύλη. Αναπαράγονται μέσω των σπορίων που παράγουν και κατατάσσονται με βάση τη μορφολογία και τη χρησιμότητά τους σε ζυμομύκητες (ή ζύμες) ή νηματοειδείς (ή μυκηλιακούς) και σε ωφέλιμους ή μη ωφέλιμους αντίστοιχα. Οι ωφέλιμοι συμμετέχουν στη διαδικασία της απόσύνθεσης, στην παραγωγή τροφίμων και ποτών αλλά και στη σύνθεση αντιβιοτικών. Αντίθετα, οι μη ωφέλιμοι μύκητες είναι υπεύθυνοι για την εμφάνιση πολλών φυτικών ασθενειών αλλά και αλλεργιών και λοιμώξεων στον άνθρωπο.

Έχουν ανιχνευθεί πάνω από 10,000 είδη μυκήτων τα οποία μπορούν να προσβάλλουν και κατά συνέπεια να προκαλέσουν προβλήματα στις καλλιέργειες φυτών. Τα πρώτα αντιμυκητοκτόνα δημιουργήθηκαν με σκοπό να προστατέψουν τις αγροτικές αυτές καλλιέργειες από τα καταστροφικά αποτελέσματα μόλυνσης από μύκητες (Suprarta 2016). Τα αντιμυκητιακά φάρμακα και τα φυτοφάρμακα που αναπτύχθηκαν συνέβαλαν σε μεγάλο βαθμό όχι μόνο στην προστασία αυτών καθαυτών των φυτών αλλά επιπλέον και των προϊόντων που αυτά παράγουν (Suprarta 2016). Ένας ακόμη λόγος της ραγδαίας ανάπτυξης του κλάδου των αντιμυκητιακών φαρμάκων ήταν η αύξηση του αριθμού των λοιμώξεων που οφείλονταν σε μύκητες, η οποία έγινε ιδιαίτερα αισθητή από 1980 και έπειτα. Η ραγδαία αύξηση των μυκητιάσεων οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην αύξηση των ανοσοκατεσταλμένων ατόμων, που τους κάνει πιο επιρρεπείς σε προσβολή από μύκητες (Ciociola et al. 2016). Για τους παραπάνω λόγους, κρίθηκε απαραίτητη η δημιουργία φαρμακευτικών ενώσεων που θα μπορούσαν να αντιμετωπίσουν αποτελεσματικά τις μολύνσεις από μύκητες και τις ανεπιθύμητες συνέπειές τους (Ciociola et al. 2016).

Παρόλο που η χρήση φαρμάκων έχει συμβάλει στην αντιμετώπιση ενός μεγάλου ποσοστού των μολύνσεων από μύκητες τόσο στα φυτά όσο και στον άνθρωπο, έχει επιπλέον δημιουργήσει μια σειρά από προβλήματα. Τέτοιου είδους είναι η τοξικότητά τους τόσο απέναντι στο περιβάλλον όσο και στην υγεία του

ανθρώπου καθώς και η ανθεκτικότητα που έχουν αναπτύξει τα μυκητιακά στελέχη ενάντια σε αντιμυκητιακές ενώσεις.

Για τους παραπάνω λόγους, κρίνεται απαραίτητη η ανάπτυξη νέων αποτελεσματικών φαρμακευτικών σκευασμάτων, ιδιαίτερα για την αντιμετώπιση των ανθεκτικών στα συμβατικά αντιμυκητιακά φάρμακα μυκητιάσεων. Η χρήση φυτών που περικλείουν φυσικούς αντιμυκητιακούς παράγοντες θα μπορούσε να συντελέσει στην αντιμετώπιση των ανθεκτικών μυκητιακών στελεχών καθώς και στη μείωση των αρνητικών συνεπειών από την αλόγιστη χρήση των φυτοφαρμάκων (Suprpta 2016). Στο επόμενο κεφάλαιο αναλύονται οι φυσικοί μεταβολίτες, φυτικής προέλευσης, και ταξινομούνται ανάλογα με τη χημική ένωση στην οποία οφείλεται η αντιμυκητιακή τους δράση.

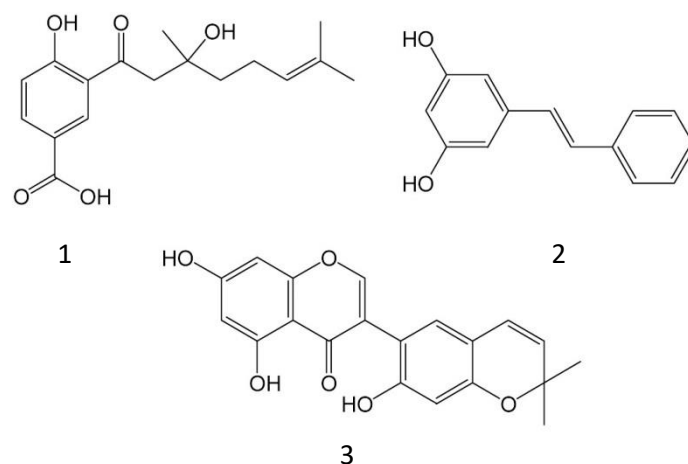
1.1 Αντιμυκητιακοί παράγοντες στα φυτά

Τα φυτά έχουν την ικανότητα να συνθέτουν πλήθος χημικών ενώσεων οι οποίες ασκούν προστατευτική δράση ενάντια σε μικροοργανισμούς. Έχουν ανακαλυφθεί πάνω από 13,000 τέτοιες ενώσεις, οι οποίες αντιπροσωπεύουν το 10% των συνολικών χημικών ενώσεων που παράγονται από φυτά. Η προστατευτική τους δράση οφείλεται στη μυρωδιά, τη γεύση ή στο χρώμα που παράγουν. Οι κυριότερες από τις χημικές αυτές ομάδες που έχουν ανιχνευτεί στα φυτά και που ασκούν αντιμυκητιακή δράση είναι: οι φαινόλες, τα флаβονοειδή, οι κουμαρίνες, οι κινόνες, οι σαπωνίνες, οι ξανθόνες, τα τερπενοειδή και τα αιθέρια έλαια, τα αλκαλοειδή, οι λεκτίνες και τα πολυπεπίδια (Suprpta 2016; Chandra et al. 2017; Ansari et al. 2013).

1.1.1 Φαινόλες

Οι φαινόλες αποτελούν μια ομάδα δευτερογενών φυτικών μεταβολιτών, χαμηλού μοριακού βάρους, που συντίθενται είτε κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης του φυτού ή ύστερα από μια στρεσογόνο κατάσταση όπως τραυματισμός, μόλυνση του φυτού ή έκθεση σε UV ακτινοβολία (Ansari et al. 2013). Ο αριθμός των υδροξυλικών ομάδων καθώς και η θέση στην οποία βρίσκονται στη

φαινόλη διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην τοξικότητά της απέναντι στους μύκητες (Arif et al. 2009; Arif et al. 2011; Castillo et al. 2012). Η ομάδα αυτή ασκεί αντιοξειδωτική και αντιμυκητιακή δράση (Ansari et al. 2013; Arif et al. 2011). Η αντιμυκητιακή τους δράση εξαρτάται από το είδος του μύκητα από τον οποίο έχει το φυτό προσβληθεί. Για παράδειγμα, έχει την ικανότητα να παρεμβαίνει στη ρευστότητα και τη δομική ακεραιότητα της μεμβράνης μυκήτων όπως οι *Candida albicans* και τα είδη του γένους *Aspergillus* (Ansari et al. 2013). Παραδείγματα φυτών τα οποία ασκούν αντιμυκητιακή δράση είναι τα *Gaullher Procumbens* και *Rhammus purshian*, από τα οποία έχουν απομονωθεί τανίνες και σαλικυλικό οξύ (που ανήκουν στις φαινόλες) (Arif et al. 2009) καθώς και το *Garcinia mangostana*, το οποίο έχει χαρακτηριστική αντιμυκητιακή δράση λόγω της 3-υδροξυ-4-γερανυλ-μεξοξυβιφενόλης (Dharmaratne et al. 2005). Η δομή των φαινολών κρασινερβικό οξύ, εριοσεμαόνη και πινοσυλβίνης, οι οποίες έχουν αντιμυκητιακή δράση (Arif et al. 2011), απεικονίζονται στην Εικόνα 1.1.

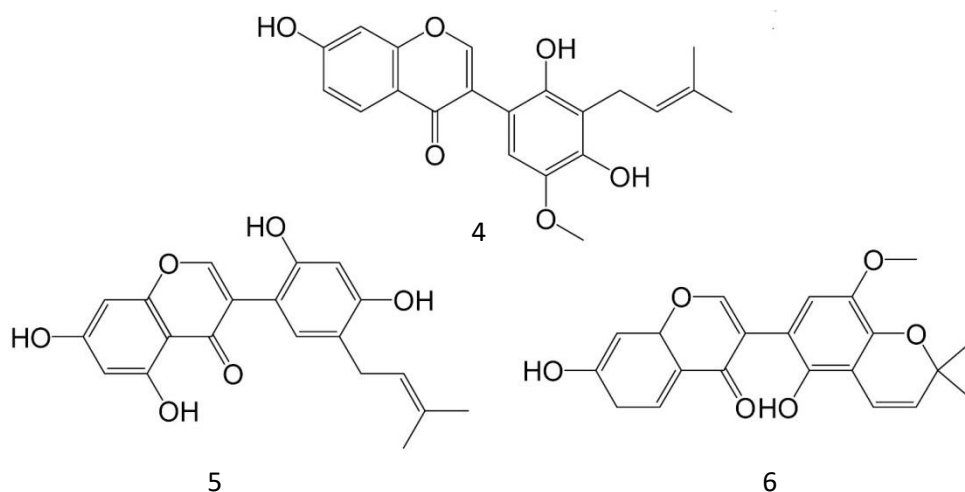


Εικόνα 1.1: Δομή των φαινολών κρασινερβικό οξύ (1), εριοσεμαόνη (2) και πινοσυλβίνης (3).

1.1.2 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή αποτελούν μια ομάδα φυτοχημικών που συναντώνται σε πλήθος φυτών καθώς και σε φρούτα, σπόρους και μέλι (Chandra et al. 2017). Εμφανίζουν αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντιαλλεργικές και αντιμυκητιακές ικανότητες (Chandra et al. 2017). Η αντιμυκητιακή δράση των φλαβονοειδών, συμπεριλαμβανομένων και των λιποφιλικών φλαβονοειδών, έγκειται στην

ικανότητά τους να σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων. Έχει διαπιστωθεί πως ένας μεγάλος αριθμός φλαβονοειδών ασκούν αντιμυκητιακή δράση. Ανάμεσα σε αυτούς βρίσκονται η αμεντοφλαβόνη που προέρχεται από το φυτό *Selaginella tamariscina* και η οποία δρα εναντίον μιας ευρείας γκάμας μυκήτων (Arif et al. 2011). Φλαβονοειδή που απόμονώθηκαν από πέντε είδη του γένους *moraceae* εμφανίζουν αντιμυκητιακή δράση έναντι των μυκήτων *C. albicans* και *S. cerevisiae* (Sohn et al. 2004). Τέλος, η αλλολιοισοφλαβόνη Α και οι πισκοφλαβόνες Α και Β, η δομή των οποίων απεικονίζεται στην Εικόνα 1.2, έχουν χαρακτηριστική αντιμυκητιακή δράση (Moriyama et al. 1992; Hariri et al. 2017).

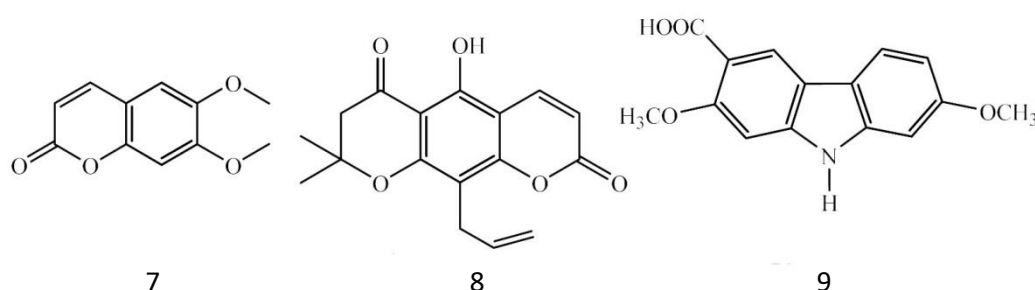


Εικόνα 1.2: Δομή των φλαβονοειδών αλλολιοισοφλαβόνη Α (4), πισκοφλαβόνες Α (5) και Β (6).

1.1.3 Κουμαρίνες

Οι κουμαρίνες είναι φαινολικές χημικές ενώσεις που αποτελούνται από βενζόλιο και έναν δακτύλιο α-πυρρολίου (Chandra et al. 2017). Είναι ιδιαίτερα διαδεδομένες ενώσεις καθώς ασκούν αντιφλεγμονώδη και αντιθρομβωτική λειτουργία. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει πως η δράση τους οφείλεται στην ικανότητά τους να προσελκύουν μακροφάγα στο σημείο της μόλυνσης. Επιπρόσθετα, έχει διαπιστωθεί πως ασκούν και αντιμυκητιακή δράση (Arif et al. 2009; Arif et al. 2011). Πιο συγκεκριμένα, η τιθονιαμαρίνη που έχει απόμονωθεί από το φυτό *Tithonia*

diversifolia (Yemele Bouberte et al. 2006) καθώς και η surangin B που έχει απόμονωθεί από το φυτό *Mammea longifolia* διαθέτουν αντιμυκητιακή δράση (Deng & Nicholson 2005). Ακόμη, η 6,7-διμεθοξυκουμαρίνη που έχει απόμονωθεί από το φυτό *P. digitatum* επιδρά αρνητικά στην ανάπτυξη του μύκητα *A. parasiticus* (Mohanlall & Odhav 2006). Υποστηρίζεται επίσης πως μια υποομάδα των κουμαρινών, οι φυτοαλεξίνες οι οποίες βρίσκονται στα καρότα, διαθέτουν αντιμυκητιακή δράση (Hoult & Paya 1996; Kawase et al. 2001). Η δομή των κουμαρινών 6,7-διμεθοξυκουμαρίνη, κλαουσεντίνη και κλαουζολίνη J απεικονίζεται στην Εικόνα 1.3.

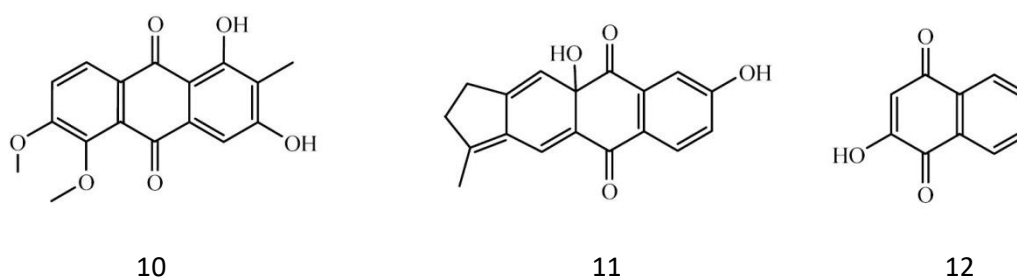


Εικόνα 1.3: Δομή των κουμαρινών 6,7-διμεθοξυκουμαρίνη (7), κλαουσεντίνη (8) και κλαουζολίνη J (9).

1.1.4 Κινόνες

Οι κινόνες είναι ιδιαίτερα δραστικά αρωματικά δαχτυλίδια τα οποία είναι υπεύθυνα για τον ιδιαίτερο χρωματισμό που απόκτούν τα φρούτα και τα λαχανικά σε περίπτωση τραυματισμού τους. Μπορούν μέσω οξειδωτικών αντιδράσεων να εναλλάσσονται μεταξύ της διφαινόλης ή υδροξυκινόνης και της δικετόνης ή κινόνης. Αποτελούν πηγή ελεύθερων ριζών και δημιουργούν σταθερά σύμπλοκα με νουκλεοφιλικά αμινοξέα. Έχει διαπιστωθεί πως οι κινόνες εμποδίζουν τη δράση ποικίλων πρωτεϊνών, όπως πολυπεπτίδια του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων, συγκολλητίνες και ένζυμα που προσδέονται στην κυτταρική μεμβράνη, δημιουργώντας σύμπλοκα μαζί τους τα οποία οδηγούν στην παρεμπόδιση της λειτουργίας των μυκήτων. Έχει διαπιστωθεί ένας περιορισμένος αριθμός ανθρακινονών και ναφθοκινονών που εμφανίζουν αντιμυκητιακή δράση.

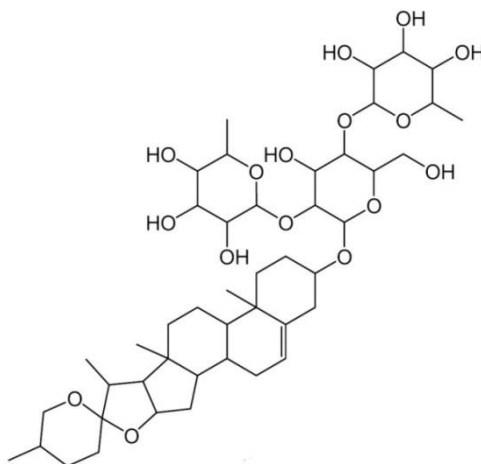
Επιγραμματικά αναφέρουμε το 1,3-διυδροξυ-2-μεθυλ-5,6-διμεθοξυανθρακινόνη που απόμονώθηκε από το φυτό *Prismatomeris fragrans* (Kanokmedhakul et al. 2005) και το *Hypericum perforatum* που απόμονώθηκε από το φυτό *Lawsonia inermis* (Qureshi et al. 1997). Επιπρόσθετα, μελέτη που διεξάχθηκε με τις ναφθοκινόνες κιγκελινόνη, ισοπινατάλη και λαπαχόλη που απόμονώθηκαν από το φυτό *Kigelia pinnata* απέδειξε την αντιμυκητιακή τους δράση (Arif et al. 2011). Η δομή των κινονών 1,3-διυδροξυ-2-μεθυλ-5,6-διμεθοξυανθρακινόνη, κιγκελινόνης και 2-υδροξυ-1,4-ναφθοκινόνη απεικονίζονται στην Εικόνα 1.4.



Εικόνα 1.4: Δομή των κινονών διυδροξυ-2-μεθυλ-5,6-διμεθοξυανθρακινόνη (10), κιγκελινόνης (11) και 2-υδροξυ-1,4-ναφθοκινόνη (12).

1.1.5 Σαπωνίνες

Οι σαπωνίνες είναι ανενεργοί φυτικοί δευτερογενείς μεταβολίτες, που απόθηκεύονται με τη μορφή γλυκοσυλιωμένων χημικών ενώσεων και μετατρέπονται σε ενεργούς μεταβολίτες που ασκούν προστατευτική δράση λειτουργώντας σαν αντιβιοτικά. Ενεργοποιούνται με τη βοήθεια ενζύμων, όταν στο φυτό εμφανιστεί κάποια μόλυνση (Arif et al. 2011; Chandra et al. 2017). Οι σαπωνίνες μινουτοσίδη Α, Β, C, η αλιογενίνη και η νεοαγενίνη που παράγονται από το φυτό *Allium minutiflorum* καθώς και η διοσίνη από το φυτό *Dioscorea cayenensis* εμφανίζουν έντονη αντιμυκητιακή δράση (Barile et al. 2007; Sautour et al. 2004). Πλήθος άλλων σαπωνινών που έχουν απόμονωθεί από φυτά όπως τα *Hedera colchica*, *Kalopanax pictus*, *Trillium grandiflorum* και *Solidago virgaurea* εμφανίζουν αντιμυκητιακή δράση (Arif et al. 2011). Η δομή της σαπωνίνης διοσίνης απεικονίζονται στην Εικόνα 1.5.

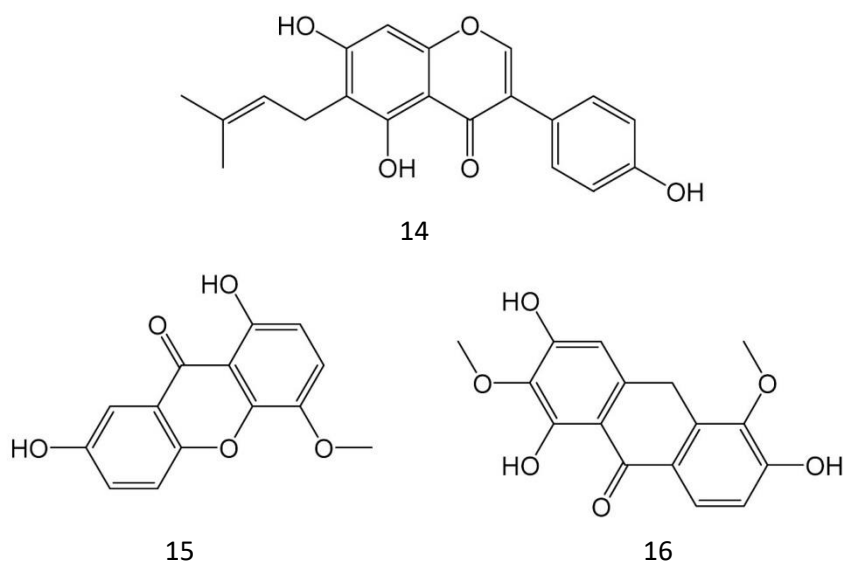


13

Εικόνα 1.5: Δομή της σαπωνίνης διοσίνης (13).

1.1.6 Ξανθόνες

Οι ξανθόνες, οι οποίες παρουσιάζουν ομοιότητες με τα φλαβονοειδή, ανήκουν στην ομάδα των πολυφαινολών. Αποτελούνται από εξι άτομα άνθρακα που είναι τοποθετημένα σε έναν δακτύλιο, που αποτελείται από δυο βενζόλια, δημιουργώντας έναν βασικό άξονα στον οποίο προσδένονται ποικίλες ομάδες. Έχουν πολύ ιδιαίτερη δομή, η οποία είναι υπεύθυνη για πλήθος από τις ιδιότητές τους. Πλήθος ξανθονών έχουν χαρακτηριστική αντιμυκητιακή δράση (Arif et al. 2011). Για παράδειγμα, η ισοπρενυλιωμένη ξανθόνη που έχει απόμονωθεί από το φυτό *Cudrania fruticosa* καθώς και η κουδραφρουτοξανθόνη που δρα ενάντια στον μύκητα *C. albicans* (Xie et al. 2006). Επιπρόσθετα, οι ξανθόνες βιτεόνη, 1,7-διυδρο-4-μεθοξανθόνη και τριδροξυ-2,5-διμεθοξυξανθόνη που παράγονται από τα φυτά *Securidaca longepedunculata* (Wang et al. 2005; Joseph et al. 2006) και *Monnina obtusifolia* αντίστοιχα εμφανίζουν αντιμυκητιακή δράση (Pinto et al. 1994). Η δομή των ξανθονών βιτεόνη, 1,7-διυδρο-4-μεθοξανθόνη και τριδροξυ-2,5-διμεθοξυξανθόνη απεικονίζονται στην Εικόνα 1.6.

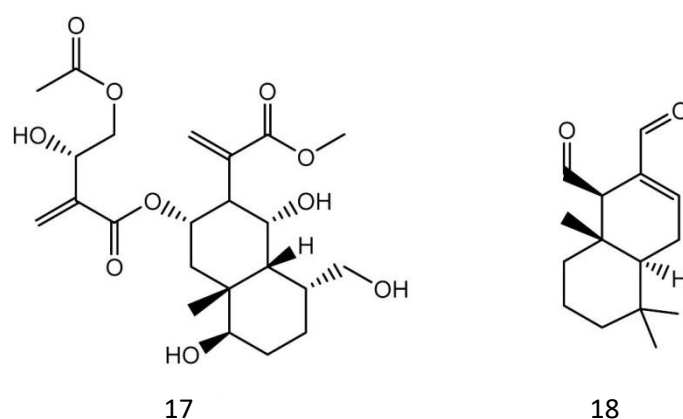


Εικόνα 1.6: Δομή των ξανθονών βιτεόνη (14), 1,7-διωδρο-4-μεθοξανθόνη (15) και τριδροξυ-2,5-διμεθοξυξανθόνη (16).

1.1.7 Τερπενοειδή, τερπένια και αιθέρια έλαια

Έχει διαπιστωθεί πως ισχυρή αντιμυκητιακή δράση ασκείται επίσης από τα τερπενοειδή καθώς και τα αιθέρια έλαια. Τα τελευταία αποτελούν δευτερογενείς φυτικούς μεταβολίτες τα οποία αποτελούνται από τερπένια και έχουν τη μοριακή φόρμουλα $C_{10}H_{16}$ (Chandra et al. 2017). Τα τερπένια ταξινομούνται σε ομάδες ανάλογα με τον αριθμό των ομάδων πεντανθράκων που έχουν (Castillo et al. 2012). Πιο συγκεκριμένα χωρίζονται σε: μονοτερπένια (διαθέτουν δυο ομάδες πεντανθράκων), σεσκιτερπένια (διαθέτουν τρεις ομάδες πεντανθράκων), διτερπένια (διαθέτουν τέσσερις ομάδες πεντανθράκων), τριτερπένια (διαθέτουν έξι ομάδες πεντανθράκων), τετρατερπένια (διαθέτουν οκτώ ομάδες πεντανθράκων) και πολυτερπένια (που διαθέτουν $n > 8$ ομάδες πεντανθράκων) (Castillo et al. 2012). Όταν τα τερπένια διαθέτουν επιπλέον το χημικό στοιχείο οξυγόνο, τότε ονομάζονται τερπενοειδή (Chandra et al. 2017). Έχει διαπιστωθεί πως το μεγαλύτερο ποσοστό αντιμυκητιακής δράσης ασκείται από τα σεσκιτερπένια (Arif et al. 2011). Παρόλο που ο ακριβής μηχανισμός δράσης τους δεν έχει διευκρινιστεί, υποστηρίζεται πως συμβάλλουν στην απόδόμηση της μεμβράνης των μυκήτων. Οι Mendoza και συνεργάτες διαπίστωσαν πως ενισχύοντας την υδροφιλία των διτερπενοειδών καουρενίου ύστερα από πρόσθεση μιας μεθυλομάδας,

προκλήθηκε δραστική ελλάτωση της αντιμυκητιακής τους δράσης (Mendoza et al. 1997). Υπάρχει πλήθος τερπενίων με αντιμυκητιακή δράση, επιγραμματικά αναφέρουμε τα παρακάτω: δυο τετρακυκλικά τριτερπένια από το φυτό *Ailantus excelsa*, το αϊλεξελόν και το αϊλεξελόλ διαπιστώθηκε πως έχουν αντιμυκητιακή δράση (Srinivas et al. 2006). Οι Starks και συνεργάτες διαπίστωσαν επιπλέον την αντιμυκητιακή δράση των γλυκοσιδίων που βρίσκονται σε τριτερπενοειδή του φυτών *Solidago virgaurea* και *Bellis perennis*, ιδιαίτερα απέναντι στα είδη των γενών *Candida* και *Cryptococcus* (Starks et al. 2010). Επιπρόσθετα, αντιμυκητιακή δράση ασκείται από την αττικίνη που παράγεται από το φυτό *C. attica* (Meng et al. 2001) και από την 1-β-(π-μεθοξυκιναμο)πολυγοδιόλη που προέρχεται από το φυτό *Drimys brasiliensis* (Haraguchi et al. 1996). Η δομή των τερπενίων αττικίνη και 1-β-(π-μεθοξυκιναμο)πολυγοδιόλη απεικονίζεται στην Εικόνα 1.7.

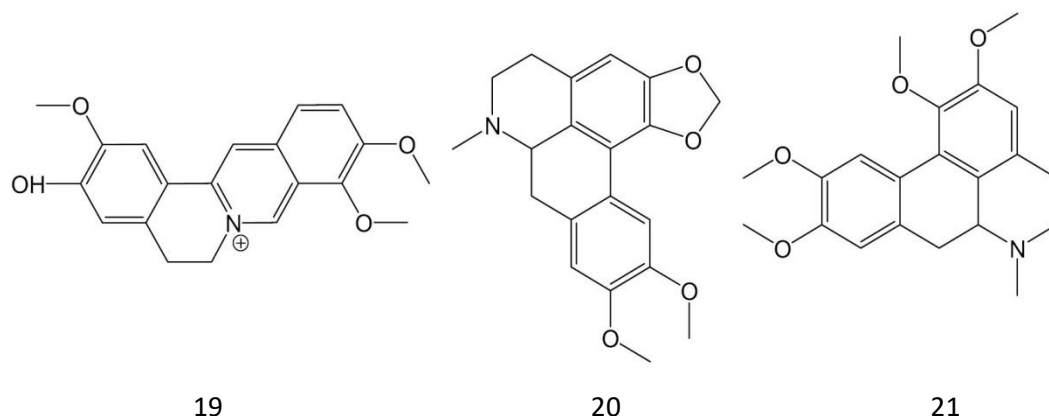


Εικόνα 1.7: Δομή των τερπενίων αττικίνη (17) και 1-β-(π-μεθοξυκιναμο)πολυγοδιόλη (18).

1.1.8 Αλκαλοειδή

Τα αλκαλοειδή, μια ομάδα ετεροκυκλικών νιτρικών ενώσεων, βρίσκονται κατα κόρον στα αγγειόσπερμα φυτά. Ο καφές και η μορφίνη περιέχουν μεγάλη συγκέντρωση των χημικών αυτών ενώσεων (Chandra et al. 2017; Arif et al. 2011). Παρόλο που τα αλκαλοειδή είναι ιδιαίτερα χρήσιμα στην αντιμετώπιση μολύνσεων, μπορούν να γίνουν τοξικά εάν χρησιμοποιηθούν σε υψηλές συγκεντρώσεις (Chandra et al. 2017). Παραδείγματα αλκαλοειδών με προστατευτική δράση έναντι

των μυκήτων είναι η ιατροριζίνη από το φυτό *Mahonia aquifolium* (Jung et al. 2006). Τα αλκαλοειδή δικεντρίνη και γλαυκίνη από το φυτό *Glaucium oxylobum* παρουσιάζουν ευρεία δράση έναντι ενός μεγάλου αριθμού μυκήτων (Singh et al. 2000). Η δομή των παραπάνω αλκαλοειδών απεικονίζεται στην Εικόνα 1.8.



Εικόνα 1.8: Δομή των αλκαλοειδών ιατροριζίνη (19), δικεντρίνη (20) και γλαυκίνη (21).

1.1.9 Λεκτίνες και πολυπεπτίδια

Η δράση των φυτικών πολυπεπτιδίων έναντι των μικροοργανισμών ανιχνεύθηκε πολύ νωρίς, ήδη από το 1942. Η πλειοψηφία των πεπτιδίων αυτών είναι θετικά φορτισμένα και αποτελούνται από δισουλφιδικούς δεσμούς. Ο μηχανισμός δράσης τους είναι διττός: προωθούν το σχηματισμό ιοντικών καναλιών στην επιφάνεια των μυκήτων ή παρεμποδίζουν την πρόσδεση των μυκήτων στους πολυσακχαρδικούς υποδοχείς του ξενιστή. Έχει ανακαλυφθεί πλήθος πολυπεπτιδίων που έχουν χαρακτηριστική αντιμυκητιακή δράση όπως η πρωτεΐνη AFP-J από το φυτό *Solanum tuberosum*, η πρωτεΐνη χιτινάση Β από το φυτό *Ananas comosus*, δυο πρωτεΐνες που δημιουργούν σύμπλοκα με χιτίνες από το φυτό *Evoonymus europaeus* αλλά και οι πρωτεΐνες α- και β-βασρουβίνη από το φυτό *Basella rubra* (Arif et al. 2011; Arif et al. 2009).

1.2 Το πρόβλημα της ανθεκτικότητας στα αντιμυκητιακά φάρμακα

Η καταγραφή περισσότερων από 300 εκατομμύρια ασθενών που πάσχουν από μυκητίαση κατέστησε απαραίτητη την ανάπτυξη σκευασμάτων για την καταπολέμηση των μολυσματικών στελεχών (Sharma & Chowdhary 2017). Τα αντιμυκητιακά αυτά σκευάσματα χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες με βάση το βασικό συστατικό στο οποίο οφείλεται η αντιμυκητιακή τους δράση: τις αζόλες, τις εχινοκανδίνες και τα πολυένια. Η κάθε ομάδα διαθέτει διαφορετικό μηχανισμό αντιμετώπισης των μυκήτων και παρουσιάζει αυξημένη και αποτελεσματική τοξικότητα σε ορισμένα μυκητιακά στελέχη. Η αλόγιστη όμως χρήση των φαρμάκων αυτών, σε συνδυασμό με τη φυσική ικανότητα ορισμένων μυκήτων να αντιμετωπίζουν τις διαθέσιμες θεραπείες οδήγησε στη δημιουργία ανθεκτικών στελεχών (Wiederhold 2017). Στο κεφάλαιο αυτό αναλύονται οι τρεις χημικές ομάδες στις οποίες βασίζονται οι σημερινές αντιμυκητιακές ενώσεις, οι μύκητες τους οποίους στοχεύουν, καθώς και ο μηχανισμός ανθεκτικότητας που έχουν αναπτύξει τα εκάστοτε στελέχη.

1.2.1 Ανθεκτικότητα στις αζόλες

Τα φάρμακα που έχουν ως βασικό συστατικό τους τις αζόλες, όπως η ιτρακοναζόλη, η φλουκοναζόλη, η βορικοναζόλη και ποσακοναζόλη, χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση των διαφόρων μορφών ασπεργίλλωσης και καντιντίασης. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν αποδείξει πως τα είδη του γένους *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium* και *Candida*, ιδιαίτερα το *C. glabrata* και το *C. krusei*, παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στις αζόλες (Perlin et al. 2017). Στην περίπτωση του γένους *Aspergillus*, η ανθεκτικότητα αυτή αποδίδεται στην αλόγιστη χρήση των φαρμάκων αυτών σε ασθενείς για μεγαλύτερο από το απαραίτητο χρονικό διάστημα καθώς και στη χρήση τους ως προληπτικό μέσο προφύλαξης από μυκητιάσεις. Επιπρόσθετα, η χρήση παρασιτοκτόνων που έχουν

ως βασικό συστατικό τους τις αζόλες, επιδείνωσε περαιτέρω το ήδη υπάρχον πρόβλημα (Perlin et al. 2017).

Τα φάρμακα που έχουν ως βασικό τους συστατικό τις αζόλες, ασκούν αντιμυκητιακή δράση εμποδίζοντας τη μετατροπή της λανοστερόλης σε εργοστερόλη (Parente-Rocha et al. 2017). Η εργοστερόλη αποτελεί δομικό συστατικό της μεμβράνης των μυκήτων, ενώ η λειτουργία της εργοστερόλης στα κύτταρα ζωικής προέλευσης επιτελείται απο μια άλλη στερόλη, την χοληστερόλη (Bagiński et al. 1989). Ο τρόπος δράσης των φαρμάκων που έχουν ως βασικό συστατικό τους τις αζόλες, έγκειται στην ικανότητάς τους να ρυθμίζουν αρνητικά τη λειτουργία της 14α-διμεθυλάσης, ενός ενζύμου της ομάδας του κυτοχρώματος P450 (Parente-Rocha et al. 2017). Ο πιο ευρέως διαδεδομένος μηχανισμός ανθεκτικότητας μυκήτων στις αζόλες σχετίζεται με την ικανότητα αποβολής του φαρμάκου από το εσωτερικό των κυττάρων του μύκητα, με αποτέλεσμα τη μειωμένη ενδοκυτταρική συγκέντρωση του φαρμάκου. Τα ένζυμα που εμπλέκονται στο μηχανισμό αυτό κωδικοποιούνται από την ομάδα γονιδίων που αλληλεπιδρά με το ATP (ABC transporters) ή από την επονομαζόμενη ομάδα MFS (Major Facilitator Family). Η ομάδα MFS κωδικοποιεί ένζυμα τα οποία συμμετέχουν στη μεταφορά ενώσεων διάμεσου της κυτταρικής μεμβράνης (Cowen et al. 2015; Perlin et al. 2017). Πιο συγκεκριμένα, τα ένζυμα αυτά διαθέτουν μια ποικιλία διπλών διαμεμβρανικών σπειροειδών δομών (TMS) και χρησιμοποιούν την ηλεκτροχημική κινητήρια ενέργεια που προκαλείται απο τη διαφορά φορτίου και pH προκειμένου να αποβάλλουν απο το εσωτερικό των μικροοργανισμών τα αντιμυκητιακά φάρμακα. Συνήθως αποτελούνται απο 12 ή 14 δομές TMS. Παρόλα αυτά δεν εμπλέκονται όλες οι TMS δομές στην ανθεκτικότητα στις αζόλες. Παρόλο που το γονιδίωμα της *C. albicans* κωδικοποιεί για 95 τέτοια γονίδια, μόνο ένα MFS γονίδιο εμπλέκεται στην αντίσταση στην αζόλη και κωδικοποιείται, πέρα απο την *C. albicans*, από την *C. dubliniensis* (Cowen et al. 2015). Ο δεύτερος μηχανισμός αντίστασης οφείλεται στη δημιουργία βιομεμβράνης στην επιφάνεια κυττάρων, όπως στα επιθηλιακά κύτταρα. Η βιομεμβράνη είτε δεν επιτρέπει στο φάρμακο να δράσει αποτελεσματικά ή προωθεί άλλους μικροβιακούς μηχανισμούς που επιτρέπουν την ανθεκτικότητα στο φάρμακο. Το φάρμακο παγιδεύεται σε μια

πλούσια σε γλυκάνες περιοχή με αποτέλεσμα την μείωση της συγκέντρωσής του (Ramage et al. 2012; Nett et al. 2010).

1.2.2 Ανθεκτικότητα στις εχινοκανδίνες

Τα φάρμακα που βασίζονται στις εχινοκανδίνες, όπως η ανιντουλαφουγκίνη, η κασποφουγκίνη και η μिकाφουνγκίνη χρησιμοποιούνται κυρίως για την αντιμετώπιση των μολύνσεων από το γένος *Candida*. Υποστηρίζεται πως το 60% των ασθενών που έχουν προσβληθεί από το στέλεχος *Candida* έχουν λάβει θεραπεία που βασίζεται στις εχινοκανδίνες (Perlin et al. 2017). Οι εχινοκανδίνες δεν παρουσιάζουν την ίδια αποτελεσματικότητα με όλα τα είδη του γένους *Candida*. Πιο συγκεκριμένα, έχουν χαμηλότερη αποτελεσματικότητα στα είδη *Candida parapsilosis* και *Candida guilliermondii*. Επιπρόσθετα, δεν είναι αποτελεσματικά απέναντι στα γένη *Cryptococcus*, *Trichosporon* και *Rhodotorula* (Perlin et al. 2017). Λόγω της αλόγιστης χρήσης των φαρμάκων αυτών, έχει παρατηρηθεί ανθεκτικότητα των περισσότερων ειδών του γένους *Candida* έναντι των εχινοκανδινών. Ανησυχία προκαλεί το γεγονός πως το είδος *C. glabrata* εμφανίζει ανθεκτικότητα τόσο στη θεραπεία με εχινοκανδίνες όσο και με αζόλες, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας μυκητιακής σειράς με πολυανθεκτικότητα σε αντιμυκητιακά φάρμακα (Perlin et al. 2017).

Η αντιμυκητιακή δράση των φαρμάκων που έχουν ως κύριο συστατικό τις εχινοκανδίνες έγκειται στην ικανότητά τους να παρεμποδίζουν τη δράση της συνθάσης 1,3β-D-γλυκάνης και κατά συνέπεια τη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων (Sharma & Chowdhary 2017).

Η ανθεκτικότητα των μυκήτων στις εχινοκανδίνες οφείλεται σε σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο *FKS*, το οποίο κωδικοποιεί για το ένζυμο συνθάση της γλυκάνης. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί πως οι μεταλλάξεις αφορούν τα γονίδια *FKS1* και *FKS2* για το γένος *Candida* και για το είδος *C. glabrata* αντίστοιχα. Στην περίπτωση του γονιδίου *FKS1* έχει διαπιστωθεί πως οι συχνότερες μεταλλάξεις προκύπτουν στο αμινοξύ σερίνη στη θέση 641 ή στη θέση 645 και είναι υπεύθυνες για το 90% των ανθεκτικών στις εχινοκανδίνες στελεχών (Garcia-Effron et al. 2009; Katiyar et al. 2012). Η ανθεκτικότητα του γένους *Candida* λόγω της μετάλλαξης αυτής οφείλεται στο γεγονός πως αλλάζει η τρισδιάστατη δομή του ενζύμου στο

χώρο με αποτέλεσμα να μειώνεται η ικανότητα του φαρμάκου να προσδένεται σε αυτό κατά 50-300 φορές (Sharma & Chowdhary 2017). Επιπρόσθετα, έχει αποδειχθεί σε πειράματα *in vitro* πως στελέχη του μύκητα *Aspergillus* και *Candida* μπορούν να επιβιώσουν σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις φαρμάκου, γεγονός που βρίσκεται σε άμεση σύνδεση με την αυξημένη σύνθεση της χιτίνης του κυτταρικού τοιχώματος (Cowen et al. 2015; Gardiner et al. 2005). Μια ακόμη πρωτεΐνη που υποστηρίζεται πως συνδέεται με την ανθεκτικότητα των μυκήτων στα φάρμακα με κύριο συστατικό την εχινοκανδίνη είναι η Hsp90. Η πρωτεΐνη Hsp90 παίζει ρυθμιστικό ρόλο σε ένα σύνολο πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην κυτταρική σηματοδότηση. Πιο συγκεκριμένα, η Hsp90 ενεργοποιεί την έκφραση της πρωτεΐνης καλσινευρίνης, η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί ένα σύνολο πρωτεϊνών που προωθούν την κυτταρική επιβίωση (Sharma & Chowdhary 2017).

1.2.3 Ανθεκτικότητα στα πολυένια

Τα πολυένια αποτελούν την παλαιότερη ομάδα αντιμυκητιακών φαρμάκων και περιλαμβάνουν κυρίως τα φάρμακα αμφοτερικίνη Β και νυστατίνη. Χρησιμοποιήθηκαν για την αντιμετώπιση μιας ευρείας γκάμας μυκητιάσεων, κυρίως για διεισδυτικές μυκητιάσεις όπως διειδυτική ασπεργίλλωση, κρυπτοκοκκίωση, βλαστοκοκκίωση, καντιντίαση, κοκκιδιομύκωση και ιστοπλάσμωση (Cowen et al. 2015). Παραδείγματα μυκήτων που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην αμφοτερικίνη Β είναι τα είδη του γένους *Scedosporium*, *Fusarium* καθώς και τα είδη *Trichosporon*, *Sporothrix schenckii*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. calidoustus*, *A. lentulus*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. rugosa*, *C. lusitaniae*, και *C. tropicalis* (Perlin et al. 2017). Στις παρενέργειες της θεραπείας με πολυένια περιλαμβάνεται η τοξικότητα που ασκεί στα νεφρά καθώς και το γεγονός πως αποτελεί μια υψηλού κόστους θεραπεία (Perlin et al. 2017).

Η αντιμυκητιακή δράση των πολυενίων έγκειται στην ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με την εργοστερόλη (Parente-Rocha et al. 2017). Υπάρχουν δυο θεωρίες σχετικά με τον τρόπο δράσης των πολυενίων. Σύμφωνα με την πρώτη ο ρόλος του φαρμάκου είναι διττός: το σύμπλοκο φάρμακο-εργοστερόλη που δημιουργείται στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων, η έκταση του οποίου

εξαρτάται από τη συγκέντρωση του φαρμάκου, οδηγεί στη δημιουργία πόρων στην επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης των μυκήτων και επιτρέπει την αποβολή ιόντων Na^+ και K^+ και άλλων απαραίτητων για τα κύτταρα συστατικών οδηγώντας στην απορρύθμιση της ωσμωτικής ισορροπίας και συνεπώς στην απόπτωση των κυττάρων (Sharma & Chowdhary 2017). Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί πως η αμφοτερικίνη Β μπορεί να αποσπάσει την εργοστερόλη από την πλασματική μεμβράνη των μυκήτων, οδηγώντας στη δημιουργία εξωκυτταρικών συμπλόκων. Η δεύτερη θεωρία υποστηρίζει πως η δράση των πολυενίων οφείλεται αποκλειστικά στην ικανότητά τους να αποσπούν την εργοστερόλη από την κυτταρική μεμβράνη (Parente-Rocha et al. 2017).

Συμπερασματικά, η ανάγκη για ανάπτυξη νέων σκευασμάτων λόγω της ανθεκτικότητας των μυκητιακών στελεχών στα ήδη υπάρχοντα είναι επιτακτική. Ένας αριθμός πιο εξελιγμένων χημικών ενώσεων, οι οποίες βρίσκονται ακόμα σε πειραματικό στάδιο, όπως οι ενώσεις CD101 και SCY-078, που στοχεύουν τη συνθάση της γλυκάνης, και η T-2307, που στοχεύει τη δομή της μεμβράνης των μιτοχονδρίων των μυκήτων, διατηρούν ελπίδες για την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση των ανθεκτικών μυκητιακών στελεχών στα ήδη υπάρχοντα φάρμακα (Wiederhold 2017). Πιο συγκεκριμένα, αποτελέσματα μελετών *in vitro* και *in vivo* έδειξαν πως τόσο η ένωση CD101, η οποία έχει πολύ υψηλή διάρκεια ημιζωής, όσο και η ένωση SCY-078, είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές απέναντι σε είδη του γένους *Candida* και *Aspergillus*. Επιπλέον, η ένωση T-2307 έχει χαρακτηριστική αντιμυκητιακή δράση γενικότερα σε είδη του γένους *Candida* αλλά και ειδικότερα σε είδη που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στις αζόλες και στις εχινοκανδίνες, όπως στα είδη *C. albicans* και *C. glabrata*. Επιπλέον *in vitro* μελέτες έχουν δείξει πως η ένωση αυτή είναι αποτελεσματική σε είδη του γένους *Aspergillus* και του γένους *Cryptococcus* (Wiederhold 2017). Παρόλα αυτά, επιπλέον πειράματα και μελέτες τόσο σε προκλινικό όσο και σε κλινικό επίπεδο είναι απαραίτητες προτού τα σκευάσματα αυτά χαρακτηριστούν επιτυχή στην αντιμετώπιση των μυκήτων.

1.3 Η δομή, λειτουργία και παθογένεια ειδών *Aspergillus* σε φυτά και ζώα

1.3.1 Γενικό Μέρος

Η ασπεργίλλωση αποτελεί μια ευρέως διαδεδομένη ασθένεια, η οποία προκαλείται από είδη του γένους *Aspergillus* (Richardson & Warnock 2012). Οι σαπροφυτικοί αυτοί μύκητες βρίσκονται κυρίως στο χώμα αλλά και σε λαχανικά που βρίσκονται σε κατάσταση αποσύνθεσης. Επιπλέον, ανιχνεύονται στον αέρα, στη σκόνη αλλά και στις νοσοκομειακές εγκαταστάσεις (Richardson & Warnock 2012). Μέσα από τους σπόρους που παράγουν, τα κονίδια, μπορούν να προσβάλλουν τα φυτά, τα ζώα και τον άνθρωπο. Οι παράγοντες που αυξάνουν την πιθανότητα μόλυνσης από ασπέργιλιο είναι η ύπαρξη αλλεργικής αντίδρασης στο στέλεχος καθώς και η λειτουργικότητα του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή, καθώς οι οργανισμοί στους οποίους υπάρχει ανοσοκαταστολή εμφανίζουν μεγαλύτερη πιθανότητα προσβολής από τον ασπέργιλιο (Richardson & Warnock 2012). Το γένος *Aspergillus* αριθμεί πάνω από 200 είδη.

1.3.2 Η δομή και η λειτουργία του μύκητα *A. nidulans*

Ο ασκομύκητας *Aspergillus nidulans* διαθέτει τόσο σεξουαλική όσο και ασεξουαλική αναπαραγωγή (Todd et al. 2007). Οι κονιδιακές κεφαλές έχουν μέγεθος 3-5μm και σχηματίζουν αποικίες με πράσινο συνήθως χρώμα (Sugui et al. 2014). Μπορεί να προκαλέσει διεισδυτική ασπεργίλλωση σε άτομα που πάσχουν από χρόνια κοκκιωματώδη νοσήματα, ενώ σπάνια προκαλεί ασπεργίλλωση σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα (Henriet et al. 2013). Ο ασεξουαλικός κύκλος αναπαραγωγής περιλαμβάνει τη δημιουργία υφών οι οποίες εκκίνονται μακριά από το σημείο εγκαθίδρυσης του κονιδίου. Επιπλέον, υφές που εκκίνονται προς την ατμόσφαιρα και το φως συντελούν στη δημιουργία των κονιδιοφόρων, τα οποία όπως προαναφέραμε είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των κονιδίων. Κατά τον σεξουαλικό κύκλο αναπαραγωγής του *Aspergillus nidulans* παράγονται τα ασκοσπόρια, τα οποία αποτελούν σεξουαλικά σπόρια που παράγονται με τη

διαδικασία της μείωσης, και τα οποία βρίσκονται μέσα σε ειδικές δομές που ονομάζονται κλειστοθήκια (Sugui et al. 2014). Τα κλειστοθήκια παράγονται από κύτταρα με ποικιλόμορφο σχήμα, παχύ τοίχωμα και διάμετρο 10-15μm, τα κύτταρα Hulle, και χρησιμεύουν στην ευκολότερη διασπορά των σπορίων του μύκητα (Sugui et al. 2014). Μελέτες έχουν δείξει πως ένα κλειστοθήκιο μπορεί να περιέχει μέχρι 80,000 ασκοσπόρια, τα οποία διατρύπουν το τοίχωμα των κλειστοθηκίων όταν βρεθούν στο φυσικό τους περιβάλλον (Dyer & O’Gorman 2012). Συνθήκες όπως χαμηλά επίπεδα φωτός, ισοροπημένο pH και ισοροπημένα επίπεδα θρεπτικών στοιχείων συντελούν σε επιτυχημένο σεξουαλικό κύκλο αναπαραγωγής. Επιπλέον ο μύκητας αυτός χρησιμοποιείται ως πρότυπο μοντέλο μελέτης των γονιδίων που εμπλέκονται στον σεξουαλικό κύκλο αναπαραγωγής του γένους *Aspergillus* λόγω της ευκολίας με την οποία προωθείται κάτω από εργαστηριακές συνθήκες ο σεξουαλικός κύκλος αναπαραγωγής (Dyer & O’Gorman 2012).

1.3.3 Η δομή και η λειτουργία του μύκητα *A. flavus*

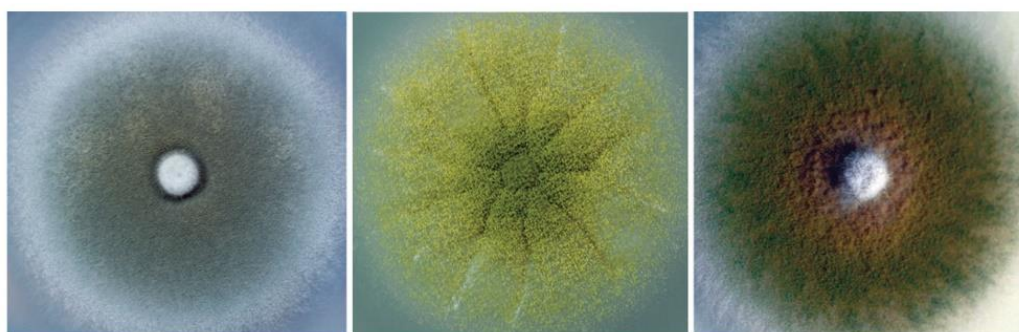
Όπως και όλα τα είδη του γένους *Aspergillus*, το *Aspergillus flavus* είναι ένας σαπροφυτικός μύκητας που το φυσικό του ενδιαίτημα είναι το έδαφος (Amaiike & Keller 2011). Το γονιδίωμα του έχει μέγεθος 36.8Mb και κωδικοποιεί για περισσότερα από 12,000 γονίδια (Yu et al. 2004; Cleveland et al. 2009). Μπορεί να προσβάλλει και να προκαλέσει ανεπανόρθωτες ζημιές σε αγροτικά προϊόντα όπως το βαμβάκι, τα φιστίκια και τον αραβόσιτο. Ήδη από πολύ νωρίς διαπιστώθηκε πως αναπαράγεται ασεξουαλικά και προσβάλλει φυτά με τη μορφή των μυκηλίων, ενώ στο έδαφος βρίσκεται με τη μορφή κονιδίων, τα οποία έχουν μέγεθος 2-3,5μm και είναι διαταγμένα σε απλή ή διπλή σειρά φιαλιδίων (Amaiike & Keller 2011; Sugui et al. 2014). Αν και έχει μεγάλο εύρος κατανομής, βρίσκεται συνήθως σε θερμά κλίματα. Τα κονίδια μπορούν να επιβιώσουν κάτω από δυσμενείς συνθήκες και να παράγουν και πάλι κονίδια όταν το περιβάλλον είναι θερμό και ξηρό (Amaiike & Keller 2011). Μεταφέρονται στα σιτηρά και στα φυτά όχι μόνο μέσω του αέρα, αλλά και λόγω των τραυματισμών που προκαλούνται σε αυτά από έντομα και πτηνά. Οι τραυματισμοί αυτοί σε συνδυασμό με το ευνοϊκό περιβάλλον ενισχύουν

τη δημιουργία αποικιών (κίτρινες ή κιτρινοπράσινες κονιδιακές κεφαλές). Μπορεί να προσβάλλει ζώα αλλά και ανθρώπους, ιδίως αυτούς με μειωμένη ικανότητα ανοσοκαταστολής, μέσω της κατανάλωσης τροφής που έχει προσβληθεί από τον εν λόγω μύκητα, προκαλώντας Διεισδυτική Ασπεργίλλωση (Payne 1998; Horn & Pitt 1997; Sugui et al. 2014). Η ικανότητά του αυτή οφείλεται κυρίως στην παραγωγή της αφλατοξίνης, ενός δευτερογενούς μεταβολίτη με καρκινογόνες και μεταλλαξιγόνες ιδιότητες (Klich 2007). Πέρα από τον ασεξουαλικό κύκλο αναπαραγωγής, μπορεί να αναπαραχθεί και σεξουαλικά, μέσω των ασκοσπορίων τα οποία αναπτύσσονται μέσα σε σκληρώτια (Horn et al. 2009). Το είδος *Aspergillus flavus* μπορεί να προκαλέσει οικονομική καταστροφή λόγω της ικανότητάς του να προσβάλλει αγροτικά προϊόντα, ελαττώνοντας όχι την ποσότητα αλλά την ποιότητα της παραγωγής (Amaiike & Keller 2011). Περιοχές όπως η Αφρική, ιδίως η Κένυα, αλλά και η Ασία, έχουν υποστεί μεγάλες ζημιές σε αγροτικά προϊόντα αλλά και σε ανθρώπινες απώλειες από τον μύκητα αυτό (Lewis et al. 2005; Yu et al. 2008).

1.3.4 Η δομή και η λειτουργία του μύκητα *A. fumigatus*

Ο μύκητας *Aspergillus fumigatus* βρίσκεται στον αέρα αλλά και στο έδαφος και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανακύκλωση του αζώτου και του άνθρακα. Επιπλέον, συμμετέχει στην αποσύνθεση της οργανικής ύλης, τόσο φυτικής όσο και ζωικής προέλευσης, αν και μελέτες δείχνουν πως σχετίζεται σε μεγαλύτερο βαθμό με την αποσύνθεση φυτικής παρά ζωικής ύλης. Είναι θερμοανθεκτικός, καθώς έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες υψηλότερες των 37°C, αναπαράγεται ασεξουαλικά, μέσω των κονιδίων και σχηματίζει αποικίες με πράσινο ή κίτρινο χρώμα. Τα κονίδια αποτελούν λοιμώδη σπόρια, παράγονται από κοντούς κονιδιοφορείς και το μέγεθός τους κυμαίνεται μεταξύ 2-3,5μm (van de Veerdonk et al. 2017; Sugui et al. 2014). Αν και μέχρι πρόσφατα υποστηριζόταν πως ο *Aspergillus fumigatus* αναπαράγεται μόνο ασεξουαλικά, δυο ανεξάρτητες μελέτες από τον Sugui και συνεργάτες καθώς και από τον O'gorman και συνεργάτες ανακάλυψαν πως ο *Aspergillus fimigatus* έχει τη δυνατότητα να παράγει ασκοσπόρια, όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες είναι ιδιαίτερα δυσμενείς. Παρόλα

αυτά, ο κύκλος ζωής του μύκητα μέσω των ασκοσπορίων παραμένει ασαφής (Sugui et al. 2011; O'gorman et al. 2009). Μετά την αναπαραγωγή ακολουθεί η βλάστηση του μύκητα, κατά την οποία παράγει υφές και μυκήλια (Beauvais et al. 2007; Sugui et al. 2014). Έχει διαπιστωθεί πως ο ρυθμός ανάπτυξη των αποικιών του *Aspergillus fumigatus* αποτελεί έναν από τους πιο υψηλούς στη φύση. Ένα ιδιαίτερο δομικό στοιχείο του μύκητα είναι το κυτταρικό του τοίχωμα, καθώς του προσφέρει προστασία απέναντι σε κάθε πιθανό κίνδυνο για την επιβίωσή του. Αν και τα δομικά του στοιχεία μεταβάλλονται ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσεται, τα δομικά χαρακτηριστικά του εσωτερικού τμήματος του κυτταρικού τοιχώματος έχουν διευκρινιστεί: β-1,3-γλυκάνη, χιτίνη, γαλακτομανάνη και β-1,3-γλυκάνη/β-1,4-γλυκάνη (van de Veerdonk et al. 2017; Latgé & Beauvais 2014). Τα στοιχεία αυτά είναι συνδεδεμένα ομοιοπολικά. Στην Εικόνα 1.10 παραθέτονται χαρακτηριστικές αποικίες των τριών ειδών του γένους *Aspergillus* τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στη Διπλωματική αυτή.



Aspergillus fumigatus

Aspergillus flavus

Aspergillus nidulans

Εικόνα 1.9: Μορφολογία αποικίας των μυκήτων *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* και *Aspergillus nidulans* ύστερα από επώαση στους 37°C.

1.3.5 Μεταφορείς πουρινών και πυριμιδινών του μύκητα *A. nidulans*

Η απορρόφηση πουρινών και πυριμιδινών στο εσωτερικό των κυττάρων, τόσο των προκαρυωτικών όσο και των ευκαρυωτικών, επιτελείται από μια ορισμένη ομάδα πρωτεϊνικών μεταφορέων που εδρεύουν στο κυταρρόπλασμα. Οι ίδιοι μεταφορείς είναι υπεύθυνοι για την απορρόφηση αντικαρκινικών, αντιμολυσματικών και

αντιμυκητιακών φαρμάκων τα οποία αποτελούνται απο πουρίνες και πυριμιδίνες. Δύο πρωτεϊνικές οικογένειες αναγνωρίζουν και μεταφέρουν πουρίνες και πυριμιδίνες: η οικογένεια NAT (Nucleobase–Ascorbate Transporter) και η οικογένεια NCS1 (nucleobase cation symporter family 1) (Kryptou et al. 2014).

Η οικογένεια NAT περιλαμβάνει μεταφορείς που διαθέτουν την ικανότητα να απορροφούν σημαντικούς κυτταρικούς μεταβολίτες, όπως ουρικό οξύ ή βιταμίνη C. Αυτοί οι μεταφορείς είναι επιπλέον υπεύθυνοι για την επαγωγή της απορρόφησης πουρινικών αναλόγων τα οποία όπως προαναφέρθηκε αποτελούν και συστατικά αντιμικροβιακών, αντικαρκινικών και αντιπαρασιτικών φαρμάκων. Οι NAT πρωτεΐνες που προέρχονται απο βακτήρια, μύκητες και φυτά και οι οποίοι συντελούν στην οξείδωση πουρινών, ξανθινών ή ουρικού οξέος αποτελούν μια χαρακτηριστική ομάδα. Αποτελούνται απο 12 διαμεμβρανικά τμήματα (TM) και διαθέτουν ένα καρβοξυτελικό και ένα αμινοτελικό τμήμα αντίστοιχα (Valdez-Taubas et al. 2004). Τα πιο μελετημένα μέλη της ομάδας NAT είναι τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες UapA και UapC και παράγονται απο το μύκητα *Aspergillus nidulans*. Η πρωτεΐνη UapA χρησιμοποιεί ως ειδικό υπόστρωμα το ουρικό οξύ και την ξανθίνη ενώ μπορεί να χρησιμεύσει ως μεταφορέας και για ανάλογα της ξανθίνης, με τα οποία όμως συνδέεται με χαμηλότερη συγγένεια. Η πρωτεΐνη UapC λειτουργεί επίσης ως μεταφορέας υψηλής συγγένειας για το ουρικό οξύ και την ξανθίνη και επιπλέον μπορεί να μεταφέρει, με χαμηλή όμως αποτελεσματικότητα την αδενίνη, τη γουανίνη και την υποξανθίνη. Μια ακόμα πρωτεΐνη που παράγεται απο τον μύκητα *Aspergillus nidulans*, ανήκει στους NAT μεταφορείς και συντελεί στη μεταφορά αδενίνης, γουανίνης και υποξανθίνης με υψηλή συγγένεια και αποτελεσματικότητα είναι η πρωτεΐνη AzgA. Επιπλέον η πρωτεΐνη AzgA αναγνωρίζει και μεταφέρει με μέτρια συγγένεια ορισμένα ανάλογα της πουρίνης, όπως την τοξική 8-αζαγουανίνη, αλλά και τη γουανοσίνη. Αντίθετα δεν αναγνωρίζει την ξανθίνη και το ουρικό οξύ, τις πυριμιδίνες καθώς και ορισμένα ανάλογα της. (Kryptou et al. 2014;).

Όπως προαναφέρθηκε, η δεύτερη ευρέως διαδεδομένη οικογένεια μεταφορέων πουρινών είναι οι μεταφορείς NCS1, οι οποίοι χαρακτηρίζονται ως H^+ ή Na^+ συμμεταφορείς και συμμετέχουν στην πρόσληψη πουρινών, πυριμιδινών καθώς και αναλόγων τους και συναντώνται, όπως και η οικογένεια NAT, στα

βακτήρια, τους μύκητες και τα φυτά (Siourouli et al. 2017). Σε αντίθεση με τους NAT μεταφορείς όμως, οι NCS1 μεταφορείς συναντώνται μόνο σε προκαρυωτικούς οργανισμούς, σε μύκητες και φυτά. Η οικογένεια NCS1 με μυκητιακή προέλευση αποτελείται από δυο υποοικογένειες, την Fur και την Fcy, οι οποίες παρουσιάζουν διαφορές στη δομή και την πρωτεϊνική αλληλουχία και τα περισσότερα στοιχεία που έχουν συλλεχθεί βασίζονται στη μελέτη των πρωτεϊνών του *Aspergillus nidulans* (Kryptou et al. 2015; Siourouli et al. 2017). Η υποοικογένεια Fcy που παράγεται από τον μύκητα *Aspergillus nidulans* αποτελείται από πέντε μέλη. Αποτελούν H⁺ συμμεταφορείς ενώ από τα μέλη είναι γνωστό μόνο για την πρωτεΐνη FcyB ότι αποτελεί μεταφορέα της κυτοσίνης-πουρίνης. Μελέτες έχουν δείξει πως εξάλειψη του γονιδίου που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη FcyB δεν επηρεάζει την ανάπτυξη ή την αναπαραγωγή του μύκητα *Aspergillus nidulans*, παρόλα αυτά του προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι της αντιμυκητιακής ουσίας 5-φλουοροκυτοσίνη (Vlanti & Diallinas 2008). Η υποοικογένεια Fur, η οποία αποτελείται από επτά μέλη, αποτελεί επίσης H⁺ συμμεταφορέα, και είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά της αλλαντοΐνης, της ουρακίλης, της ουριδίνης, της θειαμίνης αλλά και του ουρικού οξέος και της ξανθίνης. Έχει διαπιστωθεί πως οι πρωτεΐνες FurA και FurD αποτελούν μεταφορείς της αλλαντοΐνης και της ουρακίλης. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες FcyB, FurA και FurD είναι εξελικτικά διατηρημένες στα 23 είδη του γένους *Aspergillus* (Kryptou et al. 2015; Siourouli et al. 2017).

1.3.6 Μόλυνση φυτών και ζώων από το γένος *Aspergillus*

Η παθογένεια του γένους *Aspergillus* οφείλεται στην ικανότητά του να παράγει και να εκκρίνει στο περιβάλλον μια ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών στην οποία ανήκουν οι μυκοτοξίνες, οι αφλατοξίνες, οι ωχρατοξίνες και οι γλοιτοξίνες (Seyedmousavi et al. 2015). Οι γλοιτοξίνες που εκκρίνονται από το *Aspergillus fumigatus* έχουν μελετηθεί σε βάθος και αποτελούν πλέον διαγνωστικό κριτήριο μόλυνσης από τον εν λόγω μύκητα. Πειράματα τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* έχουν διαπιστώσει την ικανότητά των γλοιτοξινών να ελαττώνουν την αποτελεσματικότητα του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή, ιδιαίτερα τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης. Αν και τα δεδομένα για τον τρόπο λειτουργίας

των υπόλοιπων τοξινών είναι περιορισμένα, υποστηρίζεται πως και οι αφλατοξίνες επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα των φαγοκυττάρων του ξενιστή (Seyedmousavi et al. 2015).

Τα φυτά που προσβάλλονται από ασπέργιλλο είναι φυτά όπως ο αραβόσιτος, τα σταφύλια, η σόγια, τα μήλα, τα μάνγκο αλλά και τα φιστίκια. Ασπεργίλλωση στα φυτά προκαλείται κυρίως από το είδος *Aspergillus niger* μέσω των μαύρων κονιδίων που παράγει. Μπορούν να προσβάλλουν τα φυτά τόσο πριν όσο και μετά τη συγκομιδή τους. Στην Εικόνα 1.11 απεικονίζεται ένας προσβεβλημένος από *Aspergillus niger* αραβόσιτος. Ο βαθμός της μόλυνσης από το γένος *Aspergillus*, το οποίο βρίσκεται στο έδαφος, στον καρπό φυτών, φρούτων ή σιτηρών, εξαρτάται από τους εκάστοτε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ύστερα από την είσοδό τους στα φυτά, παράγουν ωχρατοξίνη A, φουμονισίνες B1, B2, B4 και B6 και πενικιλίνη. Η ωχρατοξίνη A αποτελεί μια από τις δραστικότερες μυκοτοξίνες. Έχει νεφροτοξικές και καρκινογόνες ιδιότητες. Επιπλέον, είναι ιδιαίτερα τοξική έναντι των ηπατικών κυττάρων (Palencia et al. 2010). Μελέτες έχουν δείξει πως επιδρά σε κυτταρικό επίπεδο, απορρυθμίζοντας τη μεταφορά υλικών από και προς την κυτταρική μεμβράνη (Lambert et al. 2007). Αποτελεί μια ευρέως διαδεδομένη μυκοτοξίνη του αραβοσίτου αλλά και γενικότερα των σιτηρών. Έχει επιπλέον ανιχνευτεί σε πλήθος φυτικών προϊόντων όπως ο καφές, οι ελιές, τα φασόλια, τα σταφύλια, το ρύζι και η βρώμη (Accensi et al. 2001; Palencia et al. 2010). Οι φουμοσίνες είναι καρκινογόνες, αν και η φουμοσίνη B1 έχει υψηλότερη δραστικότητα από τη φουμοσίνη B2. Επιπλέον, διαπιστώθηκε πως το *Aspergillus niger* μπορεί να παράγει και τη φουμοσίνη B4 αλλά και ένα νέο ανάλογό της, τη B6 (Frisvad et al. 2007; Mansson et al. 2010). Η πενικιλίνη δρα συνεργατικά με την ωχρατοξίνη A και είναι τοξική για τα φυτικά κύτταρα. Μελέτες έχουν διαπιστώσει πως αρκετά είδη του γένους *Aspergillus* μπορούν να επιβιώσουν στον αραβόσιτο και τα φιστίκια ακόμα και μετά από απολύμανση τους, γεγονός που δείχνει την ικανότητα των μυκήτων αυτών να ζουν ως ενδόφυτα (Palencia et al. 2010). Παρατηρήθηκε επιπλέον η ικανότητά τους να ζουν ως ενδόφυτα και στα κρεμμύδια και στα σκόρδα. Αν και τέτοιου είδους μολύνσεις θεωρούνται λανθάνουσες, στην περίπτωση του *Aspergillus* έχει παρατηρηθεί πως ο μύκητας είναι μεταβολικά ενεργός, αναπτύσσεται στον ξενιστή και παράγει δευτερογενείς μεταβολίτες,

ανάμεσά τους και τοξικούς. Τέτοιου είδους μολύνσεις γίνονται παθογόνες κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, που σχετίζονται τόσο με το αβιοτικό όσο και με το βιοτικό περιβάλλον. Οι μολύνσεις αυτές αποτελούν μείζον οικονομικό καθώς και πρόβλημα υγείας αφού μπορεί το φυτό να είναι φαινομενικά υγιές, όμως περιέχει τοξικούς μεταβολίτες (Palencia et al. 2010).



Εικόνα 1.10: Προσβολή αραβόσιτου από τον μύκητα *Aspergillus niger*.

Στα ζώα, οι ασπεργιλλώσεις προσβάλλουν πρωτίστως το αναπνευστικό σύστημα και στη συνέχεια μετατρέπονται σε γενικευμένες μολύνσεις. Έχει αποδεδειχθεί πως το συνηθέστερο είδος υπεύθυνο για την εμφάνιση ασπεργιλώσεων στα ζώα είναι το είδος *Aspergillus fumigatus*. Στην περίπτωση των μελισσών, ασπεργίλλωση προκαλείται κυρίως από τα είδη *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* και *Aspergillus niger* και η κυριότερη αιτία θανάτου τους είναι η παραγωγή των αφλατοξινών. Αν και απαντώνται ασπεργιλλώσεις σε ασπόνδυλα, μολύνσεις από ασπέργιλλο απαντώνται κυρίως στα σπονδυλωτά, τόσο σε ψυχρόαιμα όσο και σε θερμόαιμα. Το *Aspergillus* έχει τη δυνατότητα να προσβάλλει ψάρια αλλά και ερπετά. Στην περίπτωση των ψαριών ασπεργίλλωση προκαλείται από μυκοτοξίνες παρά από τον μύκητα. Τα είδη *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* και *Aspergillus terreus* είναι υπεύθυνα για τις ασπεργιλλώσεις στα ερπετά, οι οποίες είναι κυρίως ευκαιριακές (Girling & Fraser 2009). Πιο επιρρεπείς σε μόλυνση από ασπέργιλλο είναι τα πτηνά. Το στέλεχος *Aspergillus fumigatus* αποτελεί ένα από τα πλέον διαδεδομένα παθογόνα του αναπνευστικού των πτηνών. Μπορεί να

προκαλέσει μόλυνση ύστερα από σύντομο χρονικό διάστημα έκθεσης σε αυτό. Μπορεί να προσβάλλει τόσο οικόσιτα πτηνά όσο και άγρια. Προκαλεί χρόνια ασπεργίλλωση, οξεία ασπεργίλλωση αλλά και μυκοτοξίκωση (Beernaert et al. 2010). Τα κλινικά συμπτώματα της νόσου εξαρτώνται από την κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή, το ποσοστό των κονιδίων τα οποία έχει εισπνεύσει και εάν έχει προσβληθεί ξανά από τον συγκεκριμένο μύκητα (Hoerr 2010). Στην Εικόνα 1.11 απεικονίζεται η κλινική εικόνα ενός κύκνου που πάσχει από οξεία ασπεργίλλωση. Ασπεργίλλωση όμως παρατηρείται επίσης σε πλήθος άλλων θηλαστικών (σκύλοι, γάτες, άλογα), όπως και σε θαλάσσια θηλαστικά, μηρυκαστικά και πρωτεύοντα θηλαστικά (Seyedmousavi et al. 2015).



Εικόνα 1.11: Κύκνος που πάσχει από οξεία ασπεργίλλωση. Τα κλινικά συμπτώματα περιλαμβάνουν σοβαρής μορφής άπνοια (αριστερά) και εναπόθεση αθηρωματικών πλακών στο εσωτερικό της τραχείας (δεξιά).

1.4 Ο μύκητας *Candida albicans*

Ένας από τους πλέον διαδεδομένους μύκητες, ο οποίος βρίσκεται υπό φυσιολογικές συνθήκες σε διάφορα σημεία του γαστρεντερικού συστήματος αλλά και στον κόλπο της γυναίκας είναι ο *Candida albicans*. Είναι μονοκύτταρος οργανισμός και αναπαράγεται με εκβλάστηση. Ανήκει στην οικογένεια *Saccharomycetaceae*, το γονιδίωμα του έχει μέγεθος 13.3-13.4Mb και κωδικοποιεί 6,100-6,200 γονίδια (Braun et al. 2005; Butler et al. 2009).. Ένα ακόμα ιδιαίτερο

χαρακτηριστικό του *Candida albicans* είναι ότι ορισμένα στελέχη του μέσα στην αποικία εμφανίζουν διαφορετικό φαινότυπο (επιμηκυμένα, γκρι) από τον αναμενόμενο (λευκά, αδιαφανή, θολό σχήμα) (Kim & Sudbery 2011). Έχει δυνατότητα αναπαραγωγής, αλλά δεν μπορεί να ξεκινήσει τη διαδικασία της μείωσης. Μπορεί να προκαλέσει καντιντιάσεις των βλεννογόνων, του οισοφάγου, του κόλπου και του δέρματος. Χαρακτηριστικό κλινικό σύμπτωμα είναι τα άσπρα στίγματα, τα οποία αποτελούν φλεγμονές που προκαλούνται από τη μόλυνση. Ο *Candida albicans* επιπλέον να προκαλέσει καντινταιμίες, οι οποίες αποτελούν τις πιο επικίνδυνες μορφές καντιντίασης. Στην περίπτωση αυτή ο *Candida albicans* εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος και μπορεί να προσβάλλει τα όργανα του ανθρώπινου σώματος (Kim & Sudbery 2011). Επιρρεπείς στην μόλυνση από *Candida albicans* είναι όσοι παρουσιάζουν ελαττωμένο αριθμό ουδετερόφιλων, που συνήθως είναι αποτέλεσμα κάποιας ανοσοκατασταλτικής θεραπείας. Η αντιμετώπιση της καντινταιμίας γίνεται την προληπτική χρήση των κατάλληλων φαρμάκων, καθώς σε περίπτωση εξάπλωσής της οι πιθανότητες ανάκαμψης είναι χαμηλές (Kim & Sudbery 2011).

1.5 Φυσικά προϊόντα από φύκη και φυτά

Τα φύκη και τα φυτά παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες που συμβάλλουν στην αντιμετώπιση των μολύνσεων που προκύπτουν από μικροοργανισμούς, όπως από τα είδη του γένους *Aspergillus* και τον *Candida albicans*. Τα φύκη αποτελούν μια μεγάλη ομάδα φωτοαυτότροφων οργανισμών, ζουν σε υδάτινα οικοσυστήματα και φωτοσυνθέτουν. Είναι πλούσια σε βασικά αμινοξέα, ωμέγα 3, βιταμίνες Α, Β, C και D και έχουν πλήθος ευεργετικών ιδιοτήτων, όπως αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Τα φύκη ευδοκιμούν σε όλα τα γεωγραφικά μήκη και πλάτη της γης και διακρίνονται με βάση το μέγεθός τους σε μικροφύκη και σε μακροφύκη. Τα μακροφύκη ταξινομούνται σε τρεις κλάσεις, τα χλωροφύκη, τα φαιοφύκη και τα ροδοφύκη.

1.5.1 Φυσικά προϊόντα από τα φύκη του γένους *Laurencia*

Το γένος *Laurencia* (οικογένεια: *Rhodomalaceae*, κλάση: *Ceramiales*, τάξη: *Rhodophyceae*, φύλο: *Rhodophyta*) αποτελεί ένα από τα πιο μελετημένα γένη της κλάσης ροδοφύκη. Συναντάται σε τροπικά, υποτροπικά, εύκρατα αλλά και ψυχρά κλίματα, σε μεγάλο εύρος τόσο γεωγραφικό όσο και από άποψη θερμοκρασίας. Επιπλέον συναντάται τόσο στις ακτές όσο στο βυθό των ωκεανών όπου μπορεί να φτάσουν μέχρι 65m βάθος. Τέλος, αναπτύσσεται σε αμμώδεις ακτογραμμές. Έχει διαπιστωθεί πως το γένος *Laurencia* παράγει πλήθος δευτερογενών μεταβολιτών οι οποίοι ασκούν αντιμικροβιακή, και κυτταροτοξική δράση. Τέτοιοι μεταβολίτες είναι τα σεσκιτερπένια, διτερπένια, τριτερπένια και C15-ακετογενίνες. Σε κάθε κατηγορία υπάρχουν τόσο αλογονωμένοι (που αλληλεπιδρούν με βρώμιο ή χλώριο) όσο και μη αλογονωμένοι μεταβολίτες (Harizani et al. 2016).

1.5.1.1 Σεσκιτερπένια

Στην ομάδα αυτή ανήκει ο μεγαλύτερος αριθμός δευτερογενών μεταβολιτών που παράγεται από τα είδη του γένους *Laurencia*. Ανάλογα με τη δομή τους, τα σεσκιτερπένια ταξινομούνται σε τσαμγκράνια, κουπαρενίου, σνυδεράνια, λαουράνια και μπρασιλανικού τύπου. Πολλές από τις χημικές ενώσεις αυτές έχουν χαρακτηριστική αντιβακτηριακή (Vairappan et al. 2009), αντιτρυπανοσωμιακή (Desoti et al. 2012) και αντιλεϊσμμανιακή δράση (da Silva Machado et al. 2011) όπως η ελατόλη που απόμονώνεται από το είδος *Laurencia elata* ή η ισολαουραλδεΐδη που απόμονώνεται από το είδος *L. Obtusa* και η οποία επιπλέον ασκεί προστατευτική δράση εναντίον του ασκίτη Ehrlich (Alarif et al. 2012). Η δεβρωμοαπλυσινόλη που παράγεται από το φύκος *Laurencia tristicha* ασκεί στοχευμένη αντικαρκινική δράση έναντι των καρκινικών κυττάρων Hela (Sun et al. 2007). Κυτταροτοξική δράση εμφανίζει επίσης η περφορενόλη Β που προέρχεται από το φύκος *L. Obtusa* και η περφορατόνη από το φύκος *Laurencia perforata* (Kladi et al. 2006; González et al. 1975).

1.5.1.2 Διτερπένια

Παραδείγματα τέτοιων ενώσεων είναι η νεορογιολτριόλη που απόμονώθηκε από το φύκος *Laurencia glandulifera* (Chatter et al. 2011), η 10-υδροξυκαουκουέννη από το φύκος *Laurencia mariannensis* (Ji et al. 2007), η 15-βρωμοπαργουε-9(11)ενη-16-ολη, η 15-βρωμοπαργου-7-ενη-16-ολη από το φύκος *Laurencia nipponica* (Lyakhova et al. 2004) καθώς και η λουζοδιόλη από το φύκος *Laurencia luzonensis* (Kuniyoshi et al. 2005).

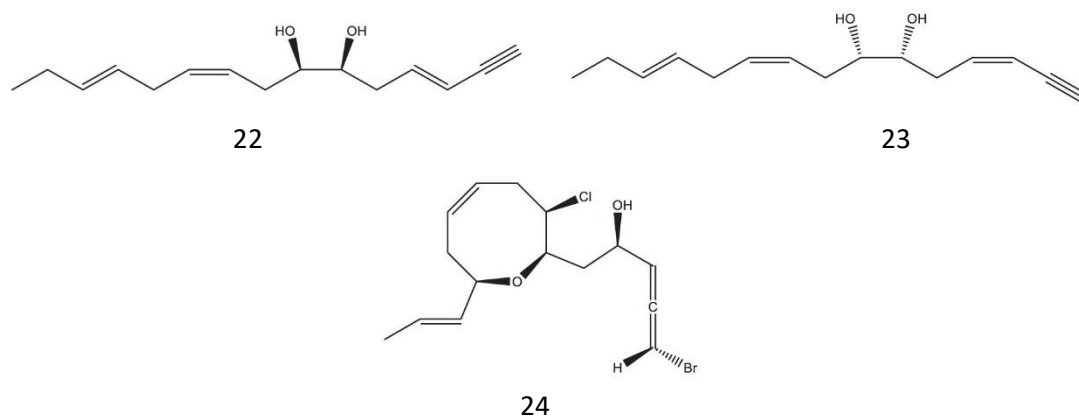
1.5.1.3 Τριτερπένια

Επιπρόσθετα, τριτερπένια του γένους *Laurencia* εμφανίζουν κυτταροτοξική δράση έναντι σε καρκινικά κύτταρα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η λαουρομαριανόλη και η υδροξυθυρσιφερόλη που απόμονώθηκαν από το φύκος *Laurencia mariannensis* και ασκούν προστατευτική δράση έναντι των P-388 καρκινικών κυττάρων (Ji et al. 2008). Πλήθος άλλων τριτερπενίων που απόμονώθηκαν από το φύκος *Laurencia viridis* όπως η διυδροξυθυρσιφερόλη και η ισοδιυδροξυθυρσιφερόλη εμφανίζουν ισχυρή αντικαρκινική δράση (Norte et al. 1996). Τέλος, οι θυρεσενόλες Α και Β που παράγονται από το φύκος *Laurencia viridis* εμφανίζουν ανασταλτική δράση πρωτεϊνικών φωσφατασών (Norte et al. 1997).

1.5.1.4 C15-ακετογενίνες

Οι C15-ακετογενίνες είναι κυρίως αλογονωμένες ενώσεις, οι οποίες δημιουργούνται σχηματίζοντας σύμπλοκα, κυρίως με το βρώμιο και το χλώριο. Η πλειοψηφία των ενώσεων αυτών είναι οκταμελείς κυκλικοί αιθέρες, με αιθερικούς δακτυλίους ποικίλου μεγέθους, αν και επιπλέον συναντώνται και γραμμικές ενώσεις. Επιπλέον χαρακτηρίζονται από μια πλευρική αλυσίδα, η οποία είναι βινυλοακετυλενική ή βρωμοαλλενική. Οι κυκλικοί αιθέρες ταξινομούνται σε λαουρενάνια, τα οποία αποτελούνται από 3Z, 6S, 7S – λαουρεδιόλη και από λαουθισάνια, τα οποία αποτελούνται από 3E,6R,7R-λαουρεδιόλη (Fukuzawa et al. 1992; Ishihara & Murai 2001). Παραδείγματα τέτοιων ενώσεων είναι το μαριλζαλλένιο και η σκανλονενίνη που βρίσκονται στα φύκη *Laurencia marilzae* και

L. obtusa αντίστοιχα (Suzuki et al. 1997; Gutiérrez-Cepeda et al. 2011). Ακετογενίνη με αντιβακτηριακή δράση που αποτελείται από τρεις αιθερικούς δακτυλίους είναι 12Ε-λεμβίνη Α που προέρχεται από το φύκος *Laurencia mariannensis* (Vairappan et al. 2001). Στην Εικόνα 1.12 απεικονίζεται η δομή της 3Ζ, 6S, 7S – λαουρεδιόλης (22), της 3Ε,6R,7R-λαουρεδιόλης(23) και του μαριλζαλλένιο (24).



Εικόνα 1.12: Δομή των C-15 ακετογενινών 3Ζ, 6S, 7S – λαουρεδιόλης (22), της 3Ε,6R,7R-λαουρεδιόλης(23) και του μαριλζαλλένιο (24).

1.6 Φυσικά προϊόντα από το φυτό *Olea europaea*

Όπως προαναφέρθηκε τα φυτά παράγουν πλήθος δευτερογενών μεταβολιτών τα οποία διαθέτουν πλήθος ευεργετικών ιδιοτήτων, όπως αντιοξειδωτικές ικανότητες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το ελαιόδεντρο (*Olea europaea*). Το είδος *Olea europaea* αποτελεί ένα από τα παλαιότερα είδη δέντρων και φύεται κυρίως σε Μεσογειακά κλίματα. Είναι ιδιαίτερα διαδεδομένο διότι τα προϊόντα του (ελαιόλαδο, ελιές) είναι ευεργετικά για την υγεία του ανθρώπου. Χαρακτηρίζονται από δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και συμβάλλουν στο χαρακτηριστικό άρωμα και στην ωραία γεύση των καρπών του. Τέτοιοι μεταβολίτες είναι τα φαινολικά οξέα, οι φαινολικές αλκοόλες, τα φλαβονοειδή και τα σεκοϊριδοειδή (Talhaoui et al. 2015). Οι κατηγορίες των

δευτερογενών μεταβολιτών της ελιάς καθώς και η δομή των κυριότερων χημικών ενώσεων κάθε κατηγορίας απεικονίζονται στην Εικόνα 1.15.

1.7.1 Φαινολικές αλκοόλες

Η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη και τα γλυκοσυλιωμένα παράγωγά τους αποτελούν τις κυριότερες φαινολικές αλκοόλες. Η υδροξυτυροσόλη αποτελεί το συχνότερο παράγωγο της ελιάς, το οποίο συνήθως βρίσκεται στα φύλλα της, στον καρπό της (4g/kg ξηρού βάρους), στο κουκούτσι, στα κλαδιά της (0,7g/kg ξηρού βάρους) αλλά και στο ελαιόλαδο (Talhaoui et al. 2015; Charoenprasert & Mitchell 2012). Επιπρόσθετα ανιχνεύεται στο ελαιόλαδο και η τυροσόλη, η οποία παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση όταν ο καρπός είναι ανώριμος. Βρίσκεται ακόμη στα φύλλα και στα κλαδιά της ελιάς (2g/kg ξηρού βάρους) (Segovia-Bravo et al. 2009; Charoenprasert & Mitchell 2012). Η υδροξυτυροσόλη παράγεται από την ελαιοευρωπεΐνη με τη δράση β-γλυκοσιδασών και εστερασών. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις παράγεται επιπλέον από την υδρόλυση της ελαιοευρωπεΐνης



Εικόνα 1.14: Χημική δομή τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης.

(Segovia-Bravo et al. 2009), ενώ η τυροσόλη παράγεται από την υδρόλυση της λιγκοστροσίδης. Η κατεχόλη αποτελεί κύριο δομικό χαρακτηριστικό της υδροξυτυροσόλης. Η υδροξυτυροσόλη συμμετέχει στην απόκτηση του χαρακτηριστικού καφέ χρώματος της ελιάς (Segovia-Bravo et al. 2009) αλλά κυρίως αποτελεί ιδιαίτερα δραστική αντιοξειδωτική ένωση με πλήθος ευεργετημάτων για την υγεία του ανθρώπου. Για παράδειγμα, διαθέτει ανοσοδιεγερτική, αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή δράση και επιπλέον δρα ανασταλτικά στη δημιουργία αθηρωματικών πλακών (Charoenprasert & Mitchell 2012).

1.7.2 Φαινολικά οξέα

Όπως προαναφέρθηκε, πέρα από τις φαινολικές αλκοόλες, η ελιά παράγει και φαινολικά οξέα, που αποτελούν την απλούστερη μορφή φαινολικών ενώσεων. Τα φαινολικά οξέα, τα οποία βρίσκονται στον καρπό του φυτού, αποτελούνται από ένα καρβοξυλικό οξύ και ένα φαινολικό δακτύλιο. Οι κατηγορίες φαινολικών οξέων είναι οι ακόλουθες: παράγωγα κινναμωμικού οξέος (C_6-C_3), παράγωγα βενζοϊκού (C_6-C_1) οξέος και λοιπά φαινολικά οξέα. Τα φαινολικά οξέα που βρίσκονται κατά κόρον στον καρπό της ελιάς είναι το καφεϊνικό οξύ, χλωρογενικά οξέα (βανιλλικό οξύ, συριγγικό οξύ, κουμαρικό οξύ) καθώς και τα πιο πολύπλοκα βερμπασκοσιδή, τα οποία αποτελούν εστέρες του καφεϊνικού οξέος και της υδροξυτυροσόλης (Kiritsakis & Shahidi 2017; Charoenprasert & Mitchell 2012). Η συγκέντρωσή τους μπορεί να φτάσει έως 3g/kg ξηρού βάρους (Charoenprasert & Mitchell 2012).

1.6.3.3 Φλαβονοειδή

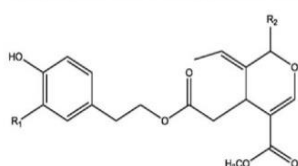
Τα φλαβονοειδή αποτελούν τους πιο κοινούς και ευρέως διαδεδομένους δευτερογενείς μεταβολίτες της ελιάς, καθώς διαθέτουν περισσότερες από 1,600 χημικές ενώσεις. Έχουν αντιοξειδωτική δράση, και την ικανότητα να μειώνουν την πιθανότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών ασθενειών καθώς και διαφόρων μορφών καρκίνου. Αποτελούνται από δυο αρωματικούς δακτυλίους που συνδέονται με τη βοήθεια τριών ατόμων άνθρακα τα οποία σχηματίζουν συνήθως μια οξυγονωμένη δομή ($C_6-C_3-C_6$) (Charoenprasert & Mitchell 2012). Έχουν γλυκοσυλιωμένη (λουτεολιν-5-0-γλουκοσίδη, λουτεολιν-7-0-γλουκοσίδη) ή μη μορφή (κουερσετίνη, απιγενίνη, λουτεολίνη, διοσμεντίνη) (Talhaoui et al. 2015).

1.6.3.4 Σεκοϊριδοειδή

Τα σεκοϊριδοειδή είναι υποκλάση των ιριδοειδών τα οποία παράγονται από την αποβολή του κυκλοπεντανικού δακτυλίου στο δεσμό που σχηματίζεται στη θέση 7,8. Σε αυτά ανήκουν η ελαιοευρωπεΐνη, η διμεθυελαιοευρωπεΐνη και η λιγκστροσίδη. Τα σεκοϊριδοειδή, και ιδιαίτερα η ελαιοευρωπεΐνη, παράγονται

μόνο απο είδη του γένους *Oleaceae* και βρίσκονται επι το πλείστον στα φύλλα (60-90mg/g ξηρού βάρους) και τον καρπό των δέντρων αυτών (140mg/g ξηρού βάρους) (Talhaoui et al. 2015; Charoenprasert & Mitchell 2012). Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της ομάδας αυτής είναι η ύπαρξη του ελενολικού οξέος σε όλους τους τύπους των ενώσεων (γλυκοσυλιωμένες ή μη) (Boskou 2015).

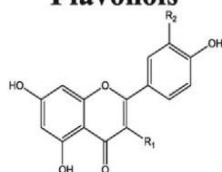
Secoiridoids



Oleuropein ($R_1=OH, R_2=Glc$)
 Ligstroside aglycone ($R_1=H, R_2=OH$)
 Oleuropein aglycone ($R_1=OH, R_2=OH$)

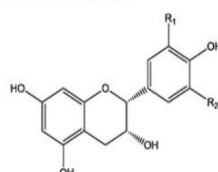
Flavonoids

Flavonols



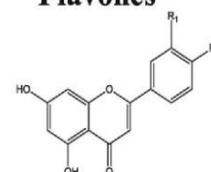
Quercetin ($R_1=OH, R_2=OH$)
 Isorhamnetin ($R_1=OH, R_2=OCH_3$)
 Rutin ($R_1=Rut, R_2=OH$)

Flavanols



Catechin ($R_1=OH, R_2=H$)
 Gallocatechin ($R_1, R_2=OH$)

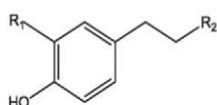
Flavones



Apigenin ($R_1=H, R_2=OH$)
 Luteolin ($R_1, R_2=OH$)

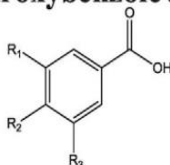
Simple phenols

Phenylethanoids



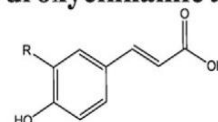
Tyrosol ($R_1=H, R_2=OH$)
 Hydroxytyrosol ($R_1, R_2=OH$)

Hydroxybenzoic acids



p-hydroxybenzoic acid ($R_1, R_3=H, R_2=OH$)
 Gallic acid ($R_1, R_2, R_3=OH$)

Hydroxycinnamic acids



p-coumaric acid ($R=H$)
 Caffeic acid ($R=OH$)
 Ferulic acid ($R=OCH_3$)

Εικόνα 1.15: Κατηγορίες φαινολικών ενώσεων που παράγονται από την ελιά.

1.7 Σκοπός

Οι μύκητες, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελούν μια ομάδα ευκαρυωτικών μικροοργανισμών που συναντώνται στο έδαφος, στον αέρα αλλά και στο νερό. Έχουν όμως την ικανότητα να προσβάλλουν πλήθος φυτών, ζώων αλλά και τον άνθρωπο. Ο στόχος της παρούσας Διπλωματικής εργασίας είναι η ανακάλυψη νέων φυτικών ουσιών με αντιμυκητιακές ιδιότητες. Οι επιμέρους στόχοι ήταν:

- Η διερεύνηση της τοξικότητας των υπο μελέτη ουσιών έναντι διαφόρων παθογόνων μύκητιακών στελεχών.
- Η μελέτη του μηχανισμού δράσης των αποτελεσματικών ουσιών

Χρησιμοποιήθηκαν χημικές ουσίες από φύκη του γένους *Laurencia* και παρασκευάστηκαν χημικά ανάλογα της τυροσόλης, ουσία που βρίσκεται στο φυτό *Olea europaea*. Η δράση των ουσιών αυτών ελέγχθηκε σε συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες προκειμένου να διαπιστωθεί η τοξικότητά τους κυρίως σε στελέχη *A. nidulans*, *A. fumigatus* και *A. flavus*. Επίσης, στόχο αποτέλεσε η προκαταρκτική μελέτη του μηχανισμού δράσης των πιο αποτελεσματικών ουσιών, καθώς και ο προσδιορισμός της ικανότητας αλλά και της συχνότητας ανάκτησης ανθεκτικών μεταλλαγμένων μυκητιακών στελεχών, αφού αυτό αποτελεί πολύ σημαντικό παράγοντα για την περαιτέρω αξιοποίηση μίας αντιμυκητιακής ουσίας. Τέλος, στόχος της παρούσας μελέτης αποτέλεσε ο προσδιορισμός της τοξικότητας σε κύτταρα θηλαστικού, τα αποτελέσματα του οποίου είναι πολύ σημαντικά για την εξέλιξη του ερευνητικού έργου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Στην παρούσα Διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω στελέχη μυκήτων.

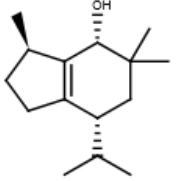
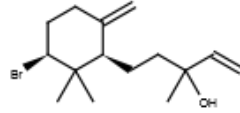
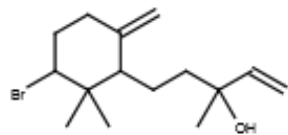
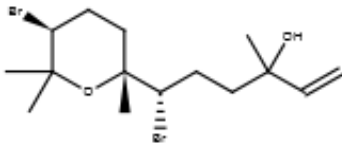
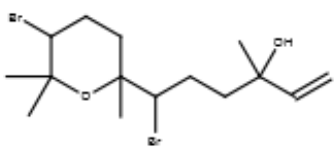
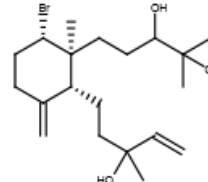
Πίνακας 2.1: Στελέχη μυκήτων

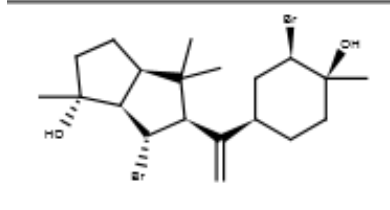
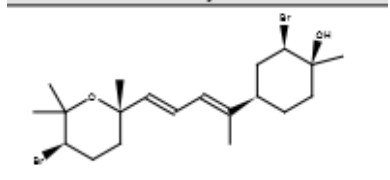
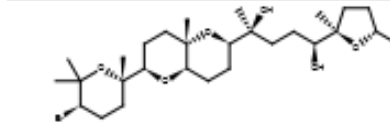
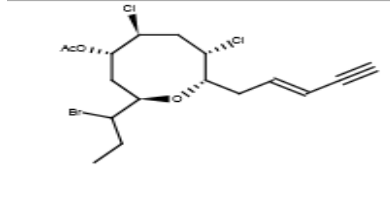
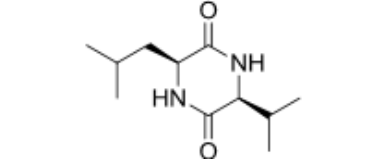
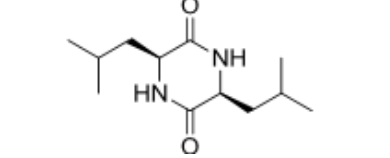
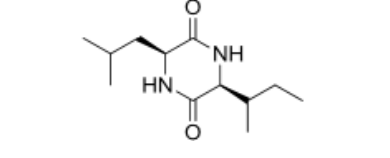
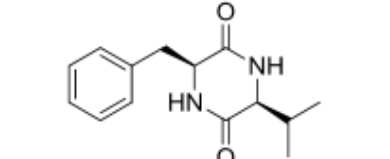
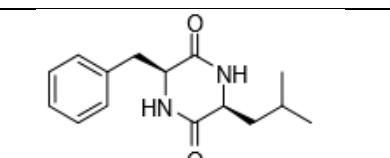
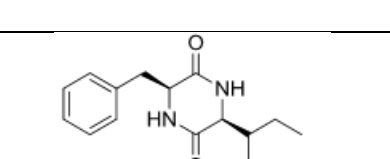
α/α	Όνομα	Γονότυπος	Βιβλιογραφία
1	Wt	<i>pabaA1</i>	-
2	Wt	<i>pantoB100</i>	-
3	Δ7	<i>uapAΔ uapCΔ::AFpyrG azgAΔ fcyBΔ::argB furDΔ::AFriboB furAΔ::AFriboB cntAΔ::AFriboB pantoB100 pabaA1</i>	Kryptou and Dhalluin, 2014
4	Sec24-GFP H1-mRFP	<i>Sec24-5xGAGFP::AFpyrG H1-mRFP::AFriboB nkuAΔ::argB pyrG89 pyroA4 riboB2</i>	Evangelinos et al., 2016
5	pH ^{OSBP} – mRFP agtA-GFP	<i>[pyroA-gpdAmini-mrfp-PHOSBP]pyroA4 agtA-GFP::pyrG inoB2</i>	Evangelinos et al., 2016
6	UapA-GFP 510	<i>ΔuapA UapC::AFpyrG ΔazgA argB2::argB(pAN510GFP)-uapA-GFP pabaA1</i>	Pantazopoulou et al., 2007
7	shrA-GFP	<i>shrA-GFP pabaA1 pantoB100</i>	Erpapazoglou et al., 2006
8	LA2	<i>ΔyA::pyr4 ΔinoB::pyrGAf niaD::Minos IR-yA-inoB-Minos IR argB::gpdAmini-MnTpase pyroA4</i>	Evangelinos et al., 2015
9	ΔXanA	<i>xanAΔ pabaA1 pantoB100 wA4</i>	Cultrone et al., 2005
10	UaY462const	<i>UaY462c pantoB100 wA3</i>	Oestreich and Scazzocchio, 1995
11	UapA locus	<i>uapAΔ::UapA-GFPL (in locus) ΔnkuA::argB pabaA1</i>	Evangelinos et al., 2016
12	basA1	<i>basA1 pyrG89</i>	Li et al., 2007
13	alcA-uapA-GFP basA1	<i>ΔuapA UapC::AFpyrG ΔazgA argB2 (pBS-argB-alcA)-uapA-GFP basA1 pabaA1</i>	Evangelinos et al., 2016
14	<i>A.fumigatus</i>	<i>Af293</i>	Galanopoulou et al 2014
15	<i>A.flavus</i>	<i>CBS128202</i>	Galanopoulou et al 2014
16	<i>Candida albicans</i>	Clinical isolate	

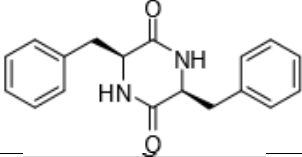
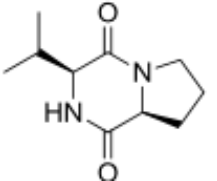
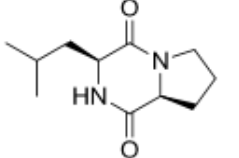
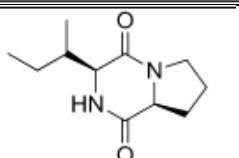
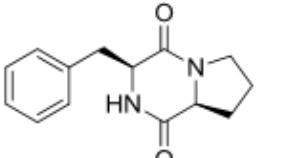
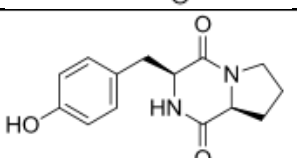
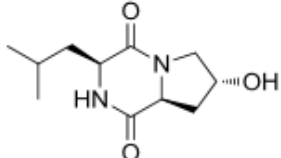
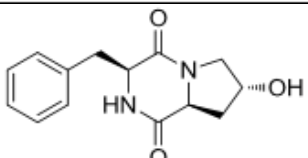
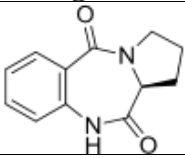
2.2 Χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ως αντιμυκητιακοί παράγοντες.

Οι παρακάτω χημικές ουσίες έχουν απομονωθεί από φύκη του γένους *Laurencia*. Πιο συγκεκριμένα, η χημική ουσία obtusenol η οποία ανήκει στην ομάδα των σεσκιτερπενίων, απομονώθηκε από το είδος *Laurencia luzonensis* το οποίο ανακτήθηκε στο νησί Kudaka (Harizani et al. 2016). Τις ουσίες αυτές μας τις παρείχε ο καθηγητής Βασίλειος Ρούσσης του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, της Φαρμακευτικής Σχολής, ΕΚΠΑ.

Πίνακας 2.2: Πίνακας των υπό μελέτη δευτερογενών μεταβολιτών από γένος *Laurencia*.

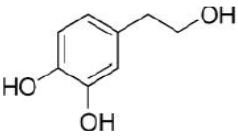
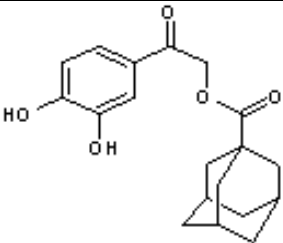
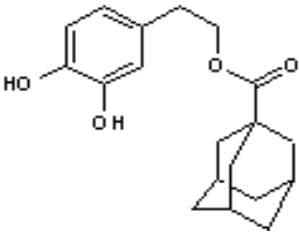
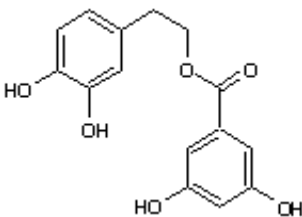
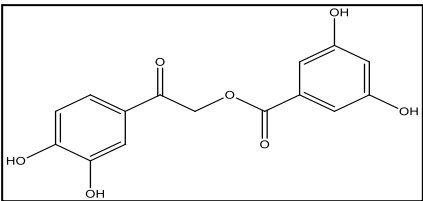
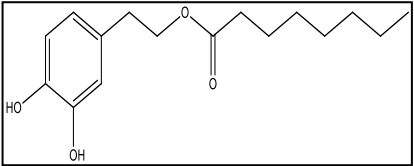
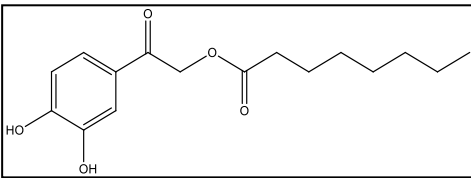
Κωδικός	Δομή	Ονομασία	Μοριακό Βάρος
MARFF-01		Epibrasilenol,	222,371
MARFF-02		B-snyderol	301,267
MARFF-03		obtusenol	398,178
MARFF-04		N/A	421,846
MARFF-05		neorogioldiol	464,281
MARFF-06		O ^{11'} 1 ⁵ -cyclo-14-bromo-14,15-dihydrogiol-3,11-diol	464,281

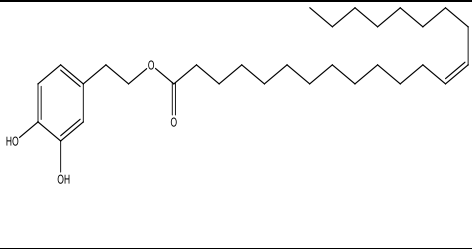
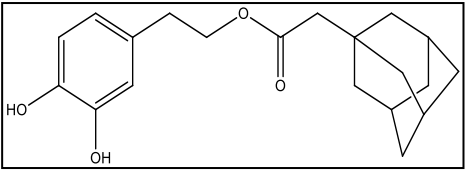
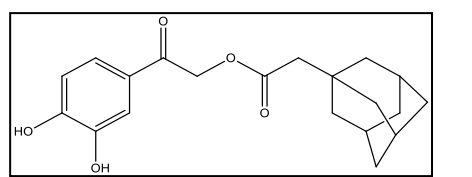
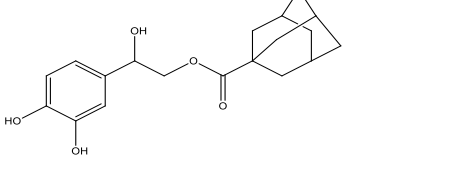
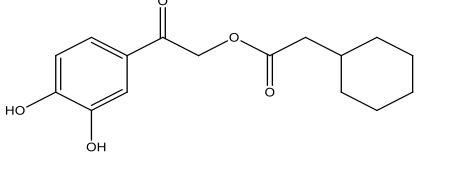
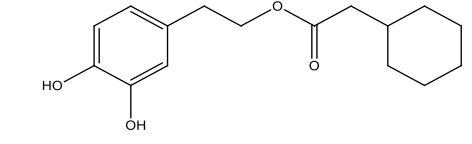
MARFF-07		(+)-Thyrsiferol	605,651
MARFF-08		13-epilaurencienyne	426,178
MARFF-09		obtusallene	424,56
MARFF-10		(1S,2R,9R,10R,12S,Z)-10-(3-bromoprop-1,2-dien-1-yl)-2-hydroxy-12-methyl-11,13-dioxabicyclo[7.3.1]tridec	343,217
MARFF-11		Cis-cyclo-(Leu-Val)	212,29
MARFF-12		Cis-cyclo-(Leu-Leu)	226,31
MARFF-13		Cis-cyclo-(Leu-Ile)	226,30
MARFF-14		Cis-cyclo-(Val-Phe)	246,30
MARFF-15		Cis-cyclo-(Phe-Leu)	260,33
MARFF-16		Cis-cyclo-(Phe-Ile)	260,33

MARFF-17		Cis-cyclo-(Phe-Phe)	294.,35
MARFF-18		Cis-clo-(Pro-Val)	196,25
MARFF-19		Cis-cyclo-(Pro-Leu)	210.27
MARFF-20		Cis-cyclo-(Pro-Leu)	210,27
MARFF-21		Cis-cyclo-(Pro-Phe)	244,29
MARFF-22		Cis-cyclo-(Pro-Tyr)	260,29
MARFF-23		Cis-cyclo-(4-OH-Pro-Leu)	226,27
MARFF-24		Cis-cyclo-(4-OH-Pro-Phe)	260,29
MARFF-25		Cycloanthranilyl proline	216,24

Οι παρακάτω χημικές ουσίες (Πίνακας 2.3) , είναι χημικά ανάλογα της υδροξυτυροσόλης, ένωση η οποία έχει απομονωθεί από το φυτό *Olea europaea*. Τις ουσίες αυτές μας παρείχε ο Επίκουρος Καθηγητής Ιωάννης Κωστάκης του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του τμήματος Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ.

Πίνακας 2.3. Πίνακας των υπό μελέτη δευτερογενών μεταβολιτών από το φυτό *Olea europaea*.

Όνομασία	Δομή	MB
hydroxytyrosol		154,16
Frako 182		330,15
Frako 183		316,17
Frako 189		290,17
Frako 185		330
Frako 509		280,36
Frako 168		294,15

Frako 508		474,70
Frako 515		330.41
Frako 510		344.16
Frako 217		332.16
Frako 186		292.00
Frako 190		278.34

2.3 Θρεπτικά Υποστρώματα & Συνθήκες Καλλιέργειας

Θρεπτικά Υποστρώματα

- Extraction Buffer: Tris-HCl 0,2M pH=8, SDS 1% EDTA 1Mm pH=8
- Trace-element solution: 40mg $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$, 400mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$, 800mg $\text{FePO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$, 800mg $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 800mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$, 8 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ & προσθήκη dH_2O έως το 1 L

- Salts Solution 26g KCl, 26g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 76g KH_2PO_4 , 50ml trace-element solution, 2ml chloroform (as preservative) & προσθήκη dH_2O έχω το 1 L
- Vitamin solution: 20mg p-aminobenzoic acid, 50 mg aneurin, 10ml biotin, 100mg nicotinic acid, 200mg calcium D-pantothenate, 50 mg pyridoxine · HCl, 100mg riboflavin & προσθήκη dH_2O έως το 1L.
- Buffer pH 5,5 1M : 100 mL Buffer εμπεριέχουν Na_2HPO_4 7,9 mL & NaH_2PO_4 92,1 mL
- Buffer pH 6,8 1M: Τα 100 mL Buffer εμπεριέχουν Na_2HPO_4 46,3 ml & NaH_2PO_4 53,7 mL
- Buffer pH 8 1 M: Τα 100 mL Buffer εμπεριέχουν Na_2HPO_4 93,2 mL & NaH_2PO_4 6,8 mL

	ΠΛΗΡΕΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ (Complete Media)	ΕΚΛΕΚΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ (Minimal Media)
H_2O απεσταγμένο	1 L	1 L
Διάλυμα Αλάτων	20 mL	20 mL
Διάλυμα Βιταμινών	10 mL	-
D-Glucose	10 g	10 g
Casamino acids	3,75 g	-
Peptone	2 g	-
Yeast extract	4 g	-
Σακχαρόζη	-	-

- Θρεπτικό υπόστρωμα μικροσκοπίου: Διάλυμα αλάτων χωρίς φωσφορικά κατάλοιπα 20 mL, D-Glucose 1 g, KH_2PO_4 25 Mm & dH_2O έως το 1 L. Η αποστείρωση γίνεται σε χύτρα ταχύτητος αυστηρά για 15 min.
- Διαλύτης χημικών ουσιών: διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethylsulfoxide, DMSO)
- Συνθήκες Καλλιέργειας
- Οι συνθήκες καλλιέργειας διαφοροποιούνται ως προς το θρεπτικό υλικό, τη θερμοκρασία, το pH, τη πηγή αζώτου, τη πηγή γλυκόζης.

Χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα:

- Πλήρες θρεπτικό υλικό (Complete Media) και Εκλεκτικό θρεπτικό υλικό (Minimal Media)
- 25 °C, 37 °C, 42 °C
- pH 5, 6.8, 8
- NO_3^- , NH_4^+
- Γλυκόζη, φρουκτόζη

Τα πειράματα επαναλήφθηκαν δύο φορές.

2.4 Μέθοδοι

- **Προσδιορισμός τιμών IC_{50} και MIC**

IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) είναι η συγκέντρωση της τοξικής ουσίας στην οποία η διάμετρος της αποικίας του μύκητα προσδιορίζεται στο μίσο της διαμέτρου του δείγματος ελέγχου.

MIC (Minimum inhibitory concentration), όπου MIC είναι η συγκέντρωση της τοξικής ουσίας στην οποία η ανάπτυξη του μύκητα αναστέλλεται πλήρως.

Ο προσδιορισμός των μεγεθών αυτών πραγματοποιήθηκε με την μέτρηση της διαμέτρου των αποικιών του μύκητα.

- **Μεταλλαξιγένεση με υπεριώδη ακτινοβολία**

Τα σπόρια του στελέχους συλλέγονται και ακολουθεί vortex. Κατόπιν το διάλυμα φιλτράρεται με bluetex και ξεπλένεται με νερό έως τα 40 mL, τα οποία τοποθετούμε σε αποστειρωμένο falcon. Τα 40 mL διαχωρίζονται σε δύο falcons, 20 mL το καθένα, και συμπληρώνονται μέχρι τα 40 mL. Με τη ποσότητα αυτή δημιουργούνται λεπτά στρώματα υλικού σε 20 τρυβλία και τα αφήνονται για 3 min 45 sec υπό τη λάμπα UV σε μέση απόσταση 20 cm. Αμέσως μετά το διάλυμα συλλέγεται σε δύο νέα falcons τα οποία φυγοκεντρούνται για 10 min στις 4000 rpm. Απορρίπτεται από το ένα falcon όλη τη ποσότητα του υπερκείμενου, ενώ από το άλλο απορρίπτεται η μισή ποσότητα. Στη συνέχεια γίνεται vortex και ενώνονται τα

δύο διαλύματα. Ακολουθεί επαναδιάλυση. Στη συνέχεια ομογενοποιούνται το Top agar, το οποίο βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου, με τα 20 mL του διαλύματος των σπορίων. Τέλος σε κάθε τρυβλίο με εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα (MM) που έχει ετοιμάσει προστίθενται 5 mL από το νέο διάλυμα (Top agar + σπόρια) .

- **Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας**

Κύτταρα διαμοιράζονται σε ειδικά φιαλίδια έτσι ώστε να υπάρχουν 5000 κύτταρα/φιαλίδιο. Κάθε φιαλίδιο περιέχει 100 μ L πλήρους θρεπτικού υλικού. Απαιτείται αναμονή για να προσκολληθούν τα κύτταρα. Επώάζονται τα κύτταρα παρουσία της επιθυμητής ουσίας σε δύο συγκεντρώσεις , αφήνοντας μια σειρά φιαλιδίων χωρίς ουσίες , οι οποίες χρησιμοποιούνται ως μάρτυρας. Τέσσερις ώρες πριν το τέλος της επώασης προστίθενται η χρωστική MTT* σε ποσότητα 20 μ L/φιαλίδιο. Απόρριψη υπερκείμενου με αναστροφή της πλάκας. Προσθήκη σε κάθε φιαλίδιο 100 μ L, 0,1 M HCl σε άνυδρη ισοπροπανόλη ή DMSO. Ανακίνηση πλάκας για να διαλυθούν τα κύτταρα.

Φωτομέτρηση σε φωτόμετρο ELISA στα 545nm.

- **Μετρήσεις πρόσληψης ραδιοσημασμένων υποστρωμάτων**

Τα στελέχη του *A. nidulans* που χρησιμοποιήθηκαν , αναπτύχθηκαν επαρκώς μετά από την επώαση τους σε στερεό, πλήρες θρεπτικό υπόστρωμα στους 37 °C για 3-4 ημέρες. Τα κονιδιοσπόρια του μύκητα επαναδιαλύθηκαν στην συνέχεια σε διάλυμα tween 80, συγκέντρωσης 0,01%, διηθήθηκαν μέσω φίλτρου blutex και χρησιμοποιήθηκαν για την επιμόλυνση 25 mL υγρής καλλιέργειας ελαχίστου θρεπτικού υποστρώματος που περιείχε τα κατάλληλα συμπληρώματα καθώς και τις απαραίτητες πηγές αζώτου και άνθρακα. Η καλλιέργεια επώαστηκε σε αναδευόμενο επωαστήριο σε συνθήκες 37 °C και σε 140rpm για 4h.

Με το πέρας των τεσσάρων ωρών, ρίχνουμε το περιεχόμενο των κωνικών σε falcon (50 mL), ισοσταθμίζουμε το βάρος του και φυγοκεντρούμε για 5 min στις 3000 rpm.

Στη συνέχεια το υπερκείμενο απορρίφθηκε και ακολούθησε έκπληση των κονιδιοσπορίων με υγρό ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα και φυγοκέντρωση όπως

προηγουμένως. Μεταφέρουμε 75 μL σε κάθε eppendorf και επωάζουμε στο heat block στους 37 °C για 5min.

Στη συνέχεια, προστίθεται η ραδιοσημασμένη νουκλεοτιδική βάση (1. X*, 2. AD*, U*, 4. X*-515 (1 μL), 5. AD*-515 (1 μL), 6. U*-515 (1 μL) σε γνωστή τελική συγκέντρωση , περίπου 0,25 μM για 1min. Η πρόσληψη της ραδιοσημασμένης ουσίας τερματίζεται με την προσθήκη περίσσειας (100 μL) μη σημασμένης ουσίας και τοποθετούμε στους 0 °C.

Ολοκληρώνοντας την διαδικασία φυγοκεντρούμε για 5 min στις 12000 rpm. Με αναρρόφηση με αντλία για ραδιενεργά, απομακρύνεται το υπερκείμενο. Το pellet αναδυαλύεται με 1 mM κρύο θρεπτικό, ακολουθεί vortex και ανάδευση. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 10 min στις 13.000 rpm και εκ νέου αναρρόφηση του υπερκείμενου με την αντλία για ραδιενεργά. Προσθέτουμε 1 mL τολουένιο και αναδιαλύουμε το pellet με vortex και το βάζουμε στα σε αριθμημένα μπουκαλακια. Μετράμε στο αντίστοιχο μηχάνημα. Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις για κάθε ραδιενεργή ουσία και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τιμών που προέκυψαν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3. Αποτελέσματα

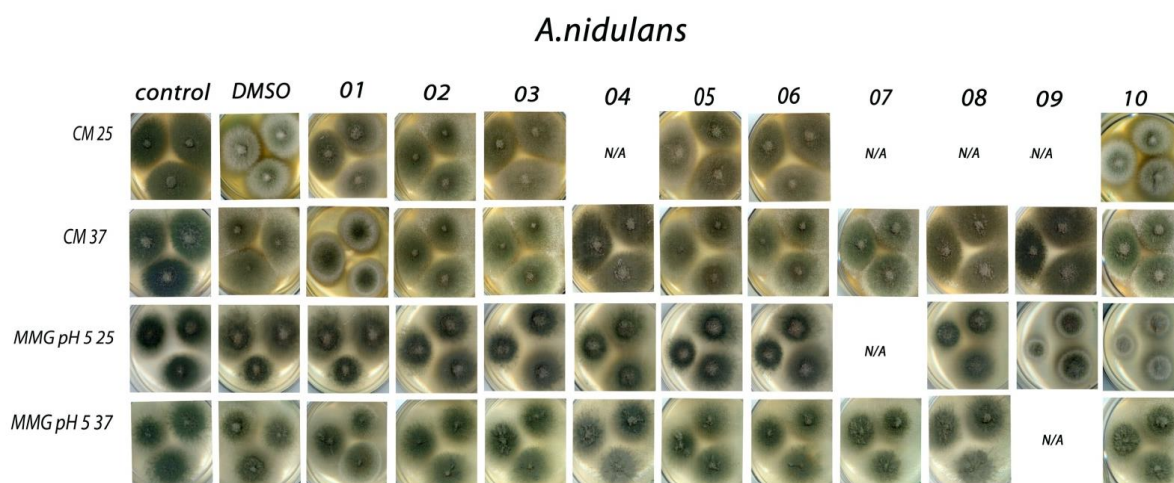
3.1 Δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φύκη του γένους *Laurencia*

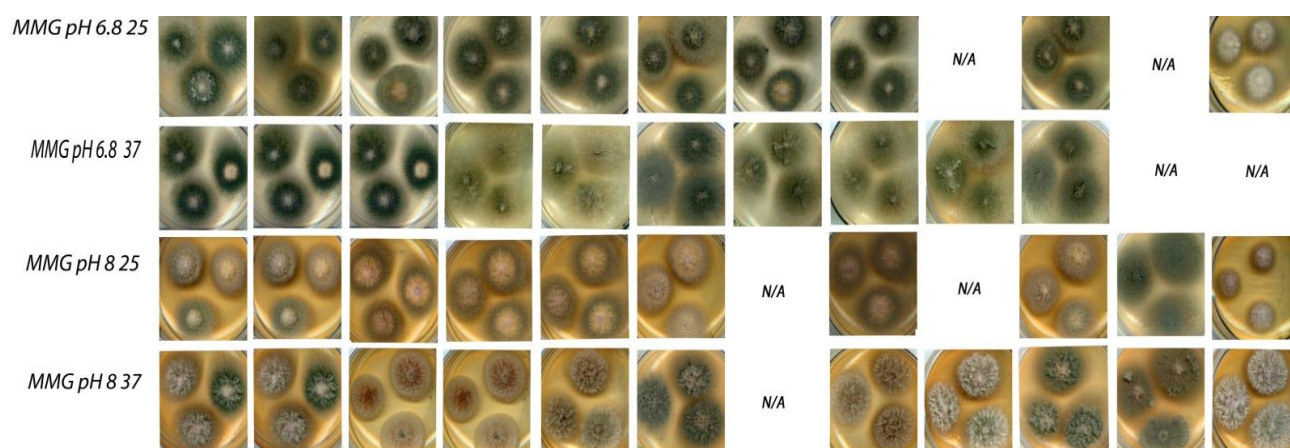
Στην παρούσα μελέτη, που σκοπό έχει την εύρεση νέων ουσιών με αντιμυκητιακή δράση, πραγματοποιήθηκαν *in vivo* δοκιμές ανάπτυξης μυκητιακών στελεχών παρουσία των ουσιών που παρεντίθενται στον Πίνακα 2.2.

3.1.1 Αύξηση των στελεχών των μυκήτων

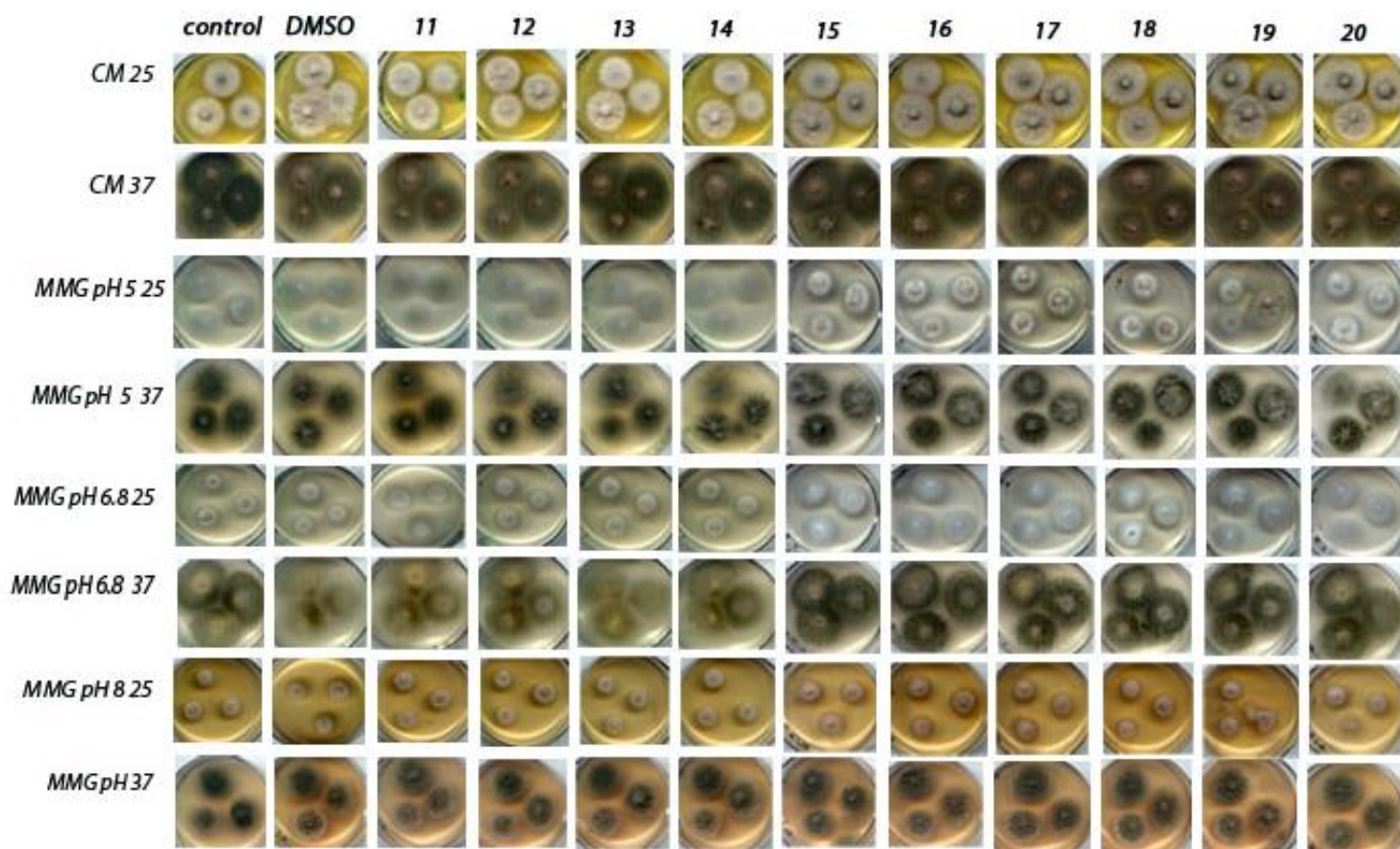
Σε θρεπτικά υλικά εμποτισμένα με τις ουσίες του Πίνακα 2.1, ελέγχτηκε η βιωσιμότητα του στελέχους *Aspergillus nidulans* φυσικού τύπου, αυξότροφου για *p*-αμινοβενζοϊκό οξύ (*pabaA1*) , αυξότροφου για D-παντοθενικό οξύ (*pantoB100*) και το στέλεχος Δ7 (βλέπε Πίνακας 2.1).

Οι δοκιμές ανάπτυξης πραγματοποιήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα CM (Πλήρες Υπόστρωμα) και MM (Εκλεκτικό Υπόστρωμα) με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα, προσθήκη νιτρικών ιόντων (NO_3^-), ως μοναδική πηγή αζώτου, και την προσθήκη των αυξοτροφικών ανάλογα με τα προς έλεγχο στελέχη *A.nidulans* (Παράγραφος 2.3) . Επίσης, οι *in vivo* δοκιμές ανάπτυξης μυκητιακών στελεχών πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικά pH (5,0, 6,8, 8,0) καθώς και σε δύο θερμοκρασίες (25° και 37°C). Η συγκέντρωση των εν δυνάμει αντιμυκητιακών ουσιών είναι 50 μM .

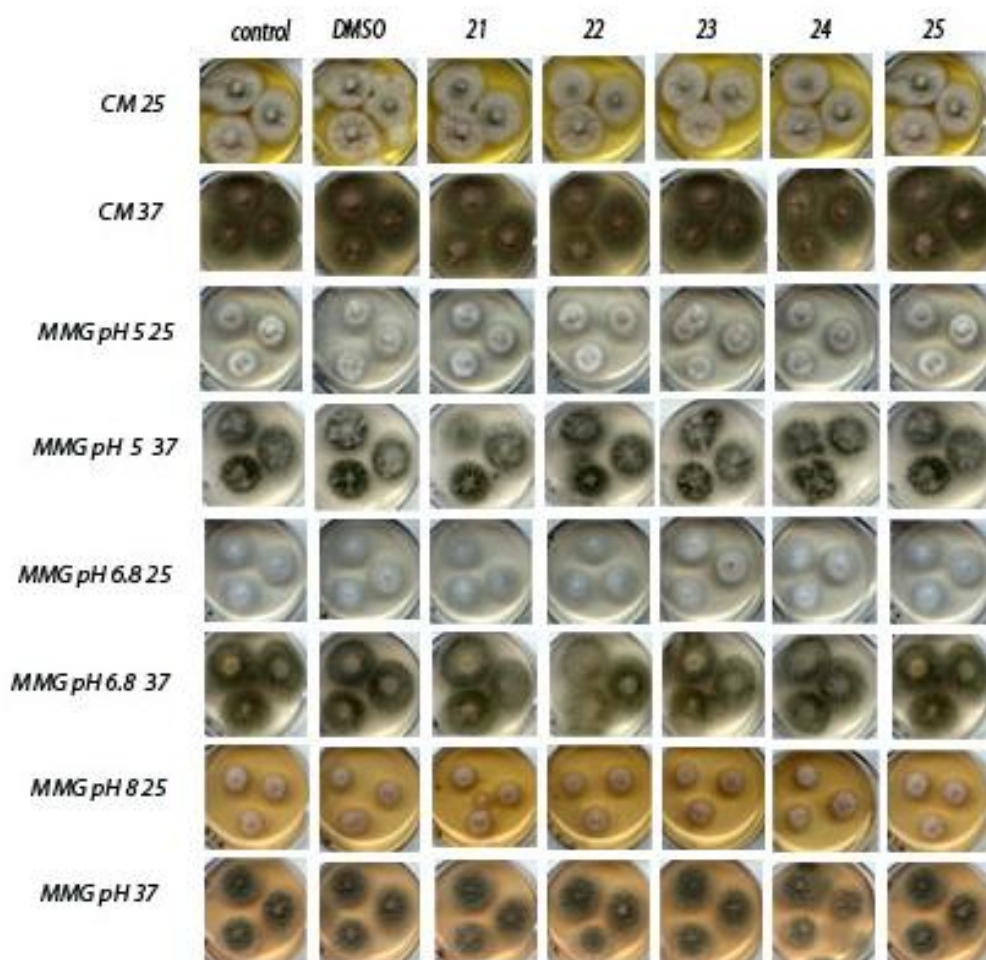




Εικόνα 3.1: Αποτελέσματα των δοκιμών ανάπτυξης για τις ενώσεις με κωδικούς 01-10.



Εικόνα 3.2: Αποτελέσματα των δοκιμών ανάπτυξης για τις ενώσεις με κωδικούς 11-20.



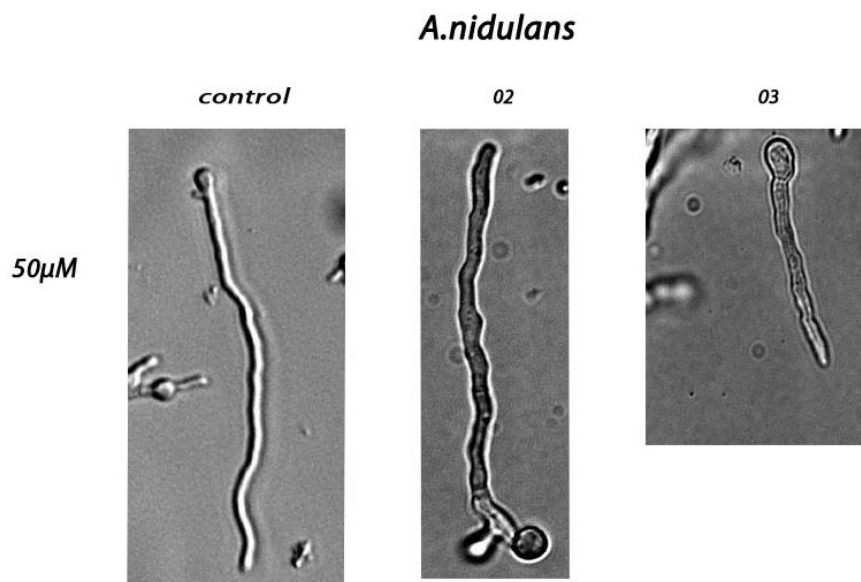
Εικόνα 3.3: Αποτελέσματα των δοκιμών ανάπτυξης για τις ενώσεις με κωδικούς 21-25.

Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών παρουσιάζονται στις Εικόνες 3.1, 3.2 και 3.3. Από την παρατήρηση των εικόνων γίνεται αντιληπτό ότι οι ουσίες δεν παρουσιάζουν αξιόλογη αντιμυκητιακή δράση καθώς δεν παρατηρείται αναστολή της ανάπτυξης των τριών στελεχών. Η βαθμός ανάπτυξης των στελεχών προσδιορίστηκε με βάση την διάμετρο των αποικιών. Οι ουσίες epibrasilenol, neorogiol, $O^{11'15}$ -cyclo-14-bromo-14,15-dihydrogiol-3,11-diol, (+)-Thysiferol, 13-epilaurencienyne, obtusallene, 1S,2R,9R,10R,12S,Z)-10-($^{\circ}$ -3-bromopropa-1,2-dien-1-yl)-2-hydroxy-12-methyl-11,13-dioxabicyclo[7.3.1]tridec, Cis-cyclo-(Leu-Val), Cis-cyclo-(Leu-Leu), Cis-cyclo-(Leu-Ile), Cis-cyclo-(Val-Phe), Cis-cyclo-(Phe-Leu), Cis-cyclo-(Phe-Ile), Cis-cyclo-(Phe-Phe), Cis-cyclo-(Pro-Val), Cis-cyclo-(Pro-Leu), Cis-cyclo-(Pro-Leu), Cis-cyclo-(Pro-Phe), Cis-cyclo-(Pro-Tyr), Cis-cyclo-(4-OH-Pro-Leu), Cis-cyclo-(4-OH-Pro-Phe), Cycloanthranilyl

proline, παρουσιάζουν μικρές αποκλίσεις στις διαμέτρους σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου. Εξαίρεση θεωρήθηκαν οι ουσίες β -snyderol και obtusenol, πρωτίστως η obtusenol όπου κατά τις πρώτες μέρες επώασης παρουσιάστηκε μερική αναστολή της ανάπτυξης των στελεχών.

3.1.2 Μορφολογική ανάλυση κυττάρων *A.nidulans*

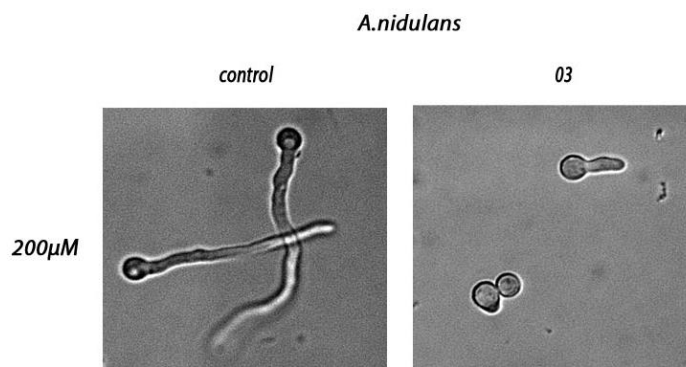
Με δεδομένο την μερική αναστολή της ανάπτυξης των στελεχών από τις ουσίες β -snyderol και obtusenol έγινε περαιτέρω διερεύνηση σε επίπεδο μικροσκοπίας. Η παρατήρηση μέσω μικροσκοπίου της δράσης των β -snyderol και obtusenol έναντι του στελέχους *A.nidulans* φυσικού τύπου, αρχικά επιλέχθηκε να πραγματοποιηθεί στην συγκέντρωση των 50 μM , και κατόπιν στην συγκέντρωση 200 μM , σε θρεπτικό υπόστρωμα γλυκόζης 0.1%. Ως πηγή αζώτου επιλέχθηκαν νιτρικά ιόντα. Η επώαση του στελέχους πραγματοποιήθηκε για 18 ώρες στους 25°C.



Εικόνα 3.4 Μικροσκόπιο Axio Z1 Observer.

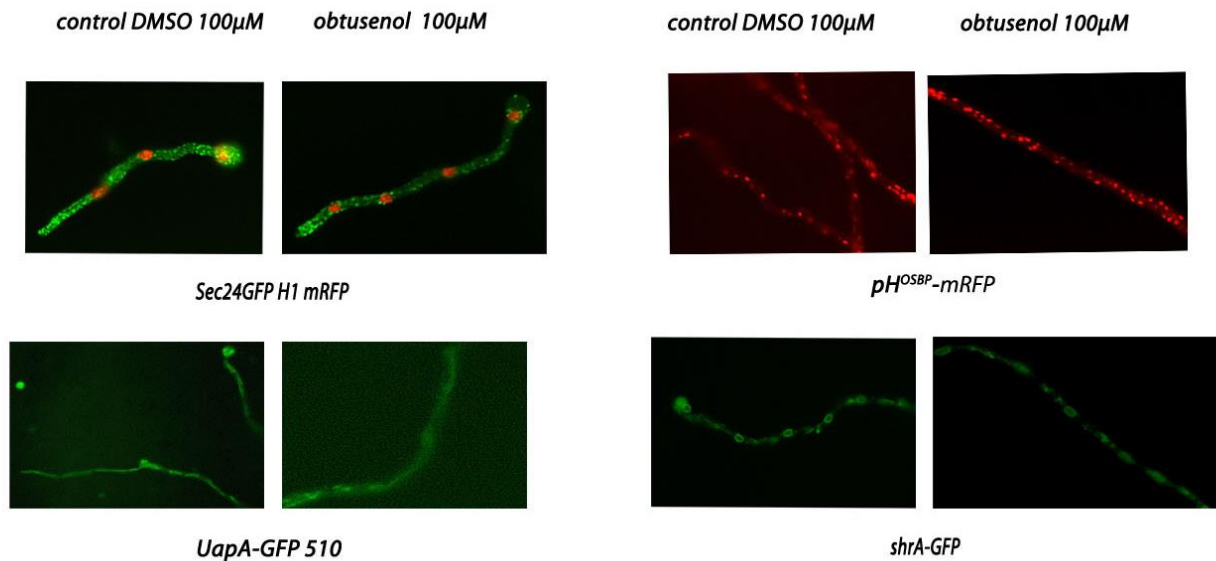
Όπως φαίνεται και από την Εικόνα 3.4, πράγματι η ουσία obtusenol στα 50 μM καθυστερεί την ανάπτυξη του *A.nidulans* και προκαλεί ενδιαφέρουσες

μορφολογικές αλλαγές στις υφές του. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και παραπάνω οι υφές παρουσία obtusenol εμφανίζονται μικρότερες σε μήκος. Παρατηρήθηκαν 50 υφές (n=50) στην κάθε επανάληψη. Το φαινόμενο είναι ειδικό καθώς δεν προκαλείται παρόμοιο αποτέλεσμα από την όμοια δομικά ουσία 02. Επιπλέον, η obtusenol στα 200 μ M αναστέλλει καθολικά την ανάπτυξη του *A.nidulans* όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.5. Παρατηρήθηκαν 50 υφές (n=50) στην κάθε επανάληψη.



Εικόνα 3.5: Μικροσκόπιο Axio Z1 Observer.

Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε παρατήρηση, μέσω μικροσκοπίας φθορισμού, της επίδρασης της obtusenol στα παρακάτω στελέχη ώστε να εντοπιστεί ο ακριβής τρόπος της αναστολής της ανάπτυξης. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν στελέχη τα οποία διαθέτουν, σημασμένες με φθορίζουσες επιτόπους, συγκεκριμένες πρωτεΐνες οι οποίες εντοπίζονται σε χαρακτηριστικές ενδοκυτταρικές δομές (π.χ. το Πυρηνικός φάκελος/Ενδοπλασματικό Δίκτυο μέσω της τσαπερόνης ShrA-GFP, ο πυρήνα μέσω της ιστόνης H1-mRFP, και τα σημεία εξόδου από το ενδοπλασματικό δίκτυο μέσω της Sec24-GFP, η πλασματική μεμβράνη μέσω του μεταφορέα UapA-GFP, και στο trans-Golgi μέσω της PH-mRFP). Η συγκέντρωση που επιλέχθηκε είναι 100 μ M ώστε να μην επηρεαστεί η φυσιολογική ανάπτυξη των στελεχών παρουσία της ουσίας obtusenol.



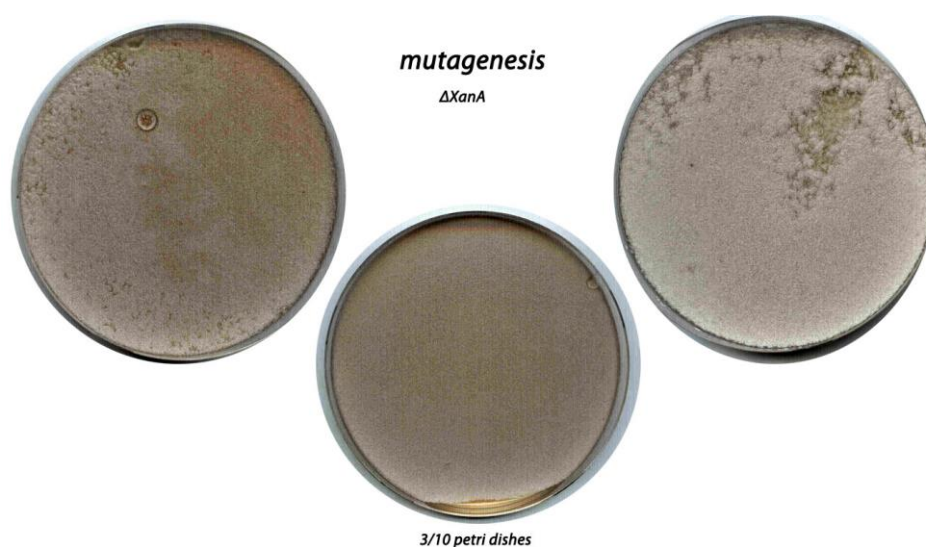
Εικόνα 3.6: Η μικροσκοπική παρατήρηση πραγματοποιήθηκε σε υγρό ελάχιστο θρεπτικό μέσο (MM) παρουσία γλυκόζης ως πηγή άνθρακα (0.1%) και νιτρικών αλάτων ως μοναδική πηγή αζώτου στους 25 °C (18h) κα pH 5.0. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από n=30 υφές σε συνολικά 2 επαναλήψεις πειραμάτων

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.6 είναι αποθαρρυντικά καθώς δεν φαίνεται να επηρεάζεται κάποιο συγκεκριμένο στέλεχος περαιτέρω, αντιθέτως παρατηρούμε ότι τα στελέχη έχουν αναπτυχθεί φυσιολογικά στη συγκέντρωση των 100 μ M.

3.1.3 Σχηματισμός μεταλλαγμένων ανθεκτικών στελεχών

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε προσπάθεια μεταλλαξιγένεσης για την ανάκτηση ανθεκτικότητας ως προς την ουσία obtuseinol. Η υπόθεση ότι η obtuseinol εισέρχεται στο κύτταρο από κάποιο μεταφορέα είναι η βάση για τον σχεδιασμό του συγκεκριμένου πειράματος. Αν μία τυχαία μετάλλαξη συμβεί στην αλληλουχία του ενεργού κέντρου του μεταφορέα που δεσμεύεται η ουσία obtuseinol και αυτό σταματήσει να αναγνωρίζεται από το κέντρο δέσμευσης του μεταφορέα, τότε το φάρμακο δεν θα μπορεί να εισέλθει στο κύτταρο και να επιδράσει αρνητικά στις δομές του, με αποτέλεσμα να παρατηρηθεί η ανάπτυξη υγιών αποικιών. Η συγκέντρωση της obtuseinol είναι 200 μ M και το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε είναι το *ΔxanA*, το οποίο φέρει μεταλλαγή εξάλειψης του γονιδίου *xanA* που όμως δεν επηρεάζει τη γενικότερη φυσιολογία του στελέχους στις πειραματικές συνθήκες

που επιλέχθηκαν, άλλα είναι ιδανικό στην επιλογή ανθεκτικών στελεχών λόγω του άσπρου χρώματος (wA1). Με μακροσκοπική παρατήρηση των τρύβλιων, δύο από τα οποία απεικονίζονται στην Εικόνα 3.7, συμπεραίνουμε ότι δεν έχει πραγματοποιηθεί μετάλλαξη η οποία θα απέκλειε τη μεταφορά του φαρμάκου μέσω μεταφορέα. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός δύο αποικιών που μακροσκοπικά έδειχναν πιο ανθεκτικές από τον υπόλοιπο πληθυσμό, χωρίς ωστόσο να ανακτηθεί κάποια ανθεκτικότητα (Εικόνα 3.8).



Εικόνα 3.7: Μεταλλαξιγένεση 10^8 σπορίων στελέχους *ΔXanA* παρουσία 200μM obtusenol στους 25 °C pH6.8



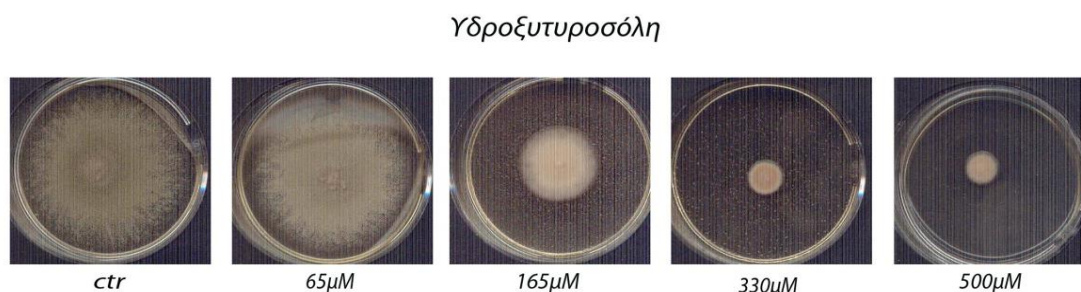
Εικόνα 3.8: Επιλογή μεταλλαγμένων στελεχών παρουσία 200μM obtusenol.

3.2 Δευτερογενείς μεταβολίτες από το το φυτό *Olea europaea*

3.2.1 Αύξηση των στελεχών των μυκήτων

Δοκιμές ανάπτυξης μυκητιακών στελεχών πραγματοποιήθηκαν παρουσία των ουσιών που παρατίθενται στον Πίνακα 2.2.

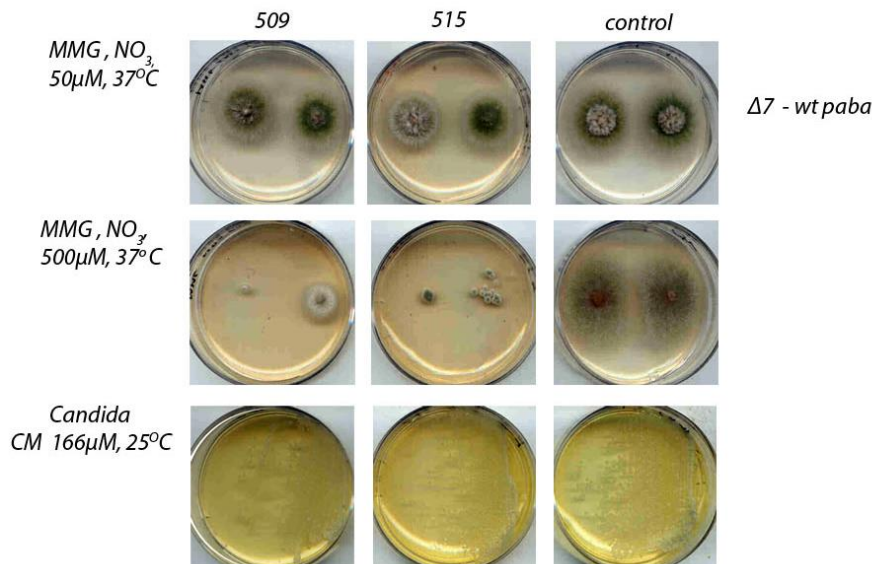
Αρχικά πραγματοποιήθηκε δοκιμασία ανάπτυξης του στελέχους *A. nidulans* φυσικού τύπου σε θρεπτικό υπόστρωμα MM (Εκλεκτικό Υπόστρωμα) παρουσία υδροξυτυροσόλης σε διαβάθμιση συγκεντρώσεων. Η υδροξυτυροσόλη παρουσιάζει αντιμυκητιακή δράση καθώς όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.11 αναστέλλει προοδευτικά την ανάπτυξη του στελέχους.



Εικόνα 3.11 : Δοκιμές ανάπτυξης του *A.nidulans* φυσικού τύπου σε MM (Εκλεκτικό Υπόστρωμα), με προσθήκη γλυκόζης 1 % w/v ως πηγή άνθρακα, νιτρικών ιόντων (NO_3^-) ως μοναδική πηγή αζώτου, pH 6.8 και θερμοκρασία 37°C.

Με δεδομένο τις αντιμυκητιακές ιδιότητες της υδροξυτυροσόλης σχεδιάστηκαν δοκιμές ανάπτυξης του στελέχους του *A.nidulans* φυσικού τύπου παρουσία χημικών αναλόγων της υδροξυτυροσόλης. Σε θρεπτικά υλικά εμποτισμένα με τα χημικά ανάλογα 509 και 515 του Πινάκα 2.2, ελέγχθηκε η βιωσιμότητα στελέχους αυξότροφου για *p-αμινοβενζοϊκό οξύ* (*pabaA1*) και του στελέχους Δ7 (βλέπε Πίνακας 2.1), καθώς και της *Candida albicans*. Οι δοκιμές ανάπτυξης του *A.nidulans* πραγματοποιήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα MM (Εκλεκτικό Υπόστρωμα) με γλυκόζη 1 % w/v ως πηγή άνθρακα, νιτρικά ιόντα (NO_3^-) ως μοναδική πηγή αζώτου, την προσθήκη της αυξοτροφίας *paba*, pH 6,8 και θερμοκρασία 37°C. Η συγκέντρωση των ουσιών είναι 50 μM στην πρώτη σειρά τρυβλίων και 500 μM στη δεύτερη σειρά τρυβλίων (Εικόνα 3.11). Επίσης η τρίτη σειρά τρυβλίων παρουσιάζει τη δοκιμή στο στέλεχος *C.albicans* το οποίο ελέγχθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα CM

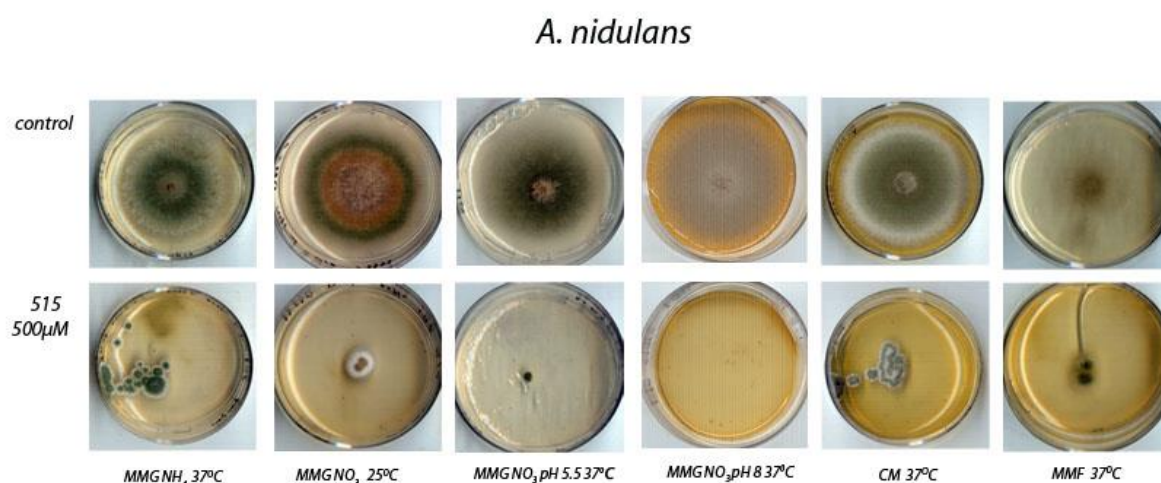
(Πλήρες Υπόστρωμα), σε θερμοκρασία 37°C και η συγκέντρωση είναι 166 μM (Εικόνα 3.12).



Εικόνα 3.12: Δοκιμές ανάπτυξης των στελεχών *A.nidulans* φυσικού τύπου και *C.albicans* παρουσία των ουσιών 509 και 515 σε 50 μM , 500 μM και 166 μM , αντιστοίχως.

Από την παρατήρηση της Εικόνα 2.12 γίνεται αντιληπτό ότι οι ουσίες παρουσιάζουν αξιόλογη αντιμυκητιακή δράση στη συγκέντρωση 500 μM καθώς παρατηρείται αναστολή της ανάπτυξης των δύο στελεχών. Πιο δραστική ουσία κρίνεται η 515 αφού η αναστολή της ανάπτυξης στη συγκέντρωση 500 μM κρίνεται ισχυρότερη. Το ίδιο συμπέρασμα εξάγεται και από την ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης της *C.albicans* στη συγκέντρωση των 166 μM . Από την αναστολή της ανάπτυξης των δύο στελεχών *A. nidulans* με την επίδραση των τοξικών ουσιών προκύπτει ότι η απουσία των μεταφορέων δεν επηρεάζει τον μηχανισμό δράσης των ουσιών. Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε δοκιμασία ανάπτυξης του *A.nidulans* φυσικού τύπου υπό διαφορετικές συνθήκες για τη διερεύνηση της πιθανής επίδρασης των συνθηκών στην τοξικότητα του χημικού αναλόγου υδροξυτυροσόλης, 515. Η συγκέντρωση της ουσίας που χρησιμοποιήθηκε είναι 500 μM καθώς ήδη αποδείχθηκε η τοξικότητα της ουσίας στη συγκέντρωση αυτή. Οι *in vivo* δοκιμές ανάπτυξης πραγματοποιήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα CM

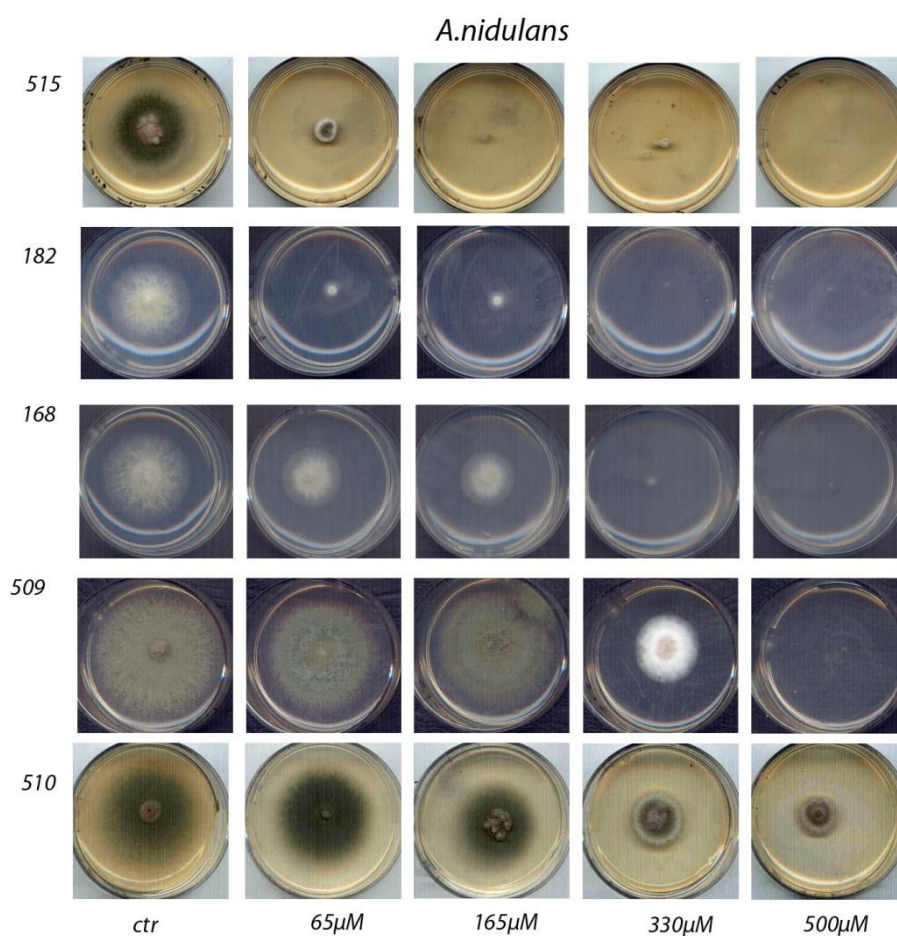
(Πλήρες Υπόστρωμα) και MM (Εκλεκτικό Υπόστρωμα) με γλυκόζη 1 % (w/v) ή φρουκτόζη 1 % (w/v) ως πηγή άνθρακα και την προσθήκη νιτρικών ιόντων (NO_3^-) ή αμμωνιακών ιόντων (NH_4^+), ως μοναδική πηγή αζώτου. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν δύο τιμές pH (5,0, 8,0) καθώς και σε δύο θερμοκρασίες 25 ° και 37 °C (Εικόνα 3.13).



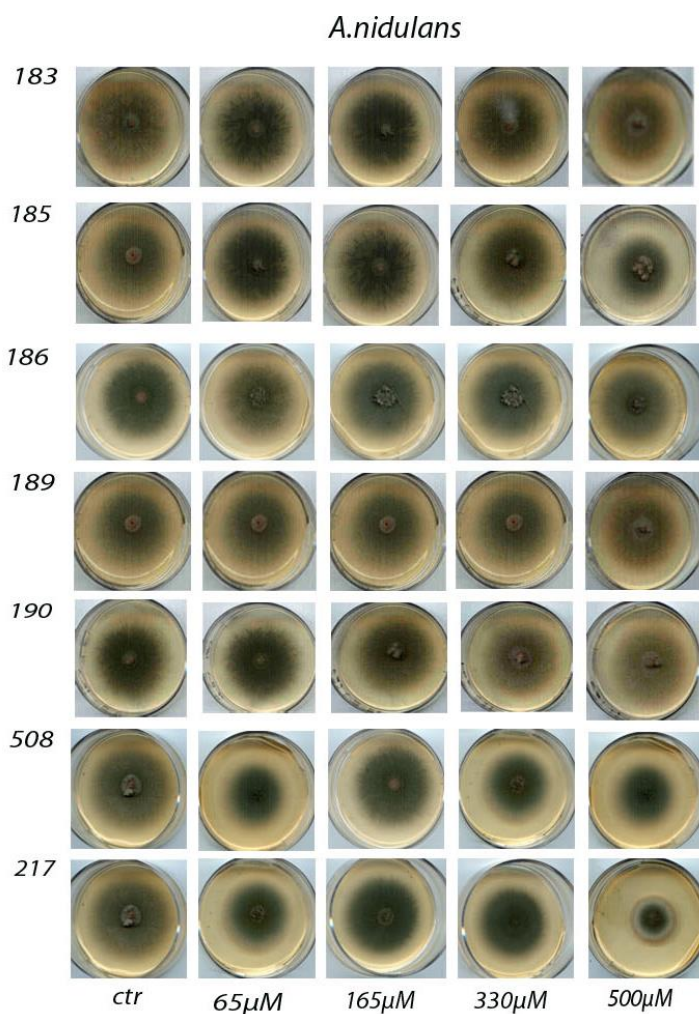
Εικόνα 3.13: Δοκιμές ανάπτυξης του στελέχους *A.nidulans* φυσικού τύπου υπό διαφορετικές συνθήκες.

Η παρατήρηση των τρυβλίων της Εικόνας 3.13 οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η διαφοροποίηση των συνθηκών (θερμοκρασία, pH, θρεπτικό υπόστρωμα) δεν συντελεί σημαντικά στην αύξηση ή μείωση της τοξικότητας της ουσίας. Θα μπορούσε όμως να σημειωθεί ότι στο τρυβλίο με εκλεκτικό υπόστρωμα (MM), νιτρικά ιόντα ως πηγή αζώτου, και τιμή pH 8 παρατηρείται πλήρης αναστολή της ανάπτυξης του στελέχους, παρατηρείται δηλαδή ελαφρώς ισχυρότερη δραστηριότητα. Συμπερασματικά, από δύο επαναλήψεις του παρόντος πειράματος, πιστεύουμε ότι η δράση του χημικού αναλόγου υδροξυτυροσόλης 515 δεν εξαρτάται από την έκφραση μεταφορέων των οποίων η έκφραση ρυθμίζεται από τις φυσιολογικές συνθήκες που επιλέχτηκαν, αλλά βασίζεται είτε σε δράση που δεν απαιτεί την εισαγωγή της ουσίας εντός των κύτταρων, είτε η ουσία διαχέεται μη ειδικά δια μέσου της λιπιδικής διπλοστοιβάδας. Ακολούθως ελέγχθηκαν τα χημικά ανάλογα υδροξυτυροσόλης 515, 182, 510, 509, 168, 183, 185, 186, 189, 508, 190 και 217 για την αντιμυκητιακή τους δράση έναντι του στελέχους *A. nidulans* φυσικού

τύπου σε διαβάθμιση συγκεντρώσεων (65 μM , 165 μM , 330 μM , 500 μM). Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα MM (Εκλεκτικό Υπόστρωμα) με γλυκόζη 1 % (w/v) ως πηγή άνθρακα, την προσθήκη νιτρικών ιόντων (NO_3^-), ως μοναδική πηγή αζώτου, και την προσθήκη της αυξατροφίας *raba*. Οι *in vivo* δοκιμές ανάπτυξης πραγματοποιήθηκαν σε pH 6,8 και σε θερμοκρασία 37 °C.



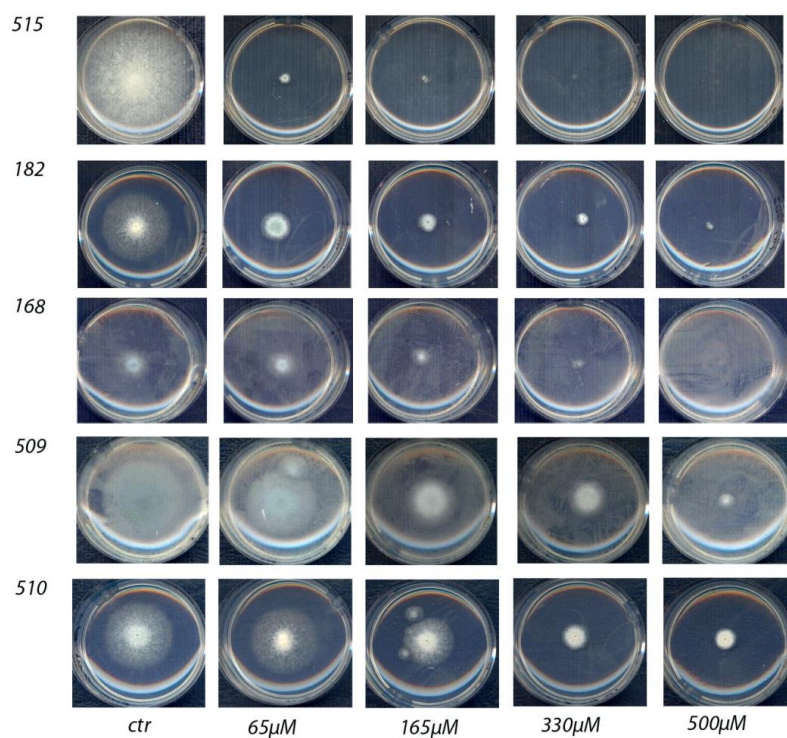
Εικόνα 3.14: Δοκιμές ανάπτυξης του *Aspergillus nidulans* φυσικού τύπου σε MM (Εκλεκτικό Υπόστρωμα), με προσθήκη γλυκόζης 1 % w/v ως πηγή άνθρακα, νιτρικών ιόντων (NO_3^-) ως πηγή αζώτου, παρουσία ουσιών (Πίνακας 2.2) σε διαβάθμιση συγκεντρώσεων.



Εικόνα 3.15: Δοκιμές ανάπτυξης του *Aspergillus nidulans* φυσικού τύπου σε MM (Εκλεκτικό Υπόστρωμα), με προσθήκη γλυκόζης 1 % w/v ως πηγή άνθρακα, νιτρικών ιόντων (NO_3^-) ως πηγή αζώτου, παρουσία ουσιών(Πίνακας 2.2) σε διαβάθμιση συγκεντρώσεων.

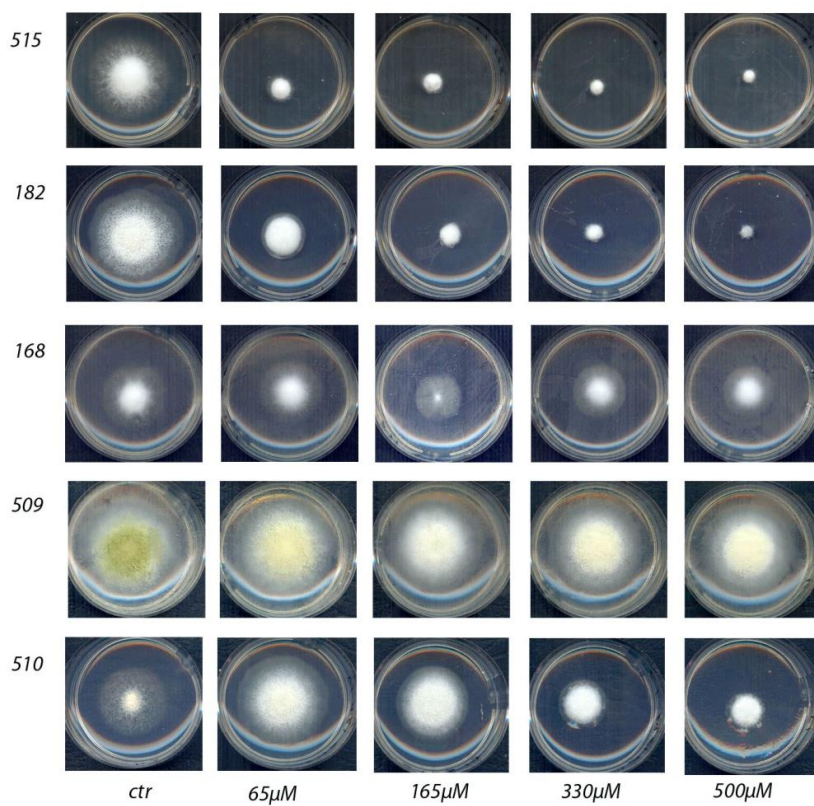
Τα αποτελέσματα (Εικόνες 3.14 & 3.15) κατέδειξαν ως δραστικότερες ουσίες τις 168, 509, 510 και όπως ήταν αναμενόμενο από τα προηγούμενα πειράματα, τις 515 και 182. Τα χημικά ανάλογα υδροξυτυροσόλης 183, 185, 186, 189, 190, 508 και 217 δεν εμφανίζουν αντιμυκητιακές ιδιότητες καθώς δεν αναστέλλεται η ανάπτυξη υγιών αποικιών του *A. nidulans* στις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά πραγματοποιήθηκαν όμοιες δοκιμές ανάπτυξης παρουσία των δραστικότερων ουσιών έναντι των στελεχών *A. fumigatus*, *A. flavus* και *C. albicans*.

A.fumigatus

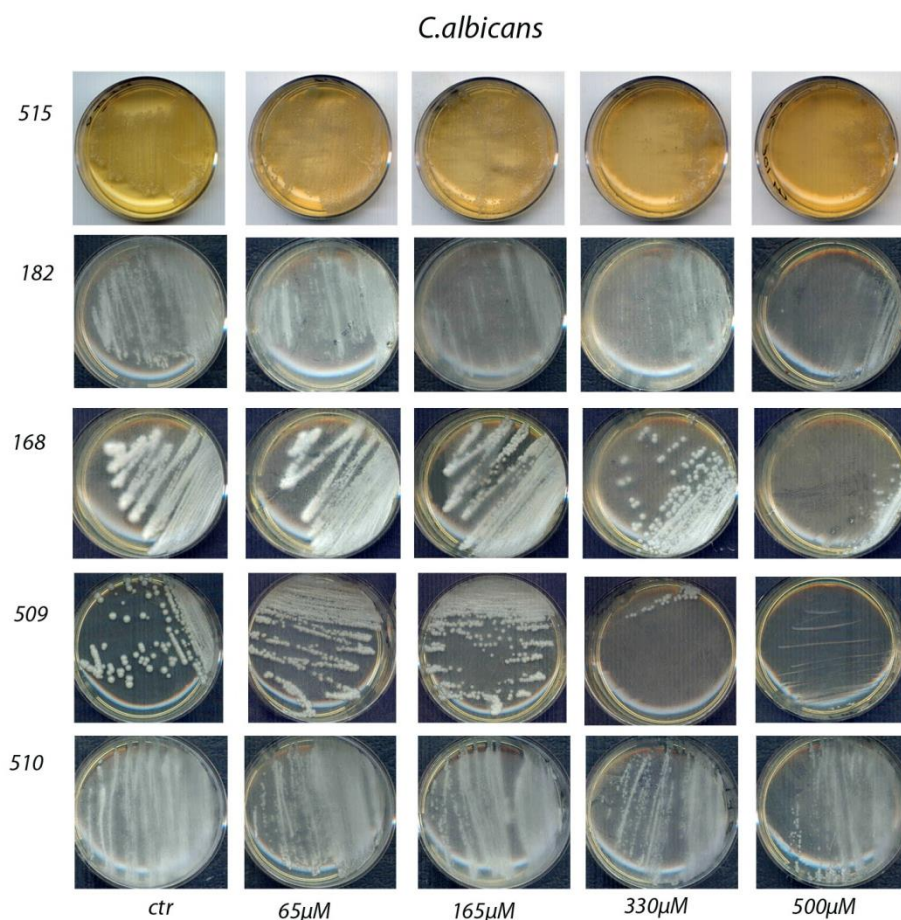


Εικόνα 3.16: Δοκιμές ανάπτυξης του *Aspergillus fumigatus* σε MM (Εκλεκτικό Υπόστρωμα), με προσθήκη γλυκόζης 1 % w/v ως πηγή άνθρακα, νιτρικών ιόντων (NO_3^-) ως πηγή αζώτου, παρουσία ουσιών(Πίνακας 2.2) σε διαβάθμιση συγκεντρώσεων.

A.flavus



Εικόνα 3.17: Δοκιμές ανάπτυξης του *Aspergillus flavus* σε MM (Εκλεκτικό Υπόστρωμα), με προσθήκη γλυκόζης 1 % w/v ως πηγή άνθρακα, νιτρικών ιόντων (NO_3^-) ως πηγή αζώτου, παρουσία ουσιών(Πίνακας 2.2) σε διαβάθμιση συγκεντρώσεων.



Εικόνα 3.18: Δοκιμές ανάπτυξης του *Candida albicans* σε CM (Πλήρες Υπόστρωμα) παρουσία ουσιών(Πίνακας 2.2) σε διαβάθμιση συγκεντρώσεων.

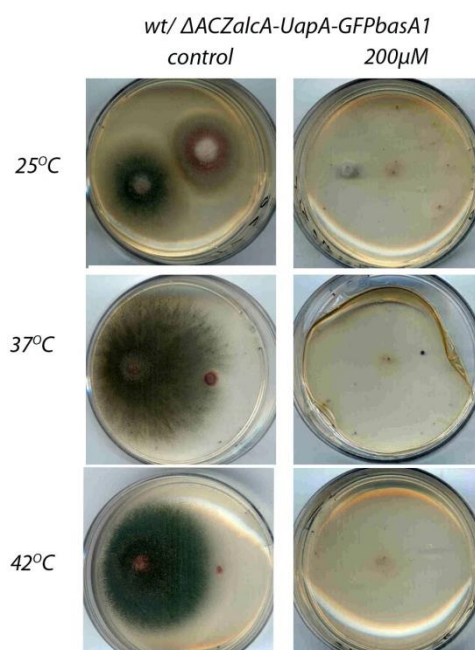
Πίνακας 3.1: Τιμές των μεγεθών IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) και MIC (Minimum inhibitory concentration) των δραστικών χημικών αναλόγων εκφρασμένες σε μM (Πίνακας 2.2).

	168		182		509		510		515		hT	
Μύκητας	IC_{50}	MIC	IC_{50}	MIC	IC_{50}	MIC	IC_{50}	MIC	IC_{50}	MIC	IC_{50}	MIC
<i>A. nidulans</i>	330	>500	165	500	>500	-	>500	-	65	500	330	>500
<i>A. fumigatus</i>	165	500	<65	500	330	>500	>500	-	65	500	500	>500
<i>A. flavus</i>	>500	-	65	>500	-	-	>500	-	<65	>500	-	-
<i>C. albicans</i>	>500	-	>500	-	330	>500	>500	-	<65	500	-	-

Συγκεντρωτικά, τα αποτελέσματα των δοκιμών παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1. Η υδροξυτυροσώλη καθώς και τα ανάλογα της 168, 182, 509, 510 and 515 παρουσιάζουν τοξικότητα έναντι των *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, και *C.*

albicans. Από τα τρυβλία μετρήθηκαν οι τιμές των MIC (Παράγραφος 2.3) και IC₅₀ (Παράγραφος 2.3). Πιο συγκεκριμένα, η δραστικότερη ουσία είναι η 515. Το IC₅₀ αποτιμάται για τα τρία στελέχη του *Aspergillus* μικρότερο των 65 μM ενώ η ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία δεν είναι ορατή η ανάπτυξη του μύκητα είναι περι τα 500 μM . Μεγάλη τοξικότητα επίσης εμφανίζει η ουσία 182. Οι τιμές των MIC και IC₅₀ είναι όμοιες με αυτές του αναλόγου 515 (500 μM και 65 μM αντιστοίχως) με τη μόνη διαφορά να εντοπίζεται στην μεγαλύτερη δραστικότητα του 182 κατά του *A. fumigatus*. Έπονται τα ανάλογα 168 με MIC IC₅₀ 500 μM και 165-330 μM και το 509 με τιμές >500 και 330-500 μM αντιστοίχως. Τέλος δραστικό αλλά σαφώς λιγότερο είναι το 510 του οποίου η τιμή IC₅₀ >500 .

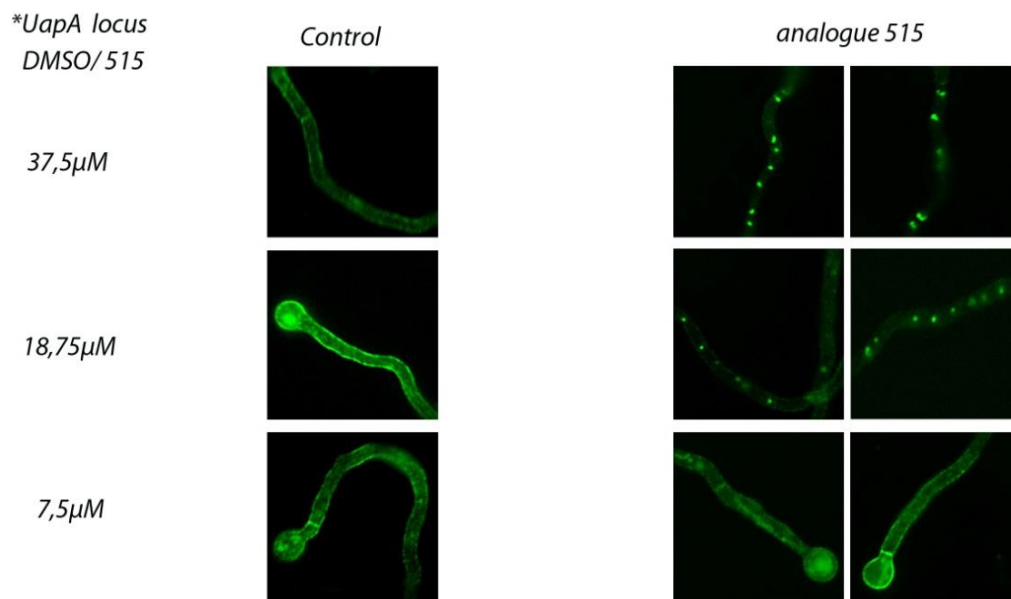
Προκειμένου να ενισχυθεί η υπόθεση της πρόσληψης των τοξικών ουσιών μέσω διάχυσης επιλέχθηκε το στέλεχος *basA1 pyrG89* το οποίο φέρει μεταλλαγή μερικής απώλειας της λειτουργίας ενός βασικού γονιδίου στο μονοπάτι βιοσύνθεσης σφινγολιπιδίων, προκειμένου να ελεγχτεί αν η σύσταση και η σωστή λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης επηρεάζει την ανθεκτικότητα του κυττάρου ως προς την υπό μελέτη ουσία. Από την Εικόνα 3.19 παρατηρήθηκε ότι κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει καθώς η ουσία 515 σε συγκέντρωση 200 μM , εμφανίζει κυττατοτοξικές ιδιότητες αναστέλλοντας πλήρως την ανάπτυξη του στελέχους στις θερμοκρασίες 25 °C, 37 °C και 42 °C τόσο στο στέλεχος *A. nidulans* φυσικού τύπου όσο και στο στέλεχος *basA1*. Παρατηρήθηκε ακόμα ότι στη θερμοκρασία των 25 °C χωρίς την παρουσία του χημικού αναλόγου υδροξυτυροσόλης 515, το στέλεχος *basA1* αναπτύσσετε φυσιολογικά σε σύγκριση με το στέλεχος φυσικού τύπου. Αντιθέτως, στις θερμοκρασίες 37 °C και 42 °C το στέλεχος *basA1* παρατηρείται πλήρους αναστολή της ανάπτυξης του στελέχους, γεγονός που αποδίδεται στο ότι το συγκεκριμένο στέλεχος είναι θερμοευαίσθητο.



Εικόνα 3.19: Δοκιμές ανάπτυξης του *Aspergillus nidulans* φυσικού τύπου και του στελέχους basA1 παρουσία της ουσίας 515, σε MM (Εκλεκτικό Υπόστρωμα), γλυκόζη 1 % w/v ως πηγή άνθρακα, νιτρικά ιόντα (NO_3^-) ως μοναδική πηγή αζώτου, pH 6.8, σε θερμοκρασίες 25°C, 37°C και 42°C.

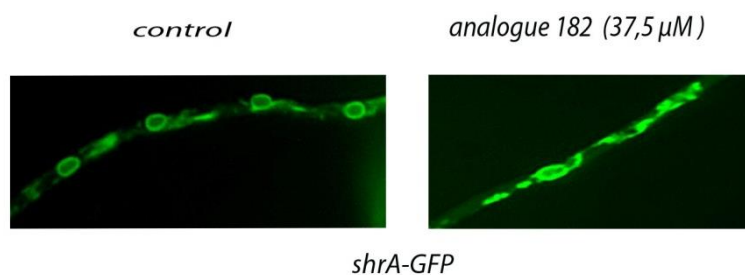
3.2.2 Μορφολογική ανάλυση κυττάρων *A.nidulans* με μικροσκοπία φθορισμού

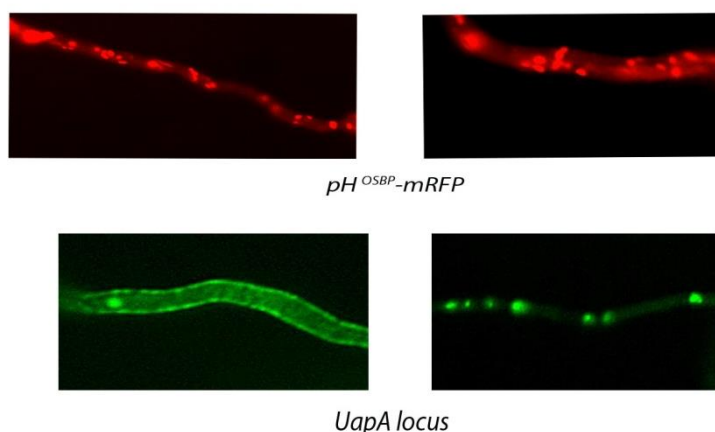
Στο επόμενο βήμα, πραγματοποιήθηκε παρατήρηση, μέσω μικροσκοπίας φθορισμού, της επίδρασης της ουσίας 515 στη πλασματική μεμβράνη του *A. nidulans*. Χρησιμοποιήθηκε στέλεχος το οποίο εκφράζει τον μεταφορέα UapA-GFP ούτως ώστε να μπορεί να εντοπιστεί η πλασματική μεμβράνη μέσω του ειδικού φθορισμού της GFP. Στην χαμηλότερη συγκέντρωση της ουσίας 515 που χρησιμοποιήθηκε (7,5 μ M), παρατηρείται διαταραχή στην δομή της μεμβράνης αλλά όχι καταστροφή. Αντιθέτως στη μεγαλύτερη συγκέντρωση της ουσίας (37,5 μ M) δεν εντοπίζεται φθορισμός στη πλασματική μεμβράνη του στελέχους παρα μόνο σε εσωτερικές δομές. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.20 η επίδραση της 515 στην πλασματική μεμβράνη αυξάνεται προοδευτικά εν συνάρτηση της συγκέντρωσης.



Εικόνα 3.20: Η μικροσκοπική παρατήρηση πραγματοποιήθηκε σε υγρό ελάχιστο θρεπτικό μέσω (MM) παρουσία γλυκόζης ως πηγή άνθρακα (0.1%) και νιτρικών αλάτων ως μοναδική πηγή αζώτου στους 25 °C (18h) και pH 5.0. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από n=20 υφές σε συνολικά 3 επαναλήψεις.

Ανάλυση μικροσκοπίας φθορισμού πραγματοποιήθηκε και για την παρατήρηση της του χημικού αναλόγου υδροξυτυροσόλης 182, που όπως ήδη αναφέρθηκε είναι εξίσου δραστική με το χημικό ανάλογο υδροξυτυροσόλης 515. Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω στελέχη ώστε να εντοπιστεί ο ακριβής τρόπος της αναστολής της ανάπτυξης όπως ακριβώς περιγράφηκε στην παράγραφο 3.1.2.





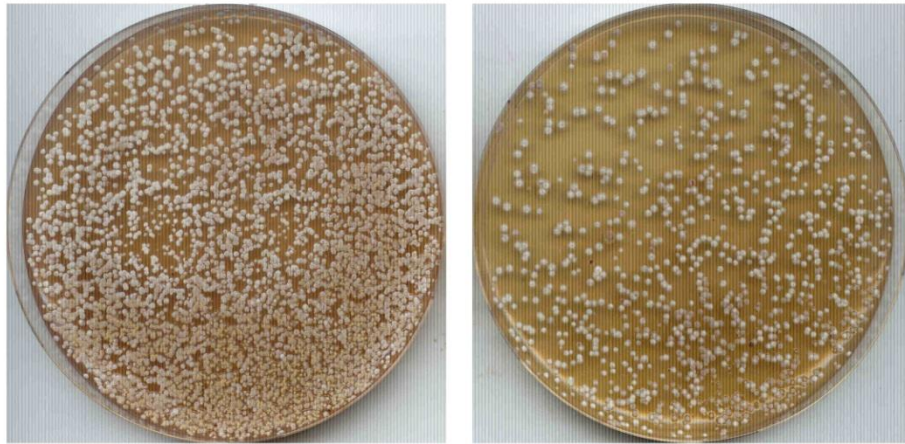
Εικόνα 3.21: Η μικροσκοπική παρατήρηση πραγματοποιήθηκε σε υγρό ελάχιστο θρεπτικό μέσω (MM) παρουσία γλυκόζης ως πηγής άνθρακα (0.1%) και νιτρικών αλάτων ως μοναδική πηγή αζώτου στους 25 °C (18h) κα pH 5.0. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από n=40 υφές σε συνολικά 2 επαναλήψεις πειραμάτων.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.21 καταδεικνύουν την καταστροφή της πλασματικής μεμβράνης ενώ δεν φαίνεται να επιδρά καταστροφικά η του χημικού αναλόγου υδροξυτυροσόλης 182 στο σύστημα Golgi μέσω της PH-mRFP και στο ενδοπλασματικό δίκτυο μέσω της τσαπερόνης ShrA-GFP.

3.2.3 Σχηματισμός μεταλλαγμένων ανθεκτικών μυκητιακών στελεχών

Πολύ σημαντικός παράγοντας για την αξιολόγηση των αντιμυκητιακών ουσιών ως πιθανά αντιμυκητιακά φάρμακα είναι η σχετική ευκολία και η συχνότητα που προκύπτουν ανθεκτικά μεταλλάγματα στελέχη. Έτσι σκοπός του παρόντος πειράματος είναι η ανάκτηση ανθεκτικότητας του στελέχους που χρησιμοποιήθηκε (Εικόνα 3.22) παρουσία της τοξικής ουσίας 515. Η συγκέντρωση του χημικού αναλόγου υδροξυτυροσόλης 515 είναι 500 μ M. Με μακροσκοπική παρατήρηση των τρύβλιων, δύο από τα οποία απεικονίζονται στην Εικόνα 3.22, συμπεραίνεται ότι δεν έχει πραγματοποιηθεί μετάλλαξη καθώς δεν έχουν αναπτυχθεί υγιείς αποικίες.

Mutagenesis
MMG, NO₃, panto, biotine, 500μM 515 (515 και στο MMG και στο TOP) strain: UaY462c

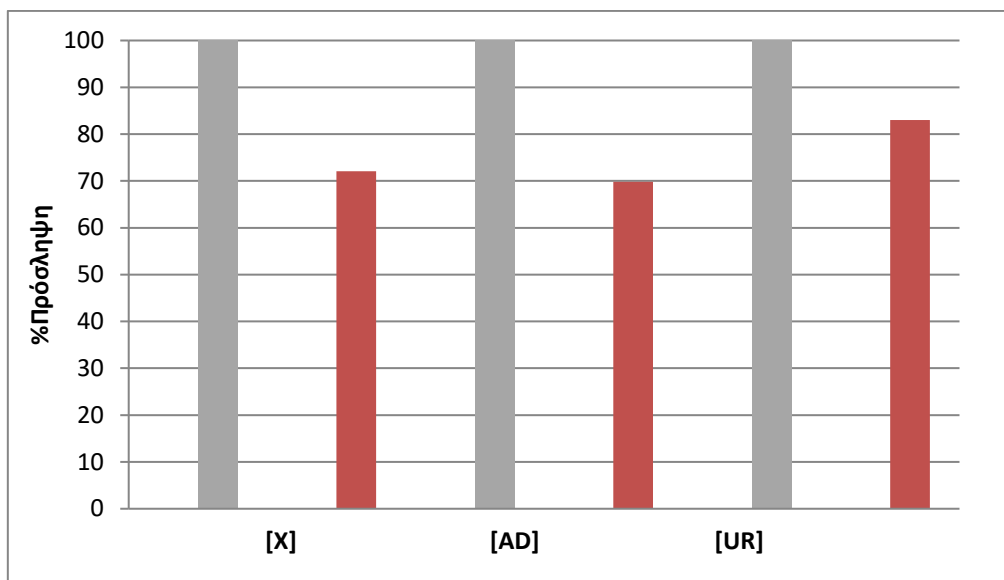


Εικόνα 3.22: Προϊόν μεταλλαξιγένεσης 10⁹ σπορίων παρουσία 500μM 515 στους 25 °C pH 6,8

3.2.4 Μελέτη της κινητικής πρόσληψης των φυσικών υποστρωμάτων παρουσία του χημικού αναλόγου υδροξυτυροσόλης 515

Στη συνέχεια, με δεδομένο ότι η ουσία 515 καταστρέφει την πλασματική μεμβράνη και συνεπώς αναστέλλει την λειτουργία των μεταφορέων, πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση της πρόσληψης των φυσικών υποστρωμάτων των μεταφορέων προκειμένου να διαπιστωθεί η εν λόγω υπόθεση. Η κινητική μελέτη πραγματοποιήθηκε με τον προσδιορισμό της ταχύτητας πρόσληψης των φυσικών υποστρωμάτων από τους μεταφορείς παρουσία της τοξικής ουσίας 515. Η ταχύτητα πρόσληψης των φυσικών υποστρωμάτων από τους μεταφορείς αντανakλάται στις τιμές ραδιοσημασμένων υποστρωμάτων που συγκεντρώνονται σε συγκεκριμένο αριθμό κονιδιοσπορίων σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (Παράγραφος 2.4). Θεωρώντας ότι το στέλεχος φυσικού τύπου απουσία φαρμάκου ως προς UapA, UapC, και FurD προσλαμβάνει ραδιοσημασμένη ξανθίνη με τη μέγιστη δυνατή ταχύτητα (100%), υπολογίστηκε η σχετική ταχύτητα πρόσληψης της ραδιοσημασμένης ξανθίνης με την παρουσία της ουσίας 515. Αντίστοιχα, με την υπόθεση ότι το στέλεχος απουσία φαρμάκου ως προς AzgA και FcyB προσλαμβάνει ραδιοσημασμένη αδενίνη στη μέγιστη δυνατή ταχύτητα υπολογίζεται η ταχύτητα

πρόσληψης παρουσία του χημικού αναλόγου υδροξυτυροσόλης 515 και τέλος με δεδομένη τη μέγιστη δυνατή απορρόφηση της ραδιοσημασμένης ουρακίλης ως προς FurD υπολογίζεται η ταχύτητα πρόσληψης με το χημικό ανάλογο 515.



Εικόνα 3.23: Απεικόνιση της ταχύτητα πρόσληψης της ξανθίνης [X] από τον μεταφορέα UapA (αριστερά), της αδερίνης [AD] από τον μεταφορέα AzgA (κέντρο) και της ουρακίλης[UR] από τον μεταφορέα FurD (δεξιά).

Τα αποτελέσματα πράγματι καταδεικνύουν ότι το χημικό ανάλογο υδροξυτυροσόλης 515 προκαλεί άμεση μη-ειδική αναστολή της δράσης όλων των μεταφορέων που αναφέρθηκαν, γεγονός που είναι αναμενόμενο για ουσίες που καταστρέφουν την πλασματική μεμβράνη.

3.2.5 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας του χημικού αναλόγου υδροξυτυροσόλης 515

Σε σειρά κυττάρων ποντικού πραγματοποιήθηκε έλεγχος κυτταροτοξικότητας του χημικού αναλόγου υδροξυτυροσόλης 515 σε συγκέντρωση 500 μ M. Η μεθοδολογία αυτού παρατίθεται αναλυτικά στο κεφάλαιο των μεθόδων. Τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης που παρατίθενται στον Πίνακα 2.3 έδειξαν ότι το χημικό ανάλογο υδροξυτυροσόλης 515 δεν εμφανίζει τοξικότητα.

Πίνακας 3.2: Φωτομέτρηση σε φωτόμετρο ELISA στα 545nm

A(nm)	Control	500μM 515
	0,689	0,611
	0,520	0,640

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4. Συζήτηση

Οι μολύνσεις από είδη του γένους *Aspergillus* αλλά και από το είδος *Candida albicans* μπορούν να προκαλέσουν πλήθος ασθενειών, όπως αναλύθηκε στα προηγούμενα κεφάλαια (βλέπε Κεφάλαιο 1.4 και 1.5 αντίστοιχα). Μπορούν να προσβάλλουν τα φυτά, τα ζώα αλλά και τον άνθρωπο και πέρα από συνέπειες που σχετίζονται με την υγεία των προσβεβλημένων ξενιστών έχουν και οικονομικές συνέπειες (Sharma & Chowdhary 2017; Perlin et al. 2017). Για τους λόγους αυτούς έχουν αναπτυχθεί αντιμυκητιακά φάρμακα. Η αλόγιστη όμως χρήση τους καθώς και η εγγενής ικανότητα ορισμένων μυκήτων να αντιμετωπίζουν τη δράση των φαρμάκων αυτών, καθιστά αναγκαία την ανάπτυξη νέων σκευασμάτων έναντι των μικροοργανισμών αυτών. Η εμφάνιση νέων μυκητιακών στελεχών αποτελεί έναν επιπλέον παράγοντα που αυξάνει την ανάγκη παραγωγής νέων σκευασμάτων. Επιπλέον, σε πολλές περιπτώσεις, όπως σε αυτή των διεισδυτικών μολύνσεων, τα υπάρχοντα φάρμακα είναι λίγα σε αριθμό. Ο μικρός αριθμός τέτοιων φαρμάκων σε συνδυασμό με πιθανή περιορισμένη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή, μπορεί να επιδεινώσει πιθανή μόλυνση από μύκητες (Wiederhold 2017; Sharma & Chowdhary 2017). Είναι εμφανές πως η ανάγκη για δημιουργία νέων αντιμυκητιακών φαρμάκων είναι επιτακτική. Σε αυτό συντελεί και η τοξικότητα των ήδη εφαρμοζόμενων φαρμάκων καθώς και η μειωμένη, σε ορισμένες περιπτώσεις αποτελεσματικότητά τους. Ένας μικρός αριθμός τέτοιων φαρμάκων εφαρμόζονται σε προκλινικές και κλινικές μελέτες. Κάποια από αυτά παρουσιάζουν παρόμοιο τρόπο δράσης με τα ήδη υπάρχοντα φάρμακα, αλλά με επιπλέον πλεονεκτήματα (Wiederhold 2017; Sharma & Chowdhary 2017). Πρόκειται για πεπτιδία που στοχεύουν στη δράση της 14α-διμεθυλάσης ή του κυτοχρώματος P450 (VT-1129, VT-1161, VT-1598) (Warrilow et al. 2014; Hoekstra et al. 2014; Wiederhold 2017). Μια άλλη ομάδα πεπτιδίων στοχεύει στη δράση της συνθάσης της γλυκάνης (πεπτιδία CD101 και SCY-078) ενώ άλλες ομάδες παρεμποδίζουν τη σύνθεση της πυριμιδίνης (πεπτιδίο F901318) (Wiederhold 2017) και της γλυκοσυλφωσφατιδυλοινωσιτόλης (πεπτιδίο AX001) (Pfaller et al. 2011). Τέλος, μια ομάδα πεπτιδίων στοχεύει τη δομή της μεμβράνης των μιτοχονδρίων (πεπτιδίο T-2307) (Wiederhold et al. 2015).

Παρόλο που παρατηρούνται βήματα τόσο σε επίπεδο προκλινικών όσο και σε επίπεδο κλινικών ερευνών, ο αριθμός των νέων σκευασμάτων που έχουν ως στόχο την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση των μυκητιακών λοιμώξεων είναι περιορισμένος.

Σκοπός της έρευνας ήταν η εύρεση χημικών ενώσεων φυτικής προέλευσης . Για το λόγο αυτό, απομονώθηκαν συγκεκριμένες χημικές ενώσεις και μελετήθηκαν υπο ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες, έτσι ώστε να μελετηθούν οι ιδιότητές τους και να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητά τους. Οι μύκητες του γένους *Aspergillus* αλλά και απο το είδος *C. albicans* μπορούν να προκαλέσουν πλήθος ασθενειών, όπως αναλύθηκε στα προηγούμενα κεφάλαια και για αυτό αποτέλεσαν το αντικείμενο μελέτης. Παράλληλα, ο *Aspergillus* ως πρότυπο σύστημα μελέτης, συγκεντρώνει πλήθος πλεονεκτημάτων όπως είναι το μικρό γονιδίωμα, η ικανότητα μετασχηματισμού και το σημαντικό πλεονέκτημα στην παρούσα εργασία, που είναι η ταχεία ανάπτυξή.

4.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων των δευτερογενών μεταβολιτών από φύκη του γένους *Laurencia*

Η αρχική ένδειξη για την τοξική δράση της obtusenol έναντι στελεχών του *A.nidulans* ήταν το εφελτήριο του σχεδιασμού μιας σειράς πειραμάτων για την διερεύνηση τόσο του βαθμού τοξικότητας της χημικής αυτής ένωσης έναντι διαφόρων μυκητιακών στελεχών, όσο και του μηχανισμού δράσης της. Ενώ αρχικά η ουσία obtusenol φάνηκε να είναι δραστική, στη συνέχεια με την πολλαπλή επανάληψη των βιοδοκιμών αλλά και με την μικροσκοπική παρατήρηση έγινε αντιληπτό ότι η obtusenol δεν αναστέλλει σε ικανοποιητικό βαθμό την ανάπτυξη των υπό μελέτη στελεχών. Ωστόσο, παρά την μέτρια αντιμικροβιακή ισχύς της obtusenol επιχειρήθηκε μέσω μεταλλαξιγένεσης η ανάκτηση ανθεκτικότητας. Το πείραμα της μεταλλαξιγένεσης με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας δεν απέδωσε ανθεκτικότητα.

4.2 Ανάλυση αποτελεσμάτων των δευτερογενών μεταβολιτών από το φυτό *Olea europaea*

Πολλά υποσχόμενες ουσίες φέρονται να είναι τα χημικά ανάλογα της υδροξυτυροσόλης 515 182, 168, 509 και 510 καθώς παρουσιάζουν αξιόλογη αντιμυκητιακή δράση. Η δράση των ουσιών αυτών έγκειται στην μερική ή ολική αναστολή της ανάπτυξης των υπό μελέτη στελεχών. Το πρώτο συμπέρασμα που προέκυψε μέσω των βιοδοκιμών που πραγματοποιήθηκαν σε ποικίλες συνθήκες είναι ότι η τοξικότητα της δραστικής ουσίας 515 δεν μπορεί να συσχετιστεί άμεσα με το θρεπτικό υπόστρωμα στο οποίο έγιναν οι βιοδοκιμές. Το γεγονός αυτό μας υποδεικνύει ότι η δράση της ουσία αυτής δεν σχετίζεται με μεταβολικά μονοπάτια η ειδικούς μεταφορείς που ρυθμίζονται από τις φυσιολογικές συνθήκες που δοκιμαστήκαν. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι είτε οι ουσίες αυτές δρουν χωρίς να εισέρχονται στα κύτταρα, είτε διαχέονται μη ειδικά μέσω της λιπιδικής διπλοστιβάδας.

Πολύ σημαντικό στοιχείο προς την ανακάλυψη του τρόπου δράσης των ουσιών 515 και 182 αποκτήθηκε μέσω της ανάλυσης μικροσκοπίας φθορισμού. Με το συγκεκριμένο πείραμα παρατηρήθηκε η κατάρρευση της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων ενώ παράλληλα, οι κυτταρικές δομές (σύστημα Golgi, ενδοπλασματικό δίκτυο και πυρήνας) διακρίνονται εύσχημα χωρίς αλλοιώσεις. Ως εκ τούτου θεωρήθηκε ότι η τοξική δράση των ουσιών 515 και 182 έγκειται κυρίως στην λύση της πλασματικής μεμβράνης. Εν συνεχεία, πειράματα της μεταλλαξιγένεσης υποστήριξαν την ιδέα ότι οι ουσίες αυτές καταστρέφουν άμεσα την πλασματική μεμβράνη, καθώς δεν ήταν δυνατή η επιλογή ανθεκτικών στελεχών, περίπτωση χαρακτηριστική αντιμυκητιακών ουσιών που δρουν άμεσα στην περιφέρεια των κυττάρων, δηλαδή στην πλασματική μεμβράνη η στο κυτταρικό τοίχωμα (π.χ. Αμφοτερικίνη Β). Τέλος, πειράματα εκτίμησης της ταχύτητας πρόσληψης συγκεκριμένων ραδιοσημασμένων ουσιών μέσω συγκεκριμένων μεταφορέων έδειξαν ότι οι ουσίες 509 και 515 προκαλούν άμεση μη-ειδική αναστολή της δράσης όλων των μεταφορέων που μελετήθηκαν, όπως είναι αναμενόμενο για ουσίες που καταστρέφουν την πλασματική μεμβράνη. Ο συνυπολογισμός όλων των προαναφερθέντων στοιχείων οδηγεί στην αποδοχή της

πρότασης ότι οι ουσίες αυτές διαχέονται μέσω της πλασματική μεμβράνη και δημιουργούν κανάλια ή πόρους από όπου γίνεται η διαρροή κυτταρικών μορίων και θάνατος των κυττάρων.

Τέλος πολύ ενθαρρυντικό στοιχείο αποτελούν τα αποτελέσματα της δοκιμασίας κυτταροτοξικότητας καθώς κατέδειξαν ότι σε σειρά κύτταρων πρότυπου οργανισμού οι ουσίες αυτές δεν εμφανίζουν τοξικότητα. Η ανακάλυψη αυτή αφήνει πολλά περιθώρια για την περαιτέρω μελέτη της ουσίας 515 αλλά και των υπολοίπων χημικών αναλόγων καθώς η δράση τους εντοπίζεται σε μυκητιακά κύτταρα και όχι σε κύτταρα των οποίων η πλασματική μεμβράνη προσομοιάζει αυτήν των ανθρωπίνων κυττάρων.

4.3 Συμπεράσματα

Ο στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας που ήταν οι ανεύρεση νέων αντιμυκητιακών ουσιών και η προκαταρκτική μελέτη του μηχανισμού δράσης αυτών, επετεύχθη. Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την παρούσα Διπλωματική εργασία συνοψίζονται παραράτω

- Τα νέα μόρια που ανακαλύφθηκαν με αντιμυκητιακές ιδιότητες είναι τα χημικά ανάλογα της υδροξυτυροσόλης και παρατίθενται με σειρά αυξανόμενης δραστηριότητας: 510 < 509 < 168 < 182 < 515
- Ο μηχανισμός δράσης των αντιμυκητιακών ουσιών εντοπίζεται στην ακαριαία καταστροφή της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων
- Δεν επετεύχθει η ανάκτηση ανθεκτικών μεταλλαγμένων μυκητιακών στελεχών
- Το χημικό ανάλογο υδροξυτυροσόλης δεν εμφανίζει τοξικότητα σε κύτταρα θηλαστικού

4.4 Νέες προοπτικές

Επόμενος στόχος του Εργαστηρίου αποτελεί η μελέτη περισσότερων χημικών αναλόγων της υδροξυτυροσόλης, ούτως ώστε να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για τον ρόλο συγκεκριμένων χημικών ομάδων στον μηχανισμό δράσης των μορίων αυτών. Επίσης, ενδιαφέρουσα προοπτική αποτελεί η ραδιοσήμανση του χημικού αναλόγου της υδροξυτυροσόλης 515 και άλλων νέων δραστικών μορίων και η μελέτη αυτών μέσω φαρμακοδυναμικών μεθόδων. Τέλος, εξαιρετικό ενδιαφέρον έχει ο έλεγχος της δράσης των τοξικών ουσιών 515 και 182 σε άλλες οικογένειες μυκήτων και συγκεκριμένα σε παθογόνα μυκητιακά στελέχη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Accensi, F. M.L. AbarcaJ. CanoL. FigueraF.J. Cabañes. 2001. Distribution of ochratoxin A producing strains in the *A. niger* aggregate. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79(3–4), pp.365–370.
- Alarif, W.M. Al-Lihaibi SS, Ayyad SE, Abdel-Rhman MH, Badria FA. et al., 2012. Laurene-type sesquiterpenes from the Red Sea red alga *Laurencia obtusa* as potential antitumor–antimicrobial agents. *European journal of medicinal chemistry*, 55, pp.462–466.
- Amaike, S. & Keller, N.P., 2011. *Aspergillus flavus*. *Annual review of phytopathology*, 49, pp.107–133.
- Ansari M. Moiz A. , Amiya Anurag, Zeeshan Fatima and Saif Hamee, 2013. Natural phenolic compounds: a potential antifungal agent. *Microb*, pp.189–195.
- Arif, T. Bhosale JD, Kumar N, Mandal TK, Bendre RS, Lavekar GS, Dabur R. 2009. Natural products--antifungal agents derived from plants. *Journal of Asian natural products research*, 11(7), pp.621–638.
- Arif, T., Mandal, T.K. & Dabur, R., 2011. Natural products: Anti-fungal agents derived from plants. *Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry*, pp.283–311.
- Bagiński M, Tempczyk A, Borowski E. 1989. Comparative conformational analysis of cholesterol and ergosterol by molecular mechanics. . *European Biophysics Journal*,;17(3):159-66.
- Bals, R. & Wilson, J.M., 2003. Cathelicidins-a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(4), pp.711–720.
- Barile E, Bonanomi G, Antignani V, Zolfaghari B, Sajjiadi S.E, Scala F, Lanzotti V. 2007. Saponins from *Allium minutiflorum* with antifungal activity. *Phytochemistry*, 68(5), pp.596–603.
- Beauvais, A. Schmidt C, Guadagnini S, Roux P, Perret E, Henry C, Paris S, Mallet A, Prévost MC, Latgé JP., 2007. An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*. *Cellular microbiology*, 9(6), pp.1588–1600.
- Beernaert, L.A. Pasmans F, Van Waeyenberghe L, Haesebrouck F, Martel A., 2010. *Aspergillus* infections in birds: a review. *Avian Pathology*, 39(5), pp.325–331.
- Boskou, D., 2015. *Olive oil: chemistry and technology*, Elsevier.

- Braun, B.R. van Het Hoog M, d'Enfert C, Martchenko M, Dungan J, Kuo A, Inglis DO, Uhl MA, Hogues H, Berriman M, Lorenz M, Levitin A, Oberholzer U, Bachewich C, Hancus D, Marcil A, Dignard D, Iouk T, Zito R, Frangeul L, Tekaia F, Rutherford K, Wang E, Munro CA, Bates S, Gow NA, Hoyer LL, Köhler G, Morschhäuser J, Newport G, Znaidi S, Raymond M, Turcotte B, Sherlock G, Costanzo M, Ihmels J, Berman J, Sanglard D, Agabian N, Mitchell AP, Johnson AD, Whiteway M, Nantel A., 2005. A human-curated annotation of the *Candida albicans* genome. *PLoS genetics*, 1(1), p.e1.
- Butler, G. Rasmussen MD, Lin MF, Santos MA, Sakthikumar S, Munro CA, Rheinbay E, Grabherr M, Forche A, Reedy JL, Agrafioti I, Arnaud MB, Bates S, Brown AJ, Brunke S, Costanzo MC, Fitzpatrick DA, de Groot PW, Harris D, Hoyer LL, Hube B, Klis FM, Kodira C, Lennard N, Logue ME, Martin R, Neiman AM, Nikolaou E, Quail MA, Quinn J, Santos MC, Schmitzberger FF, Sherlock G, Shah P, Silverstein KA, Skrzypek MS, Soll D, Staggs R, Stansfield I, Stumpf MP, Sudbery PE, Srikantha T, Zeng Q, Berman J, Berriman M, Heitman J, Gow NA, Lorenz MC, Birren BW, Kellis M, Cuomo CA., 2009. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*, 459(7247), p.657.
- Castillo, F. D. Hernández, G. Gallegos, R. Rodríguez and C. N. Aguilar , 2012. Antifungal properties of bioactive compounds from plants. In *Fungicides for plant and animal diseases*. InTech.
- Chandra, H. Bishnoi P, Yadav A, Patni B, Mishra AP, Nautiyal AR. 2017. Antimicrobial Resistance and the Alternative Resources with Special Emphasis on Plant-Based Antimicrobials—A Review. *Plants* , 6(2).
- Charoenprasert, S. & Mitchell, A. 2012. Factors Influencing Phenolic Compounds in Table Olives (*Olea europaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(29), pp.7081–7095. Available at: <http://dx.doi.org/10.1021/jf3017699>.
- Chatter, R. Ben Othman R, Rabhi S, Kladi M, Tarhouni S, Vagias C, Roussis V, Guizani-Tabbane L, Kharrrat R. 2011. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of neorogioltriol, a new diterpene extracted from the red algae *Laurencia glandulifera*. *Marine drugs*, 9(7), pp.1293–1306.
- Ciociola, T. Giovati L, Conti S, Magliani W, Santinoli C, Polonelli L. 2016. Natural and

- synthetic peptides with antifungal activity. *Future medicinal chemistry*, 8(12), pp.1413–1433.
- Cleveland, T.E. Yu J, Fedorova N, Bhatnagar D, Payne GA, Nierman WC, Bennett JW. 2009. Potential of *Aspergillus flavus* genomics for applications in biotechnology. *Trends in biotechnology*, 27(3), pp.151–157.
- Cowen, L.E. Sanglard D2, Howard SJ3, Rogers PD4, Perlin DS5. 2015. Mechanisms of antifungal drug resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(7), p.a019752.
- Cultrone, A., Domínguez, Y.R., Drevet, C., Scazzocchio, C., Fernández-Martín, R., 2007. The tightly regulated promoter of the xanA gene of *Aspergillus nidulans* is included in a helitron. *Mol. Microbiol.* 63, 1577-1587.
- Deng, Y. & Nicholson, R.A., 2005. Antifungal properties of surangin B, a coumarin from *Mammea longifolia*. *Planta medica*, 71(4), pp.364–365.
- Desoti, V.C. Lazarin-Bidóia D, Sudatti DB, Pereira RC, Alonso A, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Nakamura CV, Silva Sde O. 2012. Trypanocidal action of (–)-elatol involves an oxidative stress triggered by mitochondria dysfunction. *Marine drugs*, 10(8), pp.1631–1646.
- Dharmaratne, H.R.W., Piyasena, K. & Tennakoon, S.B., 2005. A geranylated biphenyl derivative from *Garcinia mangostana*. *Natural Product Research*, 19(3), pp.239–243.
- Dyer PS, O'Gorman CM. 2012. Sexual development and cryptic sexuality in fungi: insights from *Aspergillus* species. *FEMS Microbiol. Reviews*, 36(1):165-92
- Erpapazoglou Z, Kafasla P, Sophianopoulou V. 2006 The product of the SHR3 orthologue of *Aspergillus nidulans* has restricted range of amino acid transporter targets. *Fungal Genet Biol.* Apr;43(4):222-33.
- Evangelinos M, Anagnostopoulos G, Karvela-Kalogeraki I, Stathopoulou PM, Scazzocchio C, Dailianas G, 2015 . Minos as a novel Tc1/mariner-type transposable element for functional genomic analysis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol.* 81:1-11.
- Etxebeste, O. , Garzia A, Espeso EA, Ugalde U. 2010. *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules. *Trends in microbiology*, 18(12), pp.569–576.

- Faruck, M.O., Yusof, F. & Chowdhury, S., 2016. An overview of antifungal peptides derived from insect. *Peptides*, 80, pp.80–88.
- Frisvad, J.C. , Smedsgaard J, Samson RA, Larsen TO, Thrane U.2007. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(23), pp.9727–9732.
- Fukuzawa, A. Yasunori Takasugi M. Tamuraa M.1992. Enzymatic single-step formation of laureatin and its key intermediate, prelaureatin, from (3Z, 6S, 7S)-laurediol. *Tetrahedron letters*, 33(15), pp.2017–2018.
- Galanopoulou K, Scazzocchio C, Galinou ME, Liu W, Borbolis F, Karachaliou M, Oestreicher N, Hatzinikolaou DG, Dailianas G, Amillis S, 2014 .Purine utilization proteins in the Eurotiales: cellular compartmentalization, phylogenetic conservation and divergence. *Fungal Genet Biol* 69:96-108
- Garcia-Effron, G. Lee S, Park S, Cleary JD, Perlin DS. 2009. Effect of *Candida glabrata* FKS1 and FKS2 mutations on echinocandin sensitivity and kinetics of 1,3-beta-D-glucan synthase: implication for the existing susceptibility breakpoint. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(9), pp.3690–3699.
- Gardiner, R.E. Souteropoulos P, Park S, Perlin DS. 2005. Characterization of *Aspergillus fumigatus* mutants with reduced susceptibility to caspofungin. *Medical mycology*, 43(sup1), pp.299–305.
- Girling, S.J. & Fraser, M.A., 2009. Treatment of *Aspergillus* species infection in reptiles with itraconazole at metabolically scaled doses. *The Veterinary record*, 165(2), p.52.
- González, A.G. GonzálezJuan M.AguilarJulio D.MartínManuelNorte 1975. Three new sesquiterpenoids from the marine alga *Laurencia perforata*. *Tetrahedron Letters*, 16(29), pp.2499–2502.
- Gutiérrez-Cepeda, A. Fernández JJ, Gil LV, López-Rodríguez M, Norte M, Souto ML.2011. Nonterpenoid C15 acetogenins from *Laurencia marilzae*. *Journal of natural products*, 74(3), pp.441–448.
- Haraguchi, H. Kuwata Y, Inada K, Shingu K, Miyahara K, Nagao M, Yagi A.et al., 1996. Antifungal activity from *Alpinia galanga* and the competition for incorporation of unsaturated fatty acids in cell growth. *Planta Medica*, 62(4), pp.308–313.
- Harizani M, Ioannou E, Roussis V, 2016 . The Laurencia Paradox: An Endless Source

- of Chemodiversity. Prog Chem Org Nat Prod.102:91-252.
- Henriet, S. Verweij PE, Holland SM, Warris A. 2013. Invasive fungal infections in patients with chronic granulomatous disease. In Hot Topics in Infection and Immunity in Children IX. Springer, pp. 27–55.
- Hoekstra, W.J. Garvey EP, Shaver SR, Schotzinger RJ, Hoekstra WJ. 2014. Design and optimization of highly-selective fungal CYP51 inhibitors. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 24(15), pp.3455–3458.
- Hoerr, F.J., 2010. Clinical aspects of immunosuppression in poultry. Avian diseases, 54(1), pp.2–15.
- Horn, B.W., Moore, G.G. & Carbone, I., 2009. Sexual reproduction in *Aspergillus flavus*. Mycologia, 101(3), pp.423–429.
- Horn, B.W. & Pitt, J.I., 1997. Yellow mold and aflatoxin. Compendium of peanut diseases, 2, pp.40–42.
- Hoult, J.R.S. & Paya, M., 1996. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. General Pharmacology: The Vascular System, 27(4), pp.713–722.
- Ishihara, J. & Murai, A., 2001. Biosynthesis of cyclic bromo-ethers, derived from red algae. Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan, 59(12), pp.1181–1189.
- Ji, N. Li , X-M, Xie M, Ding J, Li K, Ding L,Bin. 2008. Highly oxygenated triterpenoids from the marine red alga *Laurencia mariannensis* (Rhodomelaceae). Helvetica Chimica Acta, 91(10), pp.1940–1946.
- Ji, N.-Y. Li XM, Li K, Ding LP, Gloer JB, Wang BG. 2007. Diterpenes, sesquiterpenes, and a C15-acetogenin from the marine red alga *Laurencia mariannensis*. Journal of natural products, 70(12), pp.1901–1905.
- Ji, N.-Y. & Wang, B.-G., 2014. Nonhalogenated organic molecules from *Laurencia* algae. Phytochemistry reviews, 13(3), pp.653–670.
- Joseph, C.C. M. J. Moshi, J. Sempombe, M. H. H. Nkunya, 2006. (4-Methoxy-benzo [1, 3] dioxol-5-yl)-Phenylmethanone: an antibacterial benzophenone from *securidaca longepedunculata*. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines (AJTCAM), 3(3), pp.80–86.
- Jung, H.J. Sung WS, Yeo SH, Kim HS, Lee IS, Woo ER, Lee DG. 2006. Antifungal effect of amentoflavone derived from *Selaginella tamariscina*. Archives of pharmacal

- research, 29(9), pp.746–751.
- Kanokmedhakul, K., Kanokmedhakul, S. & Phatchana, R., 2005. Biological activity of Anthraquinones and Triterpenoids from *Prismatomeris fragrans*. *Journal of ethnopharmacology*, 100(3), pp.284–288.
- Katiyar, S.K. Alastruey-Izquierdo A, Healey KR, Johnson ME, Perlin DS, Edlind TD. 2012. Fks1 and Fks2 are functionally redundant but differentially regulated in *Candida glabrata*: implications for echinocandin resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(12), pp.6304–6309.
- Kim, J. & Sudbery, P., 2011. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *The Journal of Microbiology*, 49(2), p.171.
- Kim, K. & Harvell, C.D., 2004. The rise and fall of a six-year coral-fungal epizootic. *the american naturalist*, 164(S5), pp.S52–S63.
- Kiritsakis, A. & Shahidi, F., 2017. *Olives and Olive Oil as Functional Foods: Bioactivity, Chemistry and Processing*, John Wiley & Sons.
- Kladi, M, Xenakia H, VagiasaC ,Papazafirib P, Roussis V. 2006. New cytotoxic sesquiterpenes from the red algae *Laurencia obtusa* and *Laurencia microcladia*. *Tetrahedron*, 62(1), pp.182–189.
- Klich, M.A., 2007. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular plant pathology*, 8(6), pp.713–722.
- Kryptou, E, Lambrinidis G, Evangelidis T, Mikros E, Dhallinas G. 2014. Modelling, substrate docking and mutational analysis identify residues essential for function and specificity of the major fungal purine transporter AzgA. *Molecular microbiology*, 93(1), pp.129–145.
- Kryptou E, Evangelidis T, Bobonis J, Pittis AA, Gabaldón T, Scazzocchio C, Mikros E, Dhallinas G. 2015. Origin, diversification and substrate specificity in the family of NCS1/FUR transporters. *Molecular microbiology*, 96(5), pp.927–950.
- Kuniyoshi M, Wahome PG, Miono T, Hashimoto T, Yokoyama M, Shrestha KL, Higa T. 2005. Terpenoids from *Laurencia luzonensis*. *Journal of natural products*, 68(9), pp.1314–1317.
- Lambert D, Padfield PJ, McLaughlin J, Cannell S, O'Neill CA. 2007. Ochratoxin A displaces claudins from detergent resistant membrane microdomains. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358(2), pp.632–636.

Available at:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X07009230>.

- Latgé, J.-P. & Beauvais, A., 2014. Functional duality of the cell wall. *Current opinion in microbiology*, 20, pp.111–117.
- Lee J.-C, Hou MF, Huang HW, Chang FR, Yeh CC, Tang JY, Chang HW. 2013. Marine algal natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. *Cancer Cell International*, 13(1), p.55.
- Lewis, Onsongo M, Njapau H, Schurz-Rogers H, Lubber G, Kieszak S, Nyamongo J, Backer L, Dahiye AM, Misore A, DeCock K, Rubin C; Kenya Aflatoxicosis Investigation Group. 2005. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. *Environmental health perspectives*, 113(12), p.1763.
- Li, S., Bao, D., Yuen, G., Harris, S.D., Calvo, A.M. (2007). *basA* regulates cell wall organization and asexual/sexual sporulation ratio in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 176: 243-253.
- Luisa Mangoni M, Grazia AD, Cappiello F, Casciaro B, Luca V. 2016. Naturally occurring peptides from *Rana temporaria*: antimicrobial properties and more. *Current topics in medicinal chemistry*, 16(1), pp.54–64.
- Lyakhova E.G, Kalinovsky AI, Kolesnikova SA, Vaskovsky VE, Stonik VA. 2004. Halogenated diterpenoids from the red alga *Laurencia nipponica*. *Phytochemistry*, 65(18), pp.2527–2532.
- Mansson M, Klejnstrup ML, Phipps RK, Nielsen KF, Frisvad JC, Gotfredsen CH, Larsen TO. 2010. Isolation and NMR characterization of fumonisin B2 and a new fumonisin B6 from *Aspergillus niger*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(2), pp.949–953.
- Mendoza, L., Wilkens, M. & Urzúa, A., 1997. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some *Chilean Pseudognaphalium* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 58(2), pp.85–88.
- Meng JC, Hu YF, Chen JH, Tan RX. 2001. Antifungal highly oxygenated guaianolides and other constituents from *Ajania fruticulosa*. *Phytochemistry*, 58(7), pp.1141–1145.

- Mohanlal, V. & Odhav, B., 2006. Biocontrol of aflatoxins B1, B2, G1, G2, and fumonisin B1 with 6, 7-dimethoxycoumarin, a phytoalexin from *Citrus sinensis*. *Journal of food protection*, 69(9), pp.2224–2229.
- Moore C.B, Sayers N, Mosquera J, Slaven J, Denning DW.2000. Antifungal drug resistance in *Aspergillus*. *Journal of Infection*, 41(3), pp.203–220.
- Moriyama M, Satoshi T, Ingham J, Mitutanaki J. 1992. Isoflavones from the root bark of *Piscidia erythrina*. *Phytochemistry*, 31(2), pp.683–687.
- Nagelkerken, I., Grol, M.G.G. & Mumby, P.J., 2012. Effects of marine reserves versus nursery habitat availability on structure of reef fish communities. *PLoS One*, 7(6), p.e36906.
- Nett J.E, Crawford K, Marchillo K, Andes DR.2010. Role of Fks1p and matrix glucan in *Candida albicans* biofilm resistance to an echinocandin, pyrimidine, and polyene. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(8), pp.3505–3508.
- Norte M, Fernandez J, Souto M, Ganin J Garcia-Gravalos M.1997. Thyrsenols A and B, two unusual polyether squalene derivatives. *Tetrahedron*, 53(9), pp.3173–3178.
- Norte M, Fernandez J, Souto M, Ganin J Garcia-Gravalos M 1996. Two new antitumoral polyether squalene derivatives. *Tetrahedron letters*, 37(15), pp.2671–2674.
- O’gorman, C.M., Fuller, H.T. & Dyer, P.S., 2009. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 457(7228), p.471.
- Oestreicher, N., Scazzocchio, C., 1995. A single amino acid change in a pathway-specific transcription factor results in differing degrees of constitutivity, hyperinducibility and derepression of several structural genes. *J. Mol. Biol.* 249, 693-699.
- Padilla-Gamiño, J.L. & Carpenter, R.C., 2007. THERMAL ECOPHYSIOLOGY OF LAURENCIA PACIFICA AND LAURENCIA NIDIFICA (CERAMIALES, RHODOPHYTA) FROM TROPICAL AND WARM-TEMPERATE REGIONS. *Journal of phycology*, 43(4), pp.686–692.
- Palencia, E.R., Hinton, D.M. & Bacon, C.W., 2010. The black *Aspergillus* species of maize and peanuts and their potential for mycotoxin production. *Toxins*, 2(4), pp.399–416.
- Parente-Rocha J.A, Bailão AM, Amaral AC, Taborda CP, Paccez JD, Borges CL, Pereira

- M 2017. Antifungal Resistance, Metabolic Routes as Drug Targets, and New Antifungal Agents: An Overview about Endemic Dimorphic Fungi. Mediators of Inflammation, 2017.
- Pantazopoulou, A., Lemuh, N. D., Hatzinikolaou, D. G., Drevet, C., Cecchetto, G., Scazzocchio, C., and Diallinas, G., 2007. Differential physiological and developmental expression of the UapA and AzgA purine transporters in *Aspergillus nidulans*. Fungal Genet. Biol. 44, 627-640.
- Payne, G.A., 1998. Process of contamination by aflatoxin-producing fungi and their impact on crops. Mycotoxins in agriculture and food safety, 9, pp.279–306.
- Perlin, D.S., Rautemaa-Richardson, R. & Alastruey-Izquierdo, A., 2017. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. The Lancet Infectious Diseases.
- Pfaller M.A, Duncanson F, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, Castanheira M. 2011. In vitro activity of a novel broad-spectrum antifungal, E1210, tested against *Aspergillus spp.* determined by CLSI and EUCAST broth microdilution methods. Antimicrobial agents and chemotherapy, 55(11), pp.5155–5158.
- Pinto D.C.G, Fuzzati N, Pazmino XC, Hostettmann K. et al., 1994. Xanthone and antifungal constituents from *Monnina obtusifolia*. Phytochemistry, 37(3), pp.875–878.
- Qureshi, S., Rai, M.K. & Agrawal, S.C., 1997. In vitro evaluation of inhibitory nature of extracts of 18-plant species of Chhindwara against 3-keratinophilic fungi. Hindustan Antibiotics Bulletin, 39(1–4), p.56.
- Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C.2012. Fungal biofilm resistance. International journal of microbiology, 2012.
- Richardson, M.D. & Warnock, D.W., 2012. Aspergillosis. In Fungal Infection. Wiley-Blackwell, pp. 166–200. Available at: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118321492.ch10>.
- Sautour M, Mitaine-Offer AC, Miyamoto T, Dongmo A, Lacaille-Dubois MA. 2004. Antifungal steroid saponins from *Dioscorea cayenensis*. Planta medica, 70(1), pp.90–92.
- Savelyeva A, Ghavami S, Davoodpour P, Asoodeh A, Los MJ. 2014. An overview of Brevinin superfamily: structure, function and clinical perspectives. In Anticancer

- Genes. Springer, pp. 197–212.
- Segovia-Bravo, K.A. et al., 2009. Browning reactions in olives: mechanism and polyphenols involved. *Food chemistry*, 114(4), pp.1380–1385.
- Seyedmousavi, Guillot J, Arné P, de Hoog GS, Mouton JW, Melchers WJ, Verweij PE. 2015. *Aspergillus* and aspergilloses in wild and domestic animals: a global health concern with parallels to human disease. *Medical Mycology*, 53(8), pp.765–797. Available at: <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myv067>.
- Shafee T.M.A, Lay FT, Phan TK, Anderson MA, Hulett MD. 2017. Convergent evolution of defensin sequence, structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(4), pp.663–682.
- Sharma, C. & Chowdhary, A., 2017. Molecular bases of antifungal resistance in filamentous fungi. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857917302674>.
- da Silva Machado, F.L Pacienza-Lima W, Rossi-Bergmann B, de Souza Gestinari LM, Fujii MT, Campos de Paula J, Costa SS, Lopes NP, Kaiser CR, Soares AR. 2011. Antileishmanial sesquiterpenes from the Brazilian red alga *Laurencia dendroidea*. *Planta medica*, 77(7), pp.733–735.
- Singh U.P, Sarma BK, Mishra PK, Ray AB. 2000. Antifungal activity of venenatine, an indole alkaloid isolated from *Alstonia venenata*. *Folia microbiologica*, 45(2), p.173.
- Sioupouli G, Lambrinidis G, Mikros E, Amillis S, Diallinas G. 2017. Cryptic purine transporters in *Aspergillus nidulans* reveal the role of specific residues in the evolution of specificity in the NCS1 family.
- Sohn H.-Y, Son KH, Kwon CS, Kwon GS, Kang SS. 2004. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai. *Phytomedicine*, 11(7), pp.666–672.
- Srinivas, P. V, Rao, R.R. & Rao, J.M., 2006. Two new tetracyclic triterpenes from the heartwood of *Ailanthus excelsa* Roxb. *Chemistry & biodiversity*, 3(8), pp.930–934.
- Starks C.M, Williams RB, Goering MG, O'Neil-Johnson M, Norman VL, Hu JF, Garo

- E, Hough GW, Rice SM, Eldridge GR. 2010. Antibacterial clerodane diterpenes from Goldenrod (*Solidago virgaurea*). *Phytochemistry*, 71(1), pp.104–109.
- Sudbery, P., Gow, N. & Berman, J., 2004. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in microbiology*, 12(7), pp.317–324.
- Sugui J.A, Kwon-Chung KJ, Juvvadi PR, Latgé JP, Steinbach WJ. 2014. *Aspergillus fumigatus* and related species. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(2), p.a019786.
- Sugui J.A, Losada L, Wang W, Varga J, Ngamskulrungroj P, Abu-Asab M, Chang YC, O'Gorman CM, Wickes BL, Nierman WC, Dyer PS, Kwon-Chung KJ. 2011. Identification and characterization of an *Aspergillus fumigatus* “supermater” pair. *MBio*, 2(6), pp.e00234-11.
- Sun, J.I.E. Shi DY, Li S, Wang SJ, Han LJ, Fan X, Yang YC, Shi JG. 2007. Chemical constituents of the red alga *Laurencia tristicha*. *Journal of Asian natural products research*, 9(8), pp.725–734.
- Suprpta, D.N., 2016. A Review of Tropical Plants with Antifungal Activities against Plant Fungal Pathogens.
- Suzuki M, Takahashi Y, Matsuo Y, Guiry M.D, Masuda M. 1997. Scanlonenyne, a novel halogenated C 15 acetogenin from the red alga *Laurencia obtusa* in Irish waters. *Tetrahedron*, 53(12), pp.4271–4278.
- Talhaoui N, Taamalli A, Gomez-Caravaca A.M, Fernandez A, Segura-Crretero A. 2015. Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International*, 77(Part 2), pp.92–108.
- Todd RB, Davis MA, Hynes MJ. 2007. Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: heterokaryons and diploids for dominance, complementation and haploidization analyses. *Nature Protocols* 2(4):822-30.
- Vairappan, C.S, Daitoh M, Vairappan CS, Abe T, Masuda M. 2001. Antibacterial halogenated metabolites from the Malaysian *Laurencia* species. *Phytochemistry*, 58(2), pp.291–297.
- Vairappan, C.S., Anangdan, S.P. & Matsunaga, S., 2009. Diet-derived halogenated metabolite from the sea hare *Aplysia parvula*. *Malaysian Journal of Science*, 28(3), pp.269–273.

- van de Veerdonk F.L, Gresnigt MS, Romani L, Netea MG, Latgé JP. 2017. *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. *Nature reviews. Microbiology*.
- Valdez-Taubas J, Harispe L, Scazzocchio C, Gorfinkiel L, Rosa AL. 2004. Ammonium-induced internalisation of UapC, the general purine permease from *Aspergillus nidulans*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 41(1), pp.42–51.
- Valdez-Taubas J, Diallinas G, Scazzocchio C, Rosa AL. 2000. Protein expression and subcellular localization of the general purine transporter UapC from *Aspergillus nidulans*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 30(2), pp.105–113.
- Vlanti, A. & Diallinas, G., 2008. The *Aspergillus nidulans* FcyB cytosine-purine scavenger is highly expressed during germination and in reproductive compartments and is downregulated by endocytosis. *Molecular microbiology*,
- Wang Y.-H, Hou AJ, Zhu GF, Chen DF, Sun HD. 2005. Cytotoxic and antifungal isoprenylated xanthenes and flavonoids from *Cudrania fruticosa*. *Planta medica*, 71(3), pp.273–274.
- Warrilow A.G.S, Hull CM, Parker JE, Garvey EP, Hoekstra WJ, Moore WR, Schotzinger RJ, Kelly DE, Kelly SL. 2014. The clinical candidate VT-1161 is a highly potent inhibitor of *Candida albicans* CYP51 but fails to bind the human enzyme. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(12), pp.7121–7127.
- Wiederhold, N.P., 2017. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. *Infection and drug resistance*, 10, pp.249–259.
- Wiederhold N.P, Najvar LK, Fothergill AW, Bocanegra R, Olivo M, McCarthy DI, Fukuda Y, Mitsuyama J, Patterson TF. 2015. The novel arylamidine T-2307 demonstrates in vitro and in vivo activity against echinocandin-resistant *Candida glabrata*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(3), pp.692–695.
- Xie B, Liu HY, Ni W, Chen CX, Lü Y, Wu L, Zheng QT. 2006. Five new steroidal compounds from *Ypsilandra thibetica*. *Chemistry & biodiversity*, 3(11), pp.1211–1218.
- Yemele Bouberte M, Krohn K, Hussain H, Dongo E, Schulz B, Hu Q. 2006. Tithoniamarin and tithoniamide: a structurally unique isocoumarin dimer and a new ceramide from *Tithonia diversifolia*. *Natural product research*, 20(9), pp.842–849.

- Yu J, Whitelaw CA, Nierman WC, Bhatnagar D, Cleveland TE. 2004. *Aspergillus flavus* expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in aflatoxin contamination of crops. *FEMS Microbiology letters*, 237(2), pp.333–340.
- Yu J, Payne GA, Nierman WC, Machida M, Bennett JW, Campbell BC, Robens JF, Bhatnagar D, Dean RA, Cleveland TE. 2008. *Aspergillus flavus* genomics as a tool for studying the mechanism of aflatoxin formation. *Food Additives and Contaminants*, 25(9), pp.1152–1157.