



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
“ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ”

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μεθοδική μελέτη της αντίδρασης του *Limulus* Amebocyte Lysate cascade (LAL test) σε επαφή με μαστιγοφόρα πρωτοζωικά παράσιτα του γένους *Leishmania* από υγρή κυτταρο-καλλιέργεια

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΠΑΠΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΧΑΤΖΗΝΙΚΟΛΑΟΥ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ, 2016

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στη Βιοιατρική Αμπελοκήπων.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Βοριάς Κωνσταντίνος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Διαλλινάς Γεώργιος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Χατζηνικολάου Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

Χατζηνικολάου Δημήτριος

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ

**Βελεγράκη Αριστέα, Επίκουρη Καθηγήτρια Μυκητολογίας
Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ**

Ευχαριστίες

Τις θερμότερες ευχαριστίες μου: στην Επιστημονικά Υπεύθυνο αυτής της εργασίας Dr. Αριστέα Βελεγράκη για την πολύτιμη βοήθεια στην καταμέτρηση των μαστιγοφόρων πρωτοζωικών κυττάρων και την ενθάρρυνση της να συνεχίσω παρά όλες τις δυσκολίες, στον Επιβλέποντα Dr. Δημήτρη Χατζηνικολάου για την απόφαση του να αναλάβει την επίβλεψη αυτής της εργασίας καθώς και για το ενδιαφέρον καθόλη τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας, στην Dr. Χαραλαμπία Μπολέτη και το Ινστιτούτο Παστέρ για την ευγενική προσφορά των μαστιγοφόρων πρωτοζωικών παρασίτων που ήταν απαραίτητα για την πραγματοποίηση αυτής της εργασίας, τον Dr. Malcolm Finkelman για την συμβολή του στο στήσιμο της πειραματικής μεθόδου σε θεωρητικό επίπεδο, τους Dr. Κωνσταντίνο Βοργιά και Dr. Γεώργιο Διαλλινά που δέχτηκαν να συμμετέχουν στη Τριμελή επιτροπή και για τις πολύτιμες συμβουλές τους, στη Βιοϊατρική Αμπελοκήπων για τη ζεστή φιλοξενία στη διάρκεια όλων των πειραματικών δοκιμών, σε όλους τους ανθρώπους που έχουν συμβάλει στην πραγματοποίηση αυτής της εργασίας γνωστούς και φίλους και τελικά στους γονείς μου που χωρίς τη στήριξη τους η εργασία αυτή δεν θα ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθεί.

Θέμα

Μεθοδολογική μελέτη της αντίδρασης του *Limulus Amebocyte Lysate cascade* (LAL test) επί μαστιγοφόρων πρωτοζωικών παρασίτων του γένους *Leishmania* από υγρή κυτταροκαλλιέργεια.

Στόχος

Στόχος της εργασίας είναι η διερεύνηση της αντίδρασης του μηχανισμού πήξης του *Limulus Amebocyte Lysate* (δοκιμή LAL) παρουσία αντιγόνων από πρωτοζωικά μαστιγοφόρα παράσιτα του γένους *Leishmania*, περιλαμβανομένων των διαφόρων πολυσακχαριτών και γλυκοσυνδετικών μορίων που παράγουν και εκκρίνουν αυτά τα κύτταρα όπως οι λιποφωσφογλυκάνες (Lipophosphoglycans - LPG), τα GIPLs (Glycosylinositolphospholipid) και ο εκκρινόμενος παράγοντας (Excreted Factor - EF).

Η ανίχνευση των πρωτοζωικών μαστιγοφόρων παρασίτων του γένους *Leishmania* από το LAL test θα δώσει το έναυσμα για τη μελέτη του μηχανισμού LAL ως προς τις τρυπανοσωματίδες και τα πρωτόζωα γενικότερα, ο οποίος μέχρι τώρα δεν έχει μελετηθεί σε αυτές τις περιπτώσεις. Ο εντοπισμός της αιτίας ενεργοποίησης του LAL cascade από τα πρωτοζωικά μαστιγοφόρα παράσιτα του γένους *Leishmania*, ως συνέχεια της παρούσας εργασίας, θα δώσει το επιστημονικό υπόβαθρο που απαιτείται για τη χρήση του LAL test στη διάγνωση πρωτοζωικών παρασιτικών νόσων και στην έρευνα για την ανάπτυξη εξειδικευμένων φαρμάκων κατά πρωτοζωικών παρασίτων από τη Φαρμακευτική Βιομηχανία.

Περίληψη

Στην παρούσα ερευνητική εργασία έγινε μεθοδολογική μελέτη για την ενεργοποίηση του μηχανισμού LAL σε πέντε στελέχη μαστιγοφόρων πρωτοζωικών παρασίτων του γένους *Leishmania* του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ. Τα δείγματα για το πειραματικό σκέλος της εργασίας (*L. major*, *L. infantum*, *L. donovani*, *L. tarantolae* και *L. donovani* με έλλειψη LPG) προήλθαν από υπερκείμενο στατικής φάσης ανάπτυξης του παρασίτου επί κυτταροκαλλιέργειας καθώς και με λήψεις δείγματος ιζήματος διαλυμένου σε στείρο νερό απαλλαγμένο πυρετογόνων μετά την αφαίρεση του υπερκείμενου και από τις δύο φάσεις ανάπτυξης. Έμφαση δόθηκε στο υπερκείμενο στατικής φάσης.

Η ενεργοποίηση του LAL cascade οδηγεί στην ενεργοποίηση του πηκτικού ενζύμου το οποίο μετατρέπει τον πηκτικό παράγοντα “θρομβογόνο” από τη διαλυτή στην αδιάλυτη μορφή του “θρομβίνη” (Gel Clot) και επιτελείται διαζευκτικά μέσω δύο μονοπατιών ενεργοποίησης:

1. C-B Factors: όπου ενεργοποιείται το LAL cascade από την ύπαρξη λιποπολυσακχαριτών (LPS) προερχόμενων από αρνητικά κατά Gram βακτήρια
2. G Factor: όπου ενεργοποιείται το LAL cascade από την ύπαρξη (1→3)-β-D-glucan, που είναι δομικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος της πλειονότητας των μυκήτων.

Το υπερκείμενο στατικής φάσης έχει ιδιαίτερη σημασία γιατί αφενός στο υπερκείμενο η αντίδραση ήταν ισχυρότερη, αφετέρου στη στατική φάση τα πρωτοζωικά παράσιτα αυτού του γένους βρίσκονται στην παθογόνο μορφή τους. Ο μηχανισμός LAL δεν ενεργοποιήθηκε σε καμία περίπτωση μέσω του μονοπατιού του προενζύμου Factor-G αλλά ενεργοποιήθηκε σε όλα τα δείγματα δια μέσω του μονοπατιού του προενζύμου Factor-C. Η αντίδραση εξαρτάτο από το στέλεχος και τον αριθμό των κυττάρων.

Abstract

This research project is about a methodological study of the LAL mechanism activation on five flagellous protozoic parasites of genus *Leishmania* derived from Athens Pasteur institute. The experimental specimens (*L. major*, *L. infantum*, *L. donovani*, *L. tarantolae* and *L. donovani* lacking LPG) were retrieved from plateau growing phase supernatant and both plateau and logarithmic growing phases pellet reconstituted in pyrogen free sterile water. Emphasis was given on the plateau growing phase supernatant.

The LAL cascade activation leads to the activation of clotting enzyme which transforms the insoluble coagulogen to the soluble coagulin (Gel Clot) through two separate activation paths:

1. C-B Factors: Bacterial gram-negative (LPS) activates LAL cascade.
2. G Factor: Fungal (1→3)-β-D-glucan, which acts as a structural component for the majority of fungi, activates LAL cascade.

Plateau phase supernatant is of a great importance because the reaction was stronger in the supernatant and also because plateau phase is the pathogenic state of the protozoic parasites of this genus. The LAL mechanism was not activated through Factor-G pathway. To the contrary, the LAL mechanism was activated through Factor-C pathway in all specimens. The reaction depended on the strain and the cell number.

Κατάλογος περιεχομένων

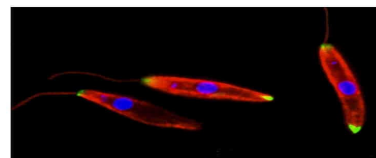
Ευχαριστίες.....	3
Θέμα.....	4
Στόχος.....	4
Περίληψη.....	5
Abstract.....	6
1 1 Γενικό Μέρος - Εισαγωγή.....	9
1.1 Γενικά για το Πρωτοζωικό Παράσιτο Leishmania.....	9
1.1.1 Δομή Κυττάρου Leishmania.....	9
1.1.2 Κύκλος Ζωής Παρασίτων του Γένους Leishmania.....	10
1.1.3 Βιοχημεία Κυττάρου Leishmania.....	13
1.1.3.1 Επιφανειακά Ένζυμα.....	13
1.1.3.1.1 Υδρολάσες (Hydrolase).....	13
1.1.3.1.2 Κινάσες Πρωτεϊνών (Protein Kinases).....	16
1.1.3.2 ΛιποΦωσφοΓλυκάνες (LPGs – Lipophosphoglycans).....	18
1.1.3.2.1 Δομή των LPG.....	18
1.1.3.2.2 Λειτουργίες των LPG.....	23
1.1.4 Η Ασθένεια της Λεισμανίασης.....	25
1.1.4.1 Επιδημιολογία Λεισμανίασης.....	26
1.1.4.1.1 Παγκόσμια Επιδημιολογικά Στοιχεία Λεισμανίασης.....	27
1.1.4.1.2 Ενδημικά Επιδημιολογικά Στοιχεία Λεισμανίασης στην Ελλάδα.....	30
1.1.4.2 Εργαστηριακή Διάγνωση Λεισμανίασης.....	32
1.2 Γενικά για το Limulus Amebocyte Lysate (LAL).....	34
1.2.1 Horseshoe Crabs.....	34
1.2.2 Limulus polyphemus.....	35
1.2.2.1 Ανατομία και Φυσιολογία.....	36
1.2.2.2 Κύκλος Ζωής και Συμπεριφορά.....	37
1.2.2.3 Εξέλιξη.....	37
1.2.3 Αμοιβαδοκύτταρο (Amebocyte).....	38
2 2 Ειδικό Μέρος.....	40
2.1 Υλικά και Μέθοδοι.....	40
2.1.1 Υλικά Πειραματικού ελέγχου.....	40
2.1.1.1 Εργαστηριακός Εξοπλισμός.....	40
2.1.1.1.1 Γενικός Εξοπλισμός.....	41
2.1.1.1.2 Φωτόμετρο Pyros Kinetix Flex 32.....	41
2.1.1.1.3 Λογισμικό EQS.....	42
2.1.1.2 Δείγματα Κυττάρων Υγρής Καλλιέργειας Παρασίτων Leishmania.....	43
2.1.1.2.1 Είδη Δειγμάτων.....	44
2.1.1.2.2 Θρεπτικά υποστρώματα.....	44
2.1.1.2.3 Χειρισμός Δειγμάτων.....	45
2.1.2 Περιγραφή Πειραματικής Μεθόδου.....	45
2.1.2.1 Περιγραφή Μεθόδου Μέτρησης Κυττάρων Υγρής Καλλιέργειας.....	46
2.1.2.2 Περιγραφή της Δοκιμής GlucateII (Factor-G).....	46
2.1.2.2.1 Πρότυπη Καμπύλη.....	47
2.1.2.2.2 Δείγματα.....	48

2.1.2.2.3 Μάρτυρες.....	49
2.1.2.3 Περιγραφή της Δοκιμής Pyrotell-T (Factor-C/B).....	49
2.1.2.3.1 Πρότυπη Καμπύλη.....	50
2.1.2.3.2 Δείγματα.....	51
2.1.2.3.3 Μάρτυρες.....	52
2.2 Αποτελέσματα.....	53
2.2.1 Ποσοτικοποίηση του Αριθμού Κυττάρων για Κάθε Καλλιέργεια.....	53
2.2.2 Δοκιμές Ενεργοποίησης του LAL Cascade Μέσω του Factor-G.....	54
2.2.2.1 Ποσοτικοποίηση (1→3)-β-D-glucan των Υποστρωμάτων.....	54
2.2.2.2 Δείγματα Ιζήματος Στατικής Φάσης.....	55
2.2.2.2.1 L. tarantolae.....	55
2.2.2.2.2 L. donovani.....	55
2.2.2.2.3 L. major.....	56
2.2.2.3 Δείγματα Υπερκειμένου Στατικής Φάσης.....	56
2.2.2.4 Δείγματα Ιζήματος Λογαριθμικής Φάσης.....	57
2.2.3 Δοκιμές Ενεργοποίησης του LAL Cascade Μέσω του Factor-C.....	57
2.2.3.1 Επιβεβαίωση Πρωτοκόλλου Polymyxin-B σε Πρότυπη Ενδοτοξίνη.....	58
2.2.3.2 Μετρήσεις με Χρήση Πρωτοκόλλου Polychymin-B.....	58
2.2.3.2.1 Δείγματα Ιζήματος Λογαριθμικής Φάσης.....	58
2.2.3.2.2 Δείγματα Ιζήματος Στατικής Φάσης.....	60
2.2.3.2.3 Δείγματα Υπερκειμένου Στατικής Φάσης.....	63
2.3 Συζήτηση.....	73
2.3.1 Έμφαση στην Καινοτομία.....	73
2.3.1.1 Βιομηχανία.....	73
2.3.1.2 Διάγνωση.....	74
2.3.1.3 Έρευνα.....	74
2.3.2 Διερεύνηση για Χρήση ως Διαγνωστικό Εργαλείο.....	75
2.3.2.1 Ειδικότητα.....	75
2.3.2.2 Ευαισθησία Δοκιμής.....	76
2.3.2.3 Ευκολία στην Παραγωγή Αποτελεσμάτων.....	76
2.3.2.4 Σύγκριση με άλλες Τεχνικές Ανίχνευσης Παρασίτων του Γένους Leishmania.....	77
2.3.3 Μελλοντικές Εργασίες.....	77
2.3.3.1 Περαιτέρω μελέτη για χρήση ως Διαγνωστικό Εργαλείο.....	78
2.3.3.1.1 Ειδικότητα.....	78
2.3.3.1.2 Μέγιστη Ευαισθησία.....	79
2.3.3.1.3 Εντοπισμός σε Βιολογικά Υγρά.....	79
2.3.3.2 Εντοπισμός Αντιγόνου που Ενεργοποιεί το LAL Cascade για χρήση στη Βιομηχανία.....	80
Αναφορές.....	82

1 Γενικό Μέρος - Εισαγωγή

1.1 Γενικά για το Πρωτοζωικό Παράσιτο *Leishmania*

Τα πρωτόζωα του γένους *Leishmania* ταξινομούνται συστηματικά στο φύλο Ευγλενόζωα (Euglenozoa) και ανήκουν στην τάξη των Τρυπανοσωματίδων (Trypanosomatida). Ευθύνονται για την πρόκληση της ασθένειας που είναι γνωστή ως Λεισμανίαση (Leishmaniasis) και μεταδίδονται από τις σκνίπες του γένους *Phlebotomus* στον Παλαιό Κόσμο και του γένους *Lutzomyia* στον Νέο Κόσμο.



Εικόνα 1: *L.tarantolae* σε προμαστιγωτή μορφή

Υπάρχουν περίπου 35 είδη σε αυτό το γένος από τα οποία τουλάχιστον 20 μπορεί να προσβάλλουν ανθρώπους [11]. Μπορούν να ταξινομηθούν σε 3 βασικά υπογένη:

- Υπογένος ***Leishmania***, που περιλαμβάνει τα είδη:
 - *L. aethiopica*, *L. amazonensis*, *L. arabica*, *L. donovani*, *L. enrietti*, *L. gerbilli*, *L. hertigi*, *L. infantum*, *L. killicki*, *L. major*, *L. martiniquensis*, *L. mexicana*, *L. siamensis*, *L. tropica*, *L. turanica*
- Υπογένος ***Sauroleishmania***, που περιλαμβάνει τα είδη:
 - *L. adleri*, *L. agamae*, *L. ceramodactyli*, *L. deanei*, *L. garnhami*, *L. gulikae*, *L. gymnodactyli*, *L. hemidactyli*, *L. hoogstraali*, *L. nicollei*, *L. senegalensis*, *L. tarantolae*
- Υπογένος ***Vianna***, που περιλαμβάνει τα είδη:
 - *L. braziliensis*, *L. colombiensis*, *L. equatorensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. pifanoi*, *L. shawi*, *L. utingensis*

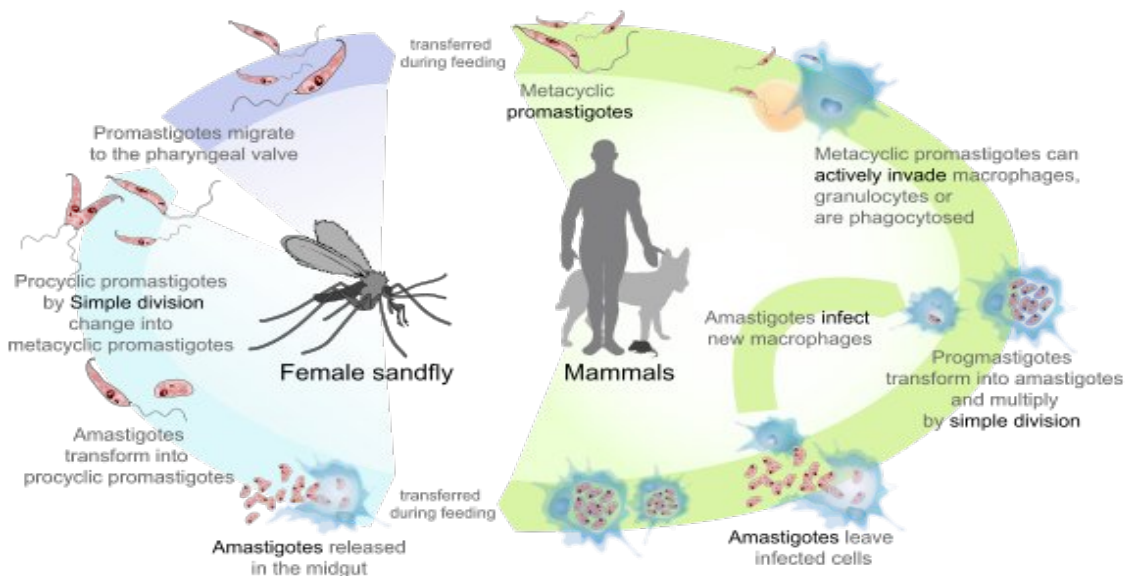
1.1.1 Δομή Κυττάρου *Leishmania*

Πρόκειται για μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς με καλώς σχηματισμένο πυρήνα και άλλα οργανίδια όπως κινητοπλάστη, μαστίγιο, συγκεκριμένα οργανίδια για

γλυκόλυση (τα γλυκοσώματα), μία υποϊμενοειδή ζώνη μικροσωληνίσκων και ένα μοναδικό μεταβολισμό θειόλης [14]. Αναλόγως με το στάδιο του κύκλου ζωής τους μπορεί να βρίσκονται σε μία από τις δύο μορφές:

- **Αμαστιγωτή** μορφή που εντοπίζεται εντός των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων και στο κυκλοφορικό σύστημα των ενδιάμεσων ξενιστών. Είναι μια ενδοκυτταρική στατική μορφή όπου το μαστίγιο βρίσκεται εντός του κυττάρου χωρίς να προεξέχει. Το κύτταρο έχει οβάλ σχήμα με μήκος 3-6 μm και πλάτος 1-3 μm.
- **Προμαστιγωτή** μορφή που εντοπίζεται εντός του πεπτικού σωλήνα των εντόμων-τελικών ξενιστών (σκνίπες). Είναι μια εξωκυτταρική και κινητή μορφή καθώς φέρει μακρύ μαστίγιο. Σε αυτή τη μορφή το κύτταρο είναι σαφώς μεγαλύτερο και επίμηκες έχοντας μήκος 15-30 μm και πλάτος περί τα 5 μm. Το κύτταρο έχει ατρακτοειδές σχήμα με εκλεπτυσμένα άκρα ενώ ο πυρήνας εντοπίζεται στο κέντρο του κυττάρου.

1.1.2 Κύκλος Ζωής Παρασίτων του Γένους *Leishmania*



Εικόνα 2: Κύκλος ζωής παρασίτων του γένους *Leishmania*

Η ασθένεια της Λεισμανίασης οφείλεται σε παράσιτα του γένους *Leishmania* και μεταδίδεται από το τσίμπημα της θηλυκής σκνίπας των γενών *Phlebotomus* και

Lutzomyia [5][6][9]. Η σκνίπα μεταδίδει το μολυσματικό στάδιο του παρασίτου, μετακυκλικές προμαστιγωτές μορφές, κατά τη διάρκεια αιματούχου γεύματος. Οι προμαστιγωτές που ενύονται από τη νύξη, φαγοκυτταρώνονται από τα πρώτα φαγοκύτταρα που καταφθάνουν στο σημείο εισβολής, τα ουδετερόφιλα. Εκεί, όντες προστατευμένοι από τις ουσίες του Συμπληρώματος (complement immune system), παρατείνουν τη διάρκεια ζωής του κυττάρου-ξενιστή αναστέλλοντας τη διαδικασία της απόπτωσης και επιτείνουν την παραγωγή ουσιών που προσελκύουν τα μακροφάγα. Αυτά αποτελούν τον τελικό προορισμό των παρασίτων στα πρώτα στάδια της μόλυνσης, καθώς αφότου εισέλθουν εντός των μακροφάγων μπορούν να παραμείνουν εκεί για μεγάλο χρονικό διάστημα (αρκετούς μήνες). Η αναστολή της απόπτωσης επεκτείνεται τοπικά και σε μη μολυσμένα αλλά εγγύς ευρισκόμενα μακροφάγα μεγαλώνοντας έτσι την πιθανότητα επέκτασης της μόλυνσης.

Παρότι είχε επικρατήσει η εντύπωση ότι τα κύτταρα του γένους *Leishmania* εισέρχονται εντός των μακροφάγων με την παραδοσιακή φαγοκυττάρωση, φαίνεται πως στελέχη των ειδών *L. major* και *L. donovani* εισέρχονται εντός των μακροφάγων κυρίως με σπειροειδή φαγοκυττάρωση (coiling phagocytosis), λόγος για τον οποίο, πολύ συχνά, τα παράσιτα αυτά εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων ξενιστών αντί εντός του φαγολυσσοσώματος όπως θα ήταν αναμενόμενο [5].

Εντός του κυττάρου ξενιστή, οι προμαστιγωτές μετατρέπονται σε αμαστιγωτές, μια περισσότερο ανθεκτική μορφή στους μηχανισμούς καταστροφής των φαγοκυττάρων λόγω αντοχής στο όξινο pH και τα ένζυμα του λυσοσώματος. Οι αμαστιγωτές πολλαπλασιάζονται εντός του κυττάρου-ξενιστή μέχρι που αυτό διαρρηγνύεται και απελευθερώνονται στις κοιλότητες των ιστών, αν και υπάρχουν αμφιλεγόμενες απόψεις για το τρόπο με τον οποίο οι αμαστιγωτές αποχωρίζονται από το κύτταρο-ξενιστή. Ελεύθεροι πλέον εντός των ιστών, μπορούν να προσβάλλουν κύτταρα του ιστού ή άλλα φαγοκύτταρα.

Βασικό ρόλο φαίνεται πως παίζουν οι LPG (Lipo-phospho-glycans) που περιβάλλουν τις προμαστιγωτές μορφές και απενεργοποιούν το μηχανισμό αναπνευστικής έκρηξης στα φαγοκύτταρα, ενώ παρεμποδίζουν τη διαδικασία επεξεργασίας και παρουσίασης των αντιγόνων από τα φαγοκύτταρα στα λεμφοκύτταρα [5]. Θα γίνει εκτενέστερη

αναφορά στο ρόλο των LPG στη συνέχεια.

Οι σκνίπες μολύνονται κατά τη διάρκεια αιματούχου τροφοληψίας από αμαστιγώτες που μεταναστεύουν στον πεπτικό σωλήνα του εντόμου οι οποίοι προσκολλούνται στη συνέχεια στα επιθηλιακά κύτταρα και μετατρέπονται σε μη μολυσματικούς προμαστιγώτες σε μια διαδικασία που διαρκεί τρεις μέρες [6][7]. Εκεί εντοπίζονται εξωκυτταρικά σε αντίθεση με τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό τους εντός των σπονδυλωτών-ενδιαμέσων ξενιστών. Μετά από μια περίοδο που μπορεί να κρατήσει από λίγες μέρες έως μία εβδομάδα, μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται μετακυκλογένεση [9][10] (metacyclogenesis), αρχίζει το τελικό στάδιο του κύκλου ζωής των παρασίτων του γένους *Leishmania* όπου οι προμαστιγώτες σταματούν να αναπαράγονται, μετατρέπονται σε μολυσματικούς προμαστιγώτες, αποκολλώνται από τα επιθηλιακά κύτταρα του εντόμου-τελικού ξενιστή και μεταναστεύουν στην προβοσκίδα από όπου θα μολύνουν τον επόμενο σπονδυλωτό-ενδιάμεσο ξενιστή [7].

1.1.3 Βιοχημεία Κυττάρου *Leishmania*

Η κατανόηση της βιοχημείας του κυττάρου *Leishmania*, θα μπορούσε να δώσει μια καλύτερη οπτική ως προς το λόγο που τα παράσιτα αυτά εισέρχονται εντός του ξενιστή και τον τρόπο που επιβιώνουν στο εσωτερικό αυτού του κατά τα άλλα αφιλόξενου περιβάλλοντος για μικροοργανισμούς. Προς αυτή τη κατεύθυνση, θα δώσουμε έμφαση στη δομή και το ρόλο που παίζουν τα επιφανειακά ένζυμα και τα γλυκοσυνδετικά (glycoconjugate) μόρια, όπως οι λιποφωσφογλυκάνες LPG (lipo-phospho-glycan), των κυττάρων του γένους *Leishmania*, στον κύκλο ζωής και την παθοφυσιολογία τους [6].

1.1.3.1 Επιφανειακά Ένζυμα

Συνδεδεμένα στο εξωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης των πρωτοζωικών παρασίτων του γένους *Leishmania*, υπάρχουν δύο βασικές κατηγορίες ενζύμων με τις επιμέρους υποκατηγορίες:

- Υδρολάσες:
 - Φωσφομονοεστεράσες:
 - Όξινες φωσφατάσες
 - Νουκλεοτιδάσες
 - Πρωτεάσες
- Κινάσες Πρωτεϊνών

1.1.3.1.1 Υδρολάσες (Hydrolase)

Φωσφομονοεστεράσες (Phosphomonoesterases)

Πρόκειται για ένζυμα τα οποία αφαιρούν φωσφορικές ομάδες από μόρια κατά τη διάρκεια της πέψης. Δύο είδη από ένζυμα αυτής της κατηγορίας εντοπίζονται στα παράσιτα του γένους *Leishmania*: οι όξινες φωσφατάσες (acid phosphatases) και οι νουκλεοτιδάσες (nucleotidases).

Όξινες φωσφατάσες

Μελέτες σε παράσιτα του είδους *L. donovani*, έδειξαν ότι υπάρχουν τουλάχιστον τρεις όξινες φωσφατάσες (ACP-P_{1,2,3}) που είναι συνδεδεμένες στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης (membrane-bound acid phosphatases). Γενικότερα η δράση των όξινων φωσφατασών, προμαστιγωτών μορφών του συγκεκριμένου είδους, φάνηκε να επικεντρώνεται στην εξωτερική μεμβράνη και διακρίνεται ένα κύριο ένζυμο, το ACP-P₁, το οποίο εμφανίζει ανθεκτικότητα στο τρυγικό οξύ και δύο ισοένζυμα, τα ACP-P_{2 & 3} [6]. Λόγω του προσανατολισμού των ενζύμων αυτών και των διαθέσιμων υποστρωμάτων στα κύτταρα ξενιστές, υπάρχει περίπτωση να εμπλέκονται σε παθοφυσιολογικά σημαντικές επιφανειακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρου-ξενιστή και παρασίτου.

Σε μελέτες που έγιναν σε παράσιτα *L. donovani* και *L. mexicana* (subsp. *mexicana* και *amazoniensis*) φάνηκε ότι, παρά τις ποιοτικές διαφορές που μπορεί να παρουσιάσουν, όξινες φωσφατάσες εμφανίζονται τόσο σε προμαστιγωτές όσο και αμαστιγωτές μορφές [6][7].

Η κύρια όξινη φωσφατάση ACP-P₁ φαίνεται πως έχει σημαντικές συνέπειες στο μεταβολισμό του κυττάρου ξενιστή. Παρεμποδίζει σημαντικά την παραγωγή ριζών O₂⁻ και κατά συνέπεια την παραγωγή του καταστρεπτικού για τα παράσιτα του γένους *Leishmania* H₂O₂ κατά την αναπνευστική έκρηξη (respiratory burst). Μάλιστα, η ποσότητα της ACP-P₁ που παράγει ένα παράσιτο του είδους *L. donovani* επαρκεί για να μειώσει στο μισό την ικανότητα παραγωγής O₂⁻ σε τρία ουδετερόφιλα [6]. Μια άλλη παρατήρηση συνδέει την όξινη φωσφατάση ACP-P₁ με την παρεμπόδιση της μεταφοράς ασβεστίου από τις ενδοκυτταρικές αποθήκες που είναι συνδεδεμένες στη μεμβράνη. Κατά συνέπεια, η παρεμπόδιση της μεταφοράς ασβεστίου, μειώνει τη δημιουργία τοξικών μεταβολιτών του οξυγόνου από βιοχημικές οδούς που είναι εξαρτώμενες από το ασβέστιο. Επίσης, η ενεργότητα του ενζύμου hexose monophosphatase, που συμμετέχει στη δημιουργία ριζών οξυγόνου με την απόσπαση ηλεκτρονίων, μειώνεται λόγω της δράσης του ACP-P₁ κατά τα ίδια επίπεδα.

Τα υποστρώματα που είναι διαθέσιμα και έχουν επιβεβαιωθεί πειραματικά για την όξινη φωσφατάση ACP-P₁ είναι η ραδιοσημασμένη με ³²P φωσφορυλάση κινάση (³²P-

radiolabeled phosphorylase kinase), η πυροσταφυλική κινάση (pyruvate kinase) και οι ιστόνες (histones), όσο αφορά φωσφοπρωτεΐνες (phosphoproteins), και τα phosphoinositide-4,5-bisphosphate και inositoltriphosphate (IP₃) όσο αφορά phosphoinositides τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των μακροφάγων. Εκτός των άλλων το IP₃ αποτελεί και ένα δεύτερο αγγελιοφόρο που προκαλεί την απελευθέρωση ασβεστίου από τις ενδοκυτταρικές αποθήκες.

Παράλληλα με τις μεμβρανικές όξινης φωσφατάσες παρατηρείται και η εκκρινόμενη όξινη φωσφατάση η οποία δεν παρουσιάζει την ίδια ανθεκτικότητα στο τρυγικό οξύ και εμφανίζεται σε διάφορες φωσφορυλιωμένες μορφές. Τα περισσότερα είδη παράγουν εκκρινόμενη όξινη φωσφατάση εκτός των *L. major* και *L. tarantolae*. Δεν έχει παρατηρηθεί ακόμα κάποια σύνδεση της με την παθοφυσιολογία των παρασίτων.

Νουκλεοτιδάσες

Συνδεδεμένες στην εξωτερική μεμβράνη υπάρχουν δύο ξεχωριστές νουκλεοτιδάσες: η 5'-νουκλεοτιδάση και η 3'-νουκλεοτιδάση οι οποίες αφαιρούν φωσφορικές ομάδες από φωσφορυλιωμένα σάκχαρα συνδεδεμένα με N-γλυκοσιδικό δεσμό σε πουρίνη ή πυριμιδίνη. Λειτουργούν σε αλκαλικό περιβάλλον και δείχνουν να έχουν θρεπτικό χαρακτήρα για το κύτταρο ενώ δεν σχετίζονται με την παθοφυσιολογία του.

Πρωτεάσες (Proteases)

Πρόκειται για ένζυμα τα οποία καταλύουν την πρωτεόλυση, δηλαδή την υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών μεταξύ των αμινοξέων στις πρωτεΐνες.

Εμφανίζονται τόσο στην αμαστιγωτή όσο και στην προμαστιγωτή μορφή υδρολύοντας πρωτεϊνικά υποστρώματα όπως αζοκαζεΐνη, γαλάζια σκόνη απόκρυψης (hide powder azure) και α-καζεΐνη [6]. Η σχετική ενεργότητα των πρωτεασών στις αμαστιγωτές μορφές είναι πολύ υψηλότερη από αυτή στις προμαστιγωτές μορφές. Το βέλτιστο pH των αμαστιγωτών μορφών για υποστρώματα αζοκαζεΐνης είναι στο 5,5 ενώ για τις προμαστιγωτές μορφές κοντά 7. Σε δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν πάνω σε *L. mexicana* subsp. *mexicana*, εντοπίστηκαν δύο πρωτεάσες αζοκαζεΐνης (A, B) στις αμαστιγωτές μορφές ενώ μία στις προμαστιγωτές μορφές (C). Οι πρωτεάσες A και C μοιάζουν αρκετά έχοντας παρόμοιο βέλτιστο pH 5,5 και υπάρχουν ενδείξεις ότι πρόκειται για μεταλλοπρωτεΐνάσες. Οι μικρότερου μοριακού βάρους πρωτεάσες B,

φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση του παρασίτου εντός των μακροφάγων του ξενιστή, καθώς αναστολές αυτών των πρωτεασών φαίνεται να έχουν αντιλεϊσμμανιακή δράση.

Σε δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν πάνω σε παράσιτα του είδους *L. major* εντοπίστηκε επιφανειακή πρωτεάση που σημάνθηκε ως p63 και gr63 με βέλτιστο pH σε εύρος από 7 – 10 και πιστεύεται πως προστατεύει το παράσιτο από τα μικροβιοκτόνα ένζυμα στο έντερο των εντόμων και κατά τη διάρκεια που αυτό εδραιώνεται στο ξενιστή [6]. Η ίδια πρωτεάση, πάνω στην επιφάνεια προμαστιγωτών μορφών *L. mexicana*, διαπιστώθηκε να αποτελεί υποδοχέα για το C3b του συμπληρώματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι η φαγοκυττάρωση μέσω του C3b ωφελεί το παράσιτο, καθώς μέσω αυτής της οδού δεν ενεργοποιείται η αναπνευστική έκρηξη στο φαγοκύτταρο.

Σε δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν πάνω σε προμαστιγωτές μορφές *L. mexicana* η πρωτεάση gr63 φάνηκε να έχει βέλτιστο pH 4.0, ενώ έδειξε δύο με τρεις φορές εντονότερη δράση σε παθογόνα στελέχη από ότι σε μη παθογόνα [6]. Η gr63 φαίνεται να είναι μια ενδοπεπτιδάση. Το όξινο περιβάλλον του φαγολυσοσώματος ενεργοποιεί τις επιφανειακές πρωτεάσες gr63 των παρασίτων, δίνοντας τη δυνατότητα να απενεργοποιηθούν μικροβιοκτόνες πρωτεΐνες και ένζυμα που βρίσκονται εκεί. Παρόλα αυτά, η gr63 λειτουργεί και σε ουδέτερο pH 7.0 – 7.5 οπότε είναι πιθανό να λειτουργεί υδρολυτικά και να απενεργοποιεί ανοσοσφαιρίνες και συστατικά του συμπληρώματος.

1.1.3.1.2 Κινάσες Πρωτεϊνών (Protein Kinases)

Τα είδη του γένους *Leishmania* έχουν σχετικά υψηλή ενεργότητα πρωτεϊνικών κινασών. Πρόκειται για ένζυμα που καταλύουν τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών, πιο συγκεκριμένα μεταφέρουν μια φωσφορική ομάδα από ένα ATP στην υδροξυλική ομάδα ενός καταλοίπου σερίνης, θρεονίνης ή τυροσίνης μιας πρωτεΐνης.

Στο παρελθόν, έχει μελετηθεί το ενδεχόμενο οι κινάσες πρωτεϊνών να συνδέονται με την παθοφυσιολογία σε βακτήρια και πρωτόζωα [6], όπως τα *Plasmodium berghei* και *Babesia bovis*, όπου μόλυνση από αυτούς τους μικροοργανισμούς οδηγεί σε φωσφορυλίωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών των ερυθροκυττάρων. Το *T. brucei*, το

οποίο ευθύνεται για την ασθένεια του ύπνου στους ανθρώπους, απελευθερώνει “variant surface glycoproteins” κατά την μόλυνση του ξενιστή, μια διαδικασία η οποία συνδέεται με την ταχύτατη φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών του.

Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν πάνω σε στελέχη του είδους *L. donovani*, έγινε εμφανές ότι οι μεμβρανικές πρωτεΐνες του υφίστανται ταχύτατα φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση ενώ οι περισσότερες κινάσες εμφανίζονται στην εξωτερική επιφάνεια του παρασίτου. Επίσης υψηλά επίπεδα ATP εμφανίζονται εξωκυτταρικά στο αίμα κάτι το οποίο, σε συνδυασμό με τα προηγούμενα, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι κινάσες των παρασίτων πιθανώς να μετατρέπουν τις επιφανειακές πρωτεΐνες των κυττάρων ξενιστών [6].

Τα επίπεδα των κινασών αυξάνονται όταν τα παράσιτα περάσουν στη μετακυκλική προμαστιγωτή φάση (μολυσματικό στάδιο) για να μειωθούν προς το τέλος αυτής ξανά, ενώ τα επίπεδα είναι έως και 8 φορές μεγαλύτερα για παθογόνα στελέχη που βρίσκονται στη στατική φάση σε αντίθεση με μη παθογόνα στελέχη που βρίσκονται στην ίδια φάση. Υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι οι κινάσες του παρασίτου συνδέονται με την παθοφυσιολογία του, καθώς φαίνεται πως αυτό έχει την ικανότητα να ρυθμίζει τις ιδιότητες και τις λειτουργίες όχι μόνο των δικών του μακρομορίων αλλά και των μακρομορίων των κυττάρων ξενιστών [6].

Μελέτες σε παράσιτα του είδους *L. tropica* έδειξαν ότι οι μικροσωληνίσκοι αυτών των πρωτοζώων είναι σχεδόν ταυτόσημοι με αυτούς των εγκεφαλικών κυττάρων θηλαστικών και αποτελούνται από μονομερή α και β -τουμπουλίνης [6]. Εφόσον η φωσφορυλίωση των μονομερών τουμπουλίνης παρεμποδίζει την ικανότητα τους να σχηματίζουν μικροσωληνίσκους είναι δυνατόν η εξωκινάση των *Leishmania* spp να μεταβάλει την κυτταροσκελετική δομή του ξενιστή.

Πρόσφατη μελέτη σε στελέχη του είδους *L. major* έδειξε ότι η κινάση MPK7 σχετίζεται με την ενδοκυτταρική ανάπτυξη του παρασίτου [8]. Συγκεκριμένα η αντιστρέψιμη επαγωγής υπερέκφρασης αυτής της κινάσης, εμπόδισε τη φυσιολογική ανάπτυξη του παρασίτου στον ξενιστή και την εξέλιξη της μόλυνσης. Όταν το παράσιτο επανήλθε στα φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης, η μόλυνση εξελίχθηκε φυσιολογικά όπως στα δείγματα

ελέγχου.

1.1.3.2 ΛιποΦωσφοΓλυκάνες (LPGs – Lipophosphoglycans)

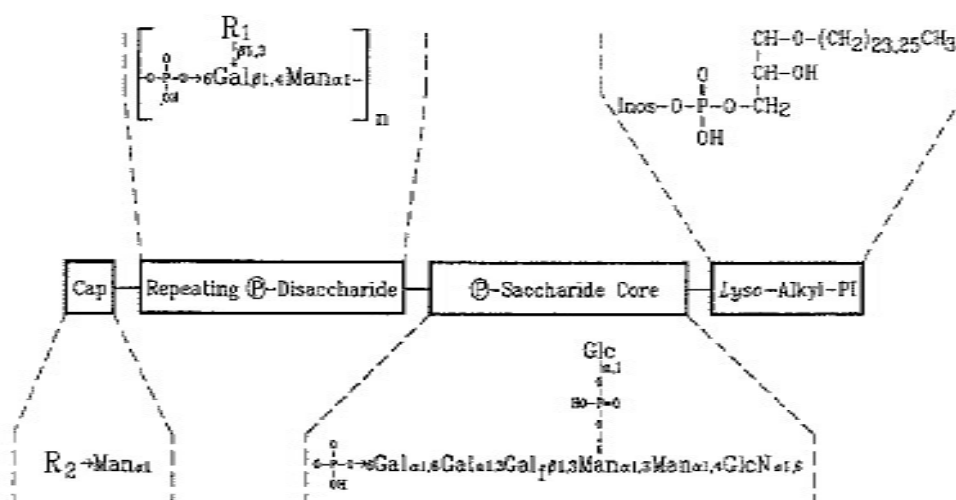
Το γεγονός ότι τα παράσιτα του γένους *Leishmania*, όχι μόνο επιβιώνουν, αλλά ανθούν σε δύσκολα περιβάλλοντα, όπως το κυκλοφορικό και πεπτικό σύστημα των σπονδυλωτών καθώς και τα φαγολυσοσώματα των μακροφάγων, οφείλεται στα διάφορα γλυκοσυνδετικά (glycoconjugate) μόρια της επιφάνειας του. Τέτοια μόρια είναι και οι LPG, τα οποία, με μικρές παραλλαγές, εμφανίζονται σε όλα τα παράσιτα του γένους *Leishmania*, τόσο στην αμαστιγωτή όσο και στην προμαστιγωτή μορφή και στο μαστίγιο. Κάθε παράσιτο εμφανίζει εκατομμύρια τέτοια μόρια στην επιφάνεια του [9].

1.1.3.2.1 Δομή των LPG

Οι LPG των προμαστιγωτών μορφών

Οι LPG αποτελούνται από 4 τμήματα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3 [9]:

- ένα φωσφοτιδυλινοσιτολικό λιπιδικό άγκιστρο
- ένα φωσφοσακχαρικό πυρήνα
- μία επαναλαμβανόμενα φωσφορυλιωμένη σακχαρική περιοχή και
- μία ολιγοσακχαρική καλύπτρα



Εικόνα 3: Δομή των LPG

Συνδεδεμένο στο λιπιδικό άγκιστρο βρίσκεται ο **φωσφοσακχαρικός πυρήνας** των LPG που στα *L. donovani*, *L. major* και *L. mexicana* αποτελείται από μία μη ακετυλιωμένη γλυκοσαμίνη, δύο μανόζες, μια 6-φωσφογαλακτόζη, μία γαλακτοπυρανόζη και μία γαλακτοφουρανόζη. Η παρουσία της τελευταίας είναι πολύ ασυνήθιστη, ιδιαιτέρως στα ευκαρυωτικά γλυκοσυνδετικά επειδή η φουρανόζη είναι εσωτερική σε μια αλυσίδα υδατανθράκων. Ο πυρήνας των *L. donovani* και *L. mexicana* φέρει μία γλυκόςυλ- α 1-φωσφορική ομάδα συνδεδεμένο με φωσφοδιεστερικό δεσμό στο C6 υδροξύλιο του εγγύς καταλοίπου μανόζης. Το ίδιο πρότυπο παρουσιάζεται και σε μεγάλο ποσοστό στελεχών *L. major*. Μία άλλη ενδιαφέρουσα αλληλουχία είναι το Gal(α 1,3)Gal το οποίο αναφέρεται ως επίτοπος κυκλοφορούντων αντισωμάτων σε ασθενείς με Λείσμανίαση [9].

Το εξέχον κομμάτι των LPG είναι η **επαναλαμβανόμενη φωσφοσακχαρική περιοχή**. Όλα τα LPG παρουσιάζουν μια δομή με το σκελετό να αποτελείται από $\text{PO}_4\text{-}\beta\text{Gal}(\beta 1,4)\text{Man}(\alpha 1)$. Σε στελέχη του είδους *L. mexicana* το 25% των καταλοίπων γαλακτόζης αντικαθίστανται στο C3 υδροξύλιο από κατάλοιπα β -Glc. Τα επαναλαμβανόμενα κομμάτια είναι εξαιρετικά πολύπλοκα λόγω του ότι τα κατάλοιπα γαλακτόζης δύναται να αντικατασταθούν περαιτέρω με μικρές πλευρικές αλυσίδες που περιέχουν από ένα έως τέσσερα κατάλοιπα γαλακτόζης, γλυκόζης ή αραβινόζης (Εικόνα 4).

	R ₁	R ₂
<i>L. donovani</i> (n _{avg.} =16)	= H = Gal	= Man _{α1,2} - = Gal _{β1,4} - = Man _{α1,2} [Gal _{β1,4}]- = Man _{α1,2} Man _{α1,2} - = Man _{α1,2} Man _{α1,2} [Gal _{β1,4}]-
<i>L. major</i> (n _{avg.} =27)	= H = Gal = Ara _{α1,2} Gal- = Gal _{β1,3} Gal- = Glc _{β1,3} Gal- = Ara _{α1,2} Gal _{β1,3} Gal- = Gal _{β1,3} Gal _{β1,3} Gal- = Ara _{α1,2} Gal _{β1,3} Gal _{β1,3} Gal-	= Man _{α1,2} -
<i>L. mexicana</i> (n _{avg.} =16)	= H = Glc	= Man _{α1,2} - = Man _{α1,2} Man _{α1,2} - = Man _{α1,2} [Gal _{β1,4}]-

Εικόνα 4: Δομή επαναλαμβανόμενης φωσφορυλιωμένης σακχαρικής περιοχής

Η καλύπτρα των LPG τερματίζει το γλυκοσυνδετικό μόριο με ένα μικρό ουδέτερο ολιγοσακχαρίτη που περιέχει γαλακτόζη ή μανόζη. Παρότι τα LPG διαθέτουν μία από τις πιο περίπλοκες δομές επαναλαμβανόμενων μονάδων, τερματίζονται με την απλούστερη δομή που αποτελείται αποκλειστικά από το δισακχαρίτη Man(α1,2)Man(α1). Ο πιο κοινός τερματικός ολιγοσακχαρίτης των LPG του *L. donovani* είναι ο κλαδωτός τρισακχαρίτης Gal(β1,4)[Man(α1,2)]Man(α1), ο οποίος έχει επίσης δομή καψιδίου για τις LPG του *L. mexicana*.

Μετατροπές των LPG κατά τη διάρκεια της Προμαστιγωτής Μετακυκλογένεσης

Οι μεταβολές στη δομή των LPG κατά τη διάρκεια της μετακυκλογένεσης είναι μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση [9]. Μελέτες σε *L. major* έδειξαν ότι παρότι το λιπιδικό άγκιστρο και ο φωσφοσακχαρικός πυρήνας παραμένουν σταθερά, το επαναλαμβανόμενο κομμάτι των φωσφορυλιωμένων σακχαριτών σχεδόν διπλασιάζεται σε μήκος και πάχος. Οι επιφάνειες των κυττάρων παρουσιάζουν πυκνά στοιβαγμένες

νηματοειδείς πτυχώσεις, που δεν είναι παρούσες στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης σε μη παθογόνες προμαστιγωτές μορφές [9].

Μια δεύτερη και πιο λεπτή διαφορά στις δύο εκδοχές των LPG εντοπίζεται στη σύνθεση των επαναλαμβανόμενων φωσφορυλιωμένων σακχαριτών [9]. Ενώ στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης η επαναλαμβανόμενη περιοχή αποτελείται από κατάλοιπα β-γαλακτόζης που διακλαδίζονται σε πλευρικές αλυσίδες, στη μετακυκλική μορφή αυτά τα κατάλοιπα αντικαθίστανται συνήθως από α-αραβινόζη και λιγότερο συχνά από β-γλυκόζη. Αυτές οι αλλαγές στη δομή των LPG μπορεί να έχουν σημαντικές επιδράσεις στη λειτουργία τους και υποδεικνύουν ότι υπάρχουν σημαντικά σημεία ρύθμισης των γλυκοτρανσφερασών που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των LPG [9].

Από την άλλη, μελέτες σε *L. donovani* επιβεβαίωσαν το διπλασιασμό των επαναλαμβανόμενων περιοχών, χωρίς όμως να αντικαθίστανται τα μόρια Gal στο τερματικό σημείο διακλάδωσης. Η καλύπτρα σε αυτή την περίπτωση υπόκειται σε μεταβολές καθώς το τερματικό κατάλοιπο γαλακτόζης είναι απόν στις μετακυκλικές προμαστιγωτές μορφές [9].

Οι LPG των αμαστιγωτών μορφών

Η παρουσία των LPG μελετήθηκε αρχικά σε αμαστιγωτές μορφές *L. donovani* και *L. major* ενώ τα αποτελέσματα ήταν αντιφατικά. Οι αμαστιγωτές μορφές *L. donovani* φαίνεται πως δεν μπορούν να συνθέσουν LPG ενώ οι *L. major* παράγουν LPG που είναι βιοχημικά και αντιγονικά διαφορετικές από αυτές των προμαστιγωτών. Σε *in vitro* μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι κατά τη μετατροπή από την αμαστιγωτή στην προμαστιγωτή μορφή, οι LPG της αμαστιγωτής μορφής εξαφανίστηκαν μετά από 48h ενώ κατά τη μετατροπή από προμαστιγωτή σε αμαστιγωτή μορφή, οι LPG της αμαστιγωτής μορφής εμφανίστηκαν μετά από 12 h. Παρόλα αυτά η ποσότητα LPG των αμαστιγωτών *L. major* φαίνεται να είναι σημαντικά μικρότερη από αυτή των προμαστιγωτών.

Glycosyl-phospho-inositides

Τα διάφορα μέρη των LPG φαίνεται να υπάρχουν στις προμαστιγωτές μορφές ως κομμάτια υδατανθράκων συνδεδεμένα σε πρωτεΐνες (γλυκοπρωτεΐνες) ή ως διακριτές

οντότητες [9]. Σχετικά με το τελευταίο, μια ομάδα μορίων που χαρακτηρίζεται ως glycosyl-phosphatidyl-inositol αντιγόνα (GPIs) ή glycosyl-inositol-phospho-lipids (GIPLs) είναι άφθονη σε *L. major* και *L. donovani*. Δομική ανάλυση αυτών των γλυκολιπιδίων έδειξε ότι ομοιάζουν στενά με το φωσφοσακχαρικό πυρήνα των LPG. Παρότι οι αμαστιγωτές μορφές των *L. donovani* δεν παράγουν LPG, φαίνεται πως συνεχίζουν να παράγουν GIPLs σε ποσότητες παρόμοιες με αυτές των προμαστιγωτών με μικρές δομικές αλλαγές.

Εξωκυτταρικά LPG-like Γλυκοσυνδετικά

Ουσίες που μοιάζουν με τα LPG, συλλογικά επονομαζόμενα εκκρινόμενος παράγοντας (excreted factor [EF]), έχουν ανιχνευτεί σε καλλιέργειες με παράσιτα *Leishmania*. Τα συστατικά του EF μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες [9].

Στην πρώτη κατηγορία, τα LPG μπορούν να σχηματίσουν σφικτά συμπλέγματα με αλβουμίνη στο μέσο. Ανάλυση αυτών των μορφών έδειξε ότι πρόκειται για τις ίδιες ουσίες με τα LPG των κυττάρων. Μια εκδοχή θα ήταν ότι το λιπιδικό κομμάτι των LPG να αλληλεπιδρά με το υδροφοβικό σημείο σύνδεσης της αλβουμίνης, εξυπηρετώντας έτσι την αποδέσμευση της από την επιφάνεια των προμαστιγωτών.

Στη δεύτερη κατηγορία, οι επαναλαμβανόμενες φωσφορυλιωμένες σακχαρικές μονάδες των LPG περιλαμβάνονται ως αλυσίδες υδατανθράκων συνδεδεμένες σε μια όξινη φωσφατάση που εκκρίνεται από κύτταρα *L. donovani*, *L. tropica* και *L. mexicana*. Δεν πρόκειται για N-γλυκοσιδικό δεσμό καθώς η επαναλαμβανόμενη μονάδα δεν αποσυνδέθηκε από την όξινη φωσφατάση ακολουθούμενη από πέψη με N-γλυκανάση.

Η τρίτη κατηγορία είναι μία εξωκυτταρική φωσφογλυκάνη (exPG) η οποία έχει απομονωθεί και χαρακτηριστεί από *L. donovani*. Δομική ανάλυση έδειξε ότι η exPG αποτελείται από την εξής δομή (CAP)→[PO₄-6Gal(β1,4)Man(α1)]₁₀₋₁₁. Η καλύπτρα βρέθηκε να είναι ένας από τους άφθονους μικρούς ουδέτερους ολιγοσακχαρίτες με πιο κοινό το διακλαδωτό Gal(β1,4)[Man(α1,2)]Man(α1). Επομένως το exPG είναι πανομοιότυπο με το LPG χωρίς το λιπιδικό άγκιστρο, το φωσφοσακχαρικό πυρήνα και ορισμένες επαναλαμβανόμενες μονάδες. Χωρίς να είναι γνωστός ο τρόπος απελευθέρωσης τους προέκυψε ότι τα exPG προέρχονται από τις LPG της επιφάνειας των παρασίτων.

1.1.3.2.2 Λειτουργίες των LPG

Η ιδιαιτερότητα της συνολικής δομής των LPG και των ασυνήθιστων τμημάτων τους, υποδεικνύει ότι έχουν μία ή περισσότερες λειτουργίες στον κύκλο ζωής των παρασίτων. Όντως, υπάρχουν ενδείξεις για ένα μεγάλο αριθμό λειτουργιών που επιτρέπουν στις προμαστιγωτές μορφές να επιβιώνουν στα υδρολυτικά περιβάλλοντα που αντιμετωπίζουν.

Λειτουργίες εντός των εντόμων ξενιστών

Μία από τις σημαντικότερες λειτουργίες της διαδικασίας της μετακυκλογένεσης, η οποία μετατρέπει το παράσιτο στην παθογόνο μορφή του και το οδηγεί στην προβοσκίδα του εντόμου, είναι η δομική τροποποίηση των LPG. Μελέτες σε σκνίπες του είδους *Phebotomus papatasi* έδειξαν πως μη μετακυκλικές προμαστιγωτές *L. major* έμεναν προσκολλημένες στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου του εντόμου ενώ εξέφραζαν μη μετακυκλικά LPG και την κύρια επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη gp63. Μη μετακυκλικά LPG βρέθηκαν στα επιθηλιακά κύτταρα του εντόμου ακόμα και εν απουσία των παρασίτων. Αντιθέτως η απουσία μετακυκλικών LPG στα επιθηλιακά κύτταρα του εντόμου υποδεικνύει ότι η τροποποιημένη μορφή αυτού του γλυκοσυνδετικού μορίου δε συνδέεται στα επιθηλιακά κύτταρα του εντόμου, με αποτέλεσμα το παράσιτο να αποδεσμεύεται και να κινείται προς την προβοσκίδα [9].

Επίσης υπάρχουν ενδείξεις ότι οι LPG προστατεύουν τις προμαστιγωτές μορφές από τα υδρολυτικά ένζυμα του εντέρου στα έντομα [9].

Λειτουργίες στο αίμα

Οι LPG φαίνεται να συνδέονται με την ανθεκτικότητα των μετακυκλικών προμαστιγωτών μορφών στα μικροβιοκτόνα ένζυμα του συμπληρώματος. Ενώ οι προμαστιγωτές μορφές που βρίσκονται στην εκθετική φάση είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στο ορό, οι μετακυκλικές προμαστιγωτές μορφές δείχνουν μεγάλη ανθεκτικότητα. Στην πρώτη περίπτωση, η σύνδεση του C3 γίνεται απευθείας με ενεργοποίηση του εναλλακτικού μονοπατιού ενώ σε μετακυκλικές προμαστιγωτές μορφές η σύνδεση του C3b, όπως φάνηκε σε παράσιτα του είδους *L. major*, γίνεται δια μέσω του κλασσικού μονοπατιού και το C3 δεν συνδέεται ισχυρά. Ενδεικτικό είναι ότι και στις δύο περιπτώσεις τα ένζυμα του συμπληρώματος συνδέονται πάνω στα μόρια LPG. Στις

μετακυκλικές προμαστιγωτές μορφές το C3 φαίνεται να απελευθερώνεται ταχύτατα ως αποτέλεσμα ενός ασυνήθιστου πρωτεολυτικού ξαλιδισμού, αυξάνοντας την πιθανότητα ο ξαλιδισμός του C3 να οφείλεται στην κύρια επιφανειακή πρωτεάση gp63 [9]. Το μεγαλύτερο μέγεθος των LPG στις μετακυκλικές προμαστιγωτές πιθανώς συνδράμει στην ανθεκτικότητα των παρασίτων ενάντια στη λύση από το συμπλήρωμα.

Οι LPG μαζί με τις γλυκοπρωτεΐνες gp63 θεωρούνται ως τα δύο βασικά συνδετικά μόρια για τη δέσμευση από τα μακροφάγα. Η παρουσία του C3 και της σύνδεσης στους υποδοχείς CR1 και CR3 των μακροφάγων αυξάνει τις πιθανότητες επιβίωσης καθώς μέσω αυτού του μονοπατιού δεν ενεργοποιείται η αναπνευστική έκρηξη. Επίσης μελέτες σε *L. donovani* και *L. major* όπου είχε απενεργοποιηθεί η σύνθεση των LPG, αλλά χωρίς να επηρεάζεται η σύνθεση της γλυκοπρωτεΐνης gp63, έδειξαν πως τα παράσιτα εισέρχονται στα μακροφάγα από άλλο υποδοχέα με τον ίδιο ή και γρηγορότερο ρυθμό [9].

Ενδοκυτταρικές λειτουργίες

Συνέπεια της σύνδεσης των παρασίτων στους υποδοχείς των μακροφάγων είναι η εισαγωγή τους εντός του κυττάρου με τη δημιουργία ενός φαγοςώματος. Δευτερεύοντα λυσοσώματα συνδέονται με το παρασιτοφόρο φαγόσωμα για να σχηματίσουν ένα φαγολυσόσωμα εντός του οποίου τα παράσιτα μετασχηματίζονται σε αμαστιγωτές μορφές. Αυτό υποδεικνύει ότι τα παράσιτα *Leishmania* έχουν προσαρμοστεί να επιβιώνουν στο πολύ καταστρεπτικό περιβάλλον του φαγολυσοσώματος όπου έρχονται αντιμέτωπα με λυτικά ένζυμα και τοξικούς μεταβολίτες οξυγόνου.

Η χρήση στελεχών *Leishmania* που δεν είχαν LPG οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για μόρια βασικά για την επιβίωση των παρασίτων [9]. Ένα μη παθογόνο στέλεχος *L. major*, χωρίς την ικανότητα να παράγει LPG, φαγοκυτταρώθηκε και εξοντώθηκε από τα μακροφάγα εντός 18 ωρών. Παθητική μεταφορά καθαρισμένων LPG από παθογόνα στελέχη *L. major* εντός των μη παθογόνων προμαστιγωτών αποκατέστησε την ικανότητα τους να επιβιώνουν εντός των μακροφάγων.

Κάτι παρόμοιο συμβαίνει και με στελέχη *L. donovani*, τα οποία δεν παράγουν LPG, φαγοκυτταρώνονται από τα μακροφάγα και δεν μπορούν να επιβιώσουν εντός των ανθρωπίνων μονοκυττάρων. Μεταφορά LPG από παθογόνα σε μη παθογόνα στελέχη

παρέτεινε την επιβίωση τους στα μονοκύτταρα. Πέραν της ύπαρξης των LPG υπάρχει και ένα αριθμητικό ελάχιστο όριο που τους επιτρέπει την επιβίωση στα φαγοκύτταρα.

Οι διάφορες ιδιότητες των LPG που σχετίζονται με την ενδοκυτταρική επιβίωση είναι συνοπτικά οι εξής [9]:

- Αναστολέας των υδρολυτικών ενζύμων του φαγολυσοσώματος.
- Δεσμεύει το ασβέστιο, το οποίο λειτουργεί ως δευτερεύον αγγελιοφόρος και ενζυμικός συμπαράγοντας.
- Αναστολέας της κινάσης πρωτεϊνών C του ξενιστή, η οποία φωσφορυλιώνει κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης και παίζει σημαντικό ρόλο στην εκκίνηση της αναπνευστικής έκρηξης (παράγωγα της οποίας, όπως το υπεροξειδίου του υδρογόνου, είναι καταστρεπτικά για τους προμαστιγώτες *Leishmania*)
- Αναστέλλει την έκφραση των c-fos αγγελιοφόρων γονιδίων και τη δημιουργία της χημειοταξίας.
- Δεσμεύει τους τοξικούς μεταβολίτες οξυγόνου, προστατεύοντας τις προμαστιγώτες από τα τοξικά προϊόντα της αναπνευστικής έκρηξης, όπως τις ρίζες υδροξυλίου και τα ιόντα υπεροξειδίου.
- Αναστολέας της παραγωγής ιντερλευκίνης-1 (IL-1), ουσίας πολύ σημαντικής στην πρόκληση αποτελεσματικής ανοσολογικής απόκρισης μέσω της ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων.
- Ρυθμιστής των υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor - TNF receptors), με αποτέλεσμα ενώ παράγεται ο TNF, που παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταροτοξικότητα των μακροφάγων, να μην συνδέεται επαρκώς στους αντίστοιχους TNF υποδοχείς, οι οποίοι λόγω των LPG υποεκφράζονται, για την αποτελεσματική αντιμετώπιση των εισβολέων.

1.1.4 Η Ασθένεια της Λεισμανίασης

Είναι η ασθένεια που προκαλείται σε έναν οργανισμό όταν αυτός προσβληθεί από ένα εκ των τουλάχιστον 20 παθογόνων πρωτοζωικών παρασίτων του γένους *Leishmania* και

μεταδίδεται από το τσίμπημα συγκεκριμένων ειδών σκνίπας που έχουν μολυνθεί με το παράσιτο [11]. Η ασθένεια προσβάλλει τις φτωχότερους πληθυσμούς στον πλανήτη και σχετίζεται με κακή διατροφή, αποψίλωση των δασών, κακή στέγαση, αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα και μη επαρκή πρόσβαση σε προμήθειες. Εκτιμώνται 1,3 εκατομμύρια νέα κρούσματα κάθε χρόνο, με 20.000-30.000 θανάτους ετησίως.

1.1.4.1 Επιδημιολογία Λεισμανίασης

Υπάρχουν τριών ειδών εκδηλώσεις της ασθένειας:

- Σπλαχνική Λεισμανίαση (Visceral Leishmaniasis – VL) η οποία είναι θανατηφόρα μορφή Λεισμανίασης αν δεν αντιμετωπιστεί κατάλληλα και οφείλεται στα είδη *L. donovani* και *L. infantum* (ισοδύναμο με το *L. chagasi* στη νότια Αμερική). Χαρακτηρίζεται από μη φυσιολογικές περιόδους πυρετού, απώλεια βάρους, διόγκωση στη σπλήνα και το συκώτι και αναιμία. Ιδιαίτερα ενδημικό στην Ινδία και τη Δυτική Αφρική. Εκτιμώνται 200.000–400.000 νέα κρούσματα παγκοσμίως κάθε χρόνο. Παραπάνω από το 90% των κρουσμάτων απαντώνται σε 6 χώρες: Μπαγκλαντές, Βραζιλία, Αιθιοπία, Ινδία, Σαουδική Αραβία και Σουδάν.
- Δερματική Λεισμανίαση (Cutaneous Leishmaniasis – CL) η οποία είναι η πιο κοινή μορφή Λεισμανίασης και οφείλεται σε τουλάχιστον 15 είδη του γένους *Leishmania* ανάμεσα στα οποία είναι τα *L. major*, *L. tropica* και *L. aethiopica* στον Παλιό Κόσμο ενώ στον Νέο Κόσμο το πιο κοινό είδος είναι το *L. mexicana*. Κατά την εκδήλωση της ασθένειας, το παράσιτο προκαλεί ανοικτές δερματικές πληγές που θεραπεύονται αυθόρμητα μέσα σε ένα διάστημα 6-18 μηνών, αφήνοντας μόνιμες ουλές και σοβαρή αναπηρία. Εκτιμώνται 0,7-1,3 εκατομμύρια νέα κρούσματα παγκοσμίως κάθε χρόνο. Περίπου το 95% των κρουσμάτων απαντώνται στην Αμερική, στη λεκάνη της Μεσογείου, τη Μέση Ανατολή και την Κεντρική Ασία. Περίπου τα 2/3 των νέων κρουσμάτων επικεντρώνονται σε 6 χώρες: Αφγανιστάν, Αλγερία, Βραζιλία, Κολομβία, Ιράν και Συρία.
- Βλενοδερματική Λεισμανίαση (Mucocutaneous Leishmaniasis – ML) η οποία

οδηγεί στην πλήρη καταστροφή των βλεννογόνων όπως μύτη, στόμα και λαιμός και οφείλεται αποκλειστικά στο είδος *L. braziliensis*. Περίπου το 90% των κρουσμάτων απαντώνται σε Βολιβία, Βραζιλία και Περού.

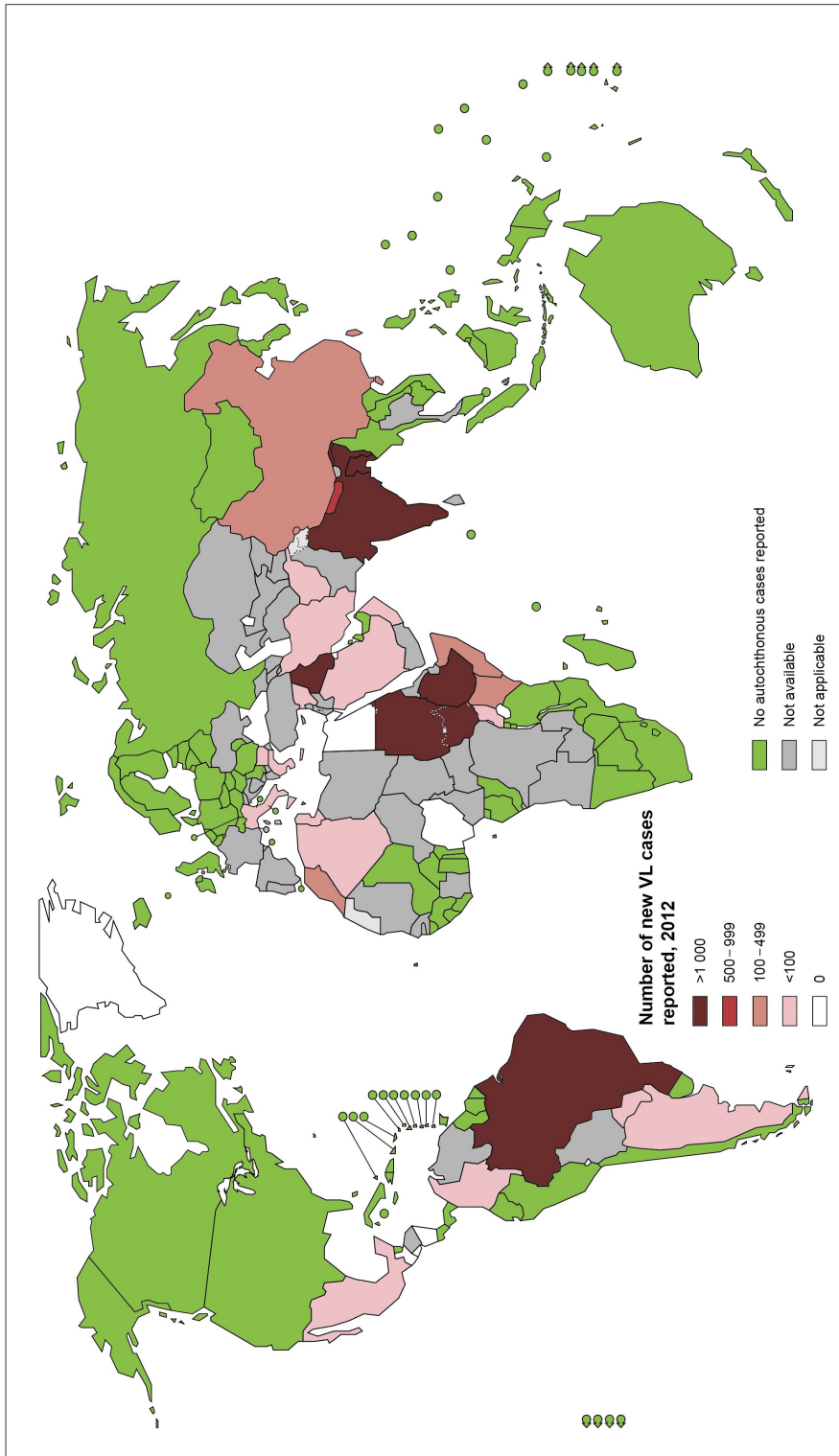
Γενικότερα τα είδη *L. donovani* (VL) και *L. guyanensis* (CL) είναι παράσιτα που προσβάλλουν ανθρώπους ενώ τα υπόλοιπα προσβάλλουν κυρίως ζώα.

1.1.4.1.1 Παγκόσμια Επιδημιολογικά Στοιχεία Λεισμανίασης

Η ασθένεια της Λεισμανίασης απαντάται σε 98 τροπικές και υποτροπικές χώρες [4][14]. Περίπου 350 εκατομμύρια άνθρωποι κατοικούν σε αυτές τις περιοχές. Οι συνθήκες στις οποίες ευδοκιμεί η ασθένεια είναι από τα τροπικά δάση της κεντρικής και Νότιας Αμερικής μέχρι τις ερήμους της Δυτικής Ασίας και της Μέσης Ανατολής. Από την ασθένεια νοσούν περί τα 12 εκατομμύρια άνθρωποι με 1,5-2 εκατομμύρια νέα κρούσματα παγκοσμίως κάθε χρόνο.

Οι χάρτες από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization) δείχνουν με λεπτομέρεια την έκταση της Σπλαχνικής και της Δερματικής Λεισμανίασης αντίστοιχα (στοιχεία 2012) (Εικόνες 5 και 6 αντίστοιχα).

Status of endemicity of visceral leishmaniasis, worldwide, 2012



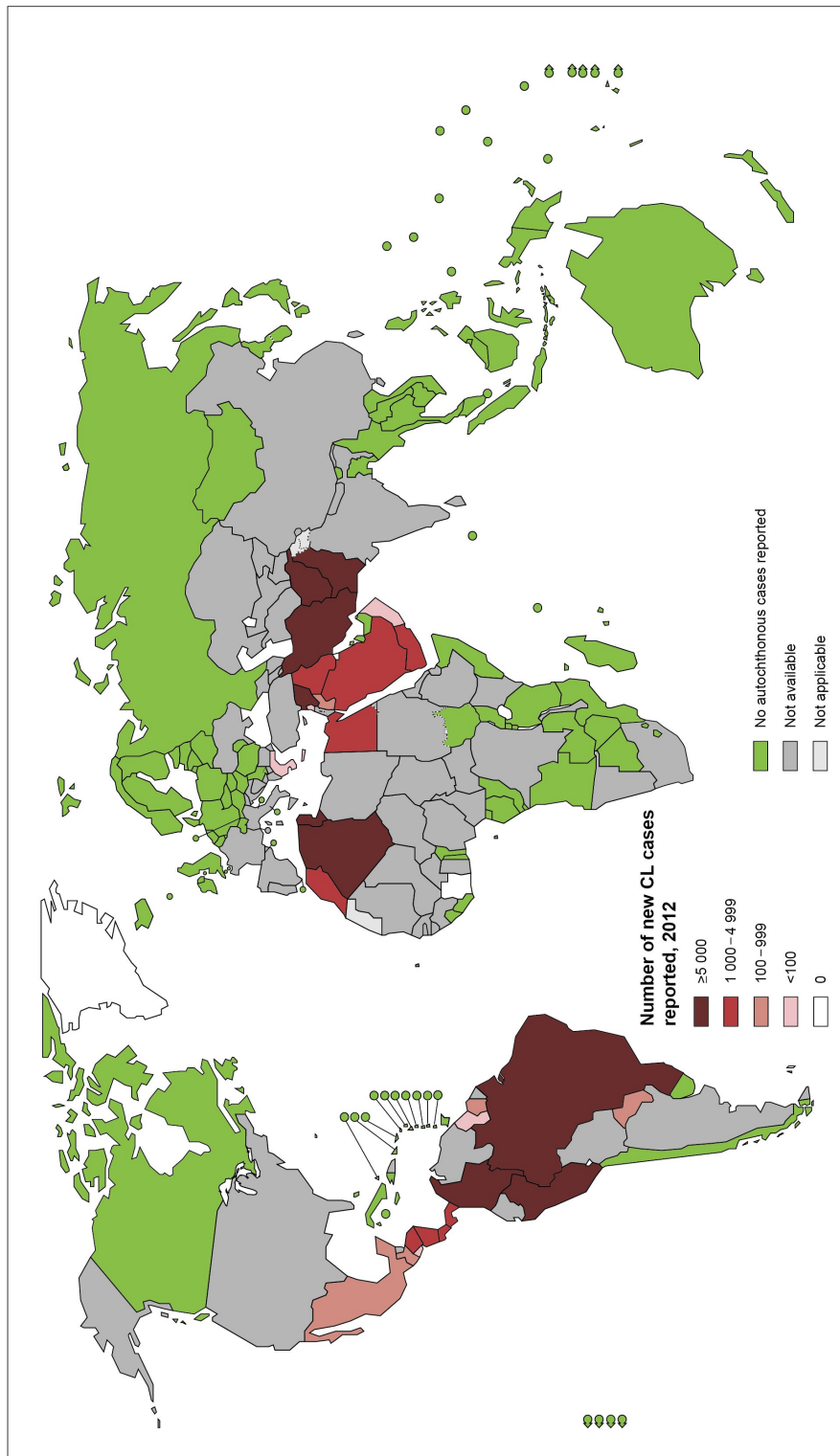
The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2013. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Εικόνα 5: Κατάσταση ενδημικότητας Σπλαχνικής Λεισημανίασης - Αριθμός νέων κρουσμάτων της νόσου που αναφέρθηκαν το 2012

Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis, worldwide, 2012



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2013. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization

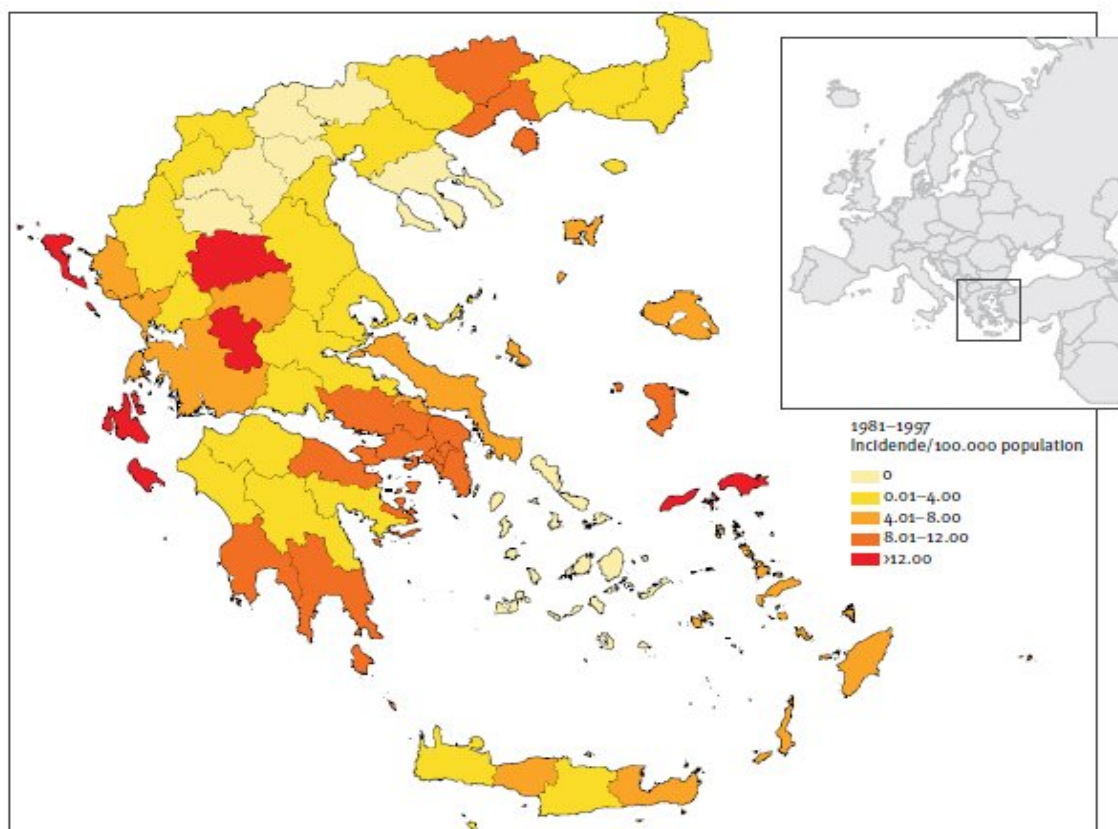


Εικόνα 6: Κατάσταση ενδημικότητας Δερματικής Λεισμανίασης - Αριθμός νέων κρουσμάτων της νόσου που αναφέρθηκαν το 2012

1.1.4.1.2 Ενδημικά Επιδημιολογικά Στοιχεία Λείσμανίασης στην Ελλάδα

Η Ελλάδα θεωρείται ενδημική χώρα για δύο μορφές Λείσμανίασης (Σπλαχνική και Δερματική), με τη Σπλαχνική να είναι η επικρατής μορφή και τη Δερματική να εμφανίζεται σποραδικά [12][13]. Στελέχη του είδους *L. infantum* είναι υπεύθυνα για την κλινική εκδήλωση της Σπλαχνικής Λείσμανίασης ενώ τα είδη σκνίπας που μεταδίδουν το παράσιτο είναι τα *Phlebotomus neglectus*, *P. tobbi* και *P. perfiliewi*. Σποραδικές περιπτώσεις Δερματικής Λείσμανίασης έχουν εμφανιστεί τόσο ηπειρωτική όσο και στην νησιώτη Ελλάδα και προκαλείται από στελέχη του είδους *L. tropica* που μεταδίδεται από τις σκνίπες του είδους *P. sergenti*.

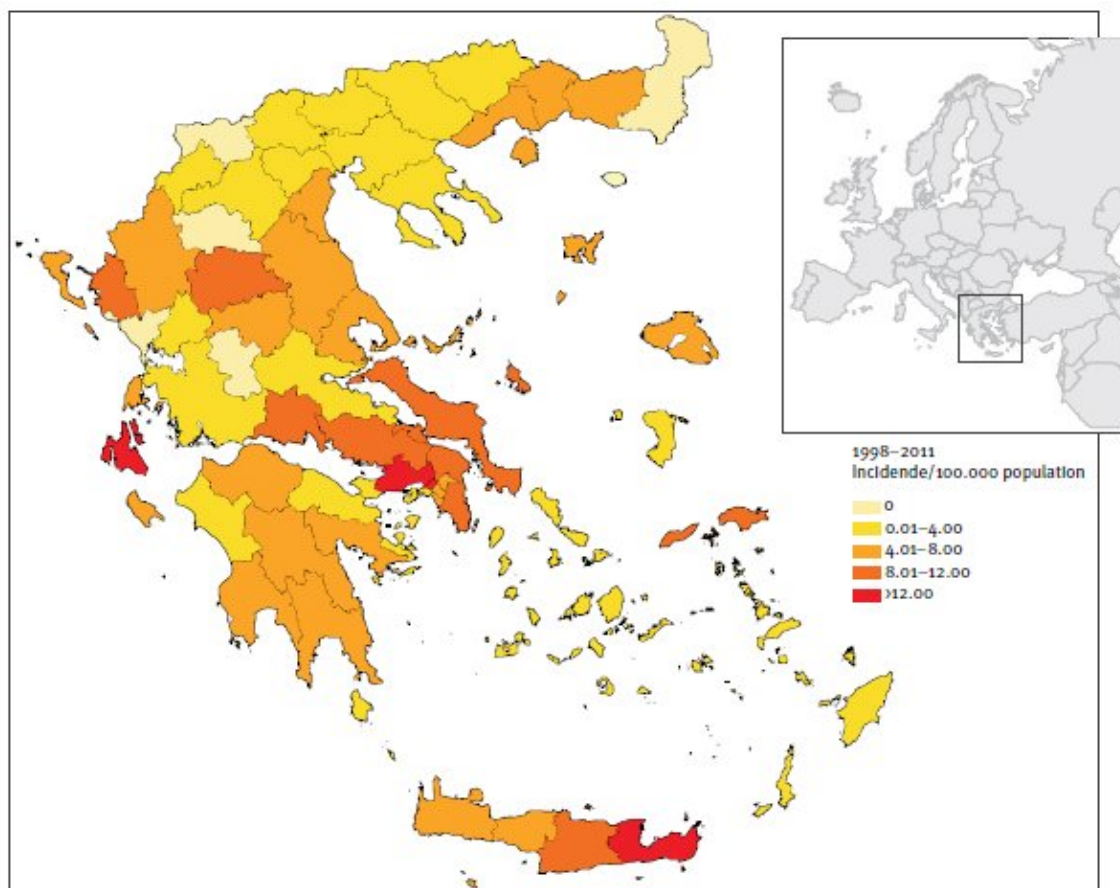
Συνολικά 688 κρούσματα έχουν σημειωθεί στην περίοδο 1981 – 1997, με συσσωρευτικό ρυθμό 8 κρούσματα ανά 100.000 πληθυσμού και εμφανίζονται κυρίως



Εικόνα 7: Κρούσματα Λείσμανίασης στην Ελλάδα κατά την περίοδο 1981-1997 στην Κεντρική Ελλάδα, τη Θεσσαλία, τη Νότια Πελοπόννησο και την Ανατολική

Μακεδονία. Στα νησιά, ο συσσωρευτικός ρυθμός ανέρχεται στα 12 κρούσματα ανά 100.000 πληθυσμού για τα νησιά της Κέρκυρας, της Κεφαλονιάς και της Ζακύνθου για το Ιόνιο Πέλαγος ενώ στον ίδιο ρυθμό ανέρχονται τα κρούσματα και για τις Χίο και Σάμο όσο αφορά το Αιγαίο Πέλαγος.

Για την περίοδο 1998 – 2011 τα εργαστηριακά επιβεβαιωμένα κρούσματα είναι συνολικά 664, με τα 614 από αυτά να είναι περιπτώσεις Σπλαχνικής Λεϊσμανίασης και τα υπόλοιπα 50 Δερματική Λεϊσμανίαση. Τα κρούσματα Σπλαχνικής Λεϊσμανίασης με συσσωρευτικό ρυθμό πάνω από 8 ανά 100.000 πληθυσμού εντοπίζονται κυρίως στην Κεντρική Ελλάδα, με την Αττική να συγκεντρώνει πάνω από τις μισές αναφορές. Στα νησιά εντοπίζονται κυρίως στην Κεφαλλονιά, τη Σάμο και την Κρήτη (Ηράκλειο). Για



Εικόνα 8: Κρούσματα Λεϊσμανίασης στην Ελλάδα κατά την περίοδο 1998-2011

τη Δερματική Λεϊσμανίαση τα κρούσματα εντοπίζονται κυρίως στην Πελοπόννησο (Αχαΐα, Αρκαδία, Ηλία, Αργολίδα, Λακωνία), την Κεντρική Ελλάδα (Αιτωλοακαρνανία, Φθιώτιδα, Αττική, Εύβοια), τη Θεσσαλία (Τρίκαλα), τη Μακεδονία (Θεσσαλονίκη και

Σέρρες) ενώ για τα νησιά υπάρχουν αναφορές για Κρήτη (Ηράκλειο, Λασίθι), Χίο και Σάμο. Όλες οι παραπάνω περιπτώσεις Δερματικής Λεισμανίασης έχουν συσσωρευτικό ρυθμό μικρότερο από 4 κρούσματα ανά 100.000 πληθυσμού, με εξαίρεση τη Λακωνία που εμφανίζει ρυθμό που ξεπερνάει τα 6 ανά 100.000 πληθυσμού.

1.1.4.2 Εργαστηριακή Διάγνωση Λεισμανίασης

Η Λεισμανίαση μπορεί να διαγνωστεί σε αιματολογικό διαγνωστικό εργαστήριο με απευθείας παρατήρηση των αμαστιγωτών στο μικροσκόπιο (σώματα Leishman-Donovan και χρώσεις Wright-Giemsa) ή μέσω ανάλυσης DNA (πχ. PCR) [4].

Δείγματα από τους λεμφαδένες, το μυελό των οστών, το ήπαρ, τη σπλήνα ή τις δερματικές πληγές είναι μία πρώτη προσέγγιση [14]. Οι αμαστιγώτες παρατηρούνται μαζί με μονοκύτταρα, λιγότερο συχνά και με ουδετερόφιλα, στο περιφερειακό αίμα και στα μακροφάγα στις αναρροφήσεις. Περιστασιακά παρατηρούνται στο αίμα ανάμεσα σε κύτταρα.

Η ανάλυση DNA (PCR) σε φλεβικό αίμα επιτρέπει μια εύστοχη ανάλυση αποφεύγοντας έτσι τη βιοψία [14]. Η ανάλυση PCR ανιχνεύει αλληλουχίες DNA από μεταβλητές περιοχές του DNA και μπορεί να δώσει άμεση διάγνωση για συγκεκριμένα είδη *Leishmania*.

Πέρα από τις βιοπτικές μεθόδους και την ανάλυση DNA, έχουν αναπτυχθεί και έμμεσες ορολογικές δοκιμές όπως:

- Η ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσρόφηση το (Enzyme-Linked-ImmunoSorbent Assay - ELISA)
- Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (Indirect Fluoresence Assay - IFA)
- Η δοκιμή άμεσης συγκόλλησης (Direct Agglutination Test – DAT)

Η τεχνική ELISA έχει δείξει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα στη διάγνωση σπλαχνικής Λεισμανίασης και post-kala-azar δερματικής Λεισμανίασης [28].

Το IFA είναι ένα ανοσοχρωματικός έλεγχος αντιγόνου με χρήση του αντιγόνου rK39 το οποίο είναι ενεργό σε σπλαχνική Λεισμανίαση που προκαλείται από *L. donovani*, *L. chagasi* και *L. infantum*. Το αντιγόνο rK39 φαίνεται να μην υπάρχει σε δερματικές και

βλενοδερματικές μολύνσεις. Μελέτες επιβεβαιώνουν τη διαγνωστική του αξία σε Ινδία και Βραζιλία αλλά με περιορισμένη επιτυχία στο Σουδάν [29, 30, 31]. Αξίζει να σημειωθεί σε αυτό το σημείο ότι παρεμβολές στη δοκιμή μπορεί να προκληθούν εξαιτίας Λέπρας, ασθένειας του Chagas, Μαλάρια και Σχιστοσωμίας.

Το DAT ανιχνεύει την ειδική ανοσοσφαιρίνη M (IgM) σε πρώιμο στάδιο και έχει αποδειχθεί χρήσιμο στην ανίχνευση τόσο κλινικών όσο και υπό-κλινικών μολύνσεων Λεϊσμανίασης. Είναι εύκολο στη χρήση και δίνει αποτελέσματα εντός 24 ωρών. Παρόλα αυτά πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν, κατά τη χρήση αυτών των δοκιμών, ο περιορισμός που τίθεται λόγω του ότι τα αντισώματα παραμένουν στο αίμα για πολλά χρόνια, ακόμα και μετά τη θεραπεία του ασθενούς.

1.2 Γενικά για το *Limulus Amebocyte Lysate (LAL)*

Το *Limulus amebocyte lysate (LAL)* είναι ένα υδατικό εκχύλισμα κυττάρων αίματος (αμοιβαδοκύτταρα) από τον βασιλικό κάβουρα (horseshoe crab), *Limulus polyphemus* [19]. Το LAL αντιδρά με βακτηριακές ενδοτοξίνες ή λιποπολυσακχαρίτες (LPS), οι οποίες είναι συστατικό των μεμβρανών από τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, καθώς και με τον πολυσακχαρίτη (1→3)-β-D-glucan, ο οποίος είναι συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων ενώ εντοπίζεται και σε διάφορα βακτήρια. Αυτή η αντίδραση είναι η βάση της δοκιμής LAL, το οποίο χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση βακτηριακών ενδοτοξινών (μόρια LPS) και του πολυσακχαρίτη (1→3)-β-D-glucan στην έρευνα και τη διάγνωση (Fungitell kit της ACC USA).

Υπάρχουν τρεις βασικές LAL μεθοδολογίες: Gel Clot, κινητική Θολοσιμετρική (kinetic Turbidimetric) και Χρωμογονική (Chromogenic) κινητική και τελικού σημείου [20]. Οι τελευταίες δύο (Θολοσιμετρική/Χρωμογονική) χαρακτηρίζονται ως φωτομετρικές μέθοδοι καθώς είναι απαραίτητη η χρήση φωτόμετρου για τη διεξαγωγή τους. Οι βασικές εφαρμογές τους είναι ο έλεγχος ενεσίμων/παρεντερικών φαρμακευτικών προϊόντων, ιατρικών μηχανημάτων και αίματος. Ο έλεγχος αίματος αφορά περισσότερο τον ιατρικό διαγνωστικό τομέα με το ολικό αίμα να χρησιμοποιείται για τη διάγνωση Βακτηραιμίας μέσω διάγνωσης Ενδοτοξιναιμίας και τον ορό αίματος για τη διάγνωση Μυκηταιμίας και εν τω βάθει Μυκητίασης (διηθητικής ή μη) γνωστές στο σύνολο τους και ως Συστηματικές (Διεισδυτικές, κατά την απόδοση της διεθνούς ορολογίας) Μυκητιάσεις (Invasive Fungal Disease).

1.2.1 Horseshoe Crabs



Εικόνα 9: *L. polyphemus*

Τα **Horseshoe crabs** είναι θαλάσσια αρθρόποδα που ταξινομούνται συστηματικά στην οικογένεια Limulidae εντός της τάξης Xiphosura της κλάσης Merostomata και ζουν κυρίως εντός και γύρω από ρηγά νερά στους ωκεανούς, σε μαλακούς αμμώδεις ή λασπώδεις βυθούς. Περιστασιακά βγαίνουν στα ρηγά για να ζευγαρώσουν. Λόγω της αρχαιότατης προέλευσης τους, περί τα 450 εκατομμύρια έτη, θεωρούνται

ζωντανά απολιθώματα.

Στην οικογένεια των Limulidae συγκαταλέγονται συνολικά τέσσερα είδη εν ζώη, τα οποία είναι παρόμοια ως προς τη μορφή και τη συμπεριφορά [2][16]:

- *Carcinoscorpius rotundicauda*, ο θαμνόβιος βασιλικός κάβουρας που εντοπίζεται στη Νοτιοανατολική Ασία κατά μήκος της Ανατολικής ακτής της Ινδίας.
- *Limulus polyphemus*, ο Ατλαντικός βασιλικός κάβουρας που εντοπίζεται κατά μήκος της Ατλαντικής Αμερικανικής ακτής και στον κόλπο του Μεξικού, ενώ είναι η φυσική πηγή για την παραγωγή του LAL.
- *Tachypleus gigas*, εντοπίζεται κατά μήκος της Ανατολικής Ακτής της Ινδίας στη Νοτιοανατολική και Ανατολική Ασία.
- *Tachypleus tridentatus*, εντοπίζεται στη θάλασσα που είναι γνωστή ως “Seto Inland” στη Νοτιοανατολική και Ανατολική Ασία, ενώ είναι η φυσική πηγή για την παραγωγή του *Tachypleus Amebocyte Lysate* (TAL).

Σε αντίθεση με τα σπονδυλωτά, οι βασιλικοί κάβουρες δεν έχουν αιμοσφαιρίνη στο αίμα τους αλλά χρησιμοποιούν αιμοκυανίνη για τη μεταφορά οξυγόνου. Λόγω της παρουσίας χαλκού στην αιμοκυανίνη το αίμα τους είναι μπλε. Το αίμα τους περιέχει μόνο ένα είδος κυττάρου, τα αμοιβαδοκύτταρα (amebocytes), τα οποία παίζουν βασικό ρόλο στην επιβίωση του οργανισμού. Τα αμοιβαδοκύτταρα από το αίμα του *L. polyphemus* χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του LAL.

1.2.2 *Limulus polyphemus*

Ο Ατλαντικός βασιλικός κάβουρας, *Limulus polyphemus*, είναι ένα θαλάσσιο αρθρόποδο το οποίο παρά το όνομα του είναι περισσότερο συγγενικό με τις αράχνες, τα τσιμπούρια και τους σκορπιούς παρά τα καβούρια [3][15]. Εντοπίζεται κυρίως στον κόλπο του Μεξικού και κατά μήκος της Ατλαντικής ακτής της Βορείου Αμερικής. Έχει τη σπάνια ιδιότητα να αναγεννά κομμένα άκρα με τρόπο παρόμοιο με αυτό του Αστερία [17].

1.2.2.1 Ανατομία και Φυσιολογία

Ο *L. polyphemus* έχει τρία βασικά μέρη:

- Τον κεφαλοθώρακα, γνωστό και ως πρόσωμα.
- Το κοιλιακό μέρος ή οπισθόσωμα
- Την τύπου σπονδυλικής στήλης ουρά ή 'telson'.

Το λείο κέλυφος είναι σχηματισμένο σαν πέταλο (horseshoe) και είναι πρασινωπό γκρι έως καφέ. Τα φύλα είναι παρόμοια σε εμφάνιση αλλά τα θηλυκά είναι περίπου 25-30% μεγαλύτερα από τα αρσενικά και μπορούν να μεγαλώσουν έως 60cm σε μήκος συμπεριλαμβανομένης της ουράς [18].

Μεγάλη ποικιλία από είδη προσκολλώνται στο κέλυφος του *L. polyphemus* όπως φύκη, σκουλήκια, μαλάκια, πεταλίδες και βρυόζωα. Για αυτό το λόγο έχουν χαρακτηριστεί και ως ζωντανά μουσεία λόγω του αριθμού των οργανισμών που μπορούν να υποστηρίξουν.

Το αίμα του βασιλικού κάβουρα περιλαμβάνει την χαλκούχο πρωτεΐνη αιμοκυανίνη σε συγκεντρώσεις περίπου 50g/l σε αντίθεση με τα σπονδυλωτά τα οποία περιέχουν στο αίμα τους αιμοσφαιρίνη, σιδηρούχο πρωτεΐνη η οποία αποτελεί τη βάση για τη μεταφορά του οξυγόνου [19]. Σε αντίθεση με την ενδοκυτταρική μεταφορά οξυγόνου από την αιμοσφαιρίνη εντός των ερυθρών κυττάρων στα σπονδυλωτά, η μεταφορά του οξυγόνου από την αιμοκυανίνη γίνεται μέσω εξοκυτταρικών υγρών. Η αιμοκυανίνη είναι άχρωμη και γίνεται βαθύ μπλε όταν οξυγονωθεί. Ο *L. polyphemus* ζει σε κρύα περιβάλλοντα με χαμηλά ποσοστά οξυγόνου και το αίμα εντός του κυκλοφορικού του συστήματος είναι από γκρι έως απαλό κίτρινο. Γίνεται μπλε όταν εκτίθεται στο οξυγόνο του αέρα.

Το αίμα του βασιλικού κάβουρα περιέχει μόνο ένα τύπο κυττάρων, τα αμοιβαδοκύτταρα. Αυτά τα κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο και στην άμυνα εναντίον των παθογόνων. Περιέχουν κόκκους με τον πηκτικό παράγοντα γνωστό ως “coagulogen” ο οποίος απελευθερώνεται εκτός του κυττάρου όταν εμφανιστούν βακτηριακές ενδοτοξίνες ή (1→3)-β-D-glucan. Το αποτέλεσμα είναι η πήξη του αίματος με τον εγκλωβισμό της μόλυνσης στο ημίκλειστο κυκλοφορικό σύστημα του ζώου [20].

1.2.2.2 Κύκλος Ζωής και Συμπεριφορά

Η διατροφή αυτών των ιδιαίτερων ζώων περιλαμβάνει μαλάκια, δακτυλιοειδείς σκώληκες, βενθικά ασπόνδυλα και ψάρια. Χωρίς την ύπαρξη σιαγόνων, αλέθει την τροφή με το τριχωτό μέρος των άκρων του και ένα πρόλοβο που περιλαμβάνει άμμο και χαλίκι [21].

Περνούν το χειμώνα στην ηπειρωτική υφαλοκρηπίδα και βγαίνουν στην ακτογραμμή προς το τέλος της άνοιξης για ζευγάρωμα, με τα αρσενικά να φτάνουν πρώτα ενώ τα θηλυκά προσεγγίζουν την παραλία σε παλίρροια [22]. Τα θηλυκά εναποθέτουν τα αυγά τους μέσα στην άμμο σε βάθος 15-20cm και γονιμοποιούνται εκεί από το σπέρμα των αρσενικών. Ο αριθμός των αυγών εξαρτάται από το σωματικό μέγεθος των θηλυκών και κυμαίνεται από 15,000 έως 64,000 [23]. Τα μικρότερα σε μέγεθος αρσενικά γαντζώνονται στην ουρά των θηλυκών χρησιμοποιώντας τα μπροστινά νύχια και μπορεί να παραμείνουν εκεί για μήνες. Πολύ συχνά παρατηρείται πολλά αρσενικά να κρατιούνται από την ουρά ενός θηλυκού.

Ο σχηματισμός της νύμφης ξεκινά όταν το αυγό σπάει και μια νέα μεμβράνη, παραγόμενη από το έμβρυο, δημιουργεί μία σφαιρική κάψουλα. Η νύμφη σχηματίζεται και στη συνέχεια παρασύρεται από τα νερά για 5 με 7 μέρες. Αφού κατασταλάξουν στο βυθό, ξεκινά η ωρίμανση περίπου 20 μέρες μετά το σχηματισμό της κάψουλας. Το νεαρό καβούρι μεγαλώνει και προχωρά σε βαθύτερα νερά όπου η ωρίμανση συνεχίζεται. Μέχρι τη σεξουαλική ωρίμανση, γύρω στην ηλικία των 9 ετών, θα έχουν αλλάξει το κέλυφος τους για περισσότερες από 17 φορές [18]. Ο μέσος όρος ηλικίας του κυμαίνεται από 20-40 χρόνια.

1.2.2.3 Εξέλιξη

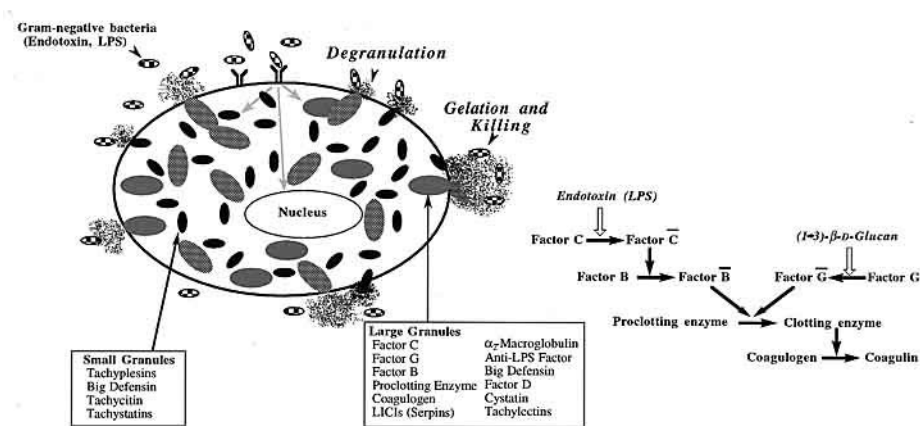
Οι βασιλικοί κάβουρες παραδοσιακά τοποθετούνταν στην εκλιπούσα τάξη eurypterida (θαλάσσιοι σκορπιοί) της κλάσης Merostomata. Πιθανότατα εξελίχθηκαν στα ρηχά νερά της Παλαιοζωικής Περιόδου (570-248 εκατ. χρόνια πριν) μαζί με άλλα πρωτόγονα αρθρόποδα όπως τα είδη της τάξης trilobita. Τα τέσσερα είδη horseshoe crab είναι τα μόνα μέλη που έχουν επιζήσει από την τάξη Xiphosura της κλάσης Merostomata, μία από τις αρχαιότερες κλάσεις θαλάσσιων αρθρόποδων.

Το εξαφανισμένο είδος horseshoe crab *Lunataspis aurora* είχε μέγεθος 4cm συμπεριλαμβανομένης της ουράς και έχει βρεθεί σε απολιθώματα 445 εκατ. ετών στη Μανιτόπα του Καναδά[24].

1.2.3 Αμοιβαδοκύτταρο (Amebocyte)

Το αμοιβαδοκύτταρο είναι ένα κινητό κύτταρο που κινείται αμοιβαδοειδώς με ψευδοπόδια (pseudopodia) και εντοπίζεται σε διάφορα ασπόνδυλα όπως ο *L. polyphemus*. Αναλόγως τον οργανισμό στον οποίο εντοπίζεται φαίνεται να παίζει διάφορους ρόλους όπως πέψη και διανομή τροφής, αντιμετώπιση εισβολέων και απομάκρυνση υπολειμμάτων, σχηματισμός σκελετικών ινών και μετατροπή σε άλλα είδη κυτταρικών τύπων.

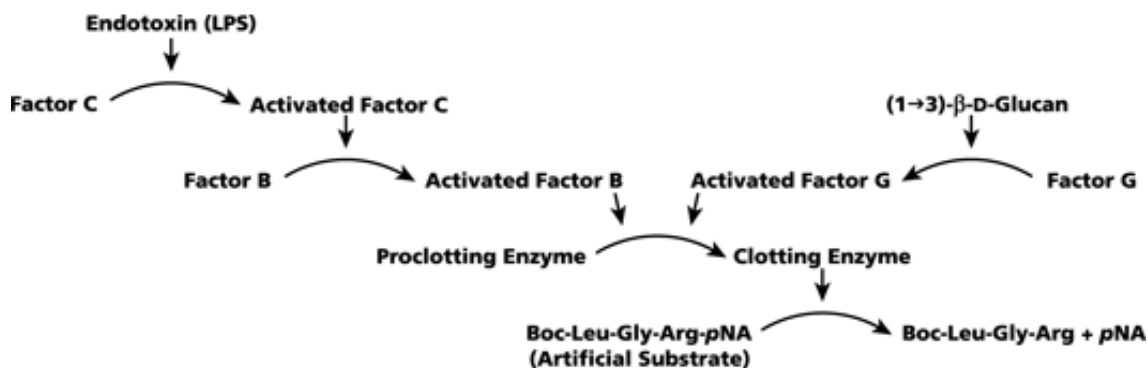
Είναι το μοναδικό κύτταρο που εντοπίζεται στο αίμα του βασιλικού κάβουρα και αποτελεί το βασικό μηχανισμό άμυνας ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς [25]. Περιέχει πολλούς κόκκους οι οποίοι απελευθερώνονται από το κύτταρο όταν αυτό έρθει σε επαφή με βακτηριακές ενδοτοξίνες (LPS) ή (1→3)-β-D-glucan (Εικόνα 10) [34].



Εικόνα 10: Αντίδραση του amebocyte σε παρουσία βακτηριακών ενδοτοξινών

Τα αντιγόνα ανιχνεύονται μέσω υποδοχέων στο εξωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης και η ύπαρξή τους ενεργοποιεί μέσω μεταγωγής σήματος την απελευθέρωση του περιεχομένου των κόκκων στο εξωτερικό του κυττάρου. Οι κόκκοι περιέχουν τις σερινικές πρωτεάσες (Factor-C/B/G), το προ-θρομβοτικό ένζυμο και τον πηκτικό παράγοντα θρομβογόνο (coagulogen). Οι πρωτεάσες Factor-C και Factor-G αυτοενεργοποιούνται παρουσία LPS και (1→3)-β-D-glucan αντίστοιχα και ξεκινούν το

LAL cascade (Εικόνα 11) που οδηγεί στη μετατροπή του θρομβογόνου στην αδιάλυτη μορφή του θρομβίνη (Gel Clot) δημιουργώντας ινώδεις θρόμβους οι οποίοι φράσσουν το σημείο μόλυνσης και παγιδεύουν τους μικροοργανισμούς που εισβάλλουν.



Εικόνα 11: Το LAL Cascade – Συνθετικό υπόστρωμα για τις Chromogenic αναλύσεις

Οι βακτηριακές ενδοτοξίνες οδηγούν στην αυτοενεργοποίηση του ζυμογόνου προενζύμου Factor-C στο ενεργό ένζυμο Factor-C το οποίο με την σειρά του μετατρέπει το ζυμογόνο προένζυμο Factor-B στο ενεργό ένζυμο Factor-B. Αντίστοιχα οι (1→3)-β-D-glucan μετατρέπουν το προένζυμο Factor-G στην ενεργή του μορφή, που επίσης είναι μια ζυμογόνος σερινική πρωτεάση. Από οποιαδήποτε διαδρομή και αν ξεκινήσει το LAL cascade, το προ-θρομβοτικό ένζυμο μετατρέπεται σε θρομβοτικό ένζυμο και αυτό μετατρέπει το θρομβογόνο στην αδιάλυτη θρομβίνη, παγιδεύοντας παθογόνους μικροοργανισμούς και υπολείμματα ενώ παράλληλα φράσσεται η πύλη εισόδου σε περίπτωση ανοιχτής πληγής.

Το LAL cascade είναι ο βασικός μηχανισμός λειτουργίας του LAL test. Στη χρωμογονική φωτομετρική μέθοδο έχει προστεθεί ένα τεχνητό υπόστρωμα το οποίο αποτελείται από ένα ολίγοπεπτίδιο και το χρωμοφόρο πάρα-νιτροανιλίνη (para Nitroaniline - pNA). Το ενεργό θρομβοτικό ένζυμο ψαλιδίζει το χρωμοφόρο pNA από το τεχνητό υπόστρωμα, μια διαδικασία η οποία μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με μετρήσεις απορρόφησης στο οπτικό φάσμα σε μήκος κύματος 405nm.

2 Ειδικό Μέρος

2.1 Υλικά και Μέθοδοι

Οι πειραματικές δοκιμές σε στελέχη του γένους *Leishmania* (προσφορά της ομάδας της Dr. Μπολέτη του Ιδρύματος Pasteur) πραγματοποιήθηκαν στα εργαστήρια της Βιοϊατρικής Αμπελοκήπων (πρόσβαση στις εγκαταστάσεις και τον εξοπλισμό, σε συνεργασία με την Dr. Βελεγράκη).

Ο αναλυτής και τα αναλώσιμα για τη διεξαγωγή των δοκιμών ήταν της Associates of Cape Cod Inc. USA, (ACC), χορηγεία της εταιρείας Biochemical Informatics Solutions (BeIS) υπεύθυνης για τη διάθεση των προϊόντων της ACC στην Ελλάδα.

2.1.1 Υλικά Πειραματικού ελέγχου

Τα υλικά πειραματικού ελέγχου χωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

- στον εργαστηριακό εξοπλισμό που χρησιμοποιήθηκε και
- στα δείγματα κυττάρων υγρής καλλιέργειας μαστιγοφόρων παρασίτων από στελέχη του γένους *Leishmania*.

2.1.1.1 Εργαστηριακός Εξοπλισμός

Ο εργαστηριακός εξοπλισμός χωρίζεται σε τρεις υποκατηγορίες:

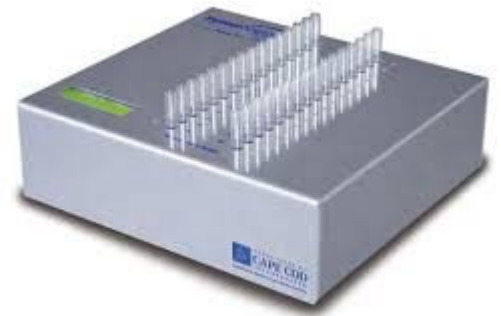
- Ο γενικός εξοπλισμός ως μέρος του εργαστηρίου που πραγματοποιήθηκε ο χειρισμός και οι κινητικές αναλύσεις των δειγμάτων.
- Ο φωτομετρικός αναλυτής που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση οπτικής πυκνότητας του μείγματος αντιδραστηρίου LAL με τα δείγματα *Leishmania*
- Το λογισμικό EQS της ACC για την αποθήκευση, την παρουσίαση και ανάλυση των αποτελεσμάτων κινητικής ανάλυσης.

2.1.1.1.1 Γενικός Εξοπλισμός

Ορισμένα από τα στελέχη *Leishmania* που εξετάστηκαν ήταν παθογόνα και για αυτό το λόγο ήταν απαραίτητη για την επεξεργασία τους η χρήση θαλάμου Βιοασφάλειας Επιπέδου Β.

Επιμέρους του γενικού εξοπλισμού ήταν:

- vortex για την ανάδευση των δειγμάτων
- πιπέττες μεταβλητού όγκου της Capp και της MRC Lab με πλαστικά ρύγχι απαλλαγμένα πυρετογόνων 250μl και 1000μl της ACC
- φυγόκεντρος για την ιζηματοποίηση των κυττάρων (στα 1100 rpm)
- επωαστικός κλίβανος 37°C
- μικροσκόπιο για τη μέτρηση των κυττάρων στην υγρή καλλιέργεια
- ψυγείο για συντήρηση των υλικών στους 2-8°C και καταψύκτης για αποθήκευση στους -20°C
- γυάλινοι και πλαστικοί σωλήνες απαλλαγμένοι πυρετογόνων, κατάλληλοι για χρήση σε LAL test της ACC, για τις αραιώσεις και την αποθήκευση των δειγμάτων καθώς και τη διεξαγωγή των δοκιμών
- parafilm



2.1.1.1.2 Φωτόμετρο Pyros Kinetix Flex 32

Το φωτόμετρο Pyros Kinetix Flex (PKF32-Εικόνα 12) έχει 32 θέσεις για γυάλινα σωληνάρια πάχους 7,9mm όπου λαμβάνει χώρα η αντίδραση του LAL με τα δείγματα. *Εικόνα 12: Αναλυτής Pyros Kinetix Flex 32* Παρέχει δύο δυνατότητες για τη λήψη μετρήσεων στο οπτικό φάσμα:

- 450nm, μετρήσεις στο ιώδες για τις κινητικές χρωμογονικές αναλύσεις (GlucateLL)
- 660nm, μετρήσεις στο ερυθρό για τις κινητικές θολοσιμετρικές αναλύσεις

(Pyrotell-T)

Η κάθε θέση λειτουργεί ανεξάρτητα και έχει:

- ανιχνευτή εγγύτητας για να αντιλαμβάνεται ότι έχει εισέλθει γυάλινο σωληνάριο
- πηγή φωτός LED (660nm και 450nm) και
- έναν αισθητήρα φωτεινότητας, αντιδιαμετρικά από την πηγή φωτός, που μετατρέπει την αναλογική τιμή φωτεινότητας που λαμβάνει σε ψηφιακή.

Σε κάθε ανάλυση οι μετρήσεις γίνονται όλες στο ίδιο φάσμα και η φωτεινή ακτίνα διανύει οριζόντια το περιεχόμενο του σωλήνα αντίδρασης. Ο αναλυτής παίρνει ψηφιακές μετρήσεις φωτεινότητας από κάθε θέση ανά 10 δευτερόλεπτα. Καθώς η αντίδραση εξελίσσεται, η απορρόφηση στη κάθε θέση αυξάνεται και αυτό αντικατοπτρίζεται σε μειωμένες τιμές φωτεινότητας τις οποίες το λογισμικό μεταφράζει σε οπτική πυκνότητα (mAbs units – milli Absorbance Units).

Η σύνδεση του αναλυτή με το λογισμικό γίνεται μέσω USB καλωδίου σε lap top, το οποίο τρέχει ταυτόχρονα το λογισμικό EQS. Το λογισμικό αποθηκεύει και αναλύει τις τιμές που λαμβάνει σε πραγματικό χρόνο.

2.1.1.1.3 Λογισμικό EQS

Το λογισμικό EQS υποστηρίζει LAL δοκιμές, τόσο σε κινητική χρωμογονική όσο και κινητική θολοσιμετρική εξέταση. Όλα τα δεδομένα αποθηκεύονται σε βάση δεδομένων.

Κάθε θέση έχει ατομικό χρονόμετρο και όλες οι τιμές οπτικής πυκνότητας, μετά την είσοδο του σωληναρίου αντίδρασης, αποθηκεύονται και αναλύονται σε πραγματικό χρόνο. Οι ψηφιακές τιμές φωτεινότητας (AD) που στέλνει ο αναλυτής, για κάθε ενεργό θέση, μετατρέπονται σε οπτική πυκνότητα με βάση τον εξής τύπο:

$$\mathbf{OD = - \log (AD/AD_z)}$$

όπου AD_z είναι η τιμή αναφοράς για μηδενική απορρόφηση. Το AD_z προκύπτει από τη μέση τιμή των δέκα πρώτων τιμών φωτεινότητας που θα λάβει το λογισμικό για κάθε θέση ξεχωριστά. Η μονάδα μέτρησης οπτικής πυκνότητας του EQS είναι το mAbs, το οποίο είναι το εξαγόμενο του παραπάνω τύπου x1000.

Αναλόγως τον τύπο της αντίδρασης μπορούμε να θέσουμε το κατώφλι οπτικής πυκνότητας (threshold OD) από 10mAbs έως 30mAbs. Η μέτρηση βακτηριακών ενδοτοξινών με κινητική θολοσημετρία γίνεται με κατώφλι 20mAbs ενώ όλες οι κινητικές χρωμογονικές μετρήσεις, LPS και (1→3)-β-D-glucan πραγματοποιούνται με κατώφλι 30mAbs. Σε κάθε ανάλυση μπορούν να εφαρμοστούν με επιτυχία πολλές διαφορετικές τιμές για το κατώφλι οπτικής πυκνότητας.

Ο χρόνος που χρειάζεται ένα μείγμα για να φτάσει στο κατώφλι OD είναι η τιμή που θα χρησιμοποιηθεί από το λογισμικό για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης για τα δείγματα ελέγχου και της εξαγωγής των αποτελεσμάτων για τα δείγματα προς εξέταση. Τα αποτελέσματα, αναλόγως το Πρότυπο Ελέγχου (Control Standard), είναι σε μονάδες Ενδοτοξίνης ανά ml για μέτρηση LPS (EU/ml – Endotoxin Units/ml) ή σε pg/ml για μέτρηση (1→3)-β-D-glucan. Θα δούμε αναλυτικότερα παρακάτω τον τρόπο χάραξης της πρότυπης καμπύλης και εξαγωγής των αποτελεσμάτων από τις ψηφιακές τιμές που παράγει ο αναλυτής.

2.1.1.2 Δείγματα Κυττάρων Υγρής Καλλιέργειας Παρασίτων *Leishmania*

Τα δείγματα προς μελέτη ήταν μαστιγοφόρα πρωτοζωικά παράσιτα από υγρή κυτταροκαλλιέργεια πέντε στελεχών του γένους *Leishmania* που ήταν διαθέσιμα στο ινστιτούτο Pasteur, ειδικότερα:

- *L. major*, παθογόνο στέλεχος που ευθύνεται για κρούσματα Δερματικής Λεισμανίασης
- *L. infantum*, παθογόνο στέλεχος που ευθύνεται για κρούσματα Δερματικής και Σπλαχνικής Λεισμανίασης
- *L. donovani*, παθογόνο στέλεχος που ευθύνεται για κρούσματα Σπλαχνικής Λεισμανίασης σε ζώα και ανθρώπους, η πιο κοινή μορφή εκδήλωσης της ασθένειας στην Ελλάδα
- *L. tarantolae*, στέλεχος που προσβάλλει τις σαύρες αλλά είναι μη παθογόνο για τους ανθρώπους
- *L. donovani* (KO), γενετικά τροποποιημένο στέλεχος ώστε να μην παράγει LPG

μέσω απενεργοποίησης γονιδίων (gene-knock out)

2.1.1.2.1 Είδη Δειγμάτων

Είναι γνωστό πως και στις δύο φάσεις (λογαριθμική-στατική) τα κύτταρα του γένους *Leishmania* φέρουν μαστίγιο όμως αλλάζουν αντιγονικό προφίλ, αλλάζοντας τη δομή και την ποσότητα των LPG που είναι προσκολλημένα στην επιφάνεια του κυττάρου. Κατά τη λογαριθμική φάση ανάπτυξης τα κύτταρα βρίσκονται στην προμαστιγωτή μορφή τους (μη παθογόνος κατάσταση) και παραμένουν προσκολλημένα στα επιθηλιακά κύτταρα εντέρου του εντόμου ξενιστή. Κατά τη στατική φάση περνούν στη μετακυκλική προμαστιγωτή μορφή τους (παθογόνος κατάσταση) όπου αποκολλώνται από τα επιθηλιακά κύτταρα εντέρου και μεταναστεύουν στην προβοσκίδα. Από εκεί θα μολύνουν τον επόμενο σπονδυλωτό ξενιστή κατά τη διάρκεια ενός γεύματος με αίμα.

Έτσι για να συγκρίνουμε τον τρόπο με τον οποίο αντιδράει το LAL σε κάθε μία από τις δύο φάσεις (προμαστιγωτή και μετακυκλική προμαστιγωτή), πήραμε για κάθε ένα από τα πέντε διαθέσιμα στελέχη δύο είδη δειγμάτων των 10ml:

1. Δείγματα από κύτταρα σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης (μη παθογόνος)
2. Δείγματα από κύτταρα σε στατική φάση ανάπτυξης (παθογόνος)

Στα δείγματα κάθε φάσης έγινε διαχωρισμός υπερκειμένου - ιζήματος. Το ίζημα διαλύθηκε σε ίση ποσότητα στείρου νερού (LRW) ώστε να χρησιμοποιηθεί στις αναλύσεις ως δείγμα. Με την έκθεση των κυττάρων σε στείρο νερό, απευθείας από το θρεπτικό υπόστρωμα, αναμένουμε μερική ή ολική ρήξη της κυτταρικής τους μεμβράνης με αποτέλεσμα οι ουσίες του εσωτερικού του κυττάρου να έρθουν σε επαφή με το αντιδραστήριο LAL.

Από τα δείγματα λογαριθμικής φάσης δεν χρησιμοποιήθηκε το υπερκείμενο στις αναλύσεις λόγω περιορισμένων πόρων. Από τα δείγματα ιζήματος και υπερκειμένου στατικής φάσης επικεντρώσαμε τις πειραματικές δοκιμές μας στο υπερκείμενο της στατικής φάσης που είναι και η παθογόνος κατάσταση των παρασίτων.

2.1.1.2.2 Θρεπτικά υποστρώματα

Κάθε δείγμα βρίσκεται στο κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα κάτι το οποίο λήφθηκε

υπόψιν κατά την ποσοτικοποίηση των LPS και της (1→3)-β-D-glucan.

Αντιμετωπίσαμε τρία είδη θρεπτικών υποστρωμάτων:

1. BHI (Brain Heart Infusion) το οποίο αποτελεί υπόστρωμα για τα δείγματα *L. tarantolae*
2. Μείγμα RPMI και FBS (Roswell Park Memorial Institute – Fetal Bovine Serum) το οποίο αποτελεί υπόστρωμα για τα δείγματα *L. donovani*, *L. major* και *L. infantum*
3. Μείγμα Schneiders και FBS το οποίο αποτελεί υπόστρωμα για τα δείγματα *L. donovani* (KO)

2.1.1.2.3 Χειρισμός Δειγμάτων

Τα δείγματα από κάθε φάση υπέστησαν φυγοκέντριση για 10 λεπτά στα 1100 rpm ώστε να διαχωριστούν τα στερεά από το υπερκείμενο. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε σε κάθε περίπτωση και αποθηκεύτηκε σε γυάλινους σωλήνες με βιδωτό καπάκι αλουμινίου για συντήρηση και αποθήκευση. Από τα δείγματα υπερκειμένου μόνο αυτό της στατικής φάσης χρησιμοποιήθηκε στις αναλύσεις μας.

Τα στερεά που προέκυψαν από τη φυγοκέντριση διαλύθηκαν σε 10ml LAL Reagent Water (LRW), το οποίο δεν είναι κάτι άλλο από στείρο απεσταγμένο νερό ελεύθερο πυρετογόνων. Κατόπιν τοποθετήθηκαν και αυτά σε γυάλινους σωλήνες με βιδωτό καπάκι αλουμινίου για συντήρηση και αποθήκευση.

2.1.2 Περιγραφή Πειραματικής Μεθόδου

Οι πειραματικές δοκιμές βασίστηκαν όλες στο αντιδραστήριο LAL ενεργοποιώντας κάθε φορά μία από τις δύο διαδρομές του μηχανισμού πήξης όπως αυτές φαίνονται στην Εικόνα 11.

Στη δοκιμή GlucateLL έχει απενεργοποιηθεί το ένζυμο Factor-C (LPS-sensitivite) οπότε η αντίδραση ενεργοποιείται αποκλειστικά από το ένζυμο Factor-G. Η αραιώση εργασίας για κάθε δείγμα ήταν τέτοια ώστε να αποκλείει την ενεργοποίηση από (1→3)-β-D-glucan που βρίσκονται στα θρεπτικά υποστρώματα.

Στη δοκιμή Pyrotell-T είχε απενεργοποιηθεί το Factor-G με χρήση του Glucashield Buffer της ACC. Το buffer αυτό χρησιμοποιήθηκε για την ανασύσταση του αντιδραστηρίου LAL και μπορεί να παρεμποδίσει επαρκώς την ενεργοποίηση του Factor-G σε συγκεντρώσεις (1→3)-β-D-glucan έως και 100ng/ml. Οι βακτηριακές ενδοτοξίνες του δείγματος προς ανάλυση απενεργοποιήθηκαν με χρήση διαλύματος Polymyxin-B σε συγκέντρωση 10μg/ml. Όλα τα δείγματα επώαστηκαν παρουσία Polymyxin-B για τουλάχιστον μια ώρα στους 37°C πριν την έναρξη της αντίδρασης.

Κάθε φορά χρησιμοποιήθηκε το αντίστοιχο πρότυπο για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης όπου ήταν απαραίτητο. Με τη διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων προέκυψαν τα σημεία της καμπύλης και από αυτά προσδιορίστηκε το εύρος της κάθε ανάλυσης. Η ογκομετρική σχέση αντιδραστηρίου-δείγματος ήταν η ίδια (1:4) και για τις δύο δοκιμές Glucatell και Pyrotell-T με χρήση 50μl LAL και 200μl δείγμα.

2.1.2.1 Περιγραφή Μεθόδου Μέτρησης Κυττάρων Υγρής Καλλιέργειας

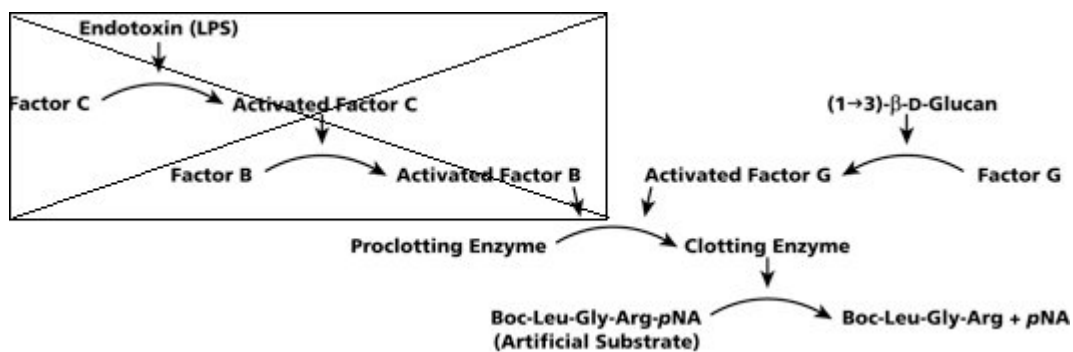
Για τη μέτρηση των κυττάρων στις καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε ειδική πλακέτα και μικροσκόπιο. Ποσότητα 100μl απλώθηκε στην πλακέτα καταμέτρησης για κάθε δείγμα σε κατάλληλη αραιώση. Σε τέσσερις ψηφίδες της πλακέτας μετρήθηκαν τα κύτταρα για κάθε καλλιέργεια μέσω οπτικής παρατήρησης.

Οι μετρήσεις μετατράπηκαν σε συνολική κυτταρική πυκνότητα ως εξής:

$$\{(\text{Άθροισμα κυττάρων}) \times (\text{Συντελεστή Αραίωσης}) / 4\} \times 10^5 \text{ κύτταρα/ml}$$

2.1.2.2 Περιγραφή της Δοκιμής Glucatell (Factor-G)

Η δοκιμή Glucatell βασίζεται σε μια μοναδική μετατροπή του LAL η οποία απενεργοποιεί πλήρως το Factor-C όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα:



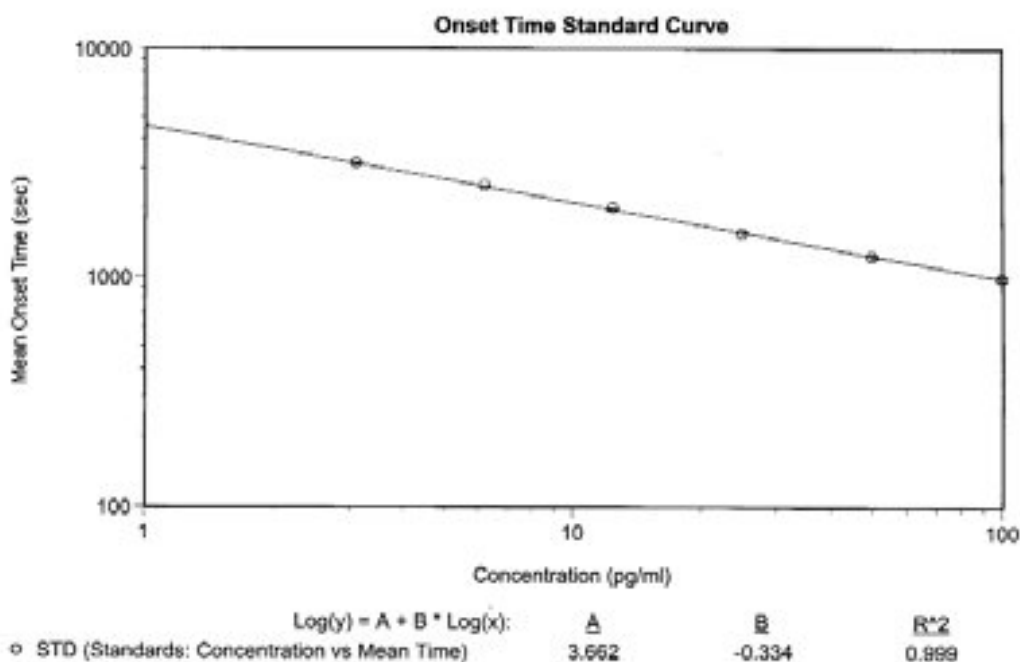
Εικόνα 13: LAL cascade για τη δοκιμή GlucateLL

Η ανάλυση δεν επηρεάζεται από την παρουσία βακτηριακών ενδοτοξινών σε οποιαδήποτε συγκέντρωση.

Το GlucateLL assay είναι κινητική χρωμογόνος ανάλυση με προσθήκη συνθετικού υποστρώματος το οποίο πέπτεται από το πηκτικό ένζυμο απελευθερώνοντας το χρωμοφόρο pNA. Η αντίδραση αυτή μετράται ποσοτικά μέσω απορρόφησης στο οπτικό φάσμα στα 405nm με κατώφλι OD τα 30mAbs.

2.1.2.2.1 Πρότυπη Καμπύλη

Βασικό στοιχείο της κάθε ανάλυσης GlucateLL είναι η δημιουργία πρότυπης καμπύλης από πρότυπο γνωστής περιεκτικότητας (1→3)-β-D-glucan. Για τις αναλύσεις GlucateLL χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο Pachyman με αρχική συγκέντρωση 100rg/ml. Μέσω διαδοχικών αραιώσεων προέκυψε το εύρος της ανάλυσης που ήταν 3,125rg/ml έως 50rg/ml για κάθε ανάλυση. Κάθε συγκέντρωση αναλύθηκε εις διπλούν. Από την πρότυπη καμπύλη προκύπτει κάθε φορά μια ευθεία παλινδρόμησης παρόμοια με τα αυτή του Διαγράμματος 1.



*Διάγραμμα 1: Ευθεία Παλινδρόμησης διαδοχικών αραιώσεων προτύπου *Rachyman**

Το λογισμικό EQS υπολογίζει αυτόματα τις παραμέτρους A και B μέσω γραμμικής παλινδρόμησης. Σε κάθε δείγμα προς ανάλυση είχαμε τον χρόνο έναρξης (x) ο οποίος τοποθετήθηκε στην εξίσωση και προέκυψε το Log(y) και κατ' επέκταση το (y) το οποίο ήταν η ζητούμενη συγκέντρωση (1→3)-β-D-glucan του δείγματος.

Για κάθε καμπύλη υπάρχουν δύο στατιστικά κριτήρια που πρέπει να ικανοποιούνται:

- ο συντελεστής συσχέτισης (Coefficient of Correlation – R²), που πρέπει να είναι από -0,98 έως -1 (αφορά το σύνολο των μετρήσεων) και
- ο συντελεστής διακύμανσης (Coefficient of Variation – CV), που πρέπει να μην είναι μεγαλύτερος από 25% (αφορά τα όμοια δείγματα σε κάθε συγκέντρωση).

2.1.2.2.2 Δείγματα

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν επίσης εις διπλούν με αντίστοιχους θετικούς μάρτυρες (spiked) και με απαίτηση το CV να είναι μικρότερο του 25% σε κάθε περίπτωση. Οι θετικοί μάρτυρες ήταν μία τροποποίηση του δείγματος στο οποίο είχε προστεθεί γνωστή ποσότητα (1→3)-β-D-glucan την οποία έπρεπε να υπολογίσει η ανάλυση. Έτσι συνολικά για κάθε αραιώση απαιτήθηκαν 4 θέσεις. Αφαιρώντας από τους θετικούς

μάρτυρες την ποσότητα που βρέθηκε στα δείγματα προκύπτει το “spike recovery” σαν το ποσοστό της (1→3)-β-D-glucan που εντοπίστηκε στους θετικούς μάρτυρες σε σχέση με τη γνωστή ποσότητα που είχαμε προσθέσει με απαίτηση να είναι από 50-200%.

Όλα τα θρεπτικά υποστρώματα βρέθηκαν θετικά σε (1→3)-β-D-glucan που ποσοτικοποιήθηκε. Οι αρχικές αραιώσεις των δειγμάτων προέκυψαν με βάση την ποσότητα (1→3)-β-D-glucan του υποστρώματος ώστε μέσω της αραιώσης να εξαλειφθεί αυτή η ποσότητα όντας κάτω από το όριο ανίχνευσης.

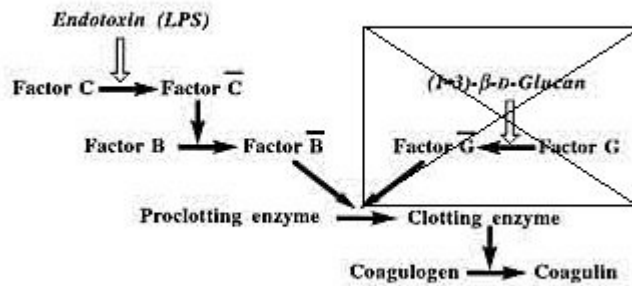
2.1.2.2.3 Μάρτυρες

Σε κάθε ανάλυση GlucateLL είχαμε δύο είδη αρνητικών μαρτύρων:

- Τυφλό, το οποίο είναι το αντιδραστήριο GlucateLL με LAL Reagent Water (LRW) ώστε να βεβαιωθούμε ότι το νερό που χρησιμοποιήθηκε για τις αραιώσεις δεν ήταν μολυσμένο με (1→3)-β-D-glucan
- Glucashield, το οποίο περιέχει αντιδραστήριο GlucateLL με δείγμα στην αρχική αραιώση εργασίας και Glucashield Buffer ώστε να βεβαιωθούμε ότι δεν υπήρχε κάτι από το δείγμα που να επιδρά απευθείας στο συνθετικό υπόστρωμα ή το πηκτικό ένζυμο (διασταυρούμενη αντίδραση)

2.1.2.3 Περιγραφή της Δοκιμής Pyrotell-T (Factor-C/B)

Η δοκιμή Pyrotell-T πραγματοποιήθηκε με χρήση του Glucashield Buffer της ACC για την ανασύσταση του LAL, ώστε να αποκλειστεί η ενεργοποίηση του cascade από τις (1→3)-β-D-glucan που υπάρχουν στο δείγμα. Η ικανότητα του Glucashield Buffer να απενεργοποιεί το Factor-G σε συγκεντρώσεις (1→3)-β-D-glucan έως 100ng/ml ήταν αρκετή για τις ανάγκες των δοκιμών μας.



Εικόνα 14: LAL cascade για τη δοκιμή Pyrotell-T με Glucashield Buffer

Η ενεργοποίηση του LAL cascade από τις βακτηριακές ενδοτοξίνες του δείγματος αποφεύχθηκε με την απενεργοποίησή τους με χρήση διαλύματος Polymyxin-B. Η Polymyxin-B έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για δέσμευση βακτηριακών ενδοτοξινών σε άλλες μελέτες με τελική συγκέντρωση 10μg/ml [26][27]. Επιβεβαιώθηκε ότι μία ώρα επώασης του δείγματος στους 37°C με παρουσία Polymyxin-B σε συγκέντρωση 10μg/ml είναι αρκετό για την απενεργοποίηση τουλάχιστον 1 EU/ml ενδοτοξίνης σε υγρό δείγμα.

Όταν ενεργοποιείται το LAL cascade, το πηκτικό ένζυμο μετατρέπει το διαλυτό θρομβογόνο στην αδιάλυτη μορφή του θρομβίνης, μια διαδικασία που μετράται μέσω απορρόφησης στα 660nm με κατώφλι OD τα 20mAbs. Παρατηρήθηκε ότι η ενεργοποίηση του LAL cascade σε παρουσία Polymyxin-B, από τα αντιγόνα *Leishmania*, είχε αρκετά πιο αργή κινητική και για αυτό το λόγο το κατώφλι OD μειώθηκε στα 10mAbs για τις ανάγκες των δοκιμών μας.

2.1.2.3.1 Πρότυπη Καμπύλη

Βασικό στοιχείο της ανάλυσης Pyrotell-T για την ανίχνευση βακτηριακών ενδοτοξινών είναι η δημιουργία πρότυπης καμπύλης από πρότυπο γνωστής συγκέντρωσης Ενδοτοξίνης. Για τις αναλύσεις Pyrotell-T χρησιμοποιείται το πρότυπο *E. coli* O113:H10 (Control Standard Endotoxin της ACC) σε αρχική συγκέντρωση μονάδων ενδοτοξίνης (EU/ml) που ορίζεται από το πιστοποιητικό ανάλυσης του αντιδραστήριου από τον κατασκευαστή. Η δυνατότητα του αντιδραστήριου περιορίζεται σε εύρος

0,001–1 EU/ml.

Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας η πρότυπη καμπύλη δεν ήταν απαραίτητη αφού δεν αναζητήθηκε βακτηριακή ενδοτοξίνη αλλά η ενεργοποίηση του LAL cascade από αντιγόνα των στελεχών *Leishmania*. Παρά όλα αυτά για την εξασφάλιση ότι το αντιδραστήριο λειτουργεί κανονικά και για ποιοτικές συγκρίσεις κινητικής δημιουργήθηκε σε πολλές από τις αναλύσεις πρότυπη καμπύλη ενδοτοξίνης μαζί με τα δείγματα προς ανάλυση.

Η δημιουργία της καμπύλης έγινε μέσω διαδοχικών αραιώσεων. Δημιουργήθηκαν τρία σημεία για την καμπύλη: 0,001 EU/ml, 0,01 EU/ml και 0,1 EU/ml δίνοντας έτσι εύρος ανάλυσης από 0,001 EU/ml έως 0,1 EU/ml. Κάθε συγκέντρωση τοποθετήθηκε εις διπλούν στον αναλυτή. Από την πρότυπη καμπύλη προκύπτει παρόμοια ευθεία παλινδρόμησης με αυτή της ανάλυσης Glucate11 (Διάγραμμα 1). Το λογισμικό EQS υπολογίζει τις παραμέτρους A και B με παρόμοιο τρόπο. Σε κάθε δείγμα προς ανάλυση είχαμε τον χρόνο έναρξης (x) το οποίο τοποθετήθηκε στην εξίσωση και προέκυψε το $\text{Log}(y)$ και κατά επέκταση το (y) το οποίο ήταν η ζητούμενη συγκέντρωση μονάδων ενδοτοξίνης του δείγματος EU/ml. Με τον ίδιο τρόπο το λογισμικό κατασκευάζει την πρότυπη καμπύλη όταν πρότυπο αναφοράς είναι η *L. tarantolae*.

Για κάθε καμπύλη υπάρχουν δύο στατιστικά κριτήρια που πρέπει να ικανοποιούνται σε κάθε περίπτωση:

- ο συντελεστής συσχέτισης (Coefficient of Correlation – R^2), που πρέπει να είναι από -0,98 έως -1 (αφορά το σύνολο των μετρήσεων) και
- ο συντελεστής διακύμανσης (Coefficient of Variation – CV), που πρέπει να μην είναι μεγαλύτερος από 25% (αφορά τα όμοια δείγματα σε κάθε συγκέντρωση).

2.1.2.3.2 Δείγματα

Όλες οι αναλύσεις έγιναν παρουσία Polymyxin-B ενώ οι βακτηριακές ενδοτοξίνες είχαν απενεργοποιηθεί. Έτσι εξετάστηκε το κατά πόσο το LAL cascade ενεργοποιείται μέσω του Factor-C από αντιγόνα *Leishmania*. Εκεί δεν χρησιμοποιήθηκαν θετικοί μάρτυρες δείγματος, οπότε για κάθε δείγμα χρειάστηκαν μόνο δύο θέσεις για κάθε αραιώση στον αναλυτή. Η απαίτηση για το CV ήταν επίσης να είναι μικρότερο του 25%

Η αρχική αραιώση για κάθε δείγμα ήταν 1:10 και κατόπιν με διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις προστέθηκαν επιπλέον αραιώσεις.

2.1.2.3.3 Μάρτυρες

Δύο είδη αρνητικών μαρτύρων χρησιμοποιήθηκαν σε αυτές τις αναλύσεις:

- Τυφλό, το οποίο ήταν το Pyrotell-T με LAL Reagent Water (LRW) ώστε να βεβαιωθούμε ότι το νερό που χρησιμοποιήθηκε για τις αραιώσεις δεν ήταν μολυσμένο με βακτηριακές ενδοτοξίνες
- Τυφλό Polymyxin-B, το οποίο περιείχε Pyrotell-T με LAL Reagent Water (LRW) και Polymyxin-B σε συγκέντρωση 10μg/ml για να βεβαιωθούμε ότι το νερό δεν είχε επιμολυνθεί με αντιγόνα *Leishmania*

2.2 Αποτελέσματα

Παρότι τα αντιγόνα *Leishmania* δεν ενεργοποίησαν τον μηχανισμό πήξης του LAL μέσω του Factor-G το πέτυχαν μέσω του Factor-C, για όλα τα στελέχη ανεξαρτήτως κυτταρικής φάσης ανάπτυξης της καλλιέργειας, αν και με αρκετά χαμηλότερη κινητική από αυτή των LPS.

Η εξαγωγή των αποτελεσμάτων από τη πειραματική διαδικασία χωρίζεται σε τρία βασικά κομμάτια:

1. Ποσοτικοποίηση του αριθμού κυττάρων για κάθε δείγμα
2. Δοκιμές ενεργοποίησης του LAL Cascade μέσω του Factor-G
3. Δοκιμές ενεργοποίησης του LAL Cascade μέσω του Factor-C

2.2.1 Ποσοτικοποίηση του Αριθμού Κυττάρων για Κάθε Καλλιέργεια

Παρουσιάζονται οι μετρήσεις από την κάθε ψηφίδα ανά δείγμα στην αραιώση εργασίας και η τελική κυτταρική πυκνότητα που υπολογίστηκε.

Κύτταρα σε στατική φάση:

<i>Είδος</i>	<i>Αραιώση</i>	<i>1η (κυτ.)</i>	<i>2η (κυτ.)</i>	<i>3η (κυτ.)</i>	<i>4η (κυτ.)</i>	<i>Κυτταρική Πυκνότητα</i>
<i>L. major</i>	1:4	537	432	325	354	1,65x10 ⁸ κύτταρα/ml
<i>L. infantum</i>	1:2	493	340	293	327	6,04x10 ⁷ κύτταρα/ml
<i>L. donovani</i>	-	271	257	293	284	2,76x10 ⁷ κύτταρα/ml
<i>L. tarantolae</i>	1:4	333	305	313	307	1,26x10 ⁸ κύτταρα/ml
<i>L. donovani (KO)</i>	1:2	394	260	313	320	6,44x10 ⁷ κύτταρα/ml

Κύτταρα σε λογαριθμική φάση:

<i>Είδος</i>	<i>Αραίωση</i>	<i>1η (κντ.)</i>	<i>2η (κντ.)</i>	<i>3η (κντ.)</i>	<i>4η (κντ.)</i>	<i>Κυτταρική Πυκνότητα</i>
<i>L. major</i>	1:4	196	184	196	188	7,64x10 ⁷ κύτταρα/ml
<i>L. infantum</i>	1:2	95	102	110	98	2,03x10 ⁷ κύτταρα/ml
<i>L. donovani</i>	-	219	186	170 c1	258	2,08x10 ⁷ κύτταρα/ml
<i>L. tarantolae</i>	1:4	44	42	42	74	2,02x10 ⁷ κύτταρα/ml
<i>L. donovani (KO)</i>	1:2	212	197	206	221	4,18x10 ⁷ κύτταρα/ml

2.2.2 Δοκιμές Ενεργοποίησης του LAL Cascade Μέσω του Factor-G

Συνολικά τέσσερις κατηγορίες δειγμάτων μετρήθηκαν για (1→3)-β-D-glucan:

- 1 Τα θρεπτικά υποστρώματα των καλλιιεργειών, για καθορισμό του υποβαθρικού σήματος:
 - 1.1 BHI, υπόστρωμα του *L. tarantolae*
 - 1.2 RPMI-FBS, υπόστρωμα των *L. donovani*, *L. major*, *L. infantum*
 - 1.3 Schneiders-FBS, υπόστρωμα του *L. donovani (KO)*
- 2 Δείγματα ιζήματος στατικής φάσης *L. tarantolae*, *L. donovani* και *L. major*
- 3 Δείγματα υπερκειμένου στατικής φάσης *L. tarantolae*
- 4 Δείγματα ιζήματος λογαριθμικής φάσης και από τα πέντε στελέχη

2.2.2.1 Ποσοτικοποίηση (1→3)-β-D-glucan των Υποστρωμάτων

Τα επίπεδα (1→3)-β-D-glucan για κάθε υπόστρωμα βρέθηκαν:

- BHI → 267.000 pg/ml δηλαδή 0,267 μg/ml
- RPMI-FBS → 1230 pg/ml δηλαδή 0,001 μg/ml
- Schneiders-FBS → 51.400 pg/ml δηλαδή 0,051 μg/ml

Δεδομένης της ευαισθησίας της μεθόδου που ορίζεται από το τελευταίο σημείο της πρότυπης καμπύλης στα 3,125 pg/ml και της ακρίβειας των αποτελεσμάτων (50–200%) υπολογίσαμε τις ελάχιστες αρχικές αραιώσεις εργασίας για κάθε περίπτωση ώστε να εξαλειφθεί το υποβαθρικό σήμα:

- BHI – *L. tarantolae*: **1:170.000** { (267.000/3,125) x 2 }
- RPMI-FBS – *L. donovani* (WT), *L. major*, *L. infantum*: **1:800** {(1230/3,125) x 2}
- Schneiders-FBS → *L. donovani* (LPG K/O): **1:33.000** {(51.400/3,125) x 2}

2.2.2.2 Δείγματα Ιζήματος Στατικής Φάσης

Μετρήθηκαν τρία στελέχη στατικής φάσης για ενεργοποίηση του Factor-G μέσω των δειγμάτων ιζήματος:

- *L. tarantolae*, σε τρεις αραιώσεις 1:200.000, 1:1.000.000 και 1:5.000.000
- *L. donovani*, σε δύο αραιώσεις 1:1.000 και 1:5.000
- *L. major*, σε δύο αραιώσεις 1:1000 και 1:5.000

Δεν σημειώθηκε αντίδραση σε κανένα από τα τρία δείγματα.

2.2.2.2.1 *L. tarantolae*

Η κυτταρική πυκνότητα της καλλιέργειας σε στατική φάση ήταν $1,26 \times 10^8$ κύτταρα/ml. Επομένως η αντιστοίχιση κυτταρικής πυκνότητας σε κάθε αραιώση ήταν:

- 1:200.000, 630 κύτταρα/ml
- 1:1.000.000, 126 κύτταρα/ml
- 1:5.000.000, 25 κύτταρα/ml

Το spike recovery έδειξε να μην υπάρχει παρεμβολή (interference) στη δοκιμή με τιμές από 75% - 105%. Όλα τα δείγματα παρέμειναν κάτω από το κατώφλι OD, που σημαίνει ότι δεν υπήρχε ανιχνεύσιμη ποσότητα (1→3)-β-D-glucan, που να οφείλεται στην *L. tarantolae*. Το LAL cascade δεν ενεργοποιήθηκε από ουσίες υπάρχουν στο εσωτερικό ή επί της κυτταρικής τους μεμβράνης.

2.2.2.2.2 *L. donovani*

Η αρχική αραιώση ήταν 1:1.000 ώστε να εξαλειφθεί η (1→3)-β-D-glucan από το υπόστρωμα και μία δεύτερη 1:5.000 προέκυψε μέσω διαδοχικής αραιώσεως της πρώτης

με συντελεστή αραίωσης 1:5.

Η κυτταρική πυκνότητα της καλλιέργειας σε στατική φάση ήταν $2,76 \times 10^7$ κύτταρα/ml επομένως η αντιστοίχιση κυτταρικής πυκνότητας σε κάθε αραίωση ήταν:

- 1:1000, 27.600 κύτταρα/ml
- 1:5000, 5.520 κύτταρα/ml

Το spike recovery έδειξε να μην υπάρχει παρεμβολή (interference) στη δοκιμή με τιμές από 93% - 96%. Όλα τα δείγματα παρέμειναν κάτω από το κατώφλι OD, που σημαίνει ότι δεν υπήρχε ανιχνεύσιμη ποσότητα (1→3)-β-D-glucan, που να οφείλεται στα κύτταρα της *L. donovani*. Το LAL cascade δεν ενεργοποιήθηκε από ουσίες που υπάρχουν στο εσωτερικό ή επί της κυτταρικής τους μεμβράνης.

2.2.2.2.3 L. major

Η αρχική αραίωση ήταν 1:1.000 ώστε να εξαλειφθεί η (1→3)-β-D-glucan από το υπόστρωμα ενώ η επόμενη 1:5.000 προέκυψε μέσω διαδοχικής αραίωσης της πρώτης με συντελεστή αραίωσης 1:5.

Η κυτταρική πυκνότητα της καλλιέργειας σε στατική φάση ήταν $1,65 \times 10^8$ κύτταρα/ml επομένως η αντιστοίχιση κυτταρικής πυκνότητας σε κάθε αραίωση ήταν:

- 1:1000, 165.000 κύτταρα/ml
- 1:5000, 33.000 κύτταρα/ml

Το spike recovery έδειξε να μην υπάρχει παρεμβολή (interference) στη δοκιμή με τιμές από 93% - 96%. Όλα τα δείγματα παρέμειναν κάτω από το κατώφλι OD, που σημαίνει ότι δεν υπήρχε ανιχνεύσιμη ποσότητα (1→3)-β-D-glucan, που να οφείλεται στα κύτταρα της *L. major*. Το LAL cascade δεν ενεργοποιήθηκε από ουσίες που υπάρχουν στο εσωτερικό ή επί της κυτταρικής τους μεμβράνης.

2.2.2.3 Δείγματα Υπερκειμένου Στατικής Φάσης

Μετρήθηκαν τρεις αραιώσεις δείγματος στατικής φάσης *L. tarantolae* (1:200.000, 1:1.000.000 και 1:5.000.000) για ενεργοποίηση του Factor-G μέσω του υπερκειμένου.

Δεν σημειώθηκε αντίδραση σε κάποιο δείγμα..

2.2.2.4 Δείγματα Ιζήματος Λογαριθμικής Φάσης

Μετρήθηκαν για ενεργοποίηση του Factor-G μέσω του ιζήματος και τα πέντε στελέχη σε λογαριθμική φάση:

- *L. tarantolae*, σε μία αραίωση 1:200.000 (101 κύτταρα/ml)
- *L. donovani KO*, σε μία αραίωση 1:40.000 (1045 κύτταρα/ml)
- *L. major*, σε μία αραίωση 1:1.000 (76.400 κύτταρα/ml)
- *L. infantum*, σε μία αραίωση 1:1.000 (20.300 κύτταρα/ml)
- *L. donovani*, σε μία αραίωση 1:1000 (20.800 κύτταρα/ml)

Το spike recovery έδειξε να μην υπάρχει παρεμβολή (interference) στις δοκιμές με τιμές από 93% - 96%. Τα δείγματα παρέμειναν κάτω από το κατώφλι OD, που σημαίνει ότι δεν υπήρχε ανιχνεύσιμη ποσότητα (1→3)-β-D-glucan που να οφείλεται στα κύτταρα των στελεχών *Leishmania*. Το LAL cascade δεν ενεργοποιήθηκε από ουσίες που υπάρχουν στο εσωτερικό ή επί της κυτταρικής τους μεμβράνης.

2.2.3 Δοκιμές Ενεργοποίησης του LAL Cascade Μέσω του Factor-C

Συνολικά τρεις κατηγορίες δειγμάτων μετρήθηκαν για ενεργοποίηση του Factor-C σε παρουσία Polymyxin-B:

- Δείγματα ιζήματος λογαριθμικής φάσης *L. major* και *L. donovani (KO)*
- Δείγματα ιζήματος στατικής φάσης *L. tarantolae* και *L. donovani (WT)*
- Δείγματα υπερκειμένου στατικής φάσης για όλα τα στελέχη

Αρχικά επιβεβαιώθηκε το πρωτόκολλο για την απενεργοποίηση των βακτηριακών ενδοτοξινών με χρήση προτύπης ενδοτοξίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις και παρουσία Polymyxin-B σε συγκέντρωση 10 µg/ml. Έπειτα μετρήθηκε η ενεργοποίηση του Factor-C σε ορισμένα δείγματα ιζήματος λογαριθμικής και στατικής φάσης και τελικά έγινε εκτεταμένη μελέτη ενεργοποίησης του Factor-C σε δείγματα από υπερκείμενο στατικής φάσης.

2.2.3.1 Επιβεβαίωση Πρωτοκόλλου Polymyxin-B σε Πρότυπη Ενδοτοξίνη

Για την επιβεβαίωση του πρωτοκόλλου απενεργοποίησης βακτηριακών ενδοτοξινών χρησιμοποιήθηκε διάλυμα Polyxymín-B της Sigma αρχικής συγκέντρωσης 10mg/ml και πρότυπη ενδοτοξίνης CSE της ACC *E. coli* O113:H10 με αρχική συγκέντρωση 1000 EU/ml.

Για την επιβεβαίωση του πρωτοκόλλου απενεργοποίησης των βακτηριακών ενδοτοξινών, η πρότυπη ενδοτοξίνη αραιώθηκε διαδοχικά για τη δημιουργία δύο τύπων πρότυπης καμπύλης σε συγκεντρώσεις από 0,001 EU/ml έως 1 EU/ml. Ο πρώτος τύπος περιείχε απλώς την πρότυπη ενδοτοξίνη ενώ ο δεύτερος περιείχε και Polymyxin-B σε τελική συγκέντρωση 10 µg/ml. Η καμπύλη με παρουσία Polymyxin-B δεν πέρασε ποτέ το κατώφλι OD. Μάλιστα έδειξε πλήρη απενεργοποίηση του μηχανισμού καθώς η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων όλων των συγκεντρώσεων έμεινε κάτω από τα 10 mAbs OD.

2.2.3.2 Μετρήσεις με Χρήση Πρωτοκόλλου Polymyxin-B

Τρεις κατηγορίες δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν με το πρωτόκολλο Polymyxin-B για τη διερεύνηση της ενεργοποίησης του Factor-C από τα αντιγόνα των στελεχών του γένους *Leishmania*:

- Δύο δείγματα ιζήματος κυττάρων σε λογαριθμική φάση στην ίδια ανάλυση:
 - *L. major*
 - *L. donovani* (KO)
- Δύο δείγματα ιζήματος κυττάρων σε στατική φάση στην ίδια ανάλυση:
 - *L. tarantolae*
 - *L. donovani*
- Υπερκείμενο στατικής φάσης και από τα πέντε δείγματα στην ίδια ανάλυση

2.2.3.2.1 Δείγματα Ιζήματος Λογαριθμικής Φάσης

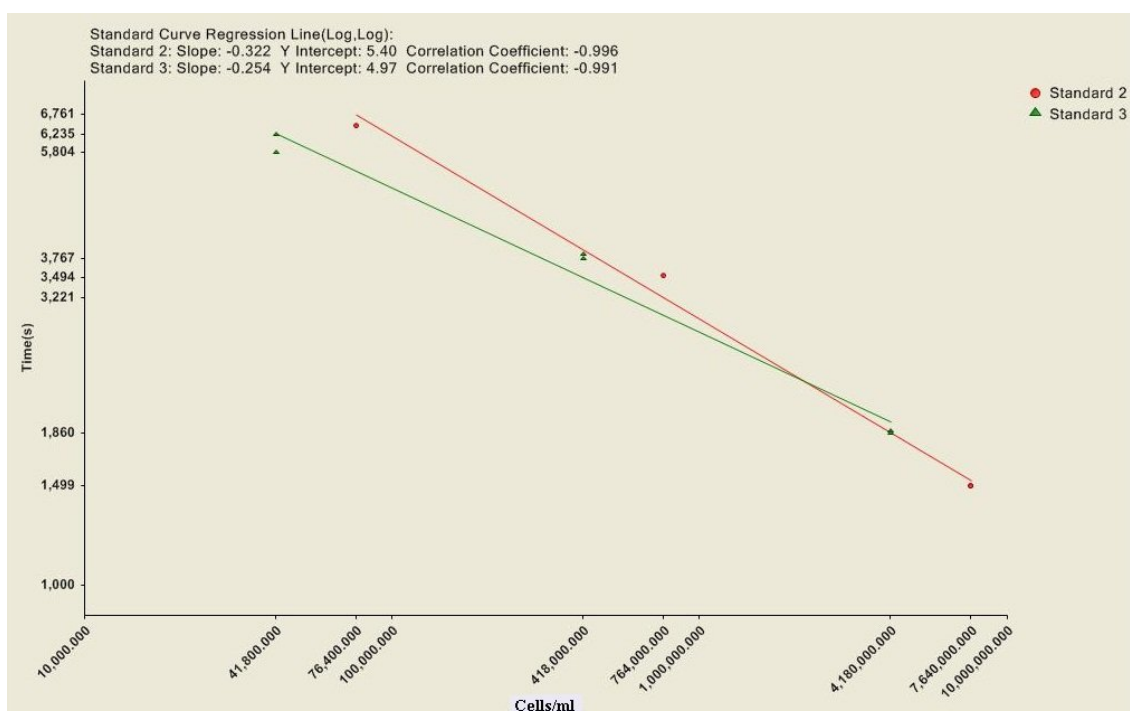
Η συγκέντρωση των κυττάρων *L. major* ήταν $7,64 \times 10^7$ κύτταρα/ml ενώ των *L.*

donovani (KO) $4,18 \times 10^7$ κύτταρα/ml.

Τρεις διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις εξετάστηκαν για το κάθε δείγμα ξεκινώντας από την 1:10. Έτσι για το κάθε δείγμα είχαμε τις εξής συγκεντρώσεις:

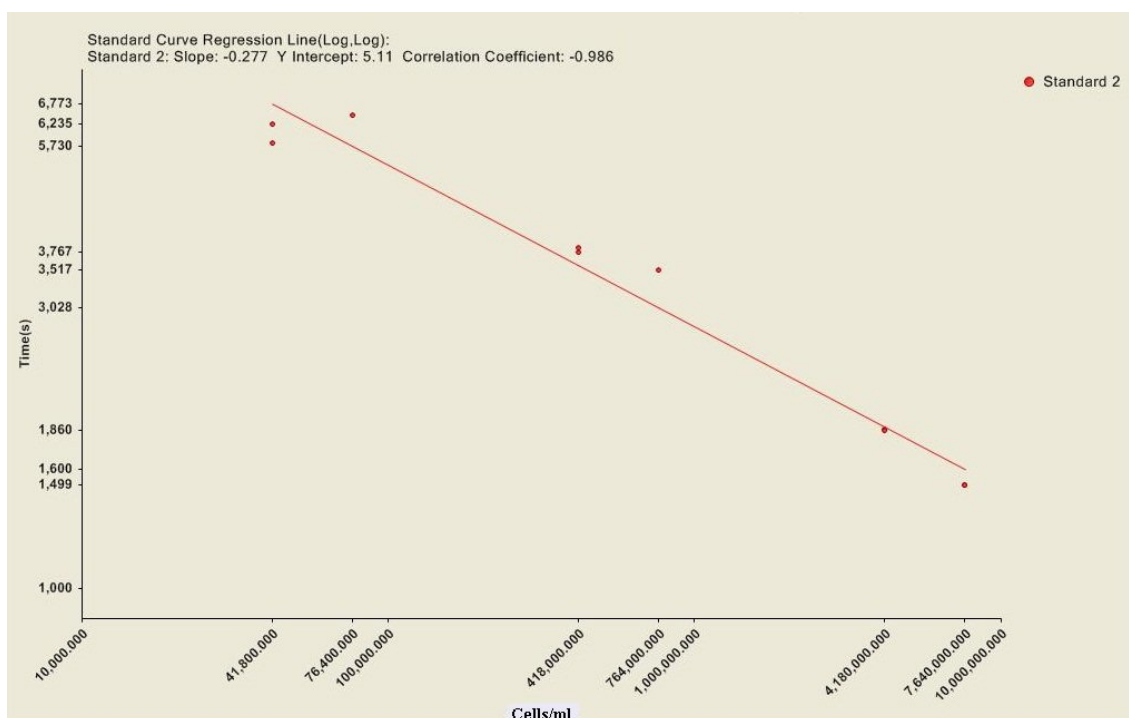
Αραίωση	1:10	1:100	1:1000
<i>L. major</i>	7.640.000 κύτταρα/ml	764.000 κύτταρα/ml	76.400 κύτταρα/ml
<i>L. donovani</i> (KO)	4.180.000 κύτταρα/ml	418.000 κύτταρα/ml	41.800 κύτταρα/ml

Με τα τρία αυτά σημεία, από το κάθε δείγμα, σχεδιάσαμε τις πρότυπες καμπύλες σε λογαριθμικό άξονα και τα τοποθετήσαμε στο ίδιο διάγραμμα (Διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 2: Πρότυπη καμπύλη *L. major* (Standard 2) και *L. donovani* (KO) (standard 3) σε δείγματα λογαριθμικής φάσης

Παρατηρήσαμε ότι και οι δύο καμπύλες είχαν εξαιρετική γραμμικότητα ενώ μάλιστα δύο σημεία της καμπύλης *L. donovani* (KO) συνέπεσαν με την καμπύλη της *L. major*. Συγχωνεύσαμε τις δύο καμπύλες χρησιμοποιώντας όλες τις τιμές στο ίδιο γράφημα και παρατηρήσαμε ότι τα κύτταρα λογαριθμικής φάσης για αυτά τα δύο στελέχη ενεργοποίησαν το Factor-C από το ίδιο μονοπάτι ενώ η ταχύτητα της αντίδρασης ήταν ανάλογη με αυτή του αριθμού των κυττάρων (Διάγραμμα 3).



Διάγραμμα 3: Κοινή πρότυπη καμπύλη για όλες τις τιμές *L. major* και *L. donovani* (KO) σε δείγματα λογαριθμικής φάσης

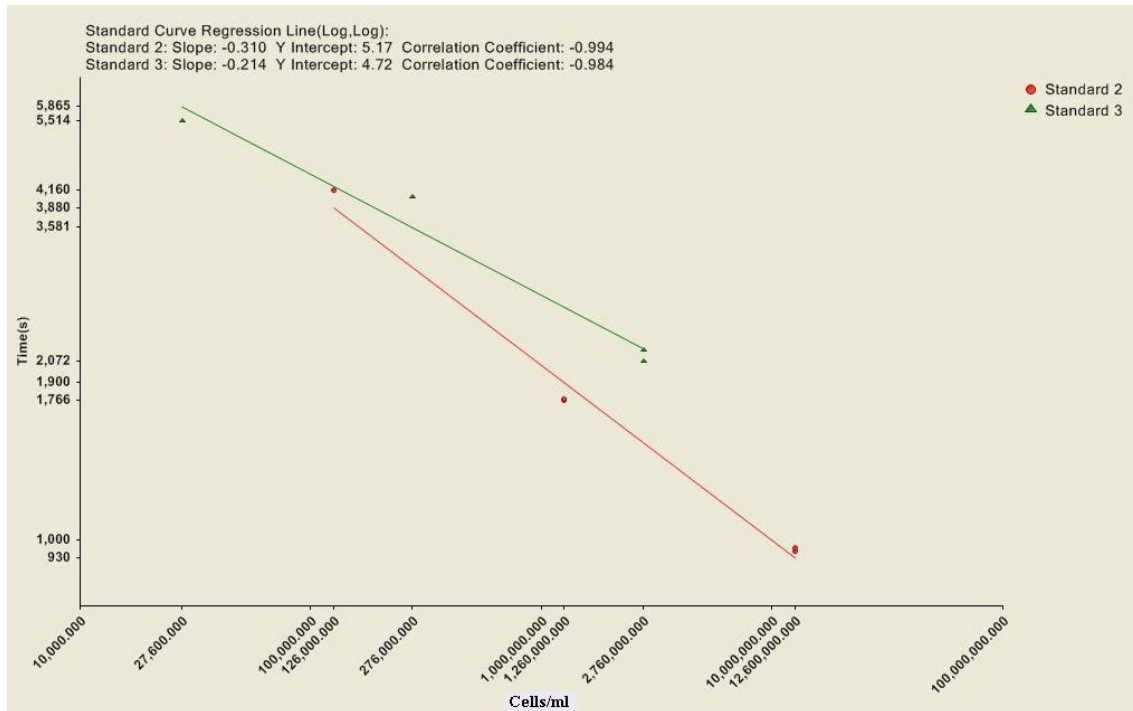
2.2.3.2.2 Δείγματα Ιζήματος Στατικής Φάσης

Η συγκέντρωση των κυττάρων *L. tarantolae* ήταν $1,26 \times 10^8$ κύτταρα/ml ενώ των *L. donovani* $2,76 \times 10^7$ κύτταρα/ml.

Τρεις διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις εξετάστηκαν για το κάθε δείγμα ξεκινώντας από την 1:10. Έτσι για το κάθε δείγμα είχαμε τις εξής συγκεντρώσεις:

Αραιώση	1:10	1:100	1:1000
<i>L. tarantolae</i>	12.600.000 κύτταρα/ml	1.260.000 κύτταρα/ml	126.000 κύτταρα/ml
<i>L. donovani</i>	2.760.000 κύτταρα/ml	276.000 κύτταρα/ml	27.600 κύτταρα/ml

Με τα τρία αυτά σημεία, από το κάθε δείγμα, σχεδιάσαμε τις πρότυπες καμπύλες σε λογαριθμικό άξονα και τα τοποθετήσαμε στο ίδιο διάγραμμα (Διάγραμμα 4).

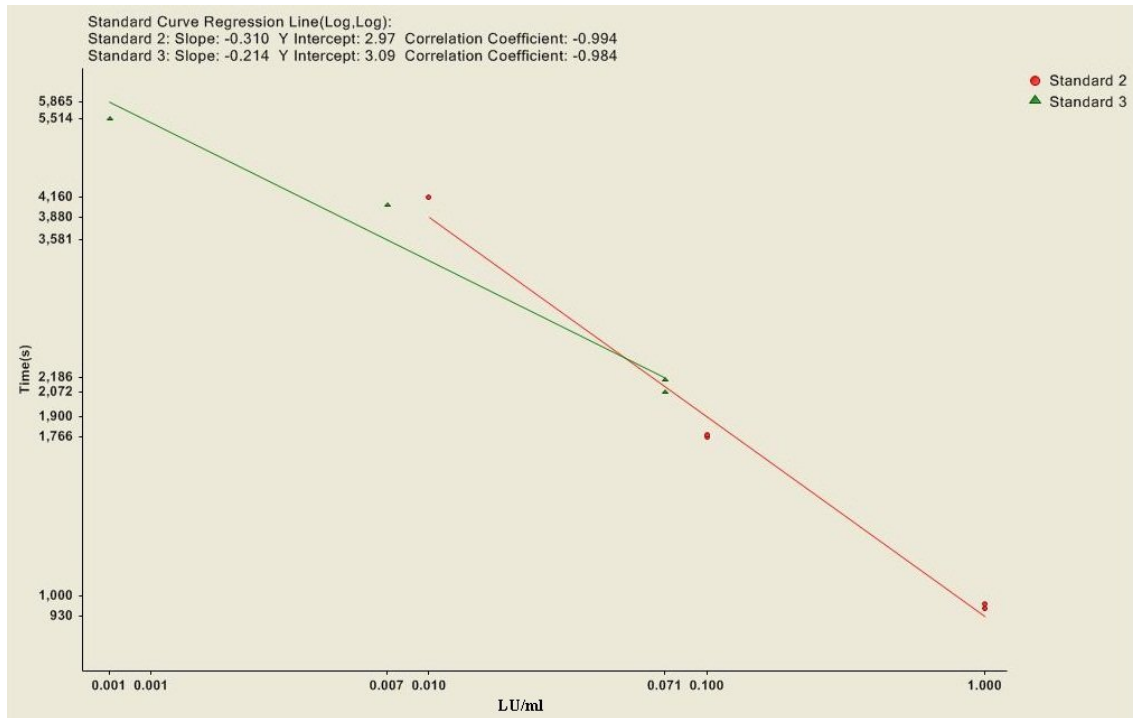


Διάγραμμα 4: Πρότυπη καμπύλη *L. tarantolae* (Standard 2) και *L. donovani* (Standard 3) σε δείγματα στατικής φάσης

Όπως βλέπουμε από τις καμπύλες που παράγουν τα δύο στελέχη, το Factor-C ενεργοποιήθηκε και από τα δύο δείγματα. Σε αντίθεση με τα δείγματα ιζήματος λογαριθμικής φάσης βλέπουμε ότι ο τρόπος με τον οποίο ενεργοποιήθηκε το LAL cascade διαφέρει ανάμεσα στα δύο στελέχη δείχνοντας μεγαλύτερη ευαισθησία στα κύτταρα *L. donovani*.

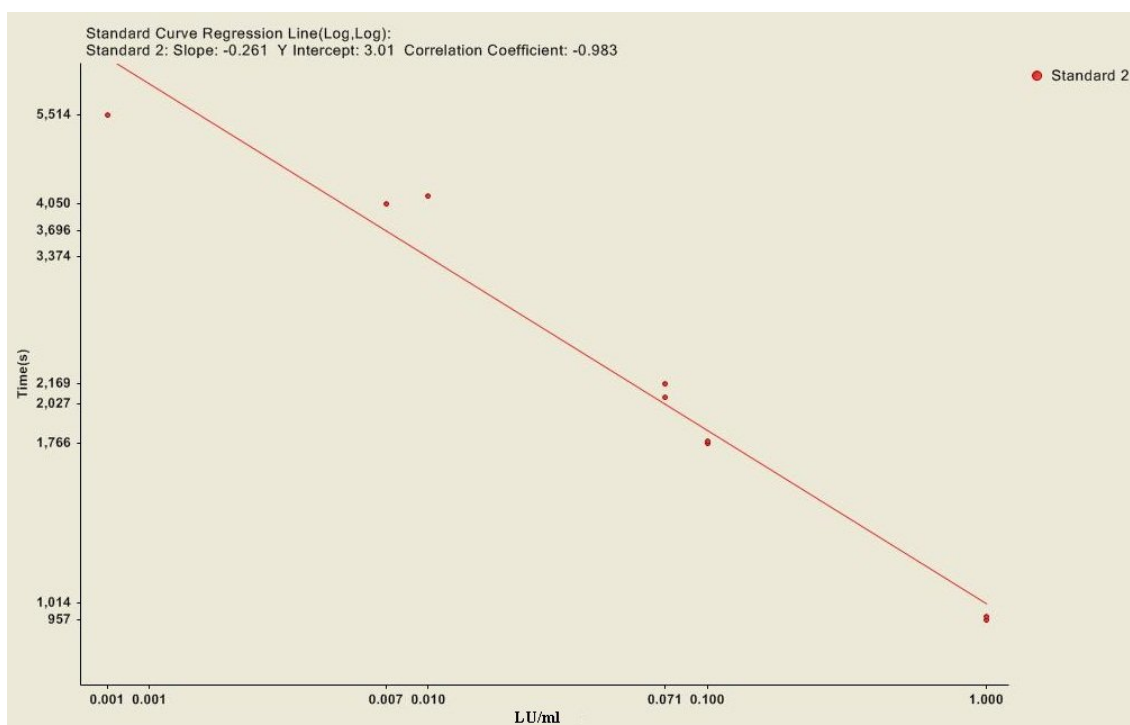
Χρησιμοποιήσαμε την *L. tarantolae* ως πρότυπο αναφοράς για τον ορισμό της Μονάδας Αντιγόνου *Leishmania* (*Leishmania* Unit LU). Η συγκέντρωση αντιγόνου που υπάρχει στα 12.600.000 κύτταρα/ml ορίστηκε ως το 1 LU/ml και υπολογίσαμε τη συγκέντρωση αντιγόνου στο δείγμα *L. donovani* με τη βοήθεια του λογισμικού ως 0,705 LU/ml στο δείγμα των 2.760.000 κύτταρων/ml. Αυτό υποδεικνύει ότι τα κύτταρα *L. donovani* ήταν κάτι περισσότερο από 3 φορές πιο ενεργά ως προς την πυροδότηση του LAL cascade από τα κύτταρα *L. tarantolae*.

Αντικαταστήσαμε τις συγκεντρώσεις κυττάρων με τις συγκεντρώσεις αντιγόνου και σχεδιάσαμε ξανά τις δύο καμπύλες στον ίδιο λογαριθμικό άξονα (Διάγραμμα 5).



Διάγραμμα 5: Πρότυπη καμπύλη σε μονάδες LU/ml για τα δείγματα *L. tarantolae* (Standard 2) και *L. donovani* (Standard 3) σε στατική φάση

Συγχωνεύσαμε τις δύο καμπύλες χρησιμοποιώντας όλες τις τιμές στο ίδιο γράφημα και παρατηρήσαμε ότι τα κύτταρα λογαριθμικής φάσης για αυτά τα δύο στελέχη ενεργοποίησαν το Factor-C από το ίδιο μονοπάτι ενώ η ταχύτητα της αντίδρασης ήταν ανάλογη με αυτή του αριθμού των κυττάρων (Διάγραμμα 6).



Διάγραμμα 6: Κοινή πρότυπη καμπύλη και για τις έξι τιμές σε μονάδες LU/ml για τα δείγματα *L. tarantolae* και *L. donovani* σε στατική φάση

2.2.3.2.3 Δείγματα Υπερκειμένου Στατικής Φάσης

Με δεδομένες τις συγκεντρώσεις των κυττάρων για τα δείγματα στατικής φάσης και για αρχική αραιώση 1:10 και τρεις υποδεκαπλάσιες αραιώσεις, προκύπτει ο παρακάτω πίνακας που δίνει την αντιστοίχιση αραιώσης με συγκέντρωση κυττάρων για κάθε στέλεχος:

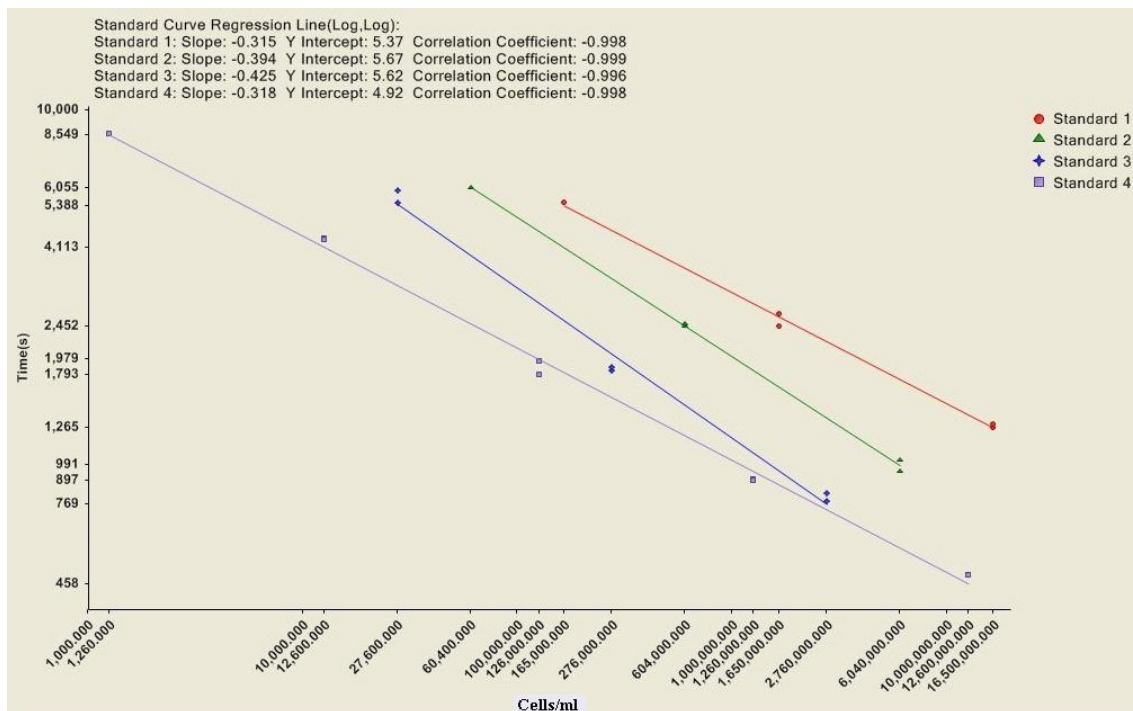
	1:10	1:100	1:1000
1. <i>L. major</i>	16.500.000 κύτταρα/ml	1.650.000 κύτταρα/ml	165.000 κύτταρα/ml
2. <i>L. infantum</i>	6.040.000 κύτταρα/ml	604.000 κύτταρα/ml	60.400 κύτταρα/ml
3. <i>L. donovani</i>	2.760.000 κύτταρα/ml	276.000 κύτταρα/ml	27.600 κύτταρα/ml
4. <i>L. tarantolae</i>	12.600.000 κύτταρα/ml	1.260.000 κύτταρα/ml	126.000 κύτταρα/ml
5. <i>L. donovani (KO)</i>	6.440.000 κύτταρα/ml	644.000 κύτταρα/ml	64.400 κύτταρα/ml

Δύο δοκιμές πραγματοποιήθηκαν με αυτά τα στελέχη για το υπερκείμενο στατικής

φάσης. Στην πρώτη δοκιμή δεν υπήρχε το *L. donovani* (KO) ενώ το *L. tarantolae* δοκιμάστηκε σε δύο επιπλέον αραιώσεις 1:10.000 (12.600 κύτταρα/ml) και 1:100.000 (1.260 κύτταρα/ml) ώστε ταυτόχρονα να προσδιοριστεί η ευαισθησία της δοκιμής. Στη δεύτερη υπήρχαν και τα πέντε στην ίδια ανάλυση σε τρεις αραιώσεις από 1:10 έως 1:1000 με εξαίρεση το *L. tarantolae* που χρησιμοποιήθηκε σε αραιώσεις 1:100 έως 1:10.000 (ελάχιστη συγκέντρωση κυττάρων 12.600 κύτταρα/ml).

1η Δοκιμή

Με όσα σημεία είχαμε από το κάθε δείγμα, σχεδιάσαμε τις πρότυπες καμπύλες σε λογαριθμικό άξονα και τα τοποθετήσαμε στο ίδιο διάγραμμα (Διάγραμμα 7).



Διάγραμμα 7: Πρότυπη καμπύλη *L. major* (Standard 1), *L. infantum* (Standard 2), *L. donovani* (Standard 3) και *L. tarantolae* (Standard 4) σε δείγματα υπερκειμένου στατικής φάσης

Όπως και στα δείγματα ιζήματος στατικής φάσης η ενεργοποίηση του LAL cascade έδειξε διαφορετική ευαισθησία εντός των διαφόρων ειδών.

Με την ίδια λογική όπως και στα δείγματα ιζήματος στατικής φάσης ορίσαμε το *L. tarantolae* σαν πρότυπο αναφοράς για να μετατρέψουμε τις συγκεντρώσεις κυττάρων σε συγκέντρωση αντιγόνου (LU/ml). Επειδή η αντίδραση στο υπερκείμενο είναι σαφώς πιο έντονη από οπουδήποτε αλλού ορίσαμε ότι τα κύτταρα στην πρώτη αραιώση 1:10 της *L. tarantolae* αντιστοιχούσαν σε 10 LU/ml. Χρησιμοποιήσαμε το *L. tarantolae* ως

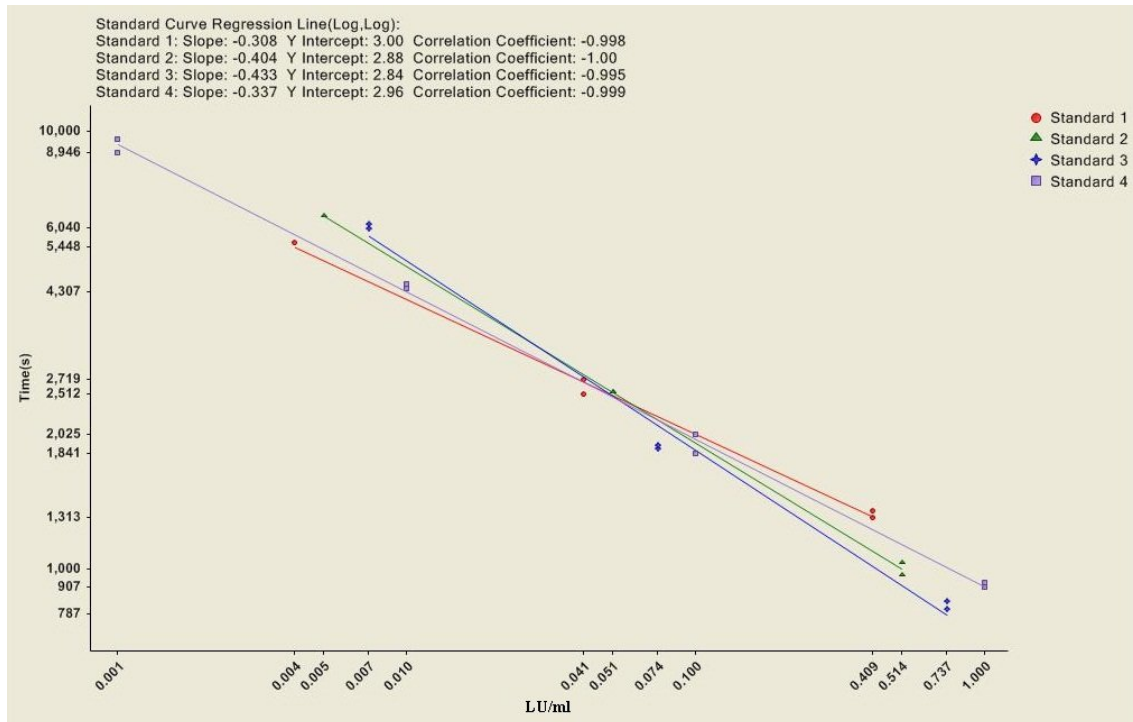
πρότυπη καμπύλη από 1 LU/ml έως 0,001 LU/ml και με τη βοήθεια του λογισμικού υπολογίσαμε τις μονάδες LU/ml για κάθε στέλεχος όπως προέκυψαν κατά μέσο όρο (Εικόνα 15):

Στέλεχος	Αρχική Συγκέντρωση	Μονάδες Αντιγόνου
1. <i>L.major</i>	1,65x10 ⁸ κύτταρα/ml	4,093 LU/ml
2. <i>L.infantum</i>	6,04x10 ⁷ κύτταρα/ml	5,14 LU/ml
3. <i>L.donovani</i>	2,76x10 ⁷ κύτταρα/ml	7,37 LU/ml

Sample Description	Sample Dilution	Standard / Spike Conc.		Mean Conc. EU/mL	Mean Spike Conc EU/mL	Measured Spiked-Unspiked EU/mL	Spike Recovery %	Mean Final Conc			Endotoxin Limit	
		Value	Unit					Value	Unit	CV %	Value	Unit
Standard4		0.00100	EU/mL	0.00104						14.556		
		0.0100	EU/mL	0.00920						5.61		
		0.100	EU/mL	0.109						19.882		
		1.00	EU/mL	0.978						5.393		
<i>L.donovani</i>	1:1000			0.00354	Invalid					4.947		
	1:100			0.112	Invalid					3.601		
	1:10			>1	Invalid							
<i>L.major</i>	1:1000			0.00482	Invalid					0		
	1:100			0.0443	Invalid					16.541		
	1:10			0.323	Invalid					7.072		
<i>L.infantum</i>	1:1000			0.00307	Invalid					0		
	1:100			0.0475	Invalid					0.298		
	1:10			0.780	Invalid					13.265		

Εικόνα 15: Αποτελέσματα για τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων σε μονάδες LU/ml, όπως προέκυψαν από το λογισμικού EQS με χρήση της *L. tarantolae* ως πρότυπο αναφοράς

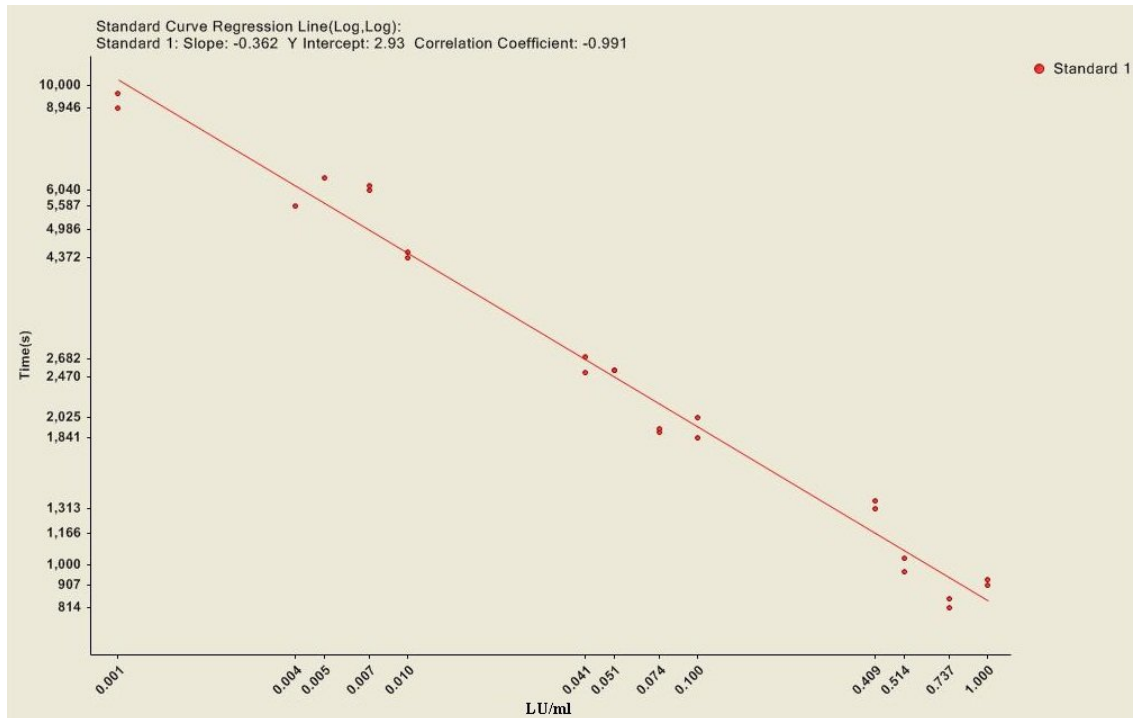
Μετατρέψαμε τις συγκεντρώσεις κυττάρων σε συγκέντρωση αντιγόνων LU/ml και σχεδιάσαμε πάλι τις πρότυπες καμπύλες σε λογαριθμικό άξονα στο ίδιο διάγραμμα για συγκεντρώσεις από 1-0,001 LU/ml (Διάγραμμα 8).



Διάγραμμα 8: Πρότυπη καμπύλη σε μονάδες LU/ml για δείγματα υπερκειμένου στατικής φάσης *L. major* (Standard 1), *L. infantum* (Standard 2), *L. donovani* (Standard 3) και *L. tarantolae* (Standard 4)

Έγινε εμφανές ότι όλα τα σημεία είναι πλέον πολύ στενά συσχετιζόμενα ως προς τον τρόπο που ενεργοποίησαν το LAL cascade.

Συγχωνεύσαμε όλες τις καμπύλες σε μία και προέκυψε καμπύλη από 1 LU/ml έως 0,001 LU/ml με Συντελεστή Συσχέτισης: -0,991 (Διάγραμμα 9).



Διάγραμμα 9: Κοινή πρότυπη καμπύλη σε μονάδες LU/ml για όλα τα δείγματα υπερκειμένου στατικής φάσης

Η καμπύλη που προέκυψε έδωσε υψηλό Συντελεστή Συσχέτισης κάτι που υποδεικνύει ότι πρόκειται για το ίδιο βιοχημικό μονοπάτι ενεργοποίησης του LAL cascade για όλα τα είδη.

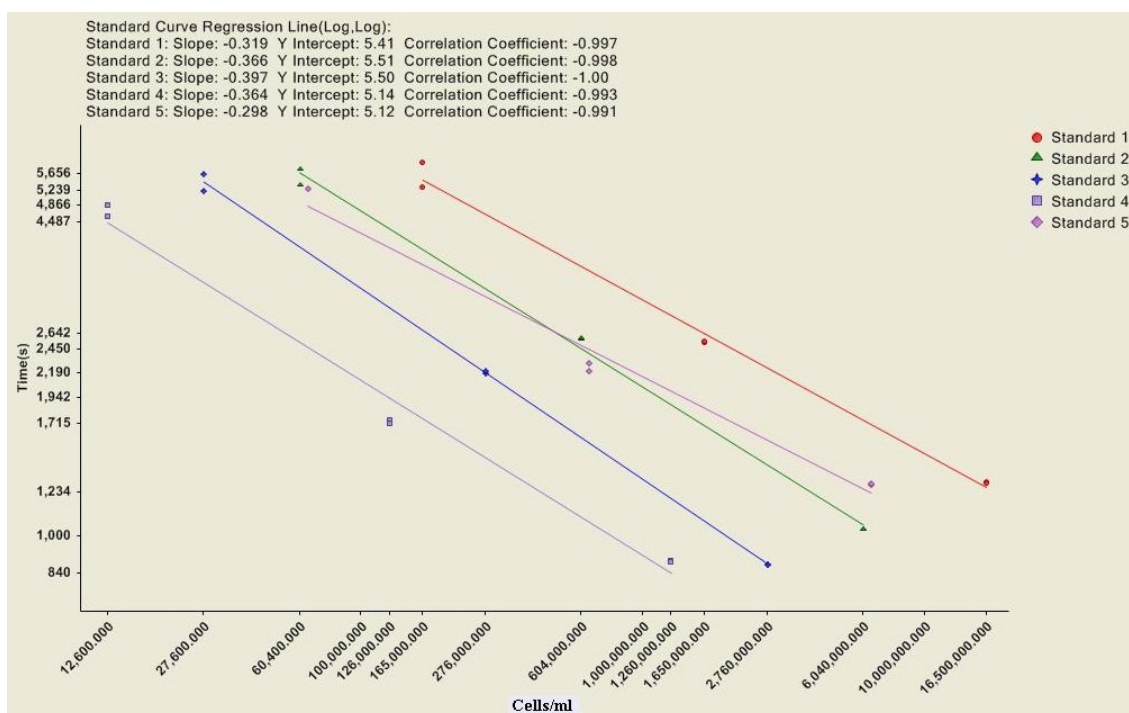
Αναδρομικά χρησιμοποιήσαμε το εργαλείο ανάλυσης του λογισμικού για τον υπολογισμό των μονάδων αντιγόνου για κάθε δείγμα με χρήση της καμπύλης του Διαγράμματος 9 (Mean Conc.). Συγκρίνοντας τις τιμές μονάδων αντιγόνου που υπολογίσαμε με χρήση της *L. tarantolae* ως πρότυπο (Εικόνας 15) με τις τιμές που προέκυψαν από την χρήση της κοινής καμπύλης (Διάγραμμα 9) φάνηκε ότι, όπως και στις δοκιμές ενδοτοξινών, όλες οι τιμές που υπολογίστηκαν από την κοινή καμπύλη είναι εντός της απόκλισης από 50-200% από τις αρχικώς ορισμένες τιμές (Εικόνα 15) όπως φαίνεται στην Εικόνα 16.

Sample Description	Sample Dilution	Standard / Spike Conc.		Mean Conc. EU/mL	Mean Spike Conc EU/mL	Measured Spiked Unspiked EU/mL	Spike Recovery %	Mean Final Conc.			Endotoxin Limit	
		Value	Unit					Value	Unit	CV %	Value	Unit
Standard1	0.00100	EU/mL	0.00194							13.576		
	0.0100	EU/mL	0.0102							5.23		
	0.100	EU/mL	0.102							18.86		
	1.00	EU/mL	0.793							5.028		
	0.00737	EU/mL	0.00420							4.612		
	0.0737	EU/mL	0.105							3.357		
	0.737	EU/mL	1.05							8.349		
	0.00409	EU/mL	0.00538							0		
	0.0409	EU/mL	0.0442							15.429		
	0.409	EU/mL	0.282							6.593		
	0.00514	EU/mL	0.00368							0		
	0.0514	EU/mL	0.0472							0.241		
	0.514	EU/mL	0.626							12.371		

Εικόνα 16: Αποτελέσματα του λογισμικού EQS για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης αντιγόνου με χρήση της κοινής πρότυπης καμπύλης (Mean Conc.), σε σχέση με τις ορισμένες τιμές (Standard/Spike Conc. - Value) όπως αυτές προέκυψαν με τη χρήση του *L. tarantolae* ως πρότυπο αναφοράς

2η Δοκιμή

Με τα τρία αυτά σημεία, από το κάθε δείγμα, σχεδιάσαμε τις πρότυπες καμπύλες σε λογαριθμικό άξονα και τα τοποθετήσαμε στο ίδιο διάγραμμα (Διάγραμμα 10).



Διάγραμμα 10: Πρότυπη καμπύλη *L. major* (Standard 1), *L. infantum* (Standard 2), *L. donovani* (Standard 3), *L. tarantolae* (Standard 4) και *L. donovani* (KO) (Standard 5) σε δείγματα υπερκειμένου στατικής φάσης

Όπως και στην πρώτη δοκιμή μετατρέψαμε τις συγκεντρώσεις κυττάρων σε συγκεντρώσεις αντιγόνου LU/ml με χρήση του *L. tarantolae* ως πρότυπο αναφοράς. Θεωρήσαμε ξανά τα 1.260.000 κύτταρα/ml *L. tarantolae* ως συγκέντρωση 1 LU/ml και

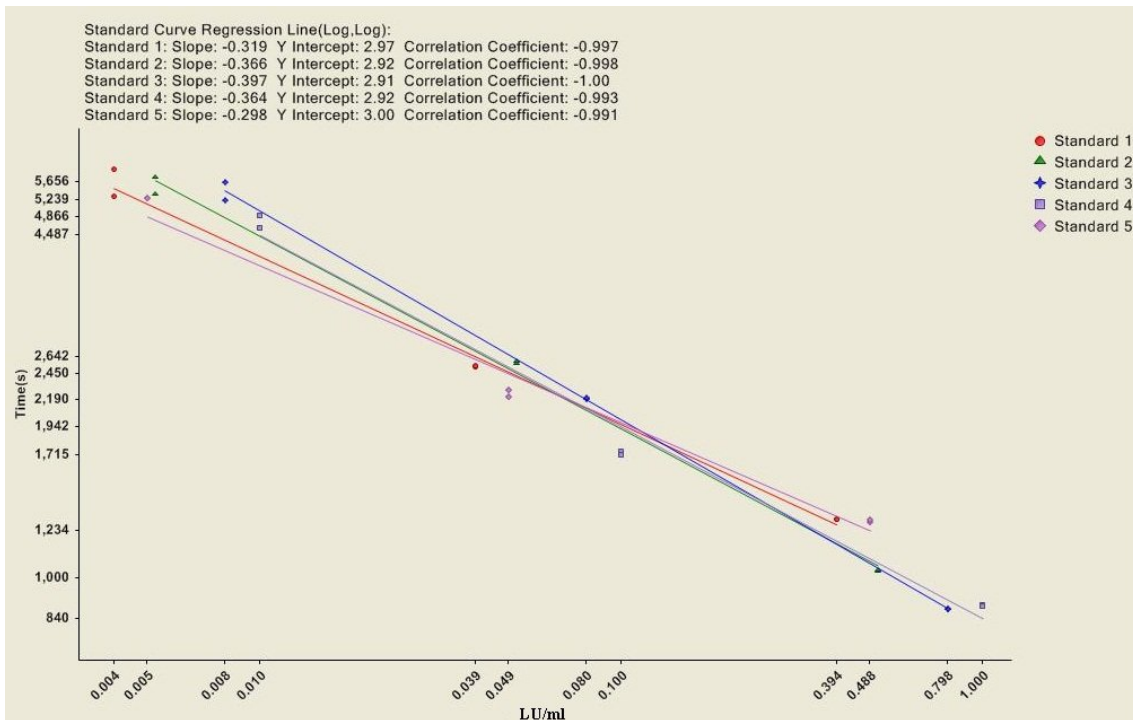
με βάση αυτό ως πρότυπο αναφοράς, υπολογίσαμε με τη βοήθεια του λογισμικού τις συγκεντρώσεις αντιγόνου των υπολοίπων στελεχών όπως προέκυψαν κατά μέσο όρο (Εικόνα 17):

Στέλεχος	Αρχική Συγκέντρωση	Μονάδες Αντιγόνου	Τιμή 1ης δοκιμής
<i>L.major</i>	1,65x10 ⁸ κύτταρα/ml	3,935 LU/ml	4,093 LU/ml
<i>L.infantum</i>	6,04x10 ⁷ κύτταρα/ml	5,125 LU/ml	5,14 LU/ml
<i>L.donovani</i>	2,76x10 ⁷ κύτταρα/ml	7,98 LU/ml	7,37 LU/ml
<i>L.donovani(KO)</i>	6,44x10 ⁷ κύτταρα/ml	4,88 LU/ml	-

Sample Description	Sample Dilution	Standard / Spike Conc.		Mean Conc. EU/mL	Mean Spike Conc EU/mL	Measured Spiked-Unspiked EU/mL	Spike Recovery %	Mean Final Conc			Endotoxin Limit	
		Value	Unit					Value	Unit	CV %	Value	Unit
Standard4		0.0100	EU/mL	0.00666						10.816		
		0.100	EU/mL	0.137						3.464		
		1.00	EU/mL	0.853						0.983		
<i>L.major</i>	1:1000			<0.01	Invalid							
	1:100			0.0482	Invalid					0.97		
	1:10			0.305	Invalid					0.631		
<i>L.infantum</i>	1:1000			<0.01	Invalid							
	1:100			0.0461	Invalid					1.366		
	1:10			0.664	Invalid					0.258		
<i>L.donovani(KO)</i>	1:1000			<0.01	Invalid							
	1:100			0.0666	Invalid					6.362		
	1:10			0.310	Invalid					1.898		
<i>L.donovani</i>	1:1000			<0.01	Invalid							
	1:100			0.0707	Invalid					1.793		
	1:10			0.889	Invalid					0.424		

Εικόνα 17: Αποτελέσματα για τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων σε μονάδες LU/ml, όπως προέκυψαν από το λογισμικό EQS με χρήση της *L. tarantolae* ως πρότυπο αναφοράς

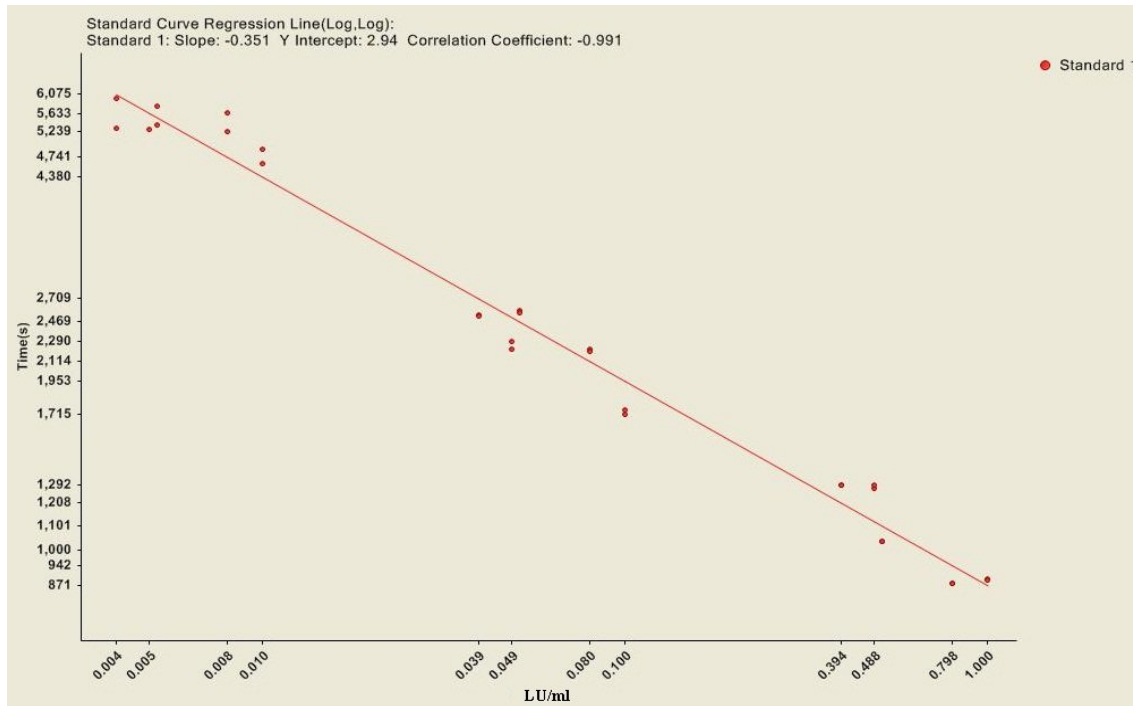
Μετατρέψαμε τις συγκεντρώσεις κυττάρων σε συγκέντρωση αντιγόνων LU/ml και σχεδιάσαμε πάλι τις πρότυπες καμπύλες σε λογαριθμικό άξονα στο ίδιο διάγραμμα για συγκεντρώσεις από 1-0,004 LU/ml (Διάγραμμα 11).



Διάγραμμα 11: Πρότυπη καμπύλη σε μονάδες LU/ml για δείγματα υπερκειμένου στατικής φάσης *L. major* (Standard 1), *L. infantum* (Standard 2), *L. donovani* (Standard 3), *L. tarantolae* (Standard 4) και *L. donovani* (KO) (Standard 5)

Παρατηρήσαμε και πάλι την έντονη συσχέτιση που έχουν οι τιμές από τα ξεχωριστά στελέχη υποδεικνύοντας ενεργοποίηση του LAL cascade από το ίδιο μονοπάτι.

Συγχωνεύσαμε όλες τις καμπύλες σε μία και προέκυψε καμπύλη από 1 LU/ml έως 0,004 LU/ml με Συντελεστή Συσχέτισης: -0,991 (Διάγραμμα 12).



Διάγραμμα 12: Κοινή πρότυπη καμπύλη σε μονάδες LU/ml για όλα τα δείγματα υπερκειμένου στατικής φάσης

Η καμπύλη που προέκυψε έδωσε επίσης υψηλό συντελεστή συσχέτισης κάτι που δείχνει ότι πρόκειται για το ίδιο βιοχημικό μονοπάτι ενεργοποίησης του LAL cascade για όλα τα στελέχη. Αυτό μας δείχνει πάλι και το εργαλείο ανάλυσης του λογισμικού το οποίο χρησιμοποιήσαμε αναδρομικά για τον υπολογισμό των μονάδων αντιγόνου με χρήση της καμπύλης του Διαγράμματος 11. Συγκρίνοντας με τις τιμές που προέκυψαν με χρήση της *L. tarantolae* ως πρότυπο αναφοράς (Standard Spike Conc.) φάνηκε ότι, όπως και στο test ενδοτοξινών, όλες οι τιμές που υπολογίζονται από την κοινή καμπύλη (Mean Conc.) είναι εντός της απόκλισης από 50-200% από την ορισμένη τιμή όπως φαίνεται στην Εικόνα 18.

Sample Description	Sample Dilution	Standard / Spike Conc.		Mean Conc. EU/mL	Mean Spike Conc. EU/mL	Measured Spiked-Unspiked EU/mL	Spike Recovery %	Mean Final Conc.			Endotoxin Limit	
		Value	Unit					Value	Unit	CV %	Value	Unit
Standard1		0.00394	EU/mL	0.00560						22.826 #		
		0.0394	EU/mL	0.0499						0.979		
		0.394	EU/mL	0.321						0.637		
		0.00513	EU/mL	0.00561						14.566		
		0.0513	EU/mL	0.0477						1.379		
		0.513	EU/mL	0.598						0.26		
		0.00488	EU/mL	0.00646						0		
		0.0488	EU/mL	0.0691						6.424		
		0.488	EU/mL	0.327						1.917		
		0.00798	EU/mL	0.00600						14.983		
		0.0798	EU/mL	0.0735						1.811		
		0.798	EU/mL	0.947						0.428		
		0.0100	EU/mL	0.00871						10.921		
		0.100	EU/mL	0.144						3.488		
		1.00	EU/mL	0.909						0.992		

Εικόνα 18: Αποτελέσματα του λογισμικού EQS για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης αντιγόνου με χρήση της κοινής πρότυπης καμπύλης (Mean Conc.), σε σχέση με τις ορισμένες τιμές (Value) όπως αυτές προέκυψαν με τη χρήση του *L. tarantolae* ως πρότυπο αναφοράς

2.3 Συζήτηση

Τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερος ενθαρρυντικά καθώς με έμφαση στην καινοτομία χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς σε έρευνα, ως εργαλείο, η δοκιμή LAL με τρόπο που δεν έχει ξαναχρησιμοποιηθεί πάνω σε μαστιγοφόρα πρωτοζωικά παράσιτα του γένους *Leishmania*.

Η ενεργοποίηση του LAL cascade δια μέσω του Factor-C από αντιγόνα στελεχών *Leishmania* ανοίγει το δρόμο για τη χρήση του LAL στη διάγνωση πρωτοζωικών νόσων, κλείνοντας τον κύκλο στη χρήση του ως “screening” διαγνωστικού σε όλο το φάσμα παθογόνων μικροοργανισμών με το LAL να χρησιμοποιείται ήδη για ανίχνευση Ενδοτοξιναιμίας (Βακτήρια) και Συστηματικής Μυκητίασης (Μύκητες). Επίσης αυτή η παρατήρηση ανοίγει παράθυρο στην έρευνα για το αντιγόνο που ενεργοποιεί τον μηχανισμό LAL από στελέχη *Leishmania*. Το αντιγόνο αυτό θα έβρισκε χρήση άμεσα ή έμμεσα από τη Βιομηχανία Φαρμάκων για την έρευνα φαρμακευτικών ουσιών που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στο σχεδιασμό Φαρμάκων για αυτή την εξελισσόμενη και ως προς το παρόν ανίατη ασθένεια.

2.3.1 Έμφαση στην Καινοτομία

Η δοκιμή LAL είναι ένα Βιοτεχνολογικό προϊόν που μετρά περί τα 40 χρόνια ιστορίας και έχει ως τώρα τρεις βασικές εφαρμογές:

- Βιομηχανία
- Διάγνωση
- Έρευνα

2.3.1.1 Βιομηχανία

Η Φαρμακευτική Βιομηχανία είναι αυτή που κατά κύριο λόγο χρησιμοποιεί εκτεταμένα σε ρουτίνα τις δοκιμές LAL, για περισσότερο από τριάντα χρόνια, στη φάση του Ποιοτικού Ελέγχου σε ενέσιμα διαλύματα για την ανίχνευση βακτηριακών ενδοτοξινών. Η ύπαρξη υψηλών επιπέδων βακτηριακών ενδοτοξινών σε παρεντερικά

και ενέσιμα διαλύματα μπορεί να οδηγήσει τον ασθενή που δέχεται τη θεραπεία σε υψηλό πυρετό που δεν υποχωρεί και κατά επέκταση σε σηψαιμία και θάνατο.

Μια άλλη εφαρμογή στη Βιομηχανία είναι ο έλεγχος των πρώτων υλών για την επιλογή ανάμεσα σε διαφορετικούς προμηθευτές με έμφαση στην καθαρότητα από ουσίες και μικροοργανισμούς καθώς και ο έλεγχος καθαρότητας του δικτύου απεσταγμένου νερού που ρέει εντός του εργοστασίου και χρησιμοποιείται κατά την παραγωγική διαδικασία.

2.3.1.2 Διάγνωση

Ως τώρα η δοκιμή LAL έχει δύο βασικές χρήσεις στη Διάγνωση με σημαντικότερη αυτή της διάγνωσης συστηματικών μυκητικών νόσων σε ευαίσθητες κατηγορίες ασθενών με πεσμένο ή κατεσταλμένο ανοσοποιητικό σύστημα. Η διαγνωστική δοκιμή για μυκητικές νόσους χρησιμοποιείται τα τελευταία δέκα χρόνια, και συμπεριλαμβάνεται στην ευρύτερη κατηγορία των ορολογικών εξετάσεων. Είναι πιστοποιημένο ως IVD (In Vitro Diagnostics) με την ονομασία Fungitell και χρησιμοποιείται εκτεταμένα στις αναπτυγμένες χώρες με χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτό της Νότιας Αφρικής, όπου καμία ασφαλιστική δεν αναλαμβάνει το κόστος χορήγησης αντι-μυκητικών φαρμάκων σε ασθενείς, πριν δύο συνεχόμενα θετικά test από το Fungitell assay.

Η LAL δοκιμή χρησιμοποιείται ως “in house” τεχνική για τη διάγνωση Ενδοτοξιναιμίας σε ολικό αίμα κάτι το οποίο μπορεί να σχετίζεται με βακτηριακή μόλυνση του ασθενούς ή χορήγηση ενεσίμων σκευασμάτων χαμηλής καθαρότητας.

2.3.1.3 Έρευνα

Τόσο οι δοκιμές ανίχνευσης βακτηριακών ενδοτοξινών όσο και της (1→3)-β-D-glucan χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στην έρευνα για τον εντοπισμό βακτηριακών μολύνσεων και χαρακτηρισμού πολυσακχαριτών αντίστοιχα.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν και τα δύο εργαλεία όμως αυτή τη φορά όχι για τον αντικειμενικό τους σκοπό, αλλά για να διερευνήσουμε το κατά πόσο ο βιοχημικός μηχανισμός του LAL cascade έχει εφαρμογή και στον κόσμο των πρωτόζωων κάνοντας στοχευμένα πειράματα σε πέντε στελέχη από μαστιγοφόρα πρωτόζωα του γένους *Leishmania* που υπήρχαν διαθέσιμα στο ινστιτούτο Παστέρ

Αθηνών.

Κάτι σχετικό δεν έχει πραγματοποιηθεί ξανά κατά την παρούσα γνώση μας και έδωσε αποτελέσματα που ανοίγουν νέους δρόμους για τη χρήση των δοκιμών LAL ερευνητικά για χρήση τόσο στη διάγνωση όσο και στη βιομηχανία.

2.3.2 Διερεύνηση για Χρήση ως Διαγνωστικό Εργαλείο

Ένα από τα πιο άμεσα πορίσματα της παρούσας εργασίας είναι η χρήση του LAL test ως διαγνωστικό εργαλείο για την ασθένεια της Λείσμανίασης. Θα αναφερθούμε σε τέσσερα βασικά ζητήματα που αφορούν ένα διαγνωστικό εργαλείο για αυτή τη χρήση:

- Ειδικότητα
- Ευαισθησία
- Ευκολία στην παραγωγή αποτελεσμάτων
- Σύγκριση με άλλες τεχνικές Ανίχνευσης Παρασίτων του γένους *Leishmania*

2.3.2.1 Ειδικότητα

Η ειδικότητα της δοκιμής όπως προκύπτει από το πειραματικό σκέλος της παρούσας εργασίας είναι κάτι που επιδέχεται περαιτέρω μελέτης καθώς δεν είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε αν το αντιγόνο που ενεργοποιεί το LAL cascade περιορίζεται σε στελέχη του γένους *Leishmania* ή είναι κάτι που θα μπορούσε να γενικευτεί στις τρυπανοσωματίδες ή τα πρωτόζωα γενικότερα. Παρά όλα αυτά, σε οποιαδήποτε περίπτωση, περαιτέρω εργαστηριακές τεχνικές θα μπορούσαν να μειώσουν επαρκώς την ειδικότητα για τη χρήση του LAL test ως διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση Λείσμανίασης σε ζώα και ανθρώπους.

Η χρήση Polymyxin-B και Glucashield Buffer περιόρισε το εύρος ανίχνευσης σε πρωτόζωα καθώς είναι γνωστό ότι από τα βακτήρια αυτό που ενεργοποιεί το μηχανισμό LAL είναι οι βακτηριακές ενδοτοξίνες ενώ από τους μύκητες η (1→3)-β-D-glucan. Για να περιορίσουμε το εύρος της δοκιμής για χρήση στη διάγνωση της Λείσμανίασης θα μπορούσαμε να χρησιμοποιήσουμε εξειδικευμένες εργαστηριακές τεχνικές όπως η απομόνωση μακροφάγων από ολικό αίμα. Η πραγματοποίηση της δοκιμής σε

μακροφάγα, αφού αυτά ξεχωριστούν και υποστούν λύση, θα περιορίζε κατά πολύ το εύρος της ανάλυσης σε όσα πρωτοζωικά παράσιτα έχουν την ικανότητα να επιβιώσουν εντός των μακροφάγων και ενεργοποιούν το LAL cascade.

2.3.2.2 Ευαισθησία Δοκιμής

Στην πρώτη δοκιμή που πραγματοποιήσαμε πάνω σε υπερκείμενο στατικής φάσης, αραιώσαμε το δείγμα του *L. tarantolae* από τα $1,26 \times 10^8$ κύτταρα/ml έως τα 126 κύτταρα/ml με διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις. Μόνο μέχρι την προτελευταία αραιώση, δηλαδή τα 1.260 κύτταρα/ml, πήραμε μετρήσιμη αντίδραση από την δοκιμή LAL. Έχοντας ορίσει την ποσότητα αντιγόνου που υπάρχει στα $1,26 \times 10^6$ κύτταρα/ml ως το 1 LU/ml θα λέγαμε ότι η ευαισθησία της δοκιμής αγγίζει το 0,001 LU/ml. Η αναλογία αντιδραστήριου δείγματος ήταν 1:4 κάτι που μας δίνει το περιθώριο να κατεβάσουμε την ευαισθησία της ανάλυσης αντιστρέφοντας την αναλογία έως και 4:1 όπως είναι στο Fungitell assay. Με χρήση συνθετικού χρωμοφόρου (Chromogenic assay) θα μπορούσε να ενισχυθεί επιπλέον η ευαισθησία της ανάλυσης φτάνοντας στα εκατοντάδες ως και δεκάδες κύτταρα ανά ml ώστε να μπορούμε να έχουμε επιτυχής διάγνωση ακόμα και με απομόνωση ενός μόνο μολυσμένου μακροφάγου από το δείγμα του ασθενούς!

2.3.2.3 Ευκολία στην Παραγωγή Αποτελεσμάτων

Η ανάλυση που πραγματοποιήσαμε απαιτεί επώαση του δείγματος με διάλυμα Polymyxin-B στους 37°C για μία ώρα ώστε να απενεργοποιηθούν οι βακτηριακές ενδοτοξίνες του δείγματος.

Κατόπιν ο χειριστής πρέπει να αναμείξει 50μl από το αντιδραστήριο με 200μl από το δείγμα με Polymyxin-B και να τα τοποθετήσει στον αναλυτή για περίπου 1 ώρα. Η διαδικασία είναι ήμι-αυτοματοποιημένη με χρήση ειδικού αναλυτή και λογισμικού που διαβάζει τις πειραματικές τιμές και παράγει τα αποτελέσματα χωρίς επιπλέον παρεμβολή του χειριστή.

Έτσι σε ένα συνολικό χρόνο από δύο έως τρεις ώρες με χρήση σχετικά απλού εργαστηριακού εξοπλισμού μπορούμε να έχουμε ποσοτικά αποτελέσματα τα οποία

αποθηκεύονται αυτόματα για μετέπειτα ανάλυση.

2.3.2.4 Σύγκριση με άλλες Τεχνικές Ανίχνευσης Παρασίτων του Γένους *Leishmania*

Η χρήση του LAL ως διαγνωστικό στη Λείσμανίαση θα είχε ρόλο παρόμοιο με αυτόν των ορολογικών διαγνωστικών για χρήση ως “screening test”. Έτσι παρόμοια με τις αναλύσεις PCR και τις ορολογικές αναλύσεις δεν χρειάζεται βιοψία αλλά σε αντίθεση με τις μικροσκοπικές και τις PCR δεν μπορεί να ταυτοποιήσει το ακριβές είδος ή στέλεχος που ευθύνεται για την ασθένεια.

Το βασικό πλεονέκτημα ως μέθοδος, παρόμοια με τη χρήση του στις μυκητικές νόσους, είναι ότι μπορεί να ανιχνεύσει την ύπαρξη οποιοδήποτε στέλεχος εντός λίγων ωρών, σε αντίθεση με τις αναλύσεις PCR και τις ορολογικές αναλύσεις που είναι για συγκεκριμένα στελέχη. Αναφορικά με τις ορολογικές εξετάσεις η ELISA χρησιμοποιείται για σπλαχνική και post-kala-azar Λείσμανίαση ενώ η IFA επίσης για σπλαχνική Λείσμανίαση. Η DAT έχει μεγαλύτερο εύρος ανάλυσης αλλά δίνει αποτελέσματα εντός 24 ωρών ενώ χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή καθώς μπορεί να οδηγήσει σε παραπλανητικά αποτελέσματα δεδομένου ότι τα αντισώματα μπορεί να υπάρχουν για πολλά χρόνια στο αίμα ακόμα και μετά τη θεραπεία του ασθενούς.

2.3.3 Μελλοντικές Εργασίες

Η παρούσα εργασία βασίστηκε στην καινοτομία και ανοίγει καινούργιους ορίζοντες σε ερευνητικό επίπεδο. Λόγω περιορισμένων πόρων κάλυψε ένα μικρό εύρος από το ερευνητικό πεδίο το οποίο ανοίγει.

Δύο βασικές ερευνητικές εργασίες θα κάλυπταν το κενό που αφήνει η παρούσα εργασία:

- Περαιτέρω μελέτη για χρήση ως Διαγνωστικό Εργαλείο
- Εντοπισμός Αντιγόνου που Ενεργοποιεί το LAL Cascade για χρήση στη Βιομηχανία

2.3.3.1 Περαιτέρω μελέτη για χρήση ως Διαγνωστικό Εργαλείο

Για τη χρήση των LAL ως διαγνωστικό εργαλείο είναι βασικό να μελετηθούν εκτενώς τα παρακάτω τρία χαρακτηριστικά της αντίδρασης LAL:

- Ειδικότητα
- Μέγιστη Ευαισθησία
- Εντοπισμός σε Βιολογικά Υγρά

2.3.3.1.1 Ειδικότητα

Βασικό χαρακτηριστικό του μηχανισμού LAL είναι ο καθολικός τρόπος να ανιχνεύει μικροοργανισμούς από αντιγόνα που είναι κοινά ανάμεσα στο βασίλειο που ανήκουν. Έτσι για τα βακτήρια οι βακτηριακές ενδοτοξίνες που απελευθερώνουν τα κατά gram αρνητικά στελέχη και για τους μύκητες οι (1→3)-β-D-glucan που απελευθερώνονται από τη συντριπτική πλειοψηφία αυτών ενεργοποιούν τον μηχανισμό LAL. Κάτι αντίστοιχο αναμένεται να συμβαίνει και με τα Πρωτόζωα.

Για τις πειραματικές μας μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν 5 στελέχη όλα από το γένος *Leishmania*. Για να μελετηθεί η ειδικότητα της αντίδρασης του LAL cascade πρέπει να δοκιμαστεί η δοκιμή και στα υπόλοιπα είδη *Leishmania* που είναι διαθέσιμα για εργαστηριακή χρήση. Κατόπιν η μελέτη να επεκταθεί και σε άλλα στελέχη που ανήκουν στο Βασίλειο των Πρωτοζώων μεταξύ των οποίων ορισμένα με κλινικό ενδιαφέρον σε ανθρώπινες νόσους όπως:

- *Entamoeba histolytica*, (Αμοιβάδωση) προκαλεί δυσεντερία
- *Plasmodium*, Μαλάρια
- *Giardia lamblia*, (Giardiasis) προσβάλλει τον πεπτικό σωλήνα σε ανθρώπους και ζώα
- *Toxoplasma gondii*, (Τοξοπλάσμωση)
- *Cryptosporidium*, (Cryptosporidiosis) προσβάλλει τον εντερικό σωλήνα και προκαλεί διάρροια

- *Trichomonas Vaginalis*, (Trichomoniasis) προκαλεί κολπίτιδα
- *Trypanosoma*, (Trypanosomiasis)
 - *Trypanosoma Cruzi*, (Ασθένεια του Chagas) εμφανίζεται πολλά χρόνια μετά τη μόλυνση και προκαλεί καρδιακή δυσλειτουργία
 - *Trypanosoma brucei*, (Ασθένεια του ύπνου)
- *Acanthamoeba keratitis*, σπάνια ασθένεια που προσβάλλει τον κερατοειδή
- *Naegleria fowleri*, (Μηνιγγίτιδα)

2.3.3.1.2 Μέγιστη Ευαισθησία

Η ευαισθησία της ανάλυσης θα μελετηθεί εκτενώς όταν ταυτοποιηθεί η αιτία ενεργοποίησης του LAL cascade. Αφού μελετηθεί η ειδικότητα με διεξαγωγή του test σε άλλα στελέχη από διάφορα είδη Πρωτοζώων θα γίνει διαχωρισμός των επιμέρους ουσιών από το υπερκείμενο των στελεχών που ενεργοποιούν τον μηχανισμό LAL ώστε να εντοπιστεί ποια ουσία είναι αυτή που ευθύνεται για την αντίδραση σε κάθε περίπτωση. Αυτό που αναμένεται να βρεθεί είναι ότι κάποιο κοινό συστατικό που εκκρίνεται από τα Πρωτόζωα ενεργοποιεί το LAL cascade μέσω κοινής βιοχημικής διαδικασίας.

Σε συνδυασμό με kinetic Chromogenic assay το οποίο ενισχύει την απόκριση του μηχανισμού θα γίνει πειραματική μελέτη ως προς την ελάχιστη ποσότητα από το αντιγόνο που ενεργοποιεί το μηχανισμό LAL και πως αυτό αντιστοιχίζεται σε κυτταρική συγκέντρωση σε κάθε περίπτωση.

2.3.3.1.3 Εντοπισμός σε Βιολογικά Υγρά

Το τελευταίο στάδιο της τεκμηρίωσης της προτεινόμενης μεθόδου ως Διαγνωστικό εργαλείο είναι η κλινική μελέτη σε ασθενείς που πάσχουν από παθογόνα στελέχη Πρωτοζώων και όχι μόνο για εφαρμογή σε βιολογικά υγρά όπως:

- ολικό αίμα
- ορός

- πλάσμα
- σε ίζημα που θα προκύψει από απομόνωση μακροφάγων
- εγκεφαλονωτιαίο υγρό
- ούρα
- κολπικά υγρά
- δάκρυ
- σάλιο

Το κατά πόσο οι ουσίες που εκκρίνονται από τα Πρωτόζωα εντοπίζονται εντός των κυττάρων ξενιστών (φαγοκυττάρων, εγκεφαλικά, μυικά, δερματικά, εντερικά κύτταρα κτλ) ή απελευθερώνονται στο αίμα όπως θα προκύψει από τα αποτελέσματα των ερευνητικών δοκιμών θα μπορούσαν να δώσουν όλες τις απαντήσεις για τη χρήση της μεθόδου ως διαγνωστικό.

2.3.3.2 Εντοπισμός Αντιγόνου που Ενεργοποιεί το LAL Cascade για χρήση στη Βιομηχανία

Όπως σημειώθηκε και παραπάνω είναι σημαντικό για την τεκμηρίωση της χρήσης του LAL ως διαγνωστικό για τη Λεϊσμανίαση ή άλλες ασθένειες που οφείλονται σε πρωτόζωα, είναι απαραίτητο να ταυτοποιηθεί το αντιγόνο που ενεργοποιεί το LAL cascade.

Ο εντοπισμός του αντιγόνου που ενεργοποιεί το LAL cascade, πέρα της τεκμηρίωσης ως προς τη διάγνωση, θα συνδυαστεί με τον εντοπισμό του γονιδίου ή των γονιδίων και των παραγώγων τους που εμπλέκονται για την παραγωγή του αντιγόνου από το κύτταρο και τον ρόλο που επιτελεί για το κύτταρο. Τόσο το αντιγόνο αυτό καθεαυτό ως στόχος όσο και τα γονίδια που εμπλέκονται για την παραγωγή του μπορεί να δώσουν ώθηση στη Φαρμακοβιομηχανία για την παραγωγή/χρήση δραστικών ουσιών που να προλαμβάνουν ή να αντιμετωπίζουν αυτές τις ασθένειες.

Σχετικό παράδειγμα είναι ο πολυσακχαρίτης (1→3)-β-D-glucan που ενεργοποιεί τον μηχανισμό LAL μέσω του Factor-G, ενώ παράγεται από τη συντριπτική πλειοψηφία

των μυκήτων και είναι δομικό συστατικό του κυτταρικού τους τοιχώματος. Η παραγωγή του πολυσακχαρίτη (1→3)-β-D-glucan στους μύκητες γίνεται μέσω της (1→3)-β-D-glucan συνθάσης. Παρεμποδιστές της (1→3)-β-D-glucan συνθάσης όπως οι εχινοκανδίνες χρησιμοποιούνται αποτελεσματικά ως δραστικές ουσίες κατά μυκητικών νόσων [32][33].

Αναφορές

- [1] Kōichi Sekiguchi (1988). *Biology of Horseshoe Crabs*. Science House. ISBN 978-4-915572-25-8.
- [2] "[The Horseshoe Crab Natural History: Crab Species](#)". Archived from the original on 12 February 2007. Retrieved 2007-03-01.
- [3] World Conservation Monitoring Centre (1996). "[Limulus polyphemus](#)". [IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.2. International Union for Conservation of Nature](#). Retrieved February 25, 2010.
- [4] "[Leishmaniasis Fact sheet N°375](#)". *World Health Organization*. January 2014. Retrieved 17 February 2014.
- [5] C. Bogdan and M. Rollinghoff, "How do Protozoan Parasites Survive inside Macrophages", [Parasitol Today](#). 1999 Jan;15(1):22-8., PMID: 10234174
- [6] R H Glew, A K Saha, S Das, and A T Remaley, "Biochemistry of the *Leishmania* Species", *Microbiol Rev*. Dec 1988; 52(4): 412–432., PMID: PMC373157
- [7] Ellis SL, Shakarian AM, Dwyer Dm, "Leishmania: amastigotes synthesize conserved secretory acid phosphatases during human infection.", [Exp Parasitol](#). 1998 Jun;89(2):161-8.
- [8] Miguel A. Morales, Pascale Pescher, and Gerald F. Spath, "*Leishmania major* MPK7 Protein Kinase Activity Inhibits Intracellular Growth of the Pathogenic Amastigote Stage, Published online Oct 2, 2009. doi: [10.1128/EC.00196-09](#)
- [9] Salvatore J. Turco and Albert Descoteaux, "The Lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites", [Annu Rev Microbiol](#). 1992;46:65-94.
- [10] Sack DL, "Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes.", [Exp Parasitol](#). 1989 Jul;69(1):100-3.
- [11] WHO (2010) Annual report. Geneva
- [12] Επιδημιολογικά Στοιχεία για τη Λεισμανίαση στην Ελλάδα (Σύστημα υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων), Τμήμα Επιδημιολογικής Επιτήρησης και

Παρέμβασης, ΚΕΕΛΠΙΝΟ Ιαν. 2011

- [13] K Gkolfinopoulou et al, “**Surveillance and outbreak reports**, Epidemiology of human leishmaniasis in Greece, 1981-2011”, Eurosurveillance, Volume 18, Issue 29, 18 July 2013
- [14] Barrett MP and Croft SL, “Management of trypanosomiasis and leishmaniasis”, [Br Med Bull](#). 2012;104:175-96. doi: 10.1093/bmb/lds031. Epub 2012 Nov 7.
- [15] Chliboyko, J. "Crabby Ancestors", *Canadian Geographic Magazine*, April 2008, p. 25
- [16] Basudev Tripathy (2006). "[In-House Research Seminar: The status of horseshoe crab in east coast of India](#)". *Wildlife Institute of India*: 5.
- [17] Misty Edgecomb (June 21, 2002). "[Horseshoe Crabs Remain Mysteries to Biologists](#)". *Bangor Daily News (Maine)*, repr. *National Geographic News*. p. 2.
- [18] Angier, Natalie (June 10, 2008). "[Tallying the Toll on an Elder of the Sea](#)". *The New York Times*. ISSN 0362-4331. [Archived](#) from the original on 25 June 2008. Retrieved June 11, 2008.
- [19] Shuster, Carl N (2004). "[Chapter 11: A blue blood: the circulatory system](#)". In Shuster, Carl N, Jr; Barlow, Robert B; Brockmann, H. Jane. *The American horseshoe crab*. [Harvard University Press](#). pp. 276–277. ISBN 0-674-01159-7.
- [20] [The history of *Limulus* and endotoxin](#), [Marine Biological Laboratory](#). Retrieved 24 September 2008.
- [21] Angier, Natalie (June 10, 2008). "[Tallying the Toll on an Elder of the Sea](#)". *The New York Times*. ISSN 0362-4331. [Archived](#) from the original on 25 June 2008. Retrieved June 11, 2008.
- [22] Juliet Eilperin (June 10, 2005). "[Horseshoe Crabs' Decline Further Imperils Shorebirds \(subtitle: Mid-Atlantic States Searching for Ways to Reverse](#)

- Trend*". [The Washington Post](#). p. A03. Retrieved May 14, 2006.
- [23] Leschen, A. S., et al. (2006). "[Fecundity and spawning of the Atlantic horseshoe crab, *Limulus polyphemus*, in Pleasant Bay, Cape Cod, Massachusetts, USA](#)". *Marine Ecology* **27**: 54–65. doi:10.1111/j.1439-0485.2005.00053.x.
- [24] [Ancient horseshoe crabs get even older](#)". [Fox News](#). January 30, 2008.
- [25] Coursey et al 2003, "Amebocyte production begins at stage 18 during embryogenesis in *Limulus polyphemus*, the American horseshoe crab.", *Biol. Bull.* 2004 Feb, 204(1):21-7
- [26] Nils A. Berglund et al. (2015), "Interaction of the Antimicrobial Peptide Polymyxin B1 with Both Membranes of *E. Coli*: A Molecular Dynamics Study".
- [27] Robert Kikkert1 et al. (2007), "Potentiation of Toll-like receptor-induced cytokine production by (1→3)- β -D-glucans: implications for the monocyte activation test".
- [28] Kubar J, Fragaki K (2015), "Recombinant DNA-derived leishmania proteins: from the laboratory to the field."
- [29] Zijlstra EE et al (2001), "Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan."
- [30] R. Kumar et al (2001), "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Recombinant K39 Antigen in Diagnosis and Prognosis of Indian Visceral Leishmaniasis"
- [31] Lemos EM et al (2003), "Evaluation of a rapid test using recombinant k39 antigen in the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil "
- [32] Lorena Martinez and Pierre Falson (2014), "Multidrug resistance ATP-binding cassette membrane transporters as targets for improving oropharyngeal candidiasis treatment"
- [33] Scott S. Walker et al. (2011), "Discovery of a Novel Class of Orally Active Antifungal β -1,3-D-Glucan Synthase Inhibitors"
- [34] B. Abkar John et al. (2010), "Mechanism of the Gel Clot Formation of Horsecrab Crab Blood during Bacteria Endotoxin Invasion"