



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΝΕΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ
ΒΙΟΦΑΙΝΟΛΩΝ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΣΕ ΠΑΡΑΣΙΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ:
ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΩΝ
ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΓΕΩΡΓΙΑ ΓΩΓΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2023

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ημερομηνία Ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 21/03/2019

Ημερομηνία Ορισμού Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: 14/12/2022

Ημερομηνία παρουσίασης Διδακτορικής Διατριβής: 08/02/2023

Τίτλος Διδακτορικής Διατριβής: «Νέες προοπτικές της θεραπευτικής δράσης των βιοφαινολών του ελαιολάδου σε παρασιτικά νοσήματα: διερεύνηση μοριακών ρυθμιστικών ανοσολογικών μηχανισμών»

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

1. Ντότσικα Ελένη (επιβλέπουσα): Διευθύντρια Ερευνών, Τμήμα Μικροβιολογίας, Εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ
2. Σκαλτσούνης Αλέξιος - Λέανδρος: Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Ε.Κ.Π.Α.
3. Χαλαμπαλάκη Μαρία: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Ε.Κ.Π.Α.

Μέλη Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

1. Ντότσικα Ελένη (επιβλέπουσα): Διευθύντρια Ερευνών, Τμήμα Μικροβιολογίας, Εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ
2. Σκαλτσούνης Αλέξιος - Λέανδρος: Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Ε.Κ.Π.Α.
3. Χαλαμπαλάκη Μαρία: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Ε.Κ.Π.Α.
4. Μητάκου Σοφία: Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Ε.Κ.Π.Α.
5. Ρούτσιαν Ιωάννης: Επίκουρος Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.
6. Παπαδόπουλος Ηλίας: Καθηγητής, Κτηνιατρική Σχολή, Εργαστήριο Παρασιτολογίας & Παρασιτικών Νοσημάτων, Α.Π.Θ.
7. Σμυρλή Δέσποινα: Κύρια Ερευνήτρια, Τμήμα Μικροβιολογίας, Εργαστήριο Μοριακής Παρασιτολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

«Φάρμακο ας γίνει η τροφή σας και η τροφή σας ας γίνει φάρμακό σας»

Ιπποκράτης (460 – 377 π.Χ.)

Περίληψη

Η λείσμανίαση αποτελεί μία πολυσυστηματική παρασιτική νόσο με ένα ευρύ φάσμα κλινικών συμπτωμάτων, όπως χρόνιων φλεγμονών του δέρματος και των σπλαγχνικών οργάνων, που μπορεί να είναι θανατηφόρος αν δεν θεραπευτεί έγκαιρα. Επηρεάζει 12 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως, ενώ 0,7 - 1,2 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις αναφέρονται ετησίως από σχεδόν 100 ενδημικές χώρες. Πρόκειται για μια ενδημική νόσο της Νοτίου Ευρώπης με προοδευτικά αυξανόμενη συχνότητα και στις μη ενδημικές περιοχές, θέτοντας πρόβλημα δημόσιας υγείας. Προκαλείται από περισσότερα από 21 διαφορετικά είδη μονοκύτταρων πρωτόζωων παρασίτων του γένους *Leishmania*, της οικογένειας των τρυπανοσωματιδών (Trypanosomatidae), που μεταδίδονται στους τελικούς σπονδυλωτούς ξενιστές τους μέσω του δήγματος των μολυσμένων θηλυκών εντόμων της οικογένειας των ψυχοειδών (γένη *Phlebotomus* και *Lutzomyia*), τα οποία εισερχόμενα στην κυκλοφορία του αίματος μολύνουν τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα του ξενιστή. Κύριοι ξενιστές του παρασίτου αποτελούν ο άνθρωπος, είδη της οικογένειας των κυνιδών και τα τρωκτικά. Η βαρύτητα των κλινικών εκδηλώσεων της νόσου εξαρτάται τόσο από το είδος του παρασίτου, όσο και από την γενετική προδιάθεση και την ανοσοϊκανότητα του προσβεβλημένου ξενιστή, όπως αυτό αποδεικνύεται στα μοντέλα ζωικών προτύπων που είναι διαθέσιμα. Δεδομένου ότι δεν υπάρχει εμπορικά διαθέσιμο αποτελεσματικό εμβόλιο, η χημειοθεραπεία αποτελεί τη μόνη θεραπευτική επιλογή για τη νόσο. Οι διαθέσιμες χημειοθεραπείες και συνδυαστικές θεραπείες περιλαμβάνουν φάρμακα, όπως η πενταμιδίνη, η παρομομυκίνη, διάφορες αζόλες, η λιποσωμιακή αμφοτερικίνη Β και η μιλτεφοσίνη. Ωστόσο, όλες αυτές οι επιλογές παρουσιάζουν σημαντικές παρενέργειες, όπως τοξικότητα, υψηλό κόστος και αυξανόμενο ποσοστό αποτυχίας, που οφείλεται κυρίως στην ανάπτυξη αντοχής του παρασίτου. Συνεπώς, καθίσταται αναγκαία η διερεύνηση νέων δραστικών αντιλεϊσμανιακών ουσιών και νέων αποτελεσματικών πρωτοκόλλων θεραπείας.

Σύγχρονες επιδημιολογικές μελέτες αναδεικνύουν πως η Μεσογειακή διατροφή συνδέεται με μειωμένη συχνότητα εμφάνισης χρόνιων φλεγμονωδών νοσημάτων όπως, καρδιαγγειακές παθήσεις, νευρολογικές διαταραχές και ορισμένοι τύποι καρκίνου. Βασικό συστατικό της αποτελεί το ελαιόλαδο και ειδικότερα το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο (extra virgin olive oil, EVOO), το οποίο προέρχεται από το φυτό *Olea europaea* L. Πολυάριθμες μελέτες σε *in vitro* και *in vivo* πειραματικά μοντέλα αποδίδουν τις ευεργετικές επιδράσεις του ελαιολάδου στα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (monounsaturated fatty acids, MUFAs) και στο πολικό του κλάσμα (total phenolic fraction, TPF), στο οποίο εμπεριέχονται ποικίλες

βιοφαινόλες, όπως φαινυλικές αλκοόλες, φαινολικά οξέα, σεκοϊριδοειδή, φλαβονοειδή και λιγνάνες. Συνεπώς, η κατανάλωση ελαιολάδου, του ακρογωνιαίου λίθου της Μεσογειακής διατροφής, συσχετίζεται με ευεργετικές για την υγεία ιδιότητες, όπως αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές. Πρόσφατα, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή Ασφάλειας Τροφίμων (EFSA) γνωμοδότησε σχετικά με τη θετική συμβολή των βιοφαινολών του ελαιολάδου στην υγεία του ανθρώπου. Επομένως, η διερεύνηση του ρόλου αυτών των βιοδραστικών μορίων του ελαιόλαδου στη θεραπεία ενδημικών λοιμωδών νοσημάτων, στις χώρες της Νοτίου Ευρώπης που είναι οι κύριες ελαιοπαραγωγικές χώρες παγκοσμίως με την υψηλότερη κατά κεφαλή κατανάλωση ελαιολάδου, είναι ιδιαίτερου επιστημονικού ενδιαφέροντος.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η συγκριτική μελέτη των αντιλεϊσμανιακών ιδιοτήτων δύο ολικών φαινολικών κλασμάτων, TPF1 και TPF2, προερχόμενα από ελληνικά EVOOs, με διαφορετική πολυφαινολική σύσταση, καθώς και η συσχέτιση τόσο αυτών όσο και τεσσάρων βασικών απομονωμένων πολυφαινολικών τους συστατικών, με το εμπορικά διαθέσιμο αντιλεϊσμανιακό φάρμακο μιτεφοσίνη (HePC), σε *in vitro* και *in vivo* πειραματικά μοντέλα της νόσου.

Η ποσοτική ανάλυση έδειξε ότι το TPF2 ήταν πλουσιότερο σε φαινολικές ενώσεις, καθώς περιείχε υδροξυτυροσόλη (HT) (5 mg/g εκχυλίσματος), τυροσόλη (T) (12 mg/g), ολεασεΐνη (OLEA) (144 mg/g) και ολεοκανθάλη (OLEO) (301 mg/g), ενώ το TPF1 περιείχε HT και T στα 7 και 42 mg/g εκχυλίσματος, αντίστοιχα. Παρά τη διαφορετική τους φαινολική σύσταση, και τα δύο TPF άσκησαν ισχυρή αντιλεϊσμανιακή δράση έναντι δύο ειδών του γένους *Leishmania*, των *L. infantum* και *L. major*, τα οποία αποτελούν αιτιολογικούς παράγοντες της σπλαγχνικής και της δερματικής μορφής της νόσου, αντίστοιχα. Ωστόσο, το TPF2 επέδειξε ισχυρότερες αντιλεϊσμανιακές ιδιότητες. Ομοίως, οι απομονωμένες πολυφαινολικές τους ενώσεις, ολεωρωπεΐνη (OLE), HT, OLEA και OLEO, επέδειξαν σημαντική αντιλεϊσμανιακή δράση και στα δύο μοντέλα. Επίσης, με εξαίρεση την OLE, όλες οι εξεταζόμενες ουσίες εμφάνισαν χαμηλή τοξικότητα έναντι των μακροφάγων και σαφή εκλεκτικότητα έναντι του *Leishmania spp.*

Η παρούσα διατριβή στη συνέχεια εστίασε στη συγκριτική μελέτη των δύο ολικών φαινολικών κλασμάτων, προσδιορίζοντας τον τύπο του επαγόμενου κυτταρικού θανάτου σε προμαστιγώτες *Leishmania spp.* Ειδικότερα, στους εξωκυττάριους προμαστιγώτες προσδιορίστηκαν χαρακτηριστικοί μορφολογικοί και βιοχημικοί δείκτες αποπτωτικού θανάτου.

Η αυξανόμενη ανθεκτικότητα του παρασίτου στα διαθέσιμα αντιλεϊσμανιακά φάρμακα που χρησιμοποιούνται για πολλές δεκαετίες, οδηγεί αναπόφευκτα στην αναζήτηση νέων

αποτελεσματικών θεραπευτικών ουσιών ή συνδυαστικών δοσολογικών σχημάτων. Τα τελευταία χρόνια η συνδυαστική χρήση φαρμάκων υποστηρίζεται όλο και περισσότερο ως ένας τρόπος για την αύξηση της αποτελεσματικότητας, τη μείωση της διάρκειας και του κόστους της θεραπείας και τον περιορισμό της ανθεκτικότητας. Στην παρούσα διατριβή αξιολογήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις καθεμίας βιοφαινολικής ένωσης με τη HePC, με απώτερο στόχο τη βελτιστοποίηση της απόδοσης της HePC, του μοναδικού εγκεκριμένου από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) σκευάσματος που χορηγείται δια στόματος για τη θεραπεία της λείσμανιάσης. Η αξιολόγηση της φύσης της αλληλεπίδρασης πραγματοποιήθηκε σε *in vitro* συστήματα εξωκυττάρων προμαστιγωτών και ενδοκυττάρων αμαστιγωτών *Leishmania*, με βάση την τροποποιημένη μέθοδο ισοβολογράμματος. Τα αποτελέσματα στο σύστημα των προμαστιγωτών *L. infantum* και *L. major* αποκάλυψαν αθροιστικότητα για τις αλληλεπιδράσεις HePC-TPF1 και HePC-TPF2, συνέργεια για την αλληλεπίδραση HePC-OLEO, αδιαφορία για HePC-HT και HePC-OLEA και ανταγωνισμό για HePC-OLE. Μεταξύ αυτών, τα αποτελέσματα που οδήγησαν σε συνέργεια και αθροιστικότητα χαρακτηρίστηκαν ως τα πιο υποσχόμενα, καθώς προκάλεσαν σημαντική μείωση στη δοσολογία της HePC. Οι υποσχόμενες αυτές αλληλεπιδράσεις επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω από την ενισχυμένη ενδοκυττάρια παραγωγή ROS στους εξωκυττάρους προμαστιγώτες. Ακολούθησε η διερεύνηση του είδους των αλληλεπιδράσεών τους με τη HePC και στο σύστημα των ενδοκυττάρων αμαστιγωτών, όπου τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ανταγωνισμό και στα δύο είδη του παρασίτου. Επιπλέον, σε *in vitro* σύστημα *Leishmania* – μολυσμένων μακροφάγων αναδείχθηκε η ανοσορυθμιστική δράση και των τριών βιοφαινολικών ενώσεων, TPF1, TPF2 και OLEO, η οποία στην πλειονότητα των δοκιμασιών ενισχύθηκε όταν οι ενώσεις αυτές συνδυάστηκαν με τη HePC.

Το σύνολο των ανωτέρω αποτελεσμάτων ανέδειξε την OLEO ως το πιο πολλά υποσχόμενο μόριο και οδήγησε στην επιλογή της για την περαιτέρω εφαρμογή της σε *in vivo* πειραματικό μοντέλο δερματικής λείσμανιάσης, προκειμένου να αξιολογηθεί τόσο η μονήρης, όσο και η συνδυαστική με τη HePC θεραπευτική της δράση.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επαλήθευσαν ότι τα ολικά φαινολικά κλάσματα του ελαιολάδου αποτελούν βιοενεργά εκχυλίσματα με ισχυρή αντιλείσμανιακή και ανοσοτροποποιητική δράση. Επιπλέον, ανέδειξαν ότι τα κλάσματα που είναι πλουσιότερα στις φαινολικές ενώσεις OLEA και OLEO, εστέρες των HT και T, αντίστοιχα, έχουν ισχυρότερη αντιλείσμανιακή δράση. Η παραδοχή αυτή επιβεβαιώθηκε περαιτέρω από τη διερεύνηση της λείσμανιοκτόνου δράσης των απομονωμένων πολυφαινολών, όπου η OLEO έδωσε τα πιο υποσχόμενα αποτελέσματα μεταξύ των υπό μελέτη καθαρών ενώσεων.

Επίσης, η συσχέτιση των βιοενεργών φυσικών συστατικών με τη HePC, έδειξε μία υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση έναντι των παρασίτων, υποδεικνύοντας νέα θεραπευτικά πρωτόκολλα που μπορούν να καθορίσουν πιθανά αποτελεσματικά δοσολογικά σχήματα που σχετίζονται με τη βέλτιστη χαμηλότερη δόση του τυπικού φαρμάκου. Η στρατηγική της συνδυαστικής χημειοθεραπείας ενθαρρύνει την μελλοντική επίτευξη αυτής της στρατηγικής για την αντιμετώπιση της νόσου σε δύσκολες κλινικές περιπτώσεις υποτροπών, σε περιπτώσεις ασθενών που δεν ανταποκρίνονται στην αρχική διαθέσιμη χημειοθεραπεία, καθώς και σε περίπλοκες καταστάσεις όπως η συλλοίμωξη με τον ιό HIV.

Λέξεις κλειδιά: λειψμανίαση, Μεσογειακή διατροφή, ελαιόλαδο, φυσικά προϊόντα, ολικό φαινολικό κλάσμα, βιοφαινόλες, προμαστιγώτες, ενδοκυττάριοι αμαστιγώτες, συνδυαστική χημειοθεραπεία, ισοβολόγραμμα, ανοσολογική απόκριση, BALB/c ποντίκια

Abstract

Leishmaniasis is a multisystemic parasitic disease with a wide range of clinical symptoms, including chronic inflammation of skin and internal visceral organs, and can be fatal if left untreated. It affects 12 million people worldwide, while 0.7 - 1.2 million new cases are annually reported from nearly 100 endemic countries. Leishmaniasis is endemic in Southern Europe with a progressively increasing incidence in non-endemic areas, posing a public health problem. It is caused by more than 21 different species of unicellular protozoan parasites of the genus *Leishmania* (family Trypanosomatidae), which are transmitted to their final vertebrate hosts through the blood meal of infected female insects belonging to the family of Psychodidae (genus *Phlebotomus* and *Lutzomyia*), and infect the host's mononuclear phagocytes. The main hosts of the parasite are humans, species of the canine family and rodents. The severity of clinical manifestations of the disease depends on both the species of the parasite and the genetic predisposition and immunocompetence of the infected host, as has been demonstrated in the available experimental animal models. Since no effective vaccine is available, chemotherapy is the only treatment option for the disease. Available chemotherapy and combination therapies include drugs such as pentamidine, paromomycin, azoles, liposomal amphotericin B and miltefosine. However, all these options present severe drawbacks, such as toxicity, high cost and an increasing failure rate, mainly due to the development of protozoan resistance, which necessitates the investigation of new active antileishmanial substances and new effective treatment protocols.

Recent epidemiological studies show that Mediterranean Diet (MD) is associated with a reduced incidence of chronic inflammatory diseases such as cardiovascular diseases, neurological disorders and certain types of cancer. The main ingredient of MD is olive oil, and in particular extra virgin olive oil (EVOO), which comes from the plant *Olea europaea* L. Numerous studies in *in vitro* and *in vivo* models of various diseases, claim that the beneficial effects of olive oil are attributed to monounsaturated fatty acids (MUFAs) and to its polar fraction (total phenolic fraction, TPF), which contains chemical classes of biophenols, such as phenyl alcohols, phenolic acids, secoiridoids, flavonoids and lignans. Thus, the consumption of olive oil, as an indispensable product of MD, is strongly associated with beneficial health benefits, such as antioxidant, anti-inflammatory and anti-cancer properties. Recently, the European Food Safety Committee (EFSA) has issued on the positive contribution of olive oil biophenols to human health. Therefore, the investigation of the role of these bioactive molecules of olive oil in the treatment of endemic infectious diseases in Southern European

countries, which are the main oil-producing countries with the highest overall consumption of olive oil, is of special scientific interest.

The aim of this PhD thesis was the comparative study of the antileishmanial properties of two total phenolic fractions, TPF1 and TPF2, with different polyphenolic composition, derived from Greek EVOOs, and their association, as well as their main isolated polyphenolic components association with the commercially available antileishmanial drug miltefosine (HePC), in *in vitro* and *in vivo* experimental models of leishmaniasis.

The quantitative analysis revealed that TPF2 was richer in phenolic compounds as it contained hydroxytyrosol (HT) (5 mg/g of extract), tyrosol (T) (12 mg/g), oleacein (OLEA) (144 mg/g) and oleocanthal (OLEO) (301 mg/g), while TPF1 contained HT and T at 7 and 42 mg/g of extract, respectively. Both TPF1 and TPF2, exerted potent antileishmanial activity against two species of the genus *Leishmania*, *L. infantum* and *L. major*, which are the causative agents of the visceral and cutaneous forms of the disease, respectively. However, TPF2 was demonstrated as the most potent antileishmanial compound. Similarly, the isolated polyphenolic compounds oleuropein (OLE), HT, OLEA and OLEO demonstrated significant antileishmanial activity in both models. Also, except OLE, all tested compounds showed low toxicity against macrophages and selectivity against *Leishmania* spp.

In order to delineate the possible differential mode of action of the two total phenolic fractions, studies aimed to determine the type of induced cell death in *Leishmania* spp. promastigotes. In particular, various characteristic morphological and biochemical markers of apoptosis were determined in *Leishmania* spp. parasites.

Due to the parasite's growing resistance to antileishmanial medications that have been used for many decades, new potent therapeutic agents or combination therapy regimens are urgently requested. In recent years, drug combinations have been increasingly advocated as a way to increase efficacy, reduce the duration and the cost of treatment and limit the occurrence of drug resistance. In this thesis, the interactions of each biophenolic compound with HePC were evaluated *in vitro*, with the ultimate goal of optimizing the effect of HePC, the only oral formulation approved for the treatment of leishmaniasis. This correlation was performed using the modified isobologram method, and the results revealed additivity for HePC-TPF1 and HePC-TPF2 interactions, synergy for HePC-OLEO, indifference for HePC-HT and HePC-OLEA and antagonism for HePC-OLE, in both *L. infantum* and *L. major* promastigotes. Among these, the results leading to synergy and additivity were characterized as the most promising, as they induced a significant reduction in the required dose of HePC. These promising interactions were further confirmed by the enhanced intracellular ROS production

in extracellular promastigotes. These results led to further investigation of the nature of the interactions of these compounds on intracellular amastigotes, and the results revealed antagonism in both species of the parasite. Furthermore, the three biophenolic compounds TPF1, TPF2, and OLEO were also highlighted for their immunomodulatory action in an *in vitro* system of *Leishmania* - infected macrophages, which in most cases was enhanced when combined with HePC.

These results characterized OLEO as the most promising molecule and drove to its further investigation in an *in vivo* experimental model of cutaneous leishmaniasis, in order to evaluate both its single and combined with HePC therapeutic effect.

Overall, the results obtained from the present PhD thesis verified that total phenolic fractions of olive oil are bioactive extracts with potent antileishmanial and immunomodulatory activity. In addition, they revealed that fractions richer in the phenolic compounds OLEA and OLEO, esters of HT and T, respectively, possess stronger antileishmanial activity. This assumption was further confirmed by the investigation of the leishmanicidal activity of the isolated polyphenols, where OLEO gave the most promising results among the studied pure compounds. Moreover, the association of these bioactive natural components with HePC showed a promising new therapeutic approach against *Leishmania* parasites, indicating that such approaches can determine potentially effective treatment regimens associated with optimal lower dose of the standard drug. Combination chemotherapy encourages future pursuit of this strategy for treating disease in difficult clinical relapses, in patients who do not respond to the initial available chemotherapy, and in complex situations such as HIV co-infection.

Keywords: leishmaniasis, Mediterranean diet, olive oil, natural products, total phenolic fraction, biophenols, promastigotes, intracellular amastigotes, combination chemotherapy, isobologram, immune response, BALB/c mice

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας, του Τμήματος Μικροβιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ (ΕΙΠ), σε συνεργασία με τον Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του Τμήματος Φαρμακευτικής, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.), κατά τη χρονική περίοδο Μάρτιος 2019 - Φεβρουάριος 2023, εν μέσω πανδημίας Covid-19 προκαλώντας μη αναμενόμενες δυσκολίες στην εκτέλεσή της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα της διδακτορικής μου διατριβής, Δρ. Ντότσικα Ελένη, Διευθύντρια Ερευνών του ΕΙΠ, για την ευκαιρία που μου έδωσε να πάρω θέση Υποψήφιου Διδάκτορα στο ΕΙΠ, για την υπόδειξη του θέματος, για την εμπιστοσύνη και την ερευνητική καθοδήγηση που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησής της, καθώς και την γενικότερη επαγγελματική προοπτική της καριέρας μου. Εκφράζω, επίσης, από καρδιάς τις ευχαριστίες μου στην Δρ. Κουτσώνη Όλγα για τη διαρκή επιστημονική καθοδήγηση, με τις εύστοχες υποδείξεις και τη συνεχή θεωρητική και πρακτική υποστήριξη του ιδιαίτερα απαιτητικού εργαστηριακού έργου της διατριβής μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω, την Υποψήφια Διδάκτορα Καραμπέτσου Καλλιόπη, μέλος του Εργαστηρίου Κυτταρικής Ανοσολογίας, με την οποία πορευτήκαμε παράλληλα και μοιραστήκαμε εργαστηριακές και ερευνητικές ανησυχίες όλα αυτά τα χρόνια. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Φραγκιαδάκη Ειρήνη, υπεύθυνη των εγκαταστάσεων του Τμήματος Ζωικών Προτύπων Βιοϊατρικής Έρευνας, την Διευθύντρια Ερευνών του Τμήματος Μικροβιολογίας του ΕΙΠ Δρ. Καραγκούνη Ευδοκία και την ομάδα της, τη Δρ. Αγάλλου Μαρία, τη Δρ. Μαργαρώνη Μαρίτσα, τη Δρ. Τουμπανάκη Δήμητρα, τη Δρ. Ευσταθίου Αντωνία και τον Υποψήφιο Διδάκτορα Τζωρτζάτο Οδυσσέα, όσο και την Διευθύντρια Ερευνών του Τμήματος Μικροβιολογίας του ΕΙΠ Δρ. Μπολέτη Χαραλαμπία και τα μέλη της ομάδας της, τις Υποψήφιες Διαδακτορικούς Τζιουβάρα Ολύβια και Παπακωνσταντίνου Κατερίνα, που όλα αυτά τα χρόνια μοιραστήκαμε κοινούς χώρους εργασίας και περάσαμε ατελείωτες ώρες μαζί. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Διοικητικό Συμβούλιο του ΕΙΠ για τη μονοετή υποτροφία NOSTOS που μου χορηγήθηκε για την εκπόνηση της διατριβής μου, καθώς και το Διοικητικό και Τεχνικό Προσωπικό του ΕΙΠ για την αποτελεσματική υποστήριξή του.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή του Τμήματος της Φαρμακευτικής, του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων Ε.Κ.Π.Α., κ. Σκαλτσούνη Αλέξιο-Λέανδρο και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Χαλαμπαλάκη Μαρία, τόσο για την παραχώρηση των ουσιών της παρούσας διατριβής και την συμβολή τους στην ερευνητική

κατεύθυνση της διατριβής, όσο και για την εκπαίδευση που μου παρείχαν για το χρονικό διάστημα που εργάστηκα στο εργαστήριό τους. Επίσης, ευχαριστώ τους Διδάκτορες Παπαχριστοδούλου Αναστασία και Μπετεινάκη Σταύρο, για την πρακτική καθοδήγηση που μου προσέφεραν στο διάστημα αυτό.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τα μέλη της ορισθείσας επταμελούς επιτροπής, τον Επίκουρο Καθηγητή Ρούτσια Ιωάννη, του Τμήματος Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, τον Καθηγητή Παπαπαδόπουλο Ηλία του Τμήματος Κτηνιατρικής του ΑΠΘ, την Δρ. Σμυρλή Δέσποινα, Κύρια Ερευνήτρια του Τμήματος Μικροβιολογίας του ΕΙΠ και την Καθηγήτρια Μητάκου Σοφία, του Τμήματος Φαρμακευτικής Ε.Κ.Π.Α., οι οποίοι δέχτηκαν να αξιολογήσουν την παρούσα διατριβή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους σημαντικότερους ανθρώπους της ζωής μου, το σύντροφό μου Δημήτρη και την οικογένεια μου, για την αμέριστη κατανόηση και συμπαράσταση που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης του παρόντος εγχειρήματος.

Γεωργία Γώγου

Αθήνα, 2023

Περιεχόμενα

Στοιχεία διδακτορικής διατριβής.....	1
Περίληψη.....	3
Abstract.....	7
Ευχαριστίες.....	10
Περιεχόμενα.....	12
Ευρετήριο εικόνων και πινάκων.....	17
Κατάλογος εικόνων.....	18
Κατάλογος πινάκων.....	22
Συντμήσεις - Επεξήγηση ακρωνυμίων.....	23
1. Εισαγωγή.....	28
1.1 Η λεισμανίαση: γενικά στοιχεία και ιστορική αναδρομή.....	29
1.2 Το παράσιτο <i>Leishmania</i> spp.....	29
1.2.1 Ταξινόμηση και συστηματική κατάταξη.....	29
1.2.2 Μετάδοση του παρασίτου.....	30
1.2.3 Δομή και μορφολογία του παρασίτου.....	31
1.2.4 Βιολογικός κύκλος του παρασίτου.....	32
1.3 Επιδημιολογία και κλινικές μορφές της νόσου.....	34
1.3.1 Σπλαγχνική λεισμανίαση.....	36
1.3.2 Δερματική λεισμανίαση.....	37
1.3.3 Βλεννογονοδερματική λεισμανίαση.....	38
1.3.4 Συλλοιμώσεις.....	38
1.4 Γεωγραφική κατανομή της νόσου.....	39
1.5 Ανοσολογική απόκριση.....	40
1.6 Ο κυτταρικός θάνατος στους μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.....	45
1.7 Θεραπεία.....	48
1.7.1 Συμβατική αντιλεισμανιακή θεραπεία.....	48
1.7.2 Πρόσφατες εξελίξεις.....	51
1.7.2.1 Η ανοσοθεραπεία ως εναλλακτική προσέγγιση για τον έλεγχο της λεισμανίασης.....	51
1.7.2.2 Συνδυαστική χημειοθεραπεία.....	51
1.7.2.3 Φυσικά προϊόντα ως νέα υποσχόμενα φάρμακα.....	52

1.8 Ελαιόλαδο.....	53
1.8.1 Ιστορική αναδρομή - Γενικά στοιχεία.....	53
1.8.2 Παραγωγή και κατανάλωση.....	54
1.8.3 Κατηγορίες ελαιολάδου.....	56
1.8.3.1 Παρθένα ελαιόλαδα.....	56
1.8.3.2 Μη παρθένα ελαιόλαδα.....	57
1.8.4 Χημική σύσταση ελαιολάδου.....	57
1.8.5 Ελαιόλαδο και υγεία.....	58
1.8.6 Βιοφαινόλες / Πολυφαινόλες ελαιολάδου.....	59
1.8.6.1 Γενικά στοιχεία.....	59
1.8.6.2 Ταξινόμηση των βιοφαινολών του ελαιολάδου.....	60
1.8.6.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο.....	66
1.8.6.4 Βιοδιαθεσιμότητα και απορρόφηση βιοφαινολών στον ανθρώπινο οργανισμό.....	66
1.8.6.5 Γνωμοδότηση της Ευρωπαϊκής Επιτροπής Ασφάλειας Τροφίμων (EFSA) για τις βιοφαινόλες του ελαιολάδου.....	68
2. Σκοπός.....	69
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	72
3.1 Φυσικά προϊόντα	73
3.1.1 Εκχύλιση εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου.....	73
3.1.2 Ανάλυση και ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών των κλασμάτων.....	74
3.1.3 Απομονωμένες βιοφαινολικές ενώσεις ελαιολάδου και φάρμακα αναφοράς.....	75
3.2 Κυτταροκαλλιέργειες.....	76
3.2.1 <i>In vitro</i> καλλιέργειες των παρασίτων <i>Leishmania</i>	76
3.2.2 <i>In vitro</i> καλλιέργειες κυττάρων θηλαστικών.....	76
3.3 Διατήρηση και επανάκτηση μολυσματικής ικανότητας ευκαρυωτικών οργανισμών και θηλαστικών κυττάρων.....	77
3.3.1 Ενίσχυση της μολυσματικής ικανότητας του παρασίτου <i>Leishmania</i> spp. σε ζωικά μοντέλα.....	77
3.3.2 Μακροχρόνια συντήρηση του παρασίτου <i>Leishmania</i> spp. και κυττάρων θηλαστικών σε υγρό άζωτο.....	78
3.3.3 Ανάκτηση ευκαρυωτικών οργανισμών και θηλαστικών κυττάρων.....	78

3.4 <i>In vitro</i> μελέτη της κυτταρικής επιβίωσης / πολλαπλασιασμού στις προμαστιγωτές και αμαστιγωτές μορφές του γένους <i>Leishmania</i> με τη μέθοδο της ρεσαζουρίνης.....	79
3.4.1 Έλεγχος δραστηριότητας των βιοφαινολικών ενώσεων στην κυτταρική επιβίωση / πολλαπλασιασμό προμαστιγωτών <i>Leishmania</i>	79
3.4.2 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας σε μακροφάγα J774A.1.....	80
3.4.3 Έλεγχος δραστηριότητας των βιοφαινολών στην κυτταρική επιβίωση / πολλαπλασιασμό ενδοκυττάρων αμαστιγωτών <i>Leishmania</i>	81
3.5 Επιδράσεις των ολικών φαινολικών κλασμάτων στην κινητική ανάπτυξης των παρασίτων του γένους <i>Leishmania</i>	82
3.6 Ποσοτικός προσδιορισμός των παραγόμενων ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS - reactive oxygen species) από τη δράση των ολικών φαινολικών κλασμάτων σε προμαστιγώτες <i>Leishmania</i> spp.....	83
3.7 Προσδιορισμός επαγόμενου κυτταρικού θανάτου σε προμαστιγώτες του γένους <i>Leishmania</i> ύστερα από μονήρεις επιδράσεις με τα ολικά φαινολικά κλάσματα.....	83
3.8 <i>In situ</i> σήμανση κατακερματισμένων τμημάτων DNA μέσω της δοκιμασίας TUNEL σε προμαστιγώτες του γένους <i>Leishmania</i> ύστερα από επιδράσεις με ολικά φαινολικά κλάσματα.....	84
3.9 Απομόνωση DNA.....	85
3.10 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	86
3.11 <i>In vitro</i> αλληλεπίδραση των βιοφαινολών και της HePC σε παράσιτα του γένους <i>Leishmania</i>	86
3.11.1 Αξιολόγηση της συνδυαστικής αλληλεπίδρασης των βιοφαινολών με τη μιλτεφοσίνη, σε προμαστιγώτες <i>Leishmania</i>	86
3.11.2 Αξιολόγηση της συνδυαστικής αλληλεπίδρασης των βιοφαινολών με τη μιλτεφοσίνη, σε αμαστιγώτες <i>Leishmania</i>	88
3.11.3 Προσδιορισμός του δείκτη κλασματικής ανασταλτικής συγκέντρωσης και κατασκευή καμπύλης ισοβολογράμματος.....	88
3.11.4 Έλεγχος παραγωγής ROS από προμαστιγώτες του γένους <i>Leishmania</i> μετά από τη συνδυαστική επίδραση βιοφαινολών και μιλτεφοσίνης	89
3.12 Διερεύνηση των ανοσοτροποποιητικών ιδιοτήτων των βιοφαινολών στο <i>in vitro</i> σύστημα των μολυσμένων μακροφάγων.....	89
3.12.1 Απομόνωση RNA.....	89
3.12.2 Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time RT-PCR).	90
3.13 <i>In vivo</i> αξιολόγηση της αντιπαρασιτικής και ανοσοτροποποιητικής δράσης φυσικών προϊόντων σε ζωικά μοντέλα δερματικής λεισμανίασης.....	92
3.13.1 Πειραματικό πρωτόκολλο για την αξιολόγηση της θεραπευτικής δράσης της ολεοκανθάλης έναντι της δερματικής λεισμανίασης.....	92
3.13.2 Προσδιορισμός του παρασιτικού φορτίου σε ιγνυακούς λεμφαδένες με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων.....	94

3.14 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων και χρήση λογισμικών προγραμμάτων.....	95
4. Αποτελέσματα.....	96
4.1 Προέλευση και απομόνωση πολυφαινολικών κλασμάτων.....	97
4.2. Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των πολυφαινολικών κλασμάτων.....	97
4.3 Αξιολόγηση της <i>in vitro</i> αντιπαρασιτικής δράσης των βιοφαινολικών συστατικών του ελαιολάδου έναντι προμαστιγωτών και αμαστιγωτών μορφών του γένους <i>Leishmania</i>	99
4.3.1 Αξιολόγηση της αντιπαρασιτικής δραστηριότητας των βιοφαινολικών έναντι προμαστιγωτών μορφών του γένους <i>Leishmania</i>	99
4.3.2 Αξιολόγηση της αντιπαρασιτικής δραστηριότητας των βιοφαινολικών έναντι ενδοκυττάριων αμαστιγωτών μορφών του γένους <i>Leishmania</i>	102
4.3.3 Έλεγχος κυτταροτοξικής δράσης των βιοφαινολικών σε μακροφάγα της κυτταρικής σειράς J774A.1.....	105
4.4 Συγκριτική αξιολόγηση της αντιλεϊσμάνιακής δράσης των ολικών φαινολικών κλασμάτων.....	106
4.4.1 Ποσοτικός προσδιορισμός του ρυθμού ανάπτυξης των προμαστιγωτών του γένους <i>Leishmania</i> κατόπιν έκθεσής τους στα ολικά φαινολικά κλάσματα.....	106
4.4.2 Διερεύνηση του επαγόμενου κυτταρικού θανάτου σε παράσιτα του γένους <i>Leishmania</i>	108
4.4.3 Προσδιορισμός του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου μέσω ολιγονουκλεοσωμικού κατακερματισμού του DNA σε προμαστιγώτες του γένους <i>Leishmania</i>	110
4.4.4 Επίδραση των ολικών φαινολικών κλασμάτων στα επίπεδα των ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS - reactive oxygen species) σε προμαστιγώτες του γένους <i>Leishmania</i>	112
4.5 <i>In vitro</i> αξιολόγηση και ταξινόμηση του είδους της αλληλεπίδρασης των βιοφαινολικών με εμπορικά διαθέσιμο φάρμακο αναφοράς, σε προμαστιγώτες και αμαστιγώτες του γένους <i>Leishmania</i>	114
4.5.1 <i>In vitro</i> αξιολόγηση της συνδυαστικής αλληλεπίδρασης των βιοφαινολικών με το φάρμακο αναφοράς, σε προμαστιγώτες του γένους <i>Leishmania</i>	115
4.5.2 <i>In vitro</i> αξιολόγηση της συνδυαστικής αλληλεπίδρασης των βιοφαινολικών με το φάρμακο αναφοράς, σε ενδοκυττάριους αμαστιγώτες του γένους <i>Leishmania</i>	117
4.5.3 Επίδραση των συνδυαστικών αλληλεπιδράσεων των βιοφαινολικών με το φάρμακο αναφοράς, στα επίπεδα των ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) σε προμαστιγώτες του γένους <i>Leishmania</i>	119
4.6 Επίδραση της μονήρους δράσης των βιοφαινολικών, καθώς και της συνδυαστικής με HePC, στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων (mRNA) στο <i>in vitro</i> σύστημα <i>Leishmania</i> -μολυσμένων μακροφάγων.....	120
4.7 Αξιολόγηση της μονήρους και συνδυαστικής θεραπευτικής δράσης της ολεοκανθάλης σε <i>in vivo</i> πειραματικό μοντέλο δερματικής λεϊσμάνιασης.....	125
5. Συζήτηση.....	127

5.1 Προοπτικές εφαρμογής των βιοδραστικών συστατικών του ελαιόλαδου ως θεραπευτική προσέγγιση έναντι της λεισμανίασης.....	128
5.2 Παράγοντες βιολογικής αξίας ελαιόλαδου.....	130
5.3 <i>In vitro</i> αντιπολλαπλασιαστική, αντιλεισμανιακή και κυτταροτοξική δράση των βιοφαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου.....	131
5.4 <i>In vitro</i> επαγωγή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου σε προμαστιγώτες <i>Leishmania</i> spp.....	134
5.5 Συνδυαστική χημειοθεραπεία έναντι ενδοκυττάρων παρασίτων <i>Leishmania</i>	138
5.6 Μελέτη ανοσοτροποποιητικών ιδιοτήτων επιλεγμένων βιοφαινολών.....	143
5.7 Αξιολόγηση της θεραπευτικής συνδυαστικής δράσης HePC-OLEO σε <i>in vivo</i> πειραματικό μοντέλο ποντικού.....	147
6. Συμπεράσματα και πρωτοτυπία μελέτης.....	150
7. Βιβλιογραφία.....	153
Παράρτημα I.....	183
Παράρτημα II.....	185
Αντίγραφα δημοσιεύσεων.....	191
Βιογραφικό σημείωμα.....	211

Ευρετήριο εικόνων και πινάκων

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1.1. Αντιστράτηγος <i>Sir William Boog Leishman</i> (1865-1926) (αριστερά), Ταγματάρχη <i>Charles Donovan</i> (1863-1951) (κέντρο), <i>Sir Ronald Ross</i> (1857-1932) (δεξιά).....	29
Εικόνα 1.2. Συστηματική ταξινόμηση του παρασίτου <i>Leishmania</i> spp.....	30
Εικόνα 1.3. Θηλυκές σκνίπες του γένους <i>Phlebotomus</i> (αριστερά) και <i>Lutzomyia</i> (δεξιά).....	30
Εικόνα 1.4. Σχηματική αναπαράσταση των κύριων ενδοκυτταρικών οργανιδίων της προμαστιγωτής (αριστερά) και της αμαστιγωτής (δεξιά) μορφής των παρασίτων <i>Leishmania</i> spp.....	31
Εικόνα 1.5. Αναπτυξιακές μορφές του παρασίτου <i>Leishmania</i> spp.....	31
Εικόνα 1.6. Ο κύκλος ζωής του παρασίτου <i>Leishmania</i> spp. στον ενδιάμεσο ξενιστή.....	32
Εικόνα 1.7. Αναπαράσταση της αναπτυξιακής αλληλουχίας των κύριων μορφών του παρασίτου <i>Leishmania</i> spp. στην φλεβοτόμο.....	33
Εικόνα 1.8. Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης, όπου απεικονίζονται τα κύρια αναπτυξιακά στάδια του παρασίτου <i>Leishmania</i> spp.....	33
Εικόνα 1.9. Σχηματική αναπαράσταση του βιολογικού κύκλου του παρασίτου <i>Leishmania</i> spp.....	33
Εικόνα 1.10. Ηπατοσπληνομεγαλία σε ασθενή με σπλαγχνική λεισημανίαση.....	36
Εικόνα 1.11. Ασθενής με PKDL.....	37
Εικόνα 1.12. Απεικόνιση βλαβών κατά τη CL (αριστερά) και κατά την DCL (δεξιά)	37
Εικόνα 1.13. Ασθενής με MCL.....	38
Εικόνα 1.14. Χάρτες ενδημικότητας της δερματικής (Α) και της σπλαγχνικής (Β) λεισημανίασης σε παγκόσμια κλίμακα.....	40
Εικόνα 1.15. Η επίδραση της λοίμωξης από το παράσιτο <i>Leishmania</i> στη λειτουργική διαφοροποίηση των μακροφάγων.....	43
Εικόνα 1.16. Διάκριση μεταξύ απόπτωσης και νέκρωσης, με κριτήριο τις μορφολογικές αλλαγές.....	47
Εικόνα 1.17. Χημική δομή κλασσικών αντιλεισημανιακών φαρμάκων.....	48
Εικόνα 1.18. Χημική δομή των πιο πρόσφατων αντιλεισημανιακών φαρμάκων.....	50
Εικόνα 1.19. Βοτανική ταξινόμηση της ελιάς.....	53
Εικόνα 1.20. Οι βασικότερες ποικιλίες ελιάς στην Ελλάδα.....	55
Εικόνα 1.21. Οι βασικότερες ποικιλίες ελιάς στη λεκάνη της Μεσογείου, εξαιρουμένων των Ελληνικών.....	56
Εικόνα 1.22. Χημική σύσταση ελαιολάδου.....	58
Εικόνα 1.23. Χημική δομή τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης.....	61
Εικόνα 1.24. Αναπαράσταση των βασικών βιοσυνθετικών μονοπατιών για την παραγωγή ολεασεΐνης (OLEA) και ολεοκανθάλης (OLEO).....	62

Εικόνα 1.25. Χημική δομή ολεοκανθάλης και ιβουπροφαίνης.....	63
Εικόνα 1.26. Χημικές δομές φαινολικών οξέων.....	64
Εικόνα 1.27. Βασική δομή σκελετού των φλαβονοειδών και των κατηγοριών τους.....	64
Εικόνα 1.28. Χημική δομή βασικών λιγνάνων που ανιχνεύονται στο ελαιόλαδο.....	65
Εικόνα 1.29. Χημική δομή βασικών υδροξυ-ισοχρωματικών ενώσεων που ανιχνεύονται στο ελαιόλαδο.....	65
Εικόνα 1.30. Ευρωπαϊκή Επιτροπή Ασφάλειας Τροφίμων.....	68
Εικόνα 2.1. Γραφική απεικόνιση της πειραματικής πορείας της διδακτορικής διατριβής.....	70
Εικόνα 3.1. Καμπύλες βαθμονόμησης υδροξυτυροσόλης (HT) (0,5-100 µg/mL) και τυροσόλης (T) (0,5-100 µg/mL).....	74
Εικόνα 3.2. Καμπύλες βαθμονόμησης ολεασεΐνης (OLEA) (5-500 µg/mL) και ολεοκανθάλης (OLEO) (5-600 µg/mL).....	74
Εικόνα 3.3. Αιματοκυτταρόμετρο τύπου <i>Malassez</i> (αριστερά) και περιοχή καταμέτρησης κυττάρων (δεξιά).....	76
Εικόνα 3.4. <i>In vitro</i> έλεγχος της κυτταρικής επιβίωσης / πολλαπλασιασμού σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 96 επίπεδων φρεατίων με την μέθοδο της ρεσαζουρίνης.....	79
Εικόνα 3.5. Αναπαράσταση του τρόπου με τον οποίο τοποθετούνται οι συνδυασμοί στα <i>in vitro</i> πειραματικά πρωτόκολλα για τον προσδιορισμό του είδους των αλληλεπιδράσεων από τη συνδυαστική δράση φαρμάκων.....	86
Εικόνα 3.6. Σχηματική αναπαράσταση των ομάδων που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της παραγωγής ROS, ύστερα από τη μονήρη και τη συνδυαστική δράση ουσιών σε προμαστιγώτες του γένους <i>Leishmania</i>	89
Εικόνα 3.7. Σχηματική αναπαράσταση πειραματικού πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκε για την αξιολόγηση της θεραπευτικής δράσης της ολεοκανθάλης, σε <i>in vivo</i> πειραματικό μοντέλο δερματικής λεισμανίασης.....	93
Εικόνα 4.1. Χρωματογράφημα HPLC-DAD των αναλυόμενων εκχυλισμάτων ελαιόλαδου στα 280 nm.....	98
Εικόνα 4.2. Ανασταλτική δράση των ολικών φαινολικών κλασμάτων έναντι προμαστιγωτών μορφών <i>Leishmania spp</i>	100
Εικόνα 4.3. Ανασταλτική δράση απομονωμένων βιοφαινολικών ενώσεων έναντι προμαστιγωτών <i>Leishmania spp</i>	101
Εικόνα 4.4. Ανασταλτική δράση των ολικών φαινολικών κλασμάτων έναντι αμαστιγωτών <i>Leishmania spp</i>	103
Εικόνα 4.5. Ανασταλτική δράση απομονωμένων βιοφαινολικών ενώσεων έναντι αμαστιγωτών <i>Leishmania spp</i>	104
Εικόνα 4.6. Επίδραση των ολικών φαινολικών κλασμάτων στην κινητική ανάπτυξης του παρασίτου του γένους <i>Leishmania</i>	107
Εικόνα 4.7. Αλλαγές στην έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης σε προμαστιγώτες <i>Leishmania spp</i> . που δέχτηκαν επίδραση με τα TPF1 και TPF2, για 72 ώρες.....	109

Εικόνα 4.8. Αλλαγές στην έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης και στην ακεραιότητα της πλασματικής μεμβράνης σε προμαστιγώτες <i>Leishmania</i> spp. που έχουν επωαστεί με TPF1 και TPF2.....	110
Εικόνα 4.9. Κατακερματισμός του DNA σε προμαστιγώτες <i>L. infantum</i> και <i>L. major</i> ύστερα από 72 ώρες επώασης με TPF1 και TPF2 με τη δοκιμασία TUNEL.....	111
Εικόνα 4.10. Ποσοτικός προσδιορισμός ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS - reactive oxygen species) σε προμαστιγώτες του γένους <i>Leishmania</i> , εκθετικής φάσης ανάπτυξης, ύστερα από 72 ώρες επώασης με τα TPF1 και TPF2.....	113
Εικόνα 4.11. Αντιπροσωπευτικά ισοβολογράμματα της αλληλεπίδρασης της HePC με τα TPF1 και TPF2.....	115
Εικόνα 4.12. Αντιπροσωπευτικά ισοβολογράμματα της αλληλεπίδρασης της HePC με τις απομονωμένες βιοφαινολικές ενώσεις.....	116
Εικόνα 4.13. Αντιπροσωπευτικά ισοβολογράμματα της αλληλεπίδρασης της HePC με τα φυσικά προϊόντα TPF1, TPF2 και OLEO σε ενδοκυττάρους αμαστιγώτες.....	118
Εικόνα 4.14. Ενδοκυττάρια παραγωγή οξειδωτικών ριζών οξυγόνου (ROS) σε προμαστιγώτες <i>L. infantum</i> και <i>L. major</i> που δέχτηκαν τη συνδυαστική δράση ουσιών.....	119
Εικόνα 4.15. Σχετική έκφραση των mRNA Th2 κυτταροκινών (IL-10 και TGF-β), σε <i>L. infantum</i> - μολυσμένα μακροφάγα J774A.1 που δέχτηκαν τη μονήρη δράση των βιοφαινολικών ενώσεων TPF1, TPF2 και OLEO, καθώς και τη συνδυαστική αυτών με τη HePC.....	121
Εικόνα 4.16. Σχετική έκφραση των mRNA Th1 κυτταροκινών (iNOS, IL-1β και TNF-α), σε <i>L. infantum</i> - μολυσμένα μακροφάγα J774A.1 που δέχτηκαν τη μονήρη δράση των βιοφαινολικών ενώσεων TPF1, TPF2 και OLEO, καθώς και τη συνδυαστική αυτών με τη HePC.....	122
Εικόνα 4.17. Σχετική έκφραση των mRNA Th1 κυτταροκινών (iNOS, IL-1β και TNF-α), σε <i>L. major</i> - μολυσμένα μακροφάγα J774A.1 που δέχτηκαν τη μονήρη δράση των βιοφαινολικών ενώσεων TPF1, TPF2 και OLEO, καθώς και τη συνδυαστική αυτών με τη HePC.....	123
Εικόνα 4.18. Σχετική έκφραση των mRNA Th2 κυτταροκινών (IL-10 και TGF-β), σε <i>L. major</i> - μολυσμένα μακροφάγα J774A.1 που δέχτηκαν τη μονήρη δράση των βιοφαινολικών ενώσεων TPF1, TPF2 και OLEO, καθώς και τη συνδυαστική αυτών με τη HePC.....	124
Εικόνα 4.19. Εξέλιξη της βλάβης του πέλματος κατά τη διάρκεια της <i>in vivo</i> θεραπείας.....	125
Εικόνα 4.20. Προσδιορισμός παρασιτικού φορτίου μετά το πέρας της θεραπείας, σε ιγνυακούς λεμφαδένες, με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων.....	126
Εικόνα 5.1. Χημικές δομές των φαινολών που υπάρχουν στις ελιές και το ελαιόλαδο, αναπαράσταση της μετατροπής τους στις άγλυκες μορφές και η υδρόλυση σε τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη.....	130
Εικόνα 5.2. Σχηματική αναπαράσταση της λεισμανιοκτόνου δράσης των ολικών φαινολικών κλασμάτων και των απομονωμένων βιοφαινολικών ενώσεων.....	134
Εικόνα 5.3. Απεικόνιση της φύσης των αλληλεπιδράσεων στους προμαστιγώτες <i>Leishmania</i> spp.....	142

Εικόνα 5.4. Απεικόνιση της φύσης των αλληλεπιδράσεων στους ενδοκυττάρους αμαστιγώτες *Leishmania* spp.....143

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1. Επιδημιολογικά στοιχεία κλινικά σημαντικών ειδών <i>Leishmania</i>	35
Πίνακας 2. Βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά απόπτωσης και νέκρωσης.....	46
Πίνακας 3. Γεωγραφική κατανομή των υποειδών του γένους <i>Olea</i>	54
Πίνακας 4. Κορυφαίες συγκεντρώσεις (top concentrations) που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον προσδιορισμό της φύσης της αλληλεπίδρασης σε προμαστιγώτες <i>Leishmania</i> spp.....	87
Πίνακας 5. Κορυφαίες συγκεντρώσεις (top concentrations) που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον προσδιορισμό της φύσης της αλληλεπίδρασης σε αμαστιγώτες <i>Leishmania</i> spp.....	88
Πίνακας 6. Πειραματικές ομάδες για την αξιολόγηση της θεραπευτικής μονήρους και συνδυαστικής δράσης της ολεοκανθάλης έναντι της δερματικής λεισμανίασης.....	92
Πίνακας 7. Φαινολική σύνθεση των αναλυόμενων κλασμάτων TPF1 και TPF2.....	98
Πίνακας 8. Αντιπαρασιτική δράση βιοφαινολών και μιλτεφοσίνης έναντι των προμαστιγωτών <i>Leishmania</i> spp., εκθετικής φάσης ανάπτυξης.....	100
Πίνακας 9. Κυτταροτοξική και αντιπαρασιτική δράση βιοφαινολών και μιλτεφοσίνης έναντι αμαστιγωτών μορφών των παρασίτων <i>Leishmania</i> spp.....	105
Πίνακας 10. Αξιολόγηση της συνδυαστικής αλληλεπίδρασης σε προμαστιγώτες <i>Leishmania</i> spp.....	115
Πίνακας 11. Αξιολόγηση της συνδυαστικής αλληλεπίδρασης σε ενδοκυττάριους αμαστιγώτες <i>Leishmania</i> spp.....	117
Πίνακας 12. IC ₅₀ S, FICs και ΣFIC από τον συνδυασμό της HePC με το TPF1 έναντι των προμαστιγωτών μορφών <i>Leishmania</i> spp.....	186
Πίνακας 13. IC ₅₀ S, FICs και ΣFIC από τον συνδυασμό της HePC με το TPF2 έναντι των προμαστιγωτών μορφών <i>Leishmania</i> spp.....	186
Πίνακας 14. IC ₅₀ S, FICs και ΣFIC από τον συνδυασμό της HePC με την OLE έναντι των προμαστιγωτών μορφών <i>Leishmania</i> spp.....	187
Πίνακας 15. IC ₅₀ S, FICs και ΣFIC από τον συνδυασμό της HePC με την HT έναντι των προμαστιγωτών μορφών <i>Leishmania</i> spp.....	187
Πίνακας 16. IC ₅₀ S, FICs και ΣFIC από τον συνδυασμό της HePC με την OLEA έναντι των προμαστιγωτών μορφών <i>Leishmania</i> spp.....	188
Πίνακας 17. IC ₅₀ S, FICs και ΣFIC από τον συνδυασμό της HePC με την OLEO έναντι των προμαστιγωτών μορφών <i>Leishmania</i> spp.....	188
Πίνακας 18. IC ₅₀ S, FICs και ΣFIC από τον συνδυασμό της HePC με το TPF1 έναντι των ενδοκυτταρικά αμαστιγωτών μορφών <i>Leishmania</i> spp.....	189
Πίνακας 19. IC ₅₀ S, FICs και ΣFIC από τον συνδυασμό της HePC με το TPF2 έναντι των ενδοκυτταρικά αμαστιγωτών μορφών <i>Leishmania</i> spp.....	189
Πίνακας 20. IC ₅₀ S, FICs και ΣFIC από τον συνδυασμό της HePC με την OLEO έναντι των ενδοκυτταρικά αμαστιγωτών μορφών <i>Leishmania</i> spp.....	190

Συντμήσεις - Επεξήγηση ακρωνυμίων

ACD (accidental cell death):	Τυχαίος κυτταρικός θάνατος
ACN (acetonitrile):	Ακετονιτρίλιο
AmB (amphotericin B):	Αμφοτερικίνη Β
AVL (anthroponotic visceral leishmaniasis):	Ανθρωπονοτική σπλαγχνική λεισμανίαση
AVLE (<i>Aloe vera</i> leaf exudate):	Εξίδρωμα από τα φύλλα της <i>Aloe vera</i>
BSA (bovine serum albumin):	Αλβουμίνη από ορό βοοειδούς
CC₅₀ (cytotoxic concentration 50%):	Μέση κυτταροτοξική συγκέντρωση
dATP (deoxy-adenosine tri-phosphate):	Τριφωσφορική δεοξυαδενίνη
dCTP (deoxy-cytidine tri-phosphate):	Τριφωσφορική δεοξυκυτοσίνη
dGTP (deoxy-guanosine tri-phosphate):	Τριφωσφορική δεοξυγουανιδίνη
ddH₂O (double distilled water):	Δις απεσταγμένο ύδωρ
DNDi (Drugs for Neglected Diseases Initiative):	Πρωτοβουλία «Φάρμακα για Παραμελημένες Ασθένειες»
dNTP (deoxyribo-nucleotide tri-phosphate):	Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια
dTTP (deoxy-thymidine tri-phosphate):	Τριφωσφορική δεοξυθυμίνη
DCL (diffuse cutaneous leishmaniasis):	Διάχυτη δερματική λεισμανίαση
DMSO (dimethyl-sulfoxide):	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
DNA (deoxyribonucleic acid):	Δεοξυριβοζονουκλεϊκό οξύ
dUTP (deoxyuridine triphosphate):	Τριφωσφορική δεοξουριδίνη
EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid):	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
EFSA (European Food Safety Association):	Ευρωπαϊκή Επιτροπή Ασφάλειας Τροφίμων
ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay):	Ενζυμική ανοσοπροσρόφηση
EROSA (eugenol-rich essential oil from <i>Syzygium aromaticum</i>):	Αιθέριο έλαιο πλούσιο σε ευγενόλη από το <i>Syzygium aromaticum</i>
EtBr (ethidium bromide):	Βρωμιούχο αιθίδιο
EVOO (extra virgin olive oil):	Εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο
FACS (fluorescence activated cell sorting):	Κυτταρομετρία ροής
FAO (Food and Agriculture Organization):	Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας
FBS (fetus bovine serum):	Ορός εμβρύου βοοειδούς
FDA (The United States Food and Drug Administration):	Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ
FIC (fractional inhibitory concentration):	Κλασματική ανασταλτική συγκέντρωση

FICI (fractional inhibitory concentration index):	Δείκτης κλασματικής ανασταλτικής συγκέντρωσης
FITC (fluorescein isothiocyanate):	Ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη
GAPDH (glycer-aldehyde 3-phosphate dehydrogenase):	Δεϋδρογονάση της γλυκεραλδεϋδης της 3-φωσφατάσης
GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor):	Παράγοντας δημιουργίας αποικιών κοκκιοκυττάρων - μακροφάγων
GMP (good manufacturing practice):	Ορθή παρασκευαστική πρακτική
HAART (highly active antiretroviral therapy):	Υψηλής δραστικότητας αντιρετροϊκή θεραπεία
HePC (hexadecylphosphocholine):	Μιλτεφοσίνη (εξαδεκυλφωσφοχολίνη)
H₂DCFDA (2',7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate):	Διοξεική 2',7' διχλωροδιϋδροφθοροσκεΐνη
HIV (human immunodeficiency virus):	Ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας
HPLC-DAD (high performance liquid chromatography chromatography with diode-array detection):	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης σε σειρά με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων
HT (hydroxytyrosol):	Υδροξυτυροσόλη
IC₅₀ (inhibition concentration 50%):	Μέση ανασταλτική συγκέντρωση
IFN-γ (interferon-γ):	Ιντερφερόνη-γ
IL-1 (interleukin-1):	Ιντερλευκίνη-1
IL-1β (interleukin-1β):	Ιντερλευκίνη-1β
IL-2 (interleukin-2):	Ιντερλευκίνη-2
IL-4 (interleukin-4):	Ιντερλευκίνη-4
IL-10 (interleukin-10):	Ιντερλευκίνη-10
IL-12 (interleukin-12):	Ιντερλευκίνη-12
IL-13 (interleukin-13):	Ιντερλευκίνη-13
IL-17 (interleukin-17):	Ιντερλευκίνη-17
IL-23 (interleukin-23):	Ιντερλευκίνη-23
iNOS (inducible nitric oxide synthase):	Επαγόμενη συνθάση του NO
IOC (International Olive Council):	Διεθνές Συμβούλιο Ελιάς
i.v. (intravenously):	Ενδοφλέβια
LA (ligstroside aglycone):	Άγλυκο του λιγκστροσίδη
L-AmB (liposomal amphotericin B):	Λιποσωμιακή αμφοτερικίνη B

LCL (localized cutaneous leishmaniasis):	Τοπική δερματική λεισμανίαση
LPS (lipopolysaccharide):	Λιποπολυσακχαρίτης
MCL (mucocutaneous leishmaniasis):	Βλεννογονοδερματική λεισμανίαση
MD (Mediterranean diet):	Μεσογειακή διατροφή
MeOH (methanol):	Μεθανόλη
MHC-II (major histocompatibility complex II):	Μείζων σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας τάξης II
MLEE (multilocus enzyme electrophoresis):	Ισοενζυμική πολυεστιακή ηλεκτροφόρηση
mRNA (messenger RNA):	Αγγελιοφόρο RNA
MUFA (monounsaturated fatty acids):	Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα
NCCD (Nomenclature Committee on Cell Death):	Επιτροπή Ονοματολογίας Κυτταρικού θανάτου
NETs (neutrophil extracellular traps):	Εξωκυττάρια παγίδες ουδετερόφιλων
NK cells (natural killer cells):	Φυσικά κύτταρα φονείς
NO (Nitric oxide):	Μονοξείδιο του αζώτου
NPs (natural products):	Φυσικά προϊόντα
NTDs (neglected tropical diseases):	Παραμελημένες τροπικές ασθένειες
OD (optical density):	Οπτική απορρόφηση
OLE (oleuropein):	Ολευρωπεΐνη
OLEA (oleacein):	Ολεασεΐνη
OLEO (oleocanthal):	Ολεοκανθάλη
OO (olive oil):	Ελαιόλαδο
PCD (programmed cell death):	Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος
PCR (polymerase chain reaction):	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PI (propidium iodide):	Ιωδιούχο προπίδιο
PKDL (post-kala-azar dermal leishmaniasis):	Μετά-Καλαζάρ δερματική λεισμανίαση
PMM (paromomycin):	Παρομομυκίνη
p.o. (per os):	Από το στόμα
RNA (ribonucleic acid):	Ριβονουκλεϊκό οξύ
RNS (reactive nitrogen species):	Ενεργές ρίζες αζώτου
ROS (reactive oxygen species):	Ενεργές ρίζες οξυγόνου

RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction):	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής
s.c (subcutaneously):	Υποδόρια
SD (standard deviation):	Τυπική απόκλιση
SDS (sodium dodecyl sulfate):	Δωδεκανικό θειικό νάτριο
SI (selectivity index):	Δείκτης εκλεκτικότητας
T (tyrosol):	Τυροσόλη
TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase):	τελική δεοξυνουκλεοτιδυλτρανσφεράση
TGF-β (transforming growth factor-β):	Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β
Th1/2 (T-helper cells type 1 and 2):	T βοηθητικά κύτταρα τύπου 1 και 2
TLR (Toll-like receptor):	Υποδοχείς τύπου Toll
TNF-α (tumor necrosis factor-α):	Παράγοντας νέκρωσης όγκων α
TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase TdT-mediated dUTP Nick end labeling):	Τελική επισήμανση dUTP με τη μεσολάβηση της δεοξυνουκλεοτιδυλτρανσφεράσης (TdT)
WHO (Π.Ο.Υ.):	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
ZVL (zoonotic visceral leishmaniasis):	Ζωονοσογόνος σπλαγχνική λεισμανίαση

1. Εισαγωγή

1.1 Η λεισμανίαση: γενικά στοιχεία και ιστορική αναδρομή

Η λεισμανίαση αποτελεί σύμπλεγμα λοιμωδών νοσημάτων, που προκαλείται από ενδοκυτταρικά πρωτόζωα του γένους *Leishmania*, τα οποία προσβάλλουν τον άνθρωπο και άλλα θηλαστικά, μέσω του δήγματος θηλυκών εντόμων (σκνιπών) (Steverding 2017). Παρότι η νόσος έχει μακρά ιστορία, που χρονολογείται στο 2500 π.Χ., η ταυτοποίηση τόσο των παρασίτων *Leishmania*, ως αιτιολογικοί παράγοντες της νόσου, όσο και των σκνιπών, ως



Εικόνα 1.1. Αντιστράτηγος *Sir William Boog Leishman* (1865-1926). Σκωτσέζος Παθολόγος και ιατρός του βρετανικού στρατού (αριστερά). Ταγματάρχης *Charles Donovan* (1863-1951). Ιρλανδός ιατρός που επιτέλεσε καθηγητής φυσιολογίας στο πανεπιστήμιο του Μαντράς (κέντρο). *Sir Ronald Ross* (1857-1932). Βρετανός ιατρός που έλαβε το Νόμπελ Φυσιολογίας ή Ιατρικής το 1902 για το έργο του στον προσδιορισμό του τρόπου μετάδοσης της ελονοσίας (δεξιά) (τροποποίηση από: Steverding et al. 2017).

φορείς μετάδοσής της, ξεκίνησε στις αρχές του 20^{ου} αιώνα (Akhoundi et al. 2016). Το 1903, ο *William Boog Leishman* και ο *Charles Donovan* (Εικόνα 1.1), παρατήρησαν ταυτόχρονα και ανεξάρτητα, ωοειδείς σχηματισμούς σε επιχρίσματα σπληνών ασθενών από την Ινδία με κοινή συμπτωματολογία (απώλεια βάρους, πυρετό, σπληνομεγαλία). Λίγο αργότερα, στο τέλος του 1904, ο *Ronald Ross*

(Εικόνα 1.1), ταυτοποίησε τα σωματίδια αυτά ως ένα νέο είδος παρασίτου, στο οποίο δόθηκε το όνομα *Leishmania donovani*, προς τιμήν των *Leishman* και *Donovan* (Gibson 1983; Herwaldt 1999; Sasidharan and Prakash Saudagar 2021; Steverding 2017). Η λεισμανίαση, ως ζωοανθρωπονόσος και ανθρωπονόσος, εξακολουθεί να αποτελεί σοβαρό παρασιτικό νόσημα. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (Π.Ο.Υ.) τη χαρακτηρίζει ως μία παραμελημένη τροπική ασθένεια (neglected tropical disease, NTD) με υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα, καθώς 700.000 έως 1,2 εκατομμύρια νέα κρούσματα αναφέρονται ετησίως σε παγκόσμια κλίμακα (WHO 2022).

1.2 Το παράσιτο *Leishmania spp.*

1.2.1 Ταξινόμηση και συστηματική κατάταξη

Τα παράσιτα του γένους *Leishmania* ανήκουν στην τάξη των κινητοπλαστοειδών (Kinetoplastida) και στην οικογένεια των τρυπανοσωματιδών (Trypanosomatidae) (Εικόνα 1.2) (García-Almagro 2005; Sharma and Singh 2008). Η συστηματική ταξινόμηση του παρασίτου έχει υποστεί συχνές μεταβολές και αναπροσαρμογές. Παλαιότερα, η διάκριση των ειδών γινόταν με βιολογικά και οικολογικά κριτήρια, αλλά με την πάροδο του χρόνου τα

κριτήρια αυτά αντικαταστάθηκαν από άλλα, όπως οι πολυμορφισμοί του κινητοπλαστικού DNA, οι πρωτεΐνες και τα αντιγόνα του παρασίτου (Barker and Butcher 1983; Lukeš et al. 2007; Schönian et al. 2008). Η ισοενζυμική πολυεστιακή ηλεκτροφόρηση (multilocus enzyme electrophoresis, MLEE) αποτελεί τεχνική αναφοράς για την ταυτοποίηση του παρασίτου σε επίπεδο είδους, με κριτήριο την ύπαρξη χαρακτηριστικών ισοενζυμικών μορφών

Βασίλειο	• Πρώτιστα (Protista)
Υποβασίλειο	• Πρωτόζωα (Protozoa)
Συνομοταξία	• Σαρκομαστιγοφόρα (Sarcomastigophora)
Υποσυνομοταξία	• Μαστιγοφόρα (Mastigophora)
Κλάση	• Ζωομαστιγοφόρα (Zoomastigophora)
Τάξη	• Κινητοπλαστοειδή (Kinetoplastida)
Υπόταξη	• Τρυπανοσωματινές (Trypanosomatina)
Οικογένεια	• Τρυπανοσωματινίδες (Trypanosomatidae)
Γένος	• Λεισμάνια (Leishmania)

Εικόνα 1.2. Συστηματική ταξινόμηση του παρασίτου *Leishmania spp.* (τροποποίηση από: García-Almagro 2005).

(ζυμοδέματα) μεταξύ 12 ενζύμων (Hommel 1999; Rioux et al. 1990). Σύμφωνα, με τις τρέχουσες φυλογενετικές αναλύσεις, το γένος *Leishmania* αποτελείται από τα ακόλουθα τέσσερα διακριτά υπογένη: *Leishmania*, *Vianna*, *Mundinia* και *Sauroleishmania* (Akhoundi et al. 2016; Bañuls, Hide, and Prugnolle 2007; Klatt et al. 2019). Μέχρι σήμερα έχουν

περιγραφεί 53 είδη *Leishmania*, από τα οποία τα 31 παρασιτούν σε θηλαστικά, ενώ τουλάχιστον 20 είναι παθογόνα για τον άνθρωπο (Akhoundi et al. 2016).

1.2.2 Μετάδοση του παρασίτου

Τα παράσιτα του γένους *Leishmania* μεταδίδονται στους τελικούς σπονδυλωτούς ξενιστές μέσω του δήγματος αίματος μολυσμένων θηλυκών εντόμων (σκνιπών), τα οποία αποτελούν τους ενδιάμεσους ξενιστές (Εικόνα 1.3) (Bates 2007). Οι σκνίπες ανήκουν στην τάξη των Δίπτερων και στην οικογένεια των Ψυχοειδών (Akhoundi et al. 2016; Sharma and Singh 2008). Η μετάδοση της νόσου μέσω άλλων οδών, όπως μέσω κοινής χρήσης μολυσμένων βελόνων, μέσω μετάγγισης αίματος,



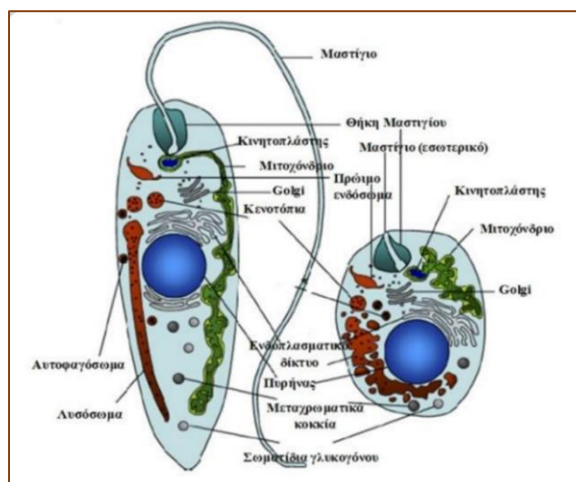
Εικόνα 1.3. Θηλυκές σκνίπες του γένους *Phlebotomus* (αριστερά) και *Lutzomyia* (δεξιά) (τροποποίηση από: Sharma et al. 2008).

μεταμόσχευσης ή από τη μολυσμένη μητέρα στο έμβρυο διαμέσου του διαπλακουντιακού φραγμού, αναφέρονται σπάνια (Mescouto-Borges et al. 2013). Οι κύριοι ξενιστές του παρασίτου είναι τα σκυλιά, τα τρωκτικά και οι άνθρωποι, ανάλογα με το είδος του παρασίτου, το γένος του ενδιάμεσου ξενιστή και τη γεωγραφική περιοχή (Arenas et al. 2017;

Millán, Ferroglia, and Solano-Gallego 2014). Το παράσιτο μεταδίδεται παγκοσμίως από περισσότερα από 90 διαφορετικά είδη θηλυκών σκνιπών, που είναι εξαπλωμένες σε τουλάχιστον 98 χώρες και τέσσερις ηπείρους (Samaranayake 2020).

1.2.3 Δομή και μορφολογία του παρασίτου

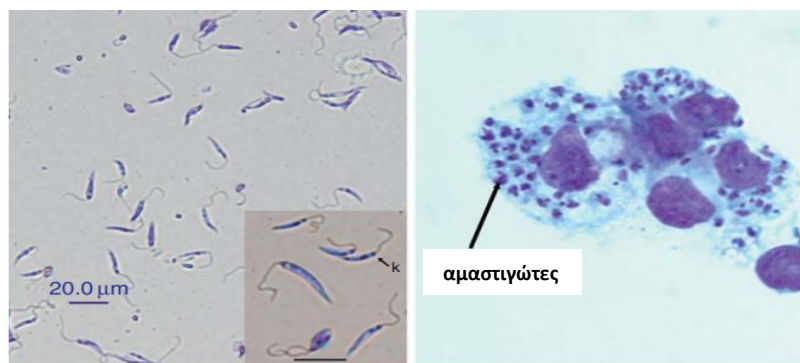
Το παράσιτο του γένους *Leishmania* εμφανίζει δύο διακριτές αναπτυξιακές μορφές, την προμαστιγωτή, η οποία εντοπίζεται στον πεπτικό σωλήνα της φλεβοτόμου (ενδιάμεσος



Εικόνα 1.4. Σχηματική αναπαράσταση των κύριων ενδοκυτταρικών οργανιδίων της προμαστιγωτής (αριστερά) και της αμαστιγωτής (δεξιά) μορφής των παρασίτων *Leishmania* spp. (προσαρμοσμένη απεικόνιση από Besteiro et al. 2007).

ξενιστής) και την αμαστιγωτή, η οποία αποτελεί υποχρεωτικό ενδοκυτταρικό παράσιτο στα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα των θηλαστικών (τελικός ξενιστής) (Εικόνα 1.5) (Orgen and Melby 2009; Rodrigues, Godinho, and de Souza 2014). Οι προμαστιγώτες είναι λεπτά, επιμήκη κύτταρα, με αναδύμενο μαστίγιο και πρόσθιο κινητοπλάστη, μία ραβδοειδή δομή μεταξύ πυρήνα και μαστιγίου (Εικόνα 1.4). Έχουν συνήθως σχήμα ατρακτοειδές και μέγεθος που κυμαίνεται από 15-20 μm σε μήκος και 1,5-3,5 μm σε

πλάτος. Το μαστίγιο, μεγέθους 15 έως 28 μm, εκφύεται από το πρόσθιο άκρο του κυτταρικού σώματος και αποτελεί ένα σημαντικό οργανίδιο κίνησης και προσκόλλησης στο μεσέντερο της φλεβοτόμου (Herwaldt 1999; Thakur, Joshi, and Kaur 2020). Οι αμαστιγώτες είναι ωοειδή κύτταρα και το μέγεθός τους κυμαίνεται από 2 έως 4 μm σε διάμετρο. Διαθέτουν πυρήνα και κινητοπλάστη, ενώ το μαστίγιο δεν είναι ορατό με κοινό μικροσκόπιο, καθώς δεν εκτείνεται

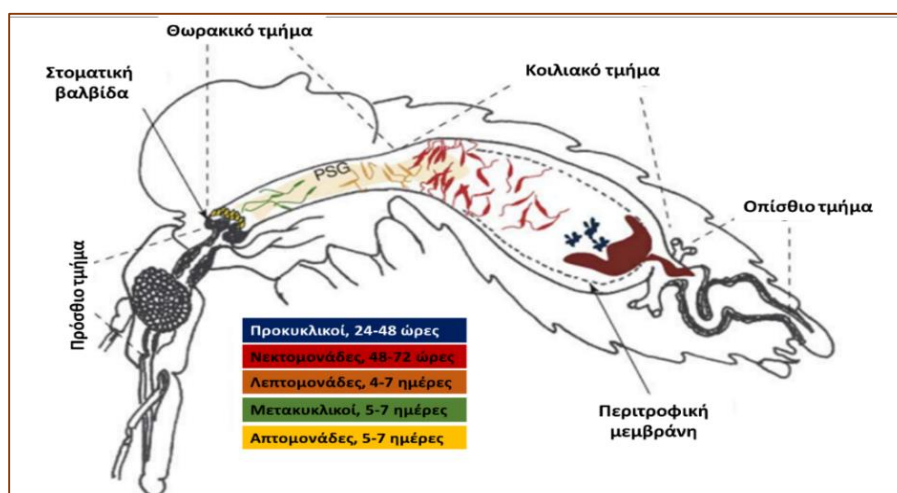


Εικόνα 1.5. Αναπτυξιακές μορφές του παρασίτου *Leishmania* spp. Αριστερά απεικονίζονται οι προμαστιγώτες μορφές και το βέλος προσδιορίζει τον κινητοπλάστη, ενώ δεξιά απεικονίζονται οι αμαστιγώτες μορφές που έχουν εισέλθει σε κύτταρα θηλαστικών (τροποποίηση από: Orgen et al. 2009).

πέρα από το κυτταρικό όριο (θύλακα) (Εικόνα 1.4) (Bates 2009; Besteiro et al. 2007; Herwaldt 1999; Orgen and Melby 2009; Rodrigues et al. 2014; Sunter and Gull 2017; Thakur et al. 2020). Η γενική δομή και σύσταση και των δύο αναπτυξιακών μορφών είναι όμοια. Τα παράσιτα, και στις δύο τους μορφές, ως ευκαρυωτικοί οργανισμοί εμφανίζουν πυρήνα με πυρηνικό φάκελο, έξω από τον οποίο εντοπίζεται το ενδοπλασματικό δίκτυο. Επίσης, ο κινητοπλάστης αποτελεί ένα από τα πιο χαρακτηριστικά οργανίδια των παρασίτων του γένους *Leishmania*, το οποίο έχει λειτουργίες ανάλογες του μιτοχονδρίου και περιέχει κινητοπλαστικό DNA (Bates 2009; Sunter and Gull 2017).

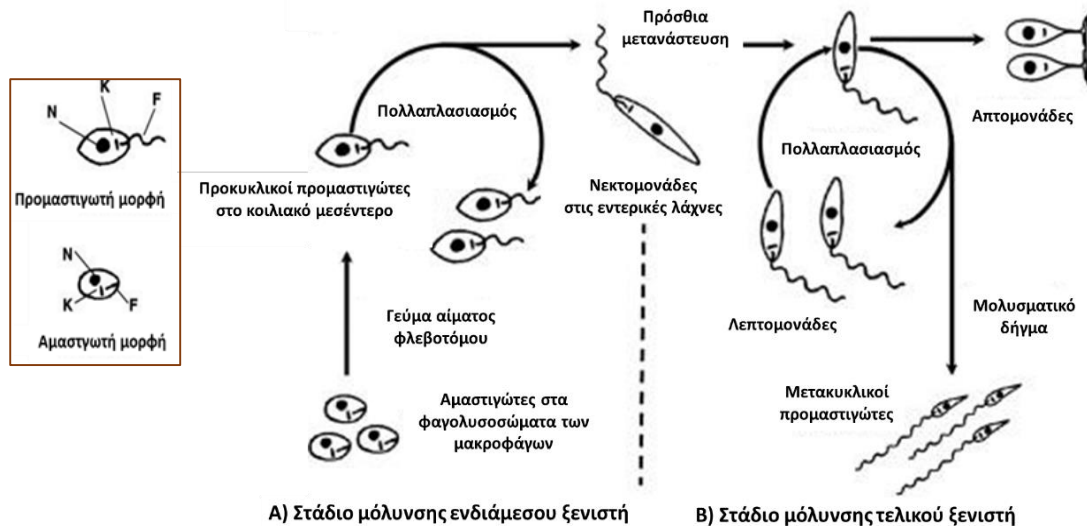
1.2.4 Βιολογικός κύκλος του παρασίτου

Τα παράσιτα του γένους *Leishmania* εμφανίζουν έναν εναλλασσόμενο διμορφικό κύκλο ζωής (Sunter and Gull 2017). Έξω από τον τελικό ξενιστή, το παράσιτο επιβιώνει στον πεπτικό σωλήνα των φλεβοτόμων (ενδιάμεσοι ξενιστές) (Bañuls et al. 2007; Besteiro et al. 2007). Καθώς η θηλυκή φλεβοτόμος απομυζεί μολυσμένο αίμα, οι αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου περνούν στο οπίσθιο τμήμα του μεσεντέρου της (Kamhawi 2006). Στη συνέχεια, τα παράσιτα μεταναστεύουν στο πρόσθιο μεσέντερο και υφίστανται πληθώρα



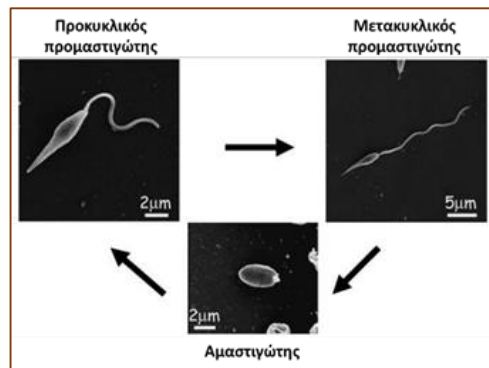
Εικόνα 1.6: Ο κύκλος ζωής του παρασίτου *Leishmania* spp. στον ενδιάμεσο ξενιστή. Απεικόνιση της χρονοεξαρθρωμένης εμφάνισης των διακριτών μορφολογικών σταδίων των προμαστιγωτών στο μεσέντερο της σκνίπας (τροποποίηση από: Kamhawi 2006).

μετασηματισμών και διαφοροποιήσεων κατά τη διαδικασία της μετακυκλογένεσης, με στόχο τη διασφάλιση της επιβίωσής τους (Bates 2009; Orgen and Melby 2009). Ειδικότερα, οι αμαστιγώτες διαφοροποιούνται αρχικά σε προκυκλικές προμαστιγωτές μορφές, οι οποίες έχουν μικρό μέγεθος, κοντό μαστίγιο και αργό ρυθμό ανάπτυξης (Εικόνα 1.6). Τρεις με τέσσερις ημέρες από τη μόλυνση της φλεβοτόμου, τα παράσιτα διαφοροποιούνται στις



Εικόνα 1.7. Αναπαράσταση της αναπτυξιακής αλληλουχίας των κύριων μορφών του παρασίτου *Leishmania* spp. στην φλεβοτόμο. Και οι δύο κύριες αναπτυξιακές μορφές του παρασίτου φέρουν πυρήνα (N), κινητοπλάστη (K) και μαστίγιο (F) (τροποποίηση από: Bates 2007).

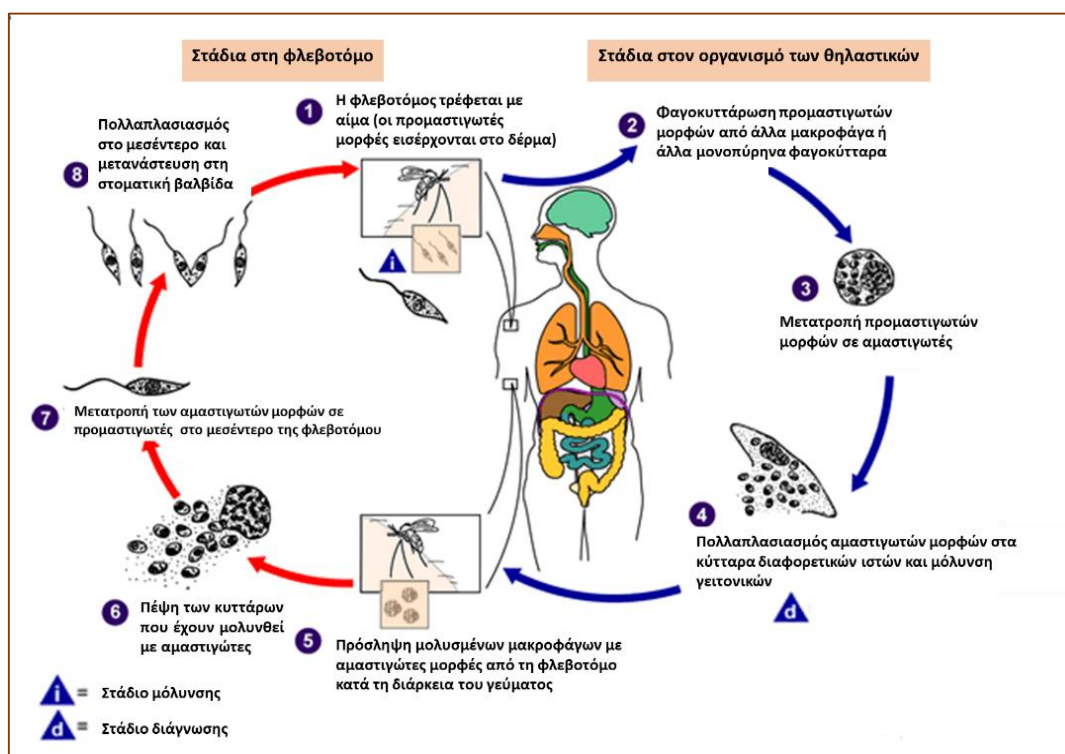
επιμήκεις και λεπτές νεκτομονάδες, οι οποίες εντοπίζονται στο θωρακικό τμήμα του πεπτικού συστήματος της φλεβοτόμου, και μεταμορφώνονται περαιτέρω στις λεπτομονάδες (Εικόνα 1.7) (Bates 2007; Kamhawi 2006). Στη συνέχεια, οι λεπτομονάδες μεταμορφώνονται σε απτομονάδες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από μικρό μαστίγιο και έλλειψη κινητικότητας



Εικόνα 1.8. Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης, όπου απεικονίζονται τα κύρια αναπτυξιακά στάδια του παρασίτου *Leishmania* spp. (τροποποίηση από: Besteiro et al. 2007).

και στις μετακυκλικές προμαστιγωτές μορφές, που αποτελούν τη μολυσματική μορφή για τους τελικούς ξενιστές (Εικόνα 1.8) (Bates 2007; Gossage, Rogers, and Bates 2003). Κύρια χαρακτηριστικά των μορφών αυτών είναι το μικρό κυτταρικό σώμα, το επίμηκες μαστίγιο και η έντονη κινητικότητα. Ακολούθως, η μολυσμένη φλεβοτόμος κατά την αναζήτηση ενός νέου γεύματος αίματος, ενοφθαλμίζει τις μετακυκλικές προμαστιγωτές μορφές στο δέρμα

του τελικού ξενιστή. Τα μολυσματικά παράσιτα διαπερνούν τον επιδερμικό φραγμό, φαγοκυτταρώνονται από τα μακροφάγα, και μεταμορφώνονται σε αμαστιγωτές μορφές, όπου εντοπίζονται στο φαγολυσόσωμα και πολλαπλασιάζονται με τελικό αποτέλεσμα τη ρήξη των κυττάρων (Εικόνα 1.9) (Bates 2007; CDC 2020; Gossage et al. 2003; Hommel 1999; Kamhawi 2006; Sunter and Gull 2017).



Εικόνα 1.9 Σχηματική αναπαράσταση του βιολογικού κύκλου του παρασίτου *Leishmania* spp. (τροποποίηση από: CDC 2020).

1.3 Επιδημιολογία και κλινικές μορφές της νόσου

Η λεισμανίαση ανήκει παγκοσμίως στις αναδυόμενες τροπικές ασθένειες μαζί με την ελονοσία, την αφρικανική τρυπανοσωμίαση (γνωστή και ως ασθένεια του ύπνου) και την ασθένεια *Chagas*, ενώ ταυτόχρονα έχει χαρακτηριστεί ως η «νόσος των φτωχότερων» (Brindha, Balamurali, and Chanda 2021; Sasidharan and Prakash Saudagar 2021). Επί του παρόντος, 98 χώρες αναφέρονται ως ενδημικές, και τα πρόσφατα δεδομένα κάνουν αναφορά για περισσότερες από 12 εκατομμύρια περιπτώσεις παγκοσμίως, με 1,5 - 2 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις να προστίθενται στον αριθμό αυτό ετησίως (WHO 2022). Η πλειονότητα των λοιμώξεων εμφανίζεται στις χώρες του Παλαιού Κόσμου (Ευρασία και Αφρική), και προκαλούνται κυρίως από τα στελέχη *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica* και *L. donovani*. Αντιθέτως, τα είδη του υπογένους *Viannia*, είναι αποκλειστικά ενδημικά στον Νέο Κόσμο (Αμερική), με τις κοινές λοιμώξεις να προκαλούνται από τα *L. braziliensis*, *L. panamensis* και *L. guyanensis* (Hartley et al. 2014).

Η λεισμανίαση χαρακτηρίζεται από ποικιλομορφία και πολυπλοκότητα και παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων, το οποίο εξαρτάται τόσο από το είδος του παρασίτου, όσο και από την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή. Ωστόσο, η νόσος εμφανίζει

τρεις κύριες κλινικές μορφές: τη σπλαγχνική (visceral leishmaniasis, VL), τη δερματική (cutaneous leishmaniasis, CL), και τη βλεννογονοδερματική (mucocutaneous leishmaniasis, MCL). Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι ένα συγκεκριμένο είδος παρασίτου *Leishmania* μπορεί να ευθύνεται για διάφορες κλινικές μορφές της νόσου (Πίνακας 1) (Grevelink, Lemer, and Boston 1996; McGwire and Satoskar 2014; WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniases. 2010).

Στην Ελλάδα, τα τελευταία χρόνια η εμφάνιση της νόσου είναι σχετικά σταθερή με μικρές διακυμάνσεις. Σημειώνονται κατά μέσο όρο 0,36 νέα περιστατικά ανά 100.000 κατοίκους ετησίως, και σχεδόν τα μισά από τα αναφερόμενα κρούσματα VL αφορούν στην Αττική (Boutsini et al. 2017; Ιλιουρούλου et al. 2018). Παρόλα αυτά, η ύπαρξη ασυμπτωματικών λοιμώξεων, τόσο στον σκύλο όσο και στον άνθρωπο, είναι γεγονός και καταδεικνύει ότι γνωρίζουμε μόνο «την κορυφή του παγόβουνου» σχετικά με τον επιπολασμό των λεισμανιάσεων στην χώρα μας (Leontides et al. 2002; Papadopoulou et al. 2005; Sideris et al. 1996, 1999). Πρόσφατες μελέτες επιβεβαιώνουν την αναγκαιότητα της συνεχούς επιτήρησης

Πίνακας 1. Επιδημιολογικά στοιχεία κλινικά σημαντικών ειδών *Leishmania* (τροποποίηση από: Burza et al. 2018 και Reithinger et al. 2007).

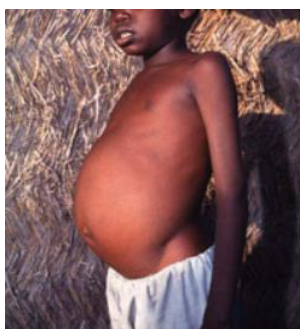
Παράσιτα	Κλινικές μορφές	Ενδιάμεσος ξενιστής	Τελικός ξενιστής	Γεωγραφική κατανομή
Παλιός Κόσμος, υπογένης <i>Leishmania</i>				
<i>L. major</i>	CL	<i>Phlebotomus papatasi</i>	Τρωκτικά	Ιράν, Σαουδική Αραβία, Βόρεια και Δυτική Αφρική, Μέση Ανατολή, Κεντρική Ασία
<i>L. tropica</i>	CL, σπάνια VL	<i>P. sergenti</i>	Άνθρωποι, σκύλοι και τρωκτικά	Ανατολική Μεσόγειος, Μέση Ανατολή, Βορειοανατολική και Νότια Αφρική
<i>L. aethiopia</i>	CL, DCL	<i>P. pedifer</i> <i>P. longipes</i>	Ύραξ (Hygaxes: <i>Proclavia capensis</i> και <i>Heterohyax brucei</i>)	Αιθιοπία και Κένυα
<i>L. infantum</i>	VL, CL	<i>P. perniciosus</i> <i>P. ariasi</i> <i>P. tobii</i> <i>P. langeroni</i>	Άνθρωποι, σκύλοι και λαγοί	Κίνα, Νότια Ευρώπη, Βραζιλία και Νότια Αμερική για VL και CL και Κεντρική Αμερική για CL
<i>L. donovani</i>	VL, PKDL	<i>P. argentipes</i> <i>P. orientalis</i> <i>P. martini</i>	Άνθρωποι	Ινδία, Μπαγκλαντές, Αιθιοπία, Σουδάν
Νέος Κόσμος, υπογένης <i>Leishmania</i>				
<i>L. mexicana</i>	CL, DCL	<i>Lutzomyia olmeca olmeca</i> <i>Lu. cruciata</i>	Τρωκτικά και μαρσιτοφόρα	Νότια Αμερική
<i>L. amazonensis</i>	CL, DCL	<i>Lu. faviscutellata</i>	Τρωκτικά και οπόσσομ	Νότια Αμερική
<i>L. chagasi</i>	VL, CL	<i>Lu. longipalpis</i>	Σκυλιά και αλεπούδες	Νότια Αμερική (Βραζιλία, Βενεζουέλα, Μεξικό)
Νέος Κόσμος, υπογένης <i>Vianna</i>				
<i>L. braziliensis</i>	CL, DCL, MCL	<i>Lutzomyia</i> spp., <i>Psychodopygus wellcomei</i>	Σκύλοι, άνθρωποι, τρωκτικά και άλογα	Νότια Αμερική
<i>L. panamensis</i>	CL, MCL	<i>Lu. trapidoi</i> <i>Lu. ylephiletor</i>	Βραδύποδες (<i>Choloerpus hoffmani</i>)	Παναμάς, Κόστα Ρίκα, Κολομβία
<i>L. guyanensis</i>	CL, MCL	<i>Lu. umbratilis</i>	Βραδύποδες (<i>Choloerpus didactylus</i>), μυρμηγκοφάγοι και οπόσσομ	Νότια Αμερική (Γουιάνα, Σουρινάμ, Βόρεια λεκάνη του Αμαζονίου)

του νοσήματος, ώστε με προνοητικότητα να σχεδιαστούν στοχευμένες παρεμβάσεις ελέγχου τόσο της επιζωοτίας της νόσου, όσο και των πιθανά εισαγόμενων νέων ειδών (Morales-Yuste, Martín-Sánchez, and Corpas-Lopez 2022).

1.3.1 Σπλαγχνική λεισμανίαση

Η σπλαγχνική λεισμανίαση (visceral leishmaniasis, VL), γνωστή επίσης και ως Καλαζάρ («μαύρος πυρετός»), αποτελεί την πιο σοβαρή εκδήλωση της νόσου. Οι κύριοι αιτιολογικοί παράγοντες της σπλαγχνικής λεισμανίασης είναι τα είδη του συμπλέγματος *L. donovani* (*L. donovani*, *L. Infantum* / *L. chagasi*) (Burza, Croft, and Boelaert 2018; van Griensven and Diro 2012, 2019; McGwire and Satoskar 2014). Η ανθρωπονοτική σπλαγχνική λεισμανίαση (anthroponotic visceral leishmaniasis, AVL), προκαλείται κατά κύριο λόγο από το *L. donovani* σε χώρες του Παλαιού Κόσμου (Ανατολική Αφρική και τη Μέση Ανατολή), ενώ η ζωοανθρωπονοτική (zoonotic visceral leishmaniasis, ZVL), μεταδίδεται μεταξύ ανθρώπων και άλλων θηλαστικών, όπως οι σκύλοι, μέσω των *L. donovani*, *L. infantum* και *L. archibaldi*, σε χώρες του Παλαιού και του Νέου Κόσμου (Ανατολική Αφρική, Νότια Αμερική, λεκάνη της Μεσογείου και Νότια Ασία) (Bi et al. 2018).

Τα παράσιτα αποικίζουν σε εσωτερικά όργανα του ξενιστή, κυρίως στον σπλήνα, στο ήπαρ και στον μυελό των οστών (Burza et al. 2018). Η νόσος μπορεί να είναι οξεία, υποξεία ή χρόνια. Ο χρόνος επώασης του παρασίτου κυμαίνεται από 2 εβδομάδες έως 36 μήνες και οι συνήθεις εκδηλώσεις περιλαμβάνουν παρατεταμένο εμπύρετο, κόπωση, καχεξία, ανορεξία,



Εικόνα 1.10: Ηπατοσπληνομεγαλία σε ασθενή με σπλαγχνική λεισμανίαση (τροποποίηση από: WHO, 2022).

ηπατομεγαλία, σπληνομεγαλία, πανκυτταροπενία και λεμφαδενοπάθεια (Εικόνα 1.10). Η κλινική διάγνωση της VL είναι δύσκολη, καθώς η συμπτωματολογία μοιάζει με κοινές λοιμώξεις, όπως ο τυφοειδής πυρετός, η φυματίωση, η βρουκέλλωση και η ελονοσία, αλλά και με ορισμένες αιματολογικές κακοήθειες (Arenas et al. 2017; Chappuis et al. 2007; Guerin et al. 2002; Safavi, Eshaghi, and Hajihassani 2020). Η VL, αν δεν αντιμετωπιστεί έγκαιρα και ορθά, μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο με

ποσοστό θνησιμότητας έως 95% (Ready 2014). Ο θάνατος επέρχεται συνήθως σε διάστημα 2 ετών και οφείλεται σε δευτερογενείς βακτηριακές λοιμώξεις ή σε σοβαρή αναιμία. Εκτιμάται ότι 50.000 έως 90.000 νέες περιπτώσεις VL παρουσιάζονται σε παγκόσμιο επίπεδο ετησίως, με μόνο το 25 έως 45% των περιστατικών να αναφέρεται στον Π.Ο.Υ.

Η δερματική λεισμανίαση μετά από σπλαγχνική (post kala-azar dermal leishmaniasis, PKDL), θεωρείται ανοσολογικά επακόλουθη της σπλαγχνικής και είναι ως επί το πλείστον ανθρωπονοτική με αιτιολογικό παράγοντα το είδος *L. donovani* (Εικόνα 1.11) (Antinori et al. 2007). Η μορφή αυτή παρατηρείται στο 10% περίπου των ασθενών που έχουν λάβει επιτυχώς θεραπεία κατά της VL, και έχουν παραμείνει ασυμπτωματικοί για μήνες έως και χρόνια (Antinori et al. 2007; Hartley et al. 2014; McGwire and Satoskar 2014; Zijlstra E E, Musa A M, Khalil E A G, Hassan I M El 2003).



Εικόνα 1.11: Ασθενής με PKDL (τροποποίηση από: E E Zijlstra et al. 2003).

1.3.2 Δερματική λεισμανίαση

Η δερματική λεισμανίαση (cutaneous leishmaniasis, CL) αποτελεί την πιο κοινή και λιγότερο σοβαρή μορφή της νόσου, η οποία υπολογίζεται ότι επηρεάζει 600.000 έως 1 εκατομμύριο ανθρώπους ετησίως, σε παγκόσμιο επίπεδο (WHO 2022). Η δερματική λεισμανίαση προκαλείται κυρίως από τα είδη *L. major*, *L. tropica* και *L. aethiopicum* στις χώρες του Παλαιού Κόσμου και *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (Viannia) panamensis* και *L. (Viannia) braziliensis* στις χώρες του Νέου Κόσμου (Dowlati 1996; Gurel, Tekin, and Uzun 2019; Reithinger et al. 2007).

Η CL συνήθως εκδηλώνεται με μεμονωμένες δερματικές βλάβες στο σημείο δήγματος της φλεβοτόμου (localized cutaneous leishmaniasis, LCL), σε εκτεθειμένο σημείο του σώματος, όπως το κεφάλι ή τα άκρα (Εικόνα 1.12). Οι πληγές ποικίλλουν από μικρές αυτοϊάσιμες ελκώσεις έως κοκκιοματώδη οζίδια και μεγάλες ερυθματώδεις πληγές. Ωστόσο, ανάλογα με το είδος του παρασίτου, υπολογίζεται ότι έως και το 10% των περιπτώσεων δερματικής λεισμανίασης εξελίσσονται σε μη ιάσιμες εκδηλώσεις (Burza et al. 2018; Hartley et al. 2014; Heras-Mosteiro et al. 2017). Η διάχυτη δερματική λεισμανίαση (diffuse cutaneous leishmaniasis, DCL) αποτελεί μια σπάνια μορφή δερματικής λεισμανίασης που



Εικόνα 1.12: Απεικόνιση βλαβών κατά τη CL (αριστερά) και κατά την DCL (δεξιά) (τροποποίηση από: McGwire et al. 2014).

χαρακτηρίζεται από πολυάριθμες και διάχυτες δερματικές βλάβες (Εικόνα 1.12) (McGwire and Satoskar 2014; Rodrigues et al. 2014).

1.3.3 Βλεννογονοδερματική λεισμανίαση

Η βλεννογονοδερματική λεισμανίαση (mucocutaneous leishmaniasis, MCL), χαρακτηρίζεται από την καθυστερημένη ανάπτυξη μεταστατικών πληγών και την καταστροφή του βλεννογόνου του στόματος, της ρινικής κοιλότητας, του φάρυγγα και του λάρυγγα (Εικόνα 1.13). Προκαλείται από τα είδη *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* και *L. panamensis* (Abadías-Granado et al. 2021; David and Craft 2009). Η MCL δεν είναι αυτοϊάσιμη και εάν δε ληφθεί άμεσα αγωγή οδηγεί σε εκτεταμένες παραμορφωτικές αλλοιώσεις, που οδηγούν σε επώδυνες χειρουργικές παρεμβάσεις, ως αποτέλεσμα της χρόνιας τοπικής ιστικής καταστροφής (Burza et al. 2018; WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis. 2010).



Εικόνα 1.13: Ασθενής με MCL (τροποποίηση από: McGwire et al. 2014).

1.3.4 Συλλοιμώξεις

Η λεισμανίαση θεωρείται «ευκαιριακή» λοίμωξη στους ασθενείς που έχουν μολυνθεί από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (human immunodeficiency virus, HIV). Υπολογίζεται ότι περίπου 36,9 εκατομμύρια άνθρωποι έχουν μολυνθεί με τον HIV και 2 εκατομμύρια νέες μολύνσεις αναφέρονται ετησίως (Lindoso et al. 2016; Oryan and Akbari 2016). Στις αρχές του 1990 παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των κρουσμάτων λεισμανίασης παγκοσμίως, κάτι το οποίο αποδόθηκε στην επέκταση της συλλοιμώξης HIV/Leishmania (Mansueto et al. 2014). Το 2021 καταγράφηκαν περιστατικά συλλοιμώξης σε 45 χώρες, κυρίως στη Βραζιλία, την Αιθιοπία και την πολιτεία Μπιχάρ της Ινδίας (WHO 2022). Η συλλοιμώξη HIV/*L. infantum* αποτελεί την πιο συχνή λοίμωξη σε ενδημικές περιοχές, λόγω της γεωγραφικής εξάπλωσης και κατανομής των διαφόρων ειδών *Leishmania* spp. Παρόλα αυτά, αναφέρονται και περιπτώσεις συλλοιμώξης με στελέχη CL (Okwor and Uzonna 2013). Οι δύο μικροοργανισμοί φαίνεται να έχουν αμφίδρομη σχέση, καθώς η λοίμωξη από τον ιό HIV αυξάνει δραματικά τον κίνδυνο εμφάνισης VL και ομοίως, η μόλυνση μονοκυττάρων από *Leishmania* προάγει την αναπαραγωγή του HIV (Okwor and Uzonna 2013; Thakur et al. 2020). Ωστόσο, από τα τέλη της δεκαετίας του 1990, ο αριθμός νέων κρουσμάτων συλλοιμώξης άρχισε να μειώνεται σημαντικά, ιδιαίτερα στο μεγαλύτερο μέρος της Ν. Ευρώπης, κυρίως λόγω της πρόσβασης σε υψηλής δραστηριότητας αντιρετροϊκή θεραπεία (highly active

antiretroviral therapy, HAART) (Alvar et al. 2008; Van Griensven et al. 2014; Lindoso et al. 2016; Monge-Maillo et al. 2014; Oryan and Akbari 2016).

1.4 Γεωγραφική κατανομή της νόσου

Η εξάπλωση της νόσου εντοπίζεται σε όλες τις ηπείρους, εκτός της Ανταρκτικής και της Αυστραλίας, ενώ οι περισσότερες ενδημικές περιοχές είναι τροπικές και υποτροπικές. Η λεισμανίαση αναφέρεται ως ενδημική σε 98 χώρες παγκοσμίως, κυρίως στη Νότια Ευρώπη, τη Κεντρική και Νότια Αμερική, την Αφρική, τη Μέση Ανατολή και τη Νότια Ασία, εκ των οποίων οι 72 κατηγοριοποιούνται ως αναπτυσσόμενες (Εικόνα 1.14) (Sasidharan and Prakash Saudagar 2021). Επιπλέον, παρατηρείται εξάπλωση της κατανομής της νόσου σε γεωγραφικές περιοχές, όπου οι ενδιάμεσοι ξενιστές απουσιάζουν, κυρίως λόγω ανθρωπογενών αιτιολογικών παραγόντων, όπως οι μετακινήσεις πληθυσμών (μετανάστευση, τουρισμός, εμπορικές δραστηριότητες), ή η αποψίλωση δασικών εκτάσεων (Alvar, Yactayo, and Bern 2006; Okwor and Uzonna 2016). Επιπρόσθετα, η δραματική κλιματική αλλαγή που εξελίσσεται ραγδαία επιφέρει αλλαγές στους φορείς και τους τελικούς ξενιστές, αλλάζοντας την κατανομή τους και επηρεάζοντας την επιβίωση και το μέγεθος του πληθυσμού τους (WHO 2022).

Από το 2018 έως και σήμερα, σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ., το 94% των συνολικών κρουσμάτων λεισμανίασης έχει σημειωθεί σε έξι κυρίως χώρες: στη Βραζιλία, στην Ινδία, στην Κένυα, στη Σομαλία, στην Αιθιοπία και στο Σουδάν (Sasidharan and Prakash Saudagar 2021). Η σπλαγχνική μορφή της νόσου εμφανίζεται κυρίως στην Ινδία, στο Νεπάλ, στο Σουδάν και στο Μπαγκλαντές μεταξύ των χωρών του Παλαιού Κόσμου, ενώ στο Νέο Κόσμο, η Βραζιλία αντιπροσωπεύει έως και το 97% των περιπτώσεων VL στην Αμερική (Sasidharan and Prakash Saudagar 2021; WHO 2022). Αντίστοιχα, το Αφγανιστάν, το Ιράν, η Συρία, η Σαουδική Αραβία, το Περού και η Βραζιλία, αποτελούν τις κύριες χώρες επικράτησης της CL, καθώς εκεί καταγράφεται το 91% όλων των κρουσμάτων δερματικής λεισμανίασης (Sasidharan and Prakash Saudagar 2021). Στην περίπτωση της MCL, η πλειοψηφία των κρουσμάτων (> 90%) εντοπίζεται στη Βολιβία, στη Βραζιλία, στην Αιθιοπία και στο Περού (Sasidharan and Prakash Saudagar 2021; WHO 2022).

Όσον αφορά στην Ελλάδα, τα πρώτα συμπτώματα που προσομοίαζαν με VL αναφέρθηκαν το 1835 στις Σπέτσες (Tzani et al. 2021), ενώ η πρώτη επίσημη καταγραφή VL εντοπίζεται στο 1907. Η Ελλάδα αποτελεί ενδημική περιοχή με υψηλή συχνότητα εμφάνισης κυρίως στον σκύλο (Christodoulou et al. 2012). Η VL είναι ενδημική στον ελλαδικό χώρο με το στέλεχος *L. infantum* να είναι παρόν σε όλες σχεδόν τις γεωγραφικές περιοχές της χώρας. Περιστατικά

CL αναφέρονται σπάνια, με το *L. tropica* να εντοπίζεται κυρίως στα νησιά του Ιονίου και στην Κρήτη (Christodoulou et al. 2012; Ntais et al. 2013; Theocharidou et al. 2019).



Εικόνα 1.14: Χάρτες ενδημικότητας της δερματικής (A) και της σπλαγγνικής (B) λεισμανιάσης, σε παγκόσμια κλίμακα (τροποποίηση από: WHO 2022).

1.5 Ανοσολογική απόκριση

Μετά τη φυσική μόλυνση και την είσοδο των προμαστιγωτών από το «γεύμα αίματος» των φλεβοτόμων, ξεκινά άμεσα ο «αγώνας επιβίωσης» του παρασίτου ενάντια στην έμφυτη και την προσαρμοστική άμυνα του ξενιστή. Τα παράσιτα έχουν αναπτύξει πολύπλοκες οδούς διαφυγής από την άμυνα του ξενιστή και αυτό περιλαμβάνει τόσο την φαγοκυττάρωση από κύτταρα της φυσικής / έμφυτης ανοσίας (Courret et al. 2002; Gueirard et al. 2008), όσο και την ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος (Domínguez et al. 2002). Ταυτόχρονα η διαβίωση του παρασίτου στο εσωτερικό του μακροφάγου, ως υποχρεωτικά ενδοκυτταρικού παθογόνου, είναι ο πλέον ασφαλής τρόπος διαφυγής του από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, όπου εξασφαλίζει τη διαθεσιμότητα απαραίτητων θρεπτικών συστατικών αναγκών για τον πολλαπλασιασμό του (Hartley et al. 2014).

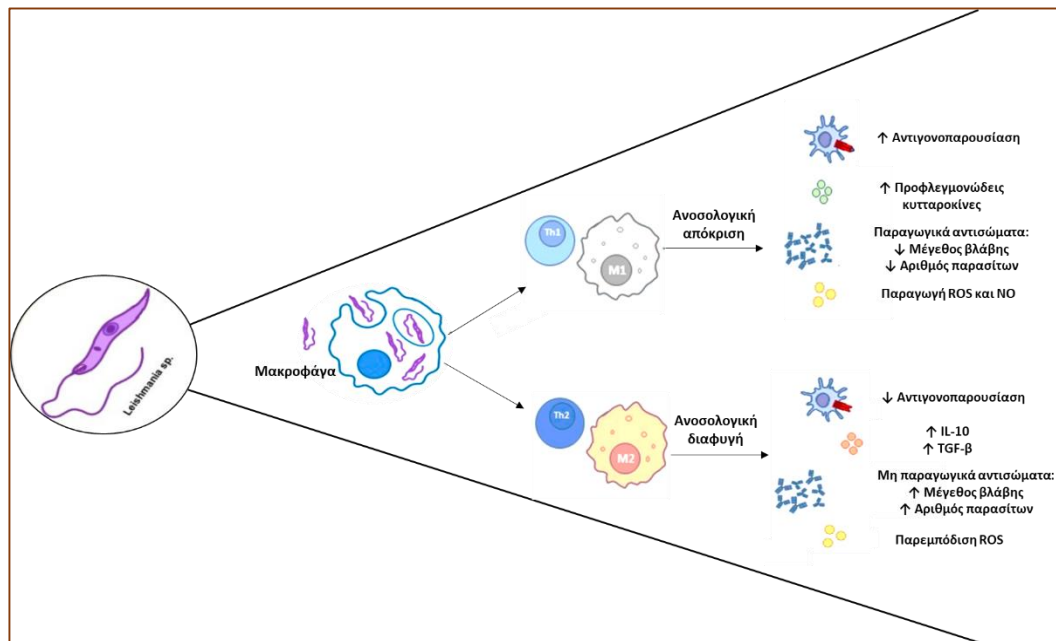
Τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα αποτελούν πρωταγωνιστές κατά την έναρξη της λοίμωξης, ενώ στη συνέχεια εμπλέκεται ένας σημαντικός αριθμός άλλων κυττάρων, όπως τα δενδριτικά κύτταρα (ΔΚ, dendritic cells - DCs), τα κύτταρα «φονείς» (natural killer - NK), τα CD4+ και CD8+ Τ λεμφοκύτταρα, καθώς και πλήθος δραστικών μορίων, όπως οι κυτταροκίνες ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) και ιντερλευκίνη-12 (IL-12). Ειδικότερα, τα ουδετερόφιλα αποτελούν μία από τις αρχικές κυτταρικές ομάδες που στρατολογούνται στο σημείο της μόλυνσης και πιστεύεται ότι συμμετέχουν στον περιορισμό των παρασίτων μέσω της εξώθησης εξωκυττάρων παγίδων (neutrophil extracellular traps, NETs). Ωστόσο, καθώς έχουν πολύ μικρή διάρκεια ζωής χρησιμεύουν κυρίως ως ενδιάμεσα κύτταρα-ξενιστές λειτουργώντας ως «δούρειοι ίπποι» που χρησιμοποιούνται από τα παράσιτα προκειμένου να εισέλθουν σιωπηλά στα μακροφάγα και να επιτύχουν τον πολλαπλασιασμό τους, αποφεύγοντας έτσι την κυτταρική ενεργοποίηση (Liu and Uzonna 2012; Nylen and Gautam 2010).

Τα μακροφάγα, τα κύρια φαγοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην εγκατάσταση και την εξέλιξη της νόσου, καθώς δρουν έχοντας διπλό ρόλο, τόσο ως ξενιστές για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του παρασίτου στο εσωτερικό του φαγοκυτταρικού συστήματος, όσο και ως αποτελεσματικά κύτταρα για την εξάλειψή του (Ikeogu et al. 2020). Μεταξύ των μηχανισμών ελέγχου και καταστροφής του παρασίτου *Leishmania* στο εσωτερικό των μακροφάγων, συγκαταλέγεται η παραγωγή των ενεργών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) και αζώτου (reactive nitrogen species, RNS) κατά την οξειδωτική έκρηξη της φαγοκυττάρωσης που ακολουθεί την ενεργοποίησή τους από την ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) (Rossi and Fasel 2018). Παρότι τα ROS αποτελούν μικροβιοκτόνα μόρια, η αναπνευστική έκρηξη που συμβαίνει στα μη-ενεργοποιημένα μακροφάγα μετά την φαγοκυττάρωση και συνεπώς τη σχετική ενεργοποίησή τους, δεν είναι ικανή να αποτρέψει την επιβίωση του παρασίτου και αυτό φαίνεται να οφείλεται στην αναστολή της παραγωγής ROS στα φαγοκυτταρικά (Novais et al. 2014). Το μονοξείδιο του αζώτου (NO), είναι επίσης, ένας σημαντικός αντιμικροβιακός δραστικός παράγοντας, η παραγωγή του οποίου καταλύεται από την επαγόμενη συνθάση NO (iNOS ή NOS2). Ταυτόχρονα, το NO είναι ικανό να εμποδίσει την περιττή ιστική βλάβη τερματίζοντας τη στρατολόγηση φαγοκυττάρων που προέρχονται από μονοκύτταρα της περιφέρειας. Τα ενδοκυττάρια παθογόνα, όπως το *L. major*, μπορούν να «εκβιάσουν» (hijack) αυτά τα κύτταρα ως ένας τρόπος για εγκατάσταση και πολλαπλασιασμό. Έτσι, το NO μπορεί να επηρεάσει θετικά τη μείωση της βλάβης περιορίζοντας τη διαθεσιμότητα των κυττάρων της ιστικής θέσης που απαιτείται για αποτελεσματικό πολλαπλασιασμό παθογόνων σε άλλα κύτταρα. Ο ερευνητής *Formaglio* και οι συνεργάτες του σε πρόσφατη δημοσίευση με την

χρήση μαθηματικών μοντέλων και μικροσκοπίας φωτονίων (intravital 2-photon biosensors), έδειξαν ότι ο χαμηλός πολλαπλασιασμός των *L. major* δεν οφείλεται στην άμεση επίδραση του NO στο παράσιτο, αλλά στην ελάττωση της στρατολόγησης και της διαθεσιμότητας κυττάρων-ξενιστών που θα επέτρεπαν τον πολλαπλασιασμό του (Formaglio et al. 2021). Συνεπώς, το NO φαίνεται να εκπληρώνει δύο διακριτές λειτουργίες για τον περιορισμό της δερματικής βλάβης με το στέλεχος *L. major*: α) επιτρέπει την άμεση καταστροφή του παρασίτου και β) περιορίζει την προσέλκυση στην περιοχή της βλάβης κυττάρων που επιτρέπουν τον πολλαπλασιασμό του.

Ο κυτταρικός πληθυσμός των μακροφάγων χαρακτηρίζεται από πλαστικότητα, καθώς είναι ικανά να μεταβάλουν τον φαινότυπό τους ως απόκριση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα, με μία περίπλοκη διαδικασία που περιγράφεται ως πόλωση (Tomiotto-Pellissier et al. 2018). Ο ρόλος των υποπληθυσμών των μακροφάγων (M1 και M2) στη μόλυνση από *Leishmania* είναι καθοριστικός για την κατανόηση της παθογένειας της λεισμανίασης, της αποτελεσματικότητας των ανοσοθεραπευτικών παρεμβάσεων / εμβολίων και της ανοσοτροποποιητικής δράσης φαρμάκων. Τα μακροφάγα βρίσκονται σε κατάσταση «ηρεμίας» (M0) όταν δεν έχουν δεχτεί συγκεκριμένη διέγερση (σήματα) στο μικρο-περιβάλλον τους. Ανάλογα των σημάτων που θα δεχτούν ενεργοποιούνται προς δύο λειτουργικά διακριτούς υποπληθυσμούς με χαρακτηριστικούς φαινότυπους, τα «κλασικά ενεργοποιημένα» M1 ή τα «εναλλακτικά ενεργοποιημένα» M2 μακροφάγα (Εικόνα 1.15) (Costa-Da-silva et al. 2022). Η ενεργοποίηση των M1 μακροφάγων από τα Th1 λεμφοκύτταρα που παράγουν IFN-γ και παράγοντα νέκρωσης όγκου- άλφα (TNF-α), είναι ζωτικής σημασίας για την εξάλειψη αυτού του ενδοκυτταρικού παρασίτου (Εικόνα 1.15) (Scott and Novais 2016; Srivastava et al. 2016; Zanlucchi 2015). Αντιθέτως, η ενεργοποίηση των Th2 (T helper 2) λεμφοκυττάρων τα οποία παράγουν IL-4 και IL-13 κυτταροκίνες, επάγει τον υποπληθυσμό M2 που χαρακτηρίζεται από βιοσύνθεση πολυαμίνης μέσω της ενεργοποίησης του ενζύμου αργινάση, καθώς και την παραγωγή ουρίας και L-ορνιθίνης που αποτελούν σημαντικά συστατικά για την ενδοκυτταρική ανάπτυξη των αμαστιγωτών μορφών στα μολυσμένα μακροφάγα και κατά συνέπεια στην εξέλιξη της νόσου (Εικόνα 1.15) (Duque and Descoteaux 2014; Muxel et al. 2018). Παρά τη διακριτή πόλωση των δύο υποπληθυσμών, μια συνολική ανασκόπηση σχετικών ερευνητικών αποτελεσμάτων συγκλίνουν στο ότι είναι απαραίτητη μια ισορροπία μεταξύ μιας ισχυρής μικροβιοκτόνου απόκρισης των M1 μακροφάγων και μιας κατάλληλης ρύθμισης των M2 μακροφάγων για την εγκατάσταση προστατευτικής ανοσολογικής απόκρισης κατά της λεισμανίασης (Tomiotto-Pellissier et al. 2018).

Τα ΔΚ, ως τα κατ' εξοχήν αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, παίζουν ουσιαστικό ρόλο στην έναρξη και στη ρύθμιση αποτελεσματικών ανοσολογικών αποκρίσεων, διότι σε συνδυασμό με τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II (MHC-II) και με την σύμπραξη συν-διεγερτικών μορίων, μεταναστεύουν στους λεμφαδένες και επάγουν την ενεργοποίηση των αποτελεσματικών Th1 (T helper 1) κυττάρων μέσω της παραγωγής κυτταροκινών, όπως η IL-12 και η IL-27 (Collin and Bigley 2018; Jafarzadeh et al. 2020).



Εικόνα 1.15: Η επίδραση της λοίμωξης από το παράσιτο *Leishmania* στη λειτουργική διαφοροποίηση των μακροφάγων (τροποποίηση από: Costa-Da-silva et al. 2022).

Τα κύτταρα της προσαρμοστικής ανοσολογικής απόκρισης, που αντιπροσωπεύονται από Β-κύτταρα και Τ-κύτταρα, είναι πολύ σημαντικά για τον προσδιορισμό της πορείας της λοίμωξης στις ποικίλες κλινικές εκδηλώσεις της νόσου. Το είδος του παρασίτου *Leishmania* και το ανοσολογικό υπόβαθρο του ξενιστή διαμορφώνουν την παραγωγή κυτταροκινών κατά τη διάρκεια έναρξης της έμφυτης ανοσοαπόκρισης, η οποία ακολούθως ρυθμίζει την επαγωγή της επίκτητης / προσαρμοστικής ανοσίας. Τις τελευταίες τέσσερις δεκαετίες η έρευνα για την ανοσολογία της λεισμανίασης ευνοήθηκε από την ανάπτυξη πειραματικών *in vivo* μοντέλων, τα οποία αναπαράγουν αρκετά επιτυχώς τις κλινικές μορφές της νόσου στον άνθρωπο. Βασικά ζώα εργαστηρίου, όπως οι αιμομικτικές σειρές ποντικών που η γονιδιακή δομή τους προσδιορίζει την ευαισθησία (π.χ. BALB/c) ή την ανθεκτικότητά (π.χ. C57BL/6) τους έναντι της λεισμανίασης, καθώς και τα τρωκτικά *golden hamster* ή *Syrian hamster* (*Mesocricetus auratus*), έχουν χρησιμοποιηθεί στις πειραματικές μολύνσεις με στελέχη του παρασίτου (Dores Moreira et al. 2016; Loria-Cervera and Andrade-Narváez 2014).

Στην περίπτωση της δερματικής λεισμανίασης, η επαγωγή των πρώτων προσαρμοστικών ανοσοαποκρίσεων στο δέρμα είναι κρίσιμη για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των ανοσολογικών αντιδράσεων που θα οδηγήσουν είτε στην αυτοθεραπεία, είτε σε χρόνιο γενικευμένο δερματικό νόσημα. Από την δεκαετία του 1980, πειραματικές λοιμώξεις σε διάφορα στελέχη ποντικών έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των παραγόντων που προωθούν τη διαφορική ανάπτυξη των Th1 και Th2 υποπληθυσμών, καθώς η Th1/Th2 πόλωση είναι χαρακτηριστική για την ανοχή ή την ευαισθησία αντίστοιχα έναντι της νόσου. Η πόλωση αυτή είναι ξεκάθαρη στη δερματική λεισμανίαση, όπου παρατηρούνται γενετικά ανθεκτικές φυλές ποντικών (π.χ. C57BL/6) που αναπτύσσουν Th1 απόκριση και γενετικά ευαίσθητες (π.χ. BALB/c) που αναπτύσσουν Th2 απόκριση, αντίστοιχα (Mosmann T., Cherwinski H., Bond M., Giedlin M. 1986). Αυτά τα πειραματικά συστήματα επέτρεψαν την ταυτοποίηση πολλών υποπληθυσμών των CD4+ T κυττάρων, καθώς και την περιγραφή των γενετικών μηχανισμών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της προσαρμοστικής ανοσίας έναντι της νόσου (Alexander and Brombacher 2012). Επιπλέον, υπάρχουν ερευνητικά αποτελέσματα τα οποία δείχνουν ότι και τα CD8+ T κύτταρα συμμετέχουν στην προστασία και στα δύο βασικά πειραματικά μοντέλα της δερματικής και σπλαγχνικής μορφής της νόσου (Gautam et al. 2014; Kaushal et al. 2014; Tsagosis, Karagouni, and Dotsika 2003).

Αντίστοιχα, στη σπλαγχνική λεισμανίαση που αποτελεί την πιο σοβαρή μορφή της νόσου, το ανοσολογικό σύστημα αδυνατεί να καταστρέψει και να απομακρύνει το παράσιτο, προκαλώντας στον σπλήνα χρόνια λοίμωξη με χαρακτηριστική ανοσοπαθολογία, ενώ στο ήπαρ η λοίμωξη αυτοπεριορίζεται από τα CD4+/CD8+ T κύτταρα, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό κοκκιωμάτων (Kaye et al. 2004). Η πειραματική σπλαγχνική λεισμανίαση στο μοντέλο του ποντικού χαρακτηρίζεται από τη μεσολάβηση ΔΚ που παράγουν IL-12 και IL-23 και συμβάλουν στην επαγωγή CD4+ Th1 και CD4+Th17 κυττάρων. Στη συνέχεια, τα εν λόγω κύτταρα παράγουν τις κυτταροκίνες IFN- γ , TNF ή IL-17 ικανές να μεγιστοποιήσουν την παραγωγή NO και ROS των μακροφάγων, και παράλληλα διαφοροποιούνται αποτελεσματικά CD8+ κύτταρα ικανά να καταστρέψουν μολυσμένα μακροφάγα (Rodrigues et al. 2016). Είναι αξιοσημείωτη η προοδευτική μείωση των CD4+ κυτταρικών ανοσολογικών αποκρίσεων στην λεισμανίαση, η οποία αφορά τόσο την ελάττωση του συνολικού αριθμού των CD4+ T κυττάρων όσο και την ελάττωση CD4+ T κυττάρων ειδικών για τα αντιγόνα της *Leishmania* (Carvalho et al. 1989). Υπάρχει άμεση συσχέτιση των CD4+ T κυττάρων με την διάγνωση και την θεραπεία της νόσου, ώστε ο αριθμός τους να θεωρείται δείκτης ενεργούς νόσου ή υποτροπής της, ενώ η επαναφορά των φυσιολογικών τιμών τους να αναγνωρίζεται σαν απόδειξη της επιτυχημένης θεραπείας (Dayakar et al. 2019; Hailu et al. 2005). Πρόσφατη

μελέτη έδειξε ότι μετά την χημειοθεραπεία ασθενών με *Glucantime* ή με λιποσωμική αμφοτερικίνη Β, οι ασθενείς ανέπτυξαν πολύ-λειτουργικούς CD4⁺ (CD4⁺IL-2⁺TNF-α⁺IFN-γ⁺ / CD4⁺TNF-α⁺IFN-γ⁺) και CD8⁺ (CD8⁺IL-2⁺TNF-α⁺IFN-γ⁺ και CD8⁺TNF-α⁺IFN-γ⁺) πληθυσμούς, οι οποίοι συσχετίστηκαν με την θεραπεία της νόσου (Rodrigues et al. 2021).

1.6 Ο κυτταρικός θάνατος στους μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς

Το ερώτημα για το πώς πεθαίνουν τα πρωτόζωα είχε παραμεληθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα, καθώς κυριαρχούσε η υπόθεση ότι ο θάνατος των μονοκύτταρων ευκαρυωτικών οργανισμών πραγματοποιείται με τρόπο ασυντόνιστο (Lüder et al. 2010). Ωστόσο, η άποψη αυτή αμφισβητήθηκε με την ανίχνευση χαρακτηριστικών δεικτών προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (programmed cell death, PCD) σε παράσιτα *Leishmania*, *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Toxoplasma*, *Trichomonas*, *Blastocystis*, *Entamoeba* και *Giardia* (Foroutan-Rad et al. 2016; Jiménez-Ruiz et al. 2010; Kaczanowski, Sajid, and Reece 2011; Lüder et al. 2010; Smirlis et al. 2010).

Περιγράφονται δύο κύριοι τύποι κυτταρικού θανάτου: ο τυχαίος κυτταρικός θάνατος ή νέκρωση (accidental cell death, ACD) και ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή απόπτωση (programmed cell death, PCD) (Basmacıyan and Casanova 2019; Galluzzi et al. 2015). Ο ACD προκαλείται από ακραία φυσικοχημικά ή μηχανικά ερεθίσματα όπως, υψηλές θερμοκρασίες, υψηλές πιέσεις και ακραίες διακυμάνσεις στο pH (Basmacıyan and Casanova 2019). Αντίθετα, ο PCD ή απόπτωση, εκφράζει τη ρυθμιζόμενη ενεργοποίηση ενός προϋπάρχοντος προγράμματος θανάτου γενετικά κωδικοποιημένου και αναγνωρίζεται ως ένα προνόμιο των μονοκύτταρων οργανισμών όπως τα παράσιτα *Leishmania*. Αν και στερούνται μερικά από τα βασικά μόρια που εμπλέκονται στην απόπτωση των θηλαστικών, όπως κασπάσες, υποδοχείς κυτταρικού θανάτου, και αντι-αποπτωτικά μόρια της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών, έχουν παρουσιάσει δείκτες απόπτωσης αποδεικνύοντας πως μπορούν να υποβληθούν σε ένα είδος κυτταρικού θανάτου που προσομοιάζει με την απόπτωση των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών (Smirlis et al. 2010). Παρότι η απόπτωση και η νέκρωση έχουν διακριτά μορφολογικά χαρακτηριστικά (Πίνακας 2), η αναγνώριση και η διάκρισή τους σε *in vitro* επίπεδο αποτελεί πρόκληση έως και σήμερα (Εικόνα 1.16).

Ο όρος απόπτωση επινοήθηκε το 1972 από τον Kerr για να περιγράψει έναν τύπο κυτταρικού θανάτου που χαρακτηρίζεται από μορφολογικές και μοριακές αλλοιώσεις, οι οποίες τον διακρίνουν από άλλους τύπους κυτταρικού θανάτου (Kerr, Wyllie, and Curriet 1972). Ο PCD είναι η φυσιολογική μορφή «αυτοκτονίας» του κυττάρου που εμφανίζεται κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη και την εξέλιξη των οργάνων και αποτελεί ένα ευρέως μελετημένο

φαινόμενο της κυτταρικής βιολογίας (BioNinja 2022; Elmore 2007; Henry, Hollville, and Martin 2013). Επιπλέον, ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος συναντάται σε πολλές φυσιολογικές καταστάσεις στο νευρικό σύστημα, σε ενδοκρинеοεξαρτώμενους ιστούς, στη διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων, αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η

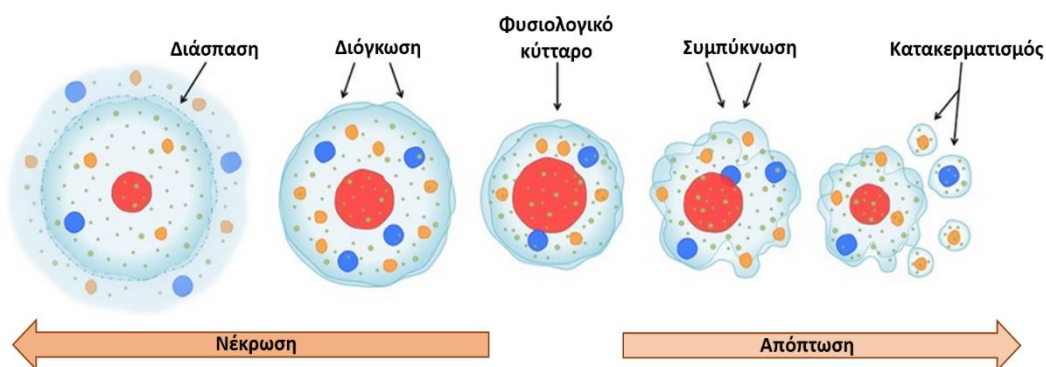
Πίνακας 2: Βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά απόπτωσης και νέκρωσης.

Απόπτωση	Νέκρωση
Σχηματισμός φυσαλίδων στην κυτταρική μεμβράνη χωρίς απώλεια ακεραιότητας και συσσωμάτωση χρωματίνης στην πυρηνική μεμβράνη	Απώλεια ακεραιότητας μεμβράνης
Συρρίκνωση κυτταροπλάσματος και συμπύκνωση πυρήνα	Διόγκωση κυττάρου
Κατάτμηση κυττάρου σε μικρότερα τμήματα και δημιουργία αποπτωτικών σωματιδίων	Πλήρης λύση κυττάρου

ογκογένεση, τα αυτοάνοσα νοσήματα και οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις (Basmacıyan and Casanova 2019; Solano-Gálvez et al. 2018). Μέχρι τη δεκαετία του 1990, η απόπτωση σχετιζόταν μόνο με πολυκύτταρους οργανισμούς

(Castro et al. 2017), ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε, τις τελευταίες δεκαετίες έχουν αναφερθεί δείκτες απόπτωσης και σε μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, αποδεικνύοντας πως και αυτοί οι οργανισμοί μπορούν να υποβληθούν σε ένα είδος κυτταρικού θανάτου που προσομοιάζει με την απόπτωση των θηλαστικών, γεγονός που την καθιστά σημαντικό αμυντικό μηχανισμό έναντι των ενδοκυττάρων παρασίτων όπως η *Leishmania* (Basmacıyan and Casanova 2019; Jiménez-Ruiz et al. 2010; Menna-Barreto 2019; Proto, Coombs, and Mottram 2013; Solano-Gálvez et al. 2021). Μέχρι και σήμερα οι ακριβείς βιοχημικές και μοριακές διεργασίες που συμβάλλουν στην αποπτωτική οδό στη *Leishmania* παραμένουν ασαφής. Ερεθίσματα όπως, το θερμικό σοκ, δραστικές μορφές οξυγόνου (νιτρικό οξείδιο, υπεροξείδιο του υδρογόνου), οι συνθήκες στέρσης τροφής, αντιμικροβιακά πεπτιδία, μεταλλάξεις σε γονίδια που ρυθμίζονται από τον κυτταρικό κύκλο, καθώς και διάφορα αντιπαρασιτικά φάρμακα, μπορούν να επάγουν την απόπτωση, η οποία πυροδοτεί την έναρξη μίας σειράς μορφολογικών και βιοχημικών μεταβολών (Basmacıyan and Casanova 2019; Menna-Barreto 2019; Smirlis et al. 2010). Αναλυτικότερα, στα μορφολογικά χαρακτηριστικά έχουν παρατηρηθεί μεταβολές όπως, α) η προοδευτική συρρίκνωση και στρογγυλοποίηση των κυττάρων, β) η συστολή των ψευδοποδίων / μαστιγίων, γ) η μείωση του κυτταρικού και πυρηνικού όγκου (πύκνωση), δ) η συμπύκνωση της χρωματίνης και ο πυρηνικός κατακερματισμός (καρυόρροια), ε) η δομική τροποποίηση των οργανιδίων και στ) ο σχηματισμός κυστιδίων λόγω δημιουργίας φυσαλίδων στην πλασματική μεμβράνη (Basmacıyan and Casanova 2019; Brauchle et al. 2014; Jiménez-Ruiz et al. 2010; Solano-Gálvez et al. 2021). Επίσης, η απόπτωση μπορεί να πυροδοτήσει και μία σειρά βιοχημικών μεταβολών. Τα μιτοχόνδρια έχουν κεντρικό ρόλο στον αποπτωτικό

κυτταρικό θάνατο των πρωτοζώων, καθώς εμπλέκονται στον ενεργό έλεγχο της απόπτωσης σε διάφορα επίπεδα, συμπεριλαμβανομένης της απελευθέρωσης προαποπτωτικών πρωτεϊνών (Smirlis et al. 2010). Η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων είναι ένα από τα χαρακτηριστικά της απόπτωσης που συχνά σχετίζεται με αλλαγές στο δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης ($\Delta\Psi m$), έναν βασικό δείκτη της μιτοχονδριακής λειτουργίας. Επίσης, η παραγωγή ROS σε προμαστιγώτες είναι ένα από τα πιθανά συμβάντα που προκαλούνται από την απώλεια της μιτοχονδριακής ακεραιότητας (Smirlis et al. 2010), ενώ ο κατακερματισμός του DNA είναι ένα από τα κοινά βιοχημικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης στα θηλαστικά και θεωρείται σημαντικός δείκτης για τον κυτταρικό θάνατο που μοιάζει με απόπτωση στα πρωτόζωα. Προσφάτως, η Επιτροπή Ονοματολογίας Κυτταρικού Θανάτου (Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD), επεσήμανε τη σημασία της συμπερίληψης και ορισμένων άλλων βιοχημικών παραμέτρων στον χαρακτηρισμό της απόπτωσης, όπως η εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης (PS) στην εξωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης διατηρώντας την ακεραιότητά της μέχρι τα τελευταία στάδια της διαδικασίας (D'Arcy 2019; Elmore 2007; Kroemer et al. 2009; Lüder et al. 2010). Ενδεικτικά, χαρακτηριστικά αποπτωτικού θανάτου όπως η στρογγυλοποίηση του κυττάρου, η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης, η απώλεια του δυναμικού της μεμβράνης των μιτοχονδρίων ($\Delta\Psi m$), η παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS), ο κατακερματισμός του DNA, έχουν παρατηρηθεί *in vitro* σε προμαστιγώτες *L. donovani* στατικής φάσης ανάπτυξης, ύστερα από στέρηση θρεπτικών συστατικών (Lee et al. 2002). Επίσης, τα αντιπαρασιτικά φάρμακα στην πλειοψηφία τους έχουν βρεθεί ότι πυροδοτούν τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Ειδικότερα, η επώαση των παρασίτων *L. donovani* με ενώσεις του αντιμονίου (Pentostam), προκάλεσε την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS), τη διάσπαση του πυρηνικού DNA των παρασίτων και την έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής τους μεμβράνης (Lee et al.



Εικόνα 1.16: Διάκριση μεταξύ απόπτωσης και νέκρωσης με κριτήριο τις μορφολογικές αλλαγές (τροποποίηση από: BioNinja 2022).

2002; Sereno et al. 2001). Με παρόμοιο τρόπο φάνηκε να δρουν και τα φάρμακα αμφοτερικίνη Β και μιλτεφοσίνη (Lee et al. 2002; Verma and Dey 2004).

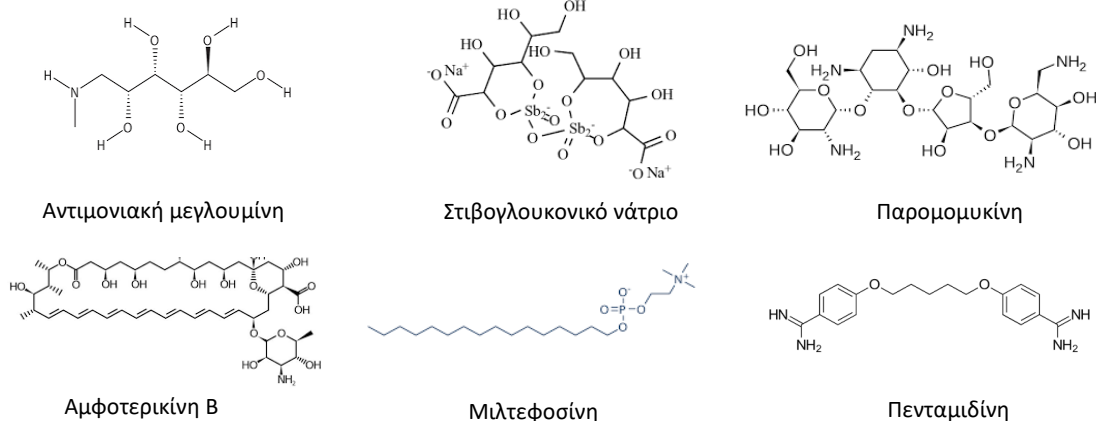
1.7 Θεραπεία

1.7.1 Συμβατική αντιλεϊσμανιακή θεραπεία

Δεδομένου ότι δεν υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα εμβόλια για την καταπολέμηση της λεϊσμανίασης του ανθρώπου, η κύρια θεραπεία όλων των κλινικών μορφών της νόσου είναι η χημειοθεραπεία (Kumari et al. 2021; Taslimi, Zahedifard, and Rafati 2016).

Οι ενώσεις του πεντασθενούς αντιμονίου (Sb^V) (Εικόνα 1.17), όπως το στιβογλουκονικό νάτριο (Pentostam[®]) και η αντιμονιακή μεγλουμίνη (Glucantime[®]), εισήχθησαν για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1940 και έχουν χρησιμοποιηθεί ως φάρμακα πρώτης γραμμής τόσο κατά της CL, όσο και κατά της VL (Uliana, Trinconi, and Coelho 2017). Ο μηχανισμός δράσης των φαρμάκων αυτών βασίζεται στη μετατροπή του πεντασθενούς αντιμονίου σε τρισθενές (Sb^{III}). Παρόλο που τα φάρμακα αυτά αποτελούσαν την κύρια χημειοθεραπευτική προσέγγιση για πολλές δεκαετίες, παρουσιάζουν σημαντικά μειονεκτήματα, όπως η ανάγκη μακροχρόνιας παρεντερικής χορήγησης, η υψηλή τοξικότητα και η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των παρασίτων (Kumari et al. 2021; Mendes Roatt et al. 2020; Pradhan et al. 2022; Taslimi et al. 2016; Uliana et al. 2017).

Ως φάρμακα δεύτερης γραμμής χορηγούνται κυρίως η πενταμιδίνη, η παρομομυκίνη (PMM) και η αμφοτερικίνη Β (AmB) (Εικόνα 1.17). Η πενταμιδίνη συντέθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1930 και αποτελεί μια αρωματική διαμιδίνη που δρα ως αντιπρωτοζωικός παράγοντας. Ωστόσο, η χρήση της εγκαταλείφθηκε λόγω υψηλής συχνότητας τοξικών επιδράσεων, όπως παγκρεατίτιδα, υπογλυκαιμία, υπόταση, καρδιακές αλλοιώσεις και



Εικόνα 1.17: Χημική δομή κλασικών αντιλεϊσμανιακών φαρμάκων (τροποποίηση από: Mishra et al. 2007).

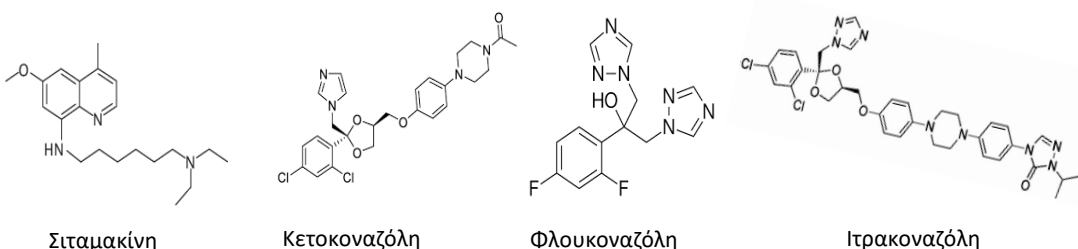
υπερκαλιαιμία (Kumari et al. 2021; Mendes Roatt et al. 2020; Pradhan et al. 2022; Taslimi et al. 2016; Uliana et al. 2017). Η PMM, γνωστή και ως αμινοσιδίνη, αποτελεί ένα αμινογλυκοσιδικό αντιβιοτικό, με λειψμανιοκτόνο δράση, που ανακαλύφθηκε τη δεκαετία του 1960 και χορηγείται επίσης παρεντερικώς με ποικίλη αποτελεσματικότητα σε διαφορετικά είδη *Leishmania* (Hailu et al. 2005; Matos et al. 2020). Έχει τη δυνατότητα να παρεμβαίνει στη σύνθεση πρωτεϊνών, τροποποιώντας τη ρευστότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η αμφοτερικίνη Β (AmB), είναι ένα ευρέως φάσματος αντιμυκητιασικό φάρμακο που χρησιμοποιείται στη χημειοθεραπεία της λειψμανίασης. Παρά την αποτελεσματικότητά της, οι ασθενείς παρουσιάζουν συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες όπως εμπύρετο, υποκαλιαιμία, μυοκαρδίτιδα και νεφροτοξικότητα, καθιστώντας αναγκαία την νοσοκομειακή τους παρακολούθηση (Matos et al. 2020; Taslimi et al. 2016).

Η λιποσωμιακή αμφοτερικίνη Β (Ambisome®), αποτελεί τροποποιημένη μορφή της αμφοτερικίνης Β με αυξημένη αντιλειψμανιακή δράση και χαμηλότερη τοξικότητα. Η θεραπεία με λιποσωμιακή αμφοτερικίνη εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1990 και σήμερα αποτελεί την πρώτη επιλογή θεραπείας της σπλαγγνικής λειψμανίασης του ανθρώπου σε πολλές ενδημικές χώρες της Ευρώπης και των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής. Παρά την υψηλή θεραπευτική της αποτελεσματικότητα, σε σύγκριση με όλα τα άλλα υπάρχοντα αντιλειψμανιακά φάρμακα, το υψηλό της κόστος την καθιστά απαγορευτική για τους πληθυσμούς των κύριων ενδημικών περιοχών που πλήττονται από τη νόσο. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί πως αποτελεί την πρώτη θεραπευτική επιλογή σε ασθενείς με συλλοίμωξη HIV, σε εγκύους και σε μεταμοσχευμένα άτομα στον ανεπτυγμένο κόσμο (Kumari et al. 2021; Matos et al. 2020; Mendes Roatt et al. 2020; Pradhan et al. 2022; Taslimi et al. 2016; Uliana et al. 2017).

Η μιλτεφοσίνη (Εικόνα 1.17), είναι ένα ανάλογο φωσφατιδυλοχολίνης, που αρχικά αναπτύχθηκε ως αντινεοπλασματικό φάρμακο για τον καρκίνο του μαστού (Mendes Roatt et al. 2020; Sunyoto, Potet, and Boelaert 2018). Το 1987, περιγράφηκε η *in vitro* και *in vivo* αντιλειψμανιακή δράση της και βρέθηκε να εμφανίζει σημαντική βιοδιαθεσιμότητα όταν χορηγήθηκε από το στόμα σε μοντέλα ποντικών, σε σύγκριση με την ενδοφλέβια χορήγηση ενώσεων πεντασθενούς αντιμονίου (Kumari et al. 2021; Sunyoto et al. 2018). Μελέτες αναφέρουν την επαγωγή αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου ως μηχανισμό δράσης της μιλτεφοσίνης (Kumari et al. 2021; Taslimi et al. 2016). Από το 2002, αποτελεί το μόνο φάρμακο κατά της λειψμανίασης που χορηγείται διά στόματος (Sunyoto et al. 2018). Οι παρενέργειες της χρήσης της είναι κυρίως γαστρεντερικές διαταραχές και αντιμετωπίζονται ικανοποιητικά. Παρόλα αυτά είναι τερατογόνος, καθιστώντας τη χρήση της απαγορευτική σε εγκύους, ενώ

απαιτεί μακρά περίοδο θεραπείας (Kumari et al. 2021; Mendes Roatt et al. 2020; Sunyoto et al. 2018). Επιπλέον, πρόσφατη έρευνα αναφέρει την επίπτωση της μυλτεφοσίνης στην αναπαραγωγική ικανότητα των ανδρών, καθώς σε ασθενείς που έλαβαν αγωγή με το φάρμακο προκλήθηκε παροδική ολιγοσπερμία (Basher A., Rashid MM., Habibullah AM., Nath R., Akter D., Chowdhury IH., Azim A., Nath P. 2019). Επίσης, ο μεγάλος χρόνος ημίσειας ζωής και το γεγονός ότι απαιτείται μακροχρόνια θεραπεία δημιουργεί συνθήκες που ευνοούν την εμφάνιση ανθεκτικότητας, ενώ η εμφάνιση σχετικού ποσοστού υποτροπής έχει ως αποτέλεσμα την τελική χρήση της κυρίως σε συνδυαστικές θεραπείες, καθώς έτσι μειώνεται η τοξικότητά της (Kumari et al. 2021; Pradhan et al. 2022; Uliana et al. 2017). Σήμερα, επικρατεί η κτηνιατρική χρήση της για την θεραπεία της λεισμανίασης στον σκύλο, ο οποίος είναι η κύρια «δεξαμενή» του παρασίτου *L. infantum*.

Επίσης, τα τελευταία χρόνια έχουν ενσωματωθεί στη φαρέτρα των κλινικών δοκιμών και άλλα φάρμακα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η σιταμακίνη (Sitamaquine, 4-methyl-6-methoxy-8-aminoquinoline), ένα φάρμακο που χορηγείται επίσης από το στόμα και έχει ευρεία αντιπαρασιτική δράση, όπως και διάφορες αζόλες (Εικόνα 1.18) (Κετοκοναζόλη, Φλουκοναζόλη, Ιτρακοναζόλη), οι οποίες παρά την υψηλή αποτελεσματικότητά τους, παρουσιάζουν επίσης σοβαρές παρενέργειες (Chakravarty and Sundar 2019; McGwire and Satoskar 2014; Mendes Roatt et al. 2020; Mishra, Saxena, and Singh 2007; Seifert 2011; Sundar and Chakravarty 2013)



Εικόνα 1.18: Χημική δομή των πιο πρόσφατων αντιλεισμανιακών φαρμάκων (τροποποίηση από: Mishra et al. 2007).

Τέλος, η φωτοδυναμική θεραπεία (με λέιζερ CO₂ ή παλμικό φως) και η θερμοθεραπεία, είναι ένας απλός τρόπος παροχής εξωτερικής θερμότητας σε μολυσμένους ιστούς, προκαλώντας βλάβη σε συγκεκριμένες περιοχές με παρασιτισμό (Mendes Roatt et al. 2020; Pradhan et al. 2022). Η άμεση εφαρμογή θερμότητας μπορεί να επιταχύνει τη θεραπεία των δερματικών βλαβών. Ομοίως, κατά την κρυοθεραπεία εφαρμόζεται υγρό άζωτο (-196 °C) σε δερματικές βλάβες (Mendes Roatt et al. 2020; Sundar and Chakravarty 2013). Οι

δευτερογενείς παρενέργειες σχετίζονται κυρίως με οίδημα και ερύθημα στο σημείο, υπέρ- ή υπομελάγχρωση. (Chakravarty and Sundar 2019; McGwire and Satoskar 2014).

1.7.2 Πρόσφατες εξελίξεις

1.7.2.1 Η ανοσοθεραπεία ως εναλλακτική προσέγγιση για τον έλεγχο της λείσμανίασης

Τα τελευταία χρόνια πραγματοποιούνται κλινικές δοκιμές μικρής κλίμακας, οι οποίες στοχεύουν στον συμπληρωματικό συνδυασμό χημειοθεραπείας και ανοσοπαρεμβατικών μεθόδων. Με αυτόν τον τρόπο, σχεδιάζονται ανοσοθεραπείες με ουσίες που προάγουν την αποκατάσταση της ανοσολογικής απόκρισης κατά του παρασίτου, αποτελώντας μια εναλλακτική προσέγγιση για την καταπολέμηση της μόλυνσης. Αυτές περιλαμβάνουν τον χειρισμό ή/και την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, προκειμένου να ενισχυθεί ή να ανακατευθυνθεί η ανοσοαπόκριση του ξενιστή προς ένα αποτελεσματικό θεραπευτικό αποτέλεσμα. Στην περίπτωση της λείσμανίασης, η βασική αρχή της ανοσοθεραπείας επιδιώκει την τροποποίηση ή/και την στροφή μιας μη προστατευτικής ανοσολογικής απόκρισης κατά του παρασίτου προς μία αποτελεσματική προστατευτική απόκριση (Ikeogu et al. 2020). Αυτό θα μπορούσε να επιτευχθεί με τη χρήση ανοσοτροποποιητικών ή/και ειδικών αντιγονικών επιτόπων του παρασίτου. Επιπλέον, οι ανοσοθεραπευτικές μέθοδοι μπορεί να περιλαμβάνουν ανασυνδυασμένες κυτταροκίνες ή αντισώματα, ή γενικότερα μόρια που ρυθμίζουν βασικές ανοσορυθμιστικές οδούς. Βιβλιογραφική ανασκόπηση αναφέρει ότι έχει επιτευχθεί σημαντικό θεραπευτικό αποτέλεσμα της νόσου σε πειραματικό μοντέλο ποντικών μετά από ανοσοτροποποίηση που επιτεύχθηκε με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την απομάκρυνση ανοσοκατασταλτικών κυτταροκινών (IL-10) ή των υποδοχέων τους ή των TLR υποδοχέων (Mendes Roatt et al. 2014). Μετά την ανακάλυψη της σημασίας της Th1/Th2 πόλωσης στην έκβαση της λείσμανίασης, οι ερευνητές προσπαθούν να συσχετίσουν φάρμακα με συγκεκριμένες κυτταροκίνες για να επηρεάσουν αυτή την ισορροπία. Για παράδειγμα, οι ανοσοδιεγερτικές κυτταροκίνες IFN- γ , IL-12 και GM-CSF προτείνονται ως μονοθεραπείες ή ως συνδυαστικές θεραπείες με Sb^v ή άλλα φάρμακα (McGwire and Satoskar 2014; Nascimento et al. 2020; Pradhan et al. 2022; Taslimi et al. 2016).

1.7.2.2 Συνδυαστική χημειοθεραπεία

Η συνδυαστική χημειοθεραπεία συνίσταται στη χρήση δύο ή περισσότερων φαρμάκων με συνεργιστικά ή αθροιστικά αποτελέσματα, με στόχο την αύξηση του φάσματος δράσης και

της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας. Ιδανικά, οι συνδυασμοί φαρμάκων στοχεύουν στην καθυστέρηση ή και αποτροπή της εμφάνισης ανθεκτικότητας, καθώς και στη μείωση της διάρκειας της θεραπείας και των απαιτούμενων δόσεων, με σκοπό να επιτευχθεί η χαμηλότερη δυνατή τοξικότητα. Τέτοιου είδους προσεγγίσεις μπορούν επίσης να μειώσουν το κόστος θεραπείας και συνεπώς την επιβάρυνση του συστήματος υγείας. Η συνδυαστική χρήση φαρμάκων μπορεί, επίσης, να βοηθήσει στην καθυστέρηση της επιλογής των ανθεκτικών στα φάρμακα παρασίτων, παρατείνοντας την αποτελεσματικότητα των διαθέσιμων φαρμάκων, όπως έχει αναφερθεί σε ασθένειες όπως η φυματίωση, η ελονοσία και το AIDS (Seifert 2011; Uliana et al. 2017). Η εφαρμογή συνδυαστικής χημειοθεραπείας για τη λεισμανίαση απαιτεί τον καθορισμό των καλύτερων συνδυαστικών σχημάτων και την αποτελεσματικότητά τους σε κλινικά περιβάλλοντα. Σχετικές μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει συνδυασμούς φαρμάκων που είναι ήδη διαθέσιμα όπως, οι πεντασθενείς ενώσεις αντιμονίου, η παρομομουκίνη, η αμφοτερικίνη Β και η μιλτεφοσίνη, και έχουν επιδείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Chakravarty and Sundar 2019; Seifert 2011; Taslimi et al. 2016; Uliana et al. 2017).

1.7.2.3 Φυσικά προϊόντα ως νέα υποσχόμενα φάρμακα

Το ενδιαφέρον για την αναζήτηση φυσικών προϊόντων (natural products, NPs) που εμφανίζουν ταυτόχρονα χημειοθεραπευτικές και ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες έχει ενισχυθεί τις τελευταίες δεκαετίες, λόγω της εμφάνισης των πολυάριθμων ανεπιθύμητων παρενεργειών των υπαρχόντων φαρμάκων κατά τις λεισμανίασης (Koko et al. 2022; Rodrigues et al. 2015). Σύμφωνα με την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA), το 34% των νέων φαρμάκων που εγκρίθηκαν μεταξύ 1981 και 2014 βασίστηκαν σε φυσικά προϊόντα ή στα παράγωγά τους, και ομοίως περίπου το 35% των παγκόσμιων φαρμάκων που χρησιμοποιούνται σήμερα προέρχονται από φυσικά προϊόντα (Carter et al. 2021). Στη συνεχή αναζήτηση για καλύτερες αντιλεισμανιακές ενώσεις, τα προϊόντα φυτικής προέλευσης κερδίζουν συνεχώς έδαφος, καθώς είναι εύκολα διαθέσιμα και σχετικά φθηνά. Ο Π.Ο.Υ. μέσω του προγράμματος DNDi (Drugs for Neglected Diseases Initiative) αναδεικνύει διαρκώς νέα φυσικά προϊόντα προερχόμενα από φυτά, για παραμελημένες τροπικές ασθένειες όπως η ελονοσία, η τρυπανοσωμίαση και η λεισμανίαση (Sen and Chatterjee 2011). Στην παγκόσμια βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί εκατοντάδες φυσικά προϊόντα, τα οποία είτε ως ακατέργαστα εκχυλίσματα, είτε ως απομονωμένες ενώσεις, επιδεικνύουν λεισμανιοκτόνο δράση σε *in vitro* ή/και σε *in vivo* συστήματα (Koko et al. 2022; Oliveira et al. 2018; Rodrigues et al. 2015; Rohloff, Hymete, and Tariku 2013; Ullah et al. 2016). Πρόκειται για δευτερογενείς μεταβολίτες που εντοπίζονται στις ρίζες, στους μίσχους, στα φύλλα, στους καρπούς, στους

σπόρους και σε άλλα μέρη των φυτών και εμφανίζουν μεγάλη δομική ποικιλομορφία (Gervazoni et al. 2020). Επί του παρόντος, τέτοιες ενώσεις, με αντιλεϊσμμανιακές ιδιότητες ανήκουν στις εξής κατηγορίες: αλκαλοειδή, τερπένια και τερπενοειδή, στεροειδή και φαινολικά παράγωγα (κουμαρίνες, κινόνες, χαλκόνες, λιγνάνες, φλαβονοειδή) (Mishra et al. 2007; Sakyi et al. 2021).

1.8 Ελαιόλαδο

1.8.1 Ιστορική αναδρομή - Γενικά στοιχεία

Ως ελαιόλαδο (olive oil, OO) χαρακτηρίζεται το έλαιο που λαμβάνεται από τους καρπούς της ευρωπαϊκής ελιάς (*Olea europaea*) με αποκλειστικά μηχανικά μέσα και φυσικές μεθόδους επεξεργασίας, σε θερμοκρασίες που να μην προκαλούν αλλοίωση του ελαίου (Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης, Άρθρο 71 1987). Σημειολογικά, το κλαδί της ελιάς αποτελεί ένα από τα αρχαιότερα σύμβολα στον κόσμο και ιδιαίτερα στη Μεσόγειο. Αποτέλεσε σύμβολο ειρήνης, ευημερίας, αθλητικής νίκης, δύναμης, πλούτου, εξουσίας, σοφίας, ελπίδας και φιλίας μεταξύ των λαών (Boskou 2006; Kapellakis, Tsagarakis, and Crowther 2008). Πολυάριθμες πηγές από την ελληνική μυθολογία και την Παλαιά Διαθήκη αναφέρονται στον κοινωνικό και θρησκευτικό ρόλο του ελαιόδεντρου, γεγονός που αποδεικνύεται από τον ιδιαίτερα σημαντικό συμβολισμό της για τους αρχαίους Έλληνες. Συνδέθηκε με τη διατροφή και τη θρησκεία και χρησιμοποιήθηκε μεταξύ άλλων ως διακοσμητικό μοτίβο σε βάζα και χρυσά κοσμήματα (Boskou 2006; Ghanbari et al. 2012; Kapellakis et al. 2008; Riley 2002).

Ο Αριστοτέλης μελέτησε το δέντρο και περιέγραψε αξιοσημείωτα επιστημονικά στοιχεία της καλλιέργειάς του, ενώ ο Σόλων νομοθέτησε την προστασία του. Το ελαιόδεντρο ή ελιά

Βασίλειο	• Plantae
Συνομοταξία	• Magnoliophyta
Κλάση	• Magnoliopsida
Τάξη	• Lamiales
Οικογένεια	• Oleaceae
Υποοικογένεια	• Oleoideae
Γένος	• <i>Olea</i>

Εικόνα 1.19: Βοτανική ταξινόμηση της ελιάς.

υπάγεται στην οικογένεια Oleaceae (Εικόνα 1.19), η οποία περιλαμβάνει 24 γένη και πάνω από 500 είδη (taxa). Το γένος *Olea* εμπεριέχει περισσότερα από 30 διαφορετικά είδη και 5 υποείδη, τα οποία ευδοκούν σε εύκρατες και σε τροπικές περιοχές, με το πιο κοινό είδος στην Ευρώπη να αποτελεί η *Olea europaea* (Πίνακας 3) (Boskou 2006; Ghanbari et al. 2012; Kapellakis et al. 2008; Vossen 2007). Ωστόσο, η προέλευση της ελιάς έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών συζητήσεων. Αν και απολιθώματα που χρονολογούνται από την Τριτογενή περίοδο (πριν από 1 εκατομμύριο χρόνια) αποδεικνύουν την ύπαρξη προγόνου της

ελιάς στην Ιταλία, φαίνεται πως η ελιά, όπως είναι γνωστή σήμερα, ήταν εγγενής στη Μικρά Ασία και εξαπλώθηκε μέσω του Ιράν, της Συρίας και της Παλαιστίνης, στη λεκάνη της Μεσογείου πριν από περίπου 6.000 χρόνια. Τα αρχαιολογικά δεδομένα και τα ιστορικά ευρήματα επιβεβαιώνουν ότι κατά τη Μινωική περίοδο (3000 - 1000 π.Χ.), η ελαιοκαλλιέργεια και το εμπόριο ελαιολάδου ήταν ευρέως διαδεδομένα στην Κρήτη, γεγονός που ευθύνεται εν μέρει και για την οικονομική άνθηση που σημειώθηκε στο νησί κατά την περίοδο αυτή (Ghanbari et al. 2012).

Πίνακας 3. Γεωγραφική κατανομή των υποειδών του γένους *Olea*.

Υποείδη του γένους <i>Olea</i>
<i>Olea europaea subsp. europaea</i> (Ευρώπη)
<i>Olea europaea subsp. cuspidata</i> (Ιράν, Κίνα)
<i>Olea europaea subsp. guanchica</i> (Κανάρια)
<i>Olea europaea subsp. maroccana</i> (Μαρόκο)
<i>Olea europaea subsp. laperrinei</i> (Αλγερία, Νιγηρία, Σουδάν)

1.8.2 Παραγωγή και κατανάλωση

Η τεράστια οικονομική, διατροφική και πολιτιστική αξία του ελαιολάδου είναι αδιαμφισβήτητη. Το «υγρό χρυσάφι», όπως χαρακτηρίζεται από τον Όμηρο, αποτελεί κύριο συστατικό της Μεσογειακής διατροφής, ενώ υπάρχουν περίπου 2500 γνωστές ποικιλίες ελαιόδεντρων, από τις οποίες οι 250 έχουν ταξινομηθεί ως εμπορικές ποικιλίες από το Διεθνές Συμβούλιο Ελιάς (International Olive Council, IOC) και χρησιμοποιούνται για την παραγωγή είτε ελαιολάδου, είτε επιτραπέζιων ελιών, ή αμφοτέρων. Ο αριθμός των ελληνικών ποικιλιών ελιάς ξεπερνάει το 40, ενώ περισσότερο από το 90% της καλλιεργήσιμης έκτασης καλύπτεται με 20 ποικιλίες, προσαρμοσμένες σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών (Εικόνες 1.20 και 1.21) (Ghanbari et al. 2012; Kalogeropoulos and Tsimidou 2014; My Olive Plant 2016). Μεταξύ αυτών, η Κορωνέικη αποτελεί την πιο διάσημη ποικιλία ελιάς στην Ελλάδα, ενώ εξίσου γνωστές είναι και οι ποικιλίες Αθηνολιά, Καλαμών, Κονσερβολιά (Αμφίσσης), Κοθρέικη (Μανάκι), Θρουμπολιά και Αδραμυτίνη (Μυτιλήνης) (Εικόνα 1.20).

Περισσότερα από 750 εκατομμύρια ελαιόδεντρα καλλιεργούνται παγκοσμίως με τη συντριπτική πλειοψηφία (περίπου 99%) των παραγωγικών δέντρων και της συνολικής ελαιοπαραγωγής να ανήκουν στις χώρες γύρω από τη λεκάνη της Μεσογείου και στη Μέση Ανατολή. Επιπλέον, σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization, FAO), έντεκα κύριες ελαιοπαραγωγικές χώρες βρίσκονται στην περιοχή της Μεσογείου (Ισπανία, Ιταλία, Ελλάδα, Τουρκία, Συρία, Μαρόκο, Τυνησία, Αίγυπτος, Αλγερία, Πορτογαλία και Αργεντινή) και είναι υπεύθυνες για το 95% της

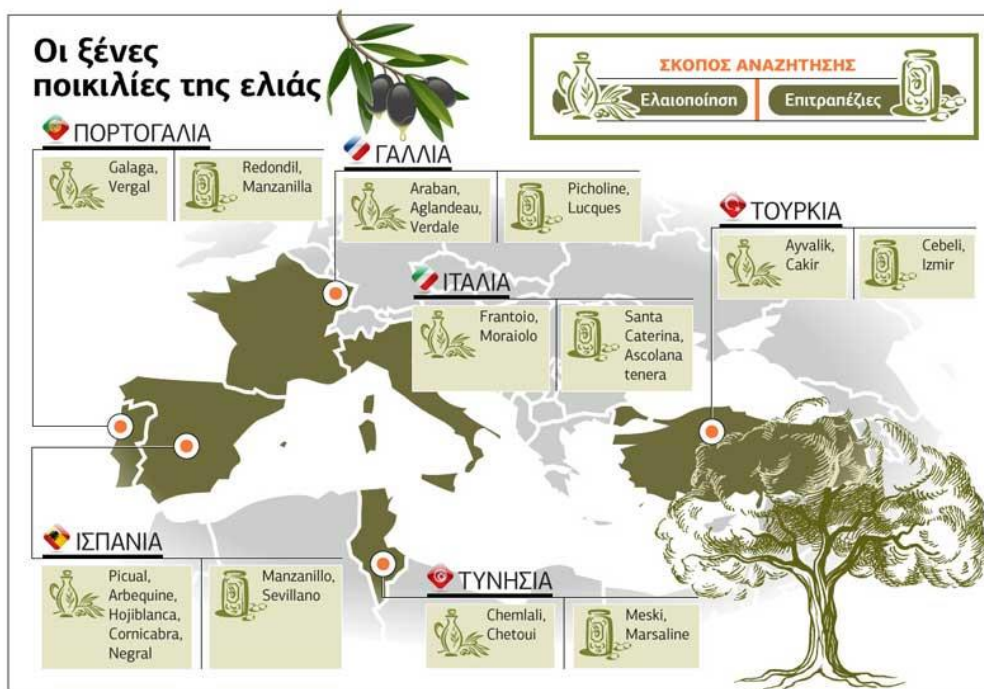
παραγωγής ελιών παγκοσμίως (Ghanbari et al. 2012). Πιο συγκεκριμένα, η Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) αποτελεί τον ισχυρότερο παραγωγό, καταναλωτή και ταυτόχρονα εξαγωγέα ελαιολάδου, καθώς καλύπτει περίπου το 67% της παγκόσμιας παραγωγής ελαιολάδου και το 53 % της παγκόσμιας κατανάλωσης (Ευρωπαϊκή Επιτροπή 2020).

Η Ισπανία, με συνολική καλλιεργούμενη έκταση 2.500.000 εκτάρια, είναι ο μεγαλύτερος παραγωγός, καθώς παράγει το 45% του ελαιολάδου που καταναλώνεται παγκοσμίως, ωστόσο εκτιμάται ότι μόνο το 20% είναι εξαιρετικά παρθένο έλαιο, και ακολουθεί η Ιταλία με καλλιεργούμενη έκταση 1.159.000 εκτάρια, και αντίστοιχη παραγωγή της τάξης του 25%. Την τρίτη θέση κατέχει η Ελλάδα με έκταση 730.000 εκτάρια και ετήσια παραγωγή



Εικόνα 1.20: Οι βασικότερες ποικιλίες ελιάς στην Ελλάδα (τροποποίηση από: My Olive Plant 2016).

ελαιολάδου που αγγίζει τους 310.000 τόνους και αντιστοιχεί στο 20% της παγκόσμιας παραγωγής, ενώ το 70% αυτού είναι εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο (Kalogeropoulos and Tsimidou 2014). Η Ιταλία και η Ισπανία αποτελούν εξίσου τους μεγαλύτερους καταναλωτές ελαιολάδου στην ΕΕ, με ετήσια κατανάλωση περίπου 500.000 τόνων η καθεμία, ενώ η Ελλάδα, με ετήσια κατανάλωση γύρω στους 220.000 τόνους, εμφανίζει τη μεγαλύτερη κατά κεφαλήν κατανάλωση ελαιολάδου στην ΕΕ (περίπου 12 κιλά ανά άτομο ετησίως) (Ghanbari et al. 2012; Ευρωπαϊκή Επιτροπή 2020).



Εικόνα 1.21: Οι βασικότερες ποικιλίες ελιάς στη λεκάνη της Μεσογείου, εξαιρουμένων των Ελληνικών (τροποποίηση από: My Olive Plant 2016).

1.8.3 Κατηγορίες ελαιολάδου

Η κατάταξη των ελαιολάδων σε κατηγορίες πραγματοποιείται με τη χρήση παραμέτρων ποιότητας, που αφορούν τόσο σε φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, όπως η οξύτητα, ο αριθμός υπεροξειδίων, η περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα και η σύσταση σε στερόλες, όσο και σε οργανοληπτικά - αισθητηριακά χαρακτηριστικά, όπως η φρουτώδης γεύση και η απουσία οργανοληπτικών ελαττωμάτων. Οι κανονισμοί της ΕΕ (Κανονισμός ΕΟΚ 1513/2001, Κανονισμός ΕΕ αριθ. 29/2012 και Κανονισμός ΕΕ 1348/2013) ταξινομούν το ελαιόλαδο σε δύο βασικούς τύπους, στα παρθένα και μη παρθένα ελαιόλαδα (Bilal et al. 2021; Ευρωπαϊκή Επιτροπή 2020).

1.8.3.1 Παρθένα ελαιόλαδα

Υπάρχουν τέσσερις βασικές κατηγορίες παρθένων ελαιολάδων, που διαχωρίζονται ανάλογα με την περιεκτικότητά τους σε ελεύθερα λιπαρά οξέα (οξύτητα):

1. Το **εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο (extra virgin olive oil - EVOO)**, είναι το βέλτιστης ποιότητας ελαιόλαδο, καθώς δεν εμφανίζει οργανοληπτικά ελαττώματα και το επίπεδο οξύτητας δεν υπερβαίνει το 0,8%.

2. Το **παρθένο ελαιόλαδο (virgin olive oil - VOO)**, μπορεί να παρουσιάζει κάποια οργανοληπτικά ελαττώματα, αλλά σε πολύ χαμηλό επίπεδο και η οξύτητά του δεν υπερβαίνει το 2%.
3. Το **μειονεκτικό ελαιόλαδο / ελαιόλαδο λαμπάντε**, είναι παρθένο ελαιόλαδο κατώτερης ποιότητας με οξύτητα πάνω από 2%, με σημαντικά οργανοληπτικά ελαττώματα. Το μειονεκτικό ελαιόλαδο δεν είναι κατάλληλο για βρώση και δεν προορίζεται προς διάθεση στην αγορά. Υποβάλλεται σε εξευγενισμό ή χρησιμοποιείται για βιομηχανικούς σκοπούς.
4. Το **αγουρέλαιο** που αποτελεί το πρώτο λάδι της ελιάς. Οι πιο φρέσκιες και γερές ελιές, άγουρες και πράσινες, συλλέγονται για να δώσουν τον χυμό τους, ο οποίος αμέσως αναλύεται για να επιβεβαιωθούν τα ποιοτικά του χαρακτηριστικά. Πρόκειται για το λάδι της πρώτης σοδειάς, που σύμφωνα με το Διεθνές Συμβούλιο Ελιάς, τα βασικά οργανοληπτικά κριτήρια αξιολόγησής του επικεντρώνονται στην έντονη γεύση και στο άρωμα.

1.8.3.2 Μη παρθένα ελαιόλαδα

Οι ακόλουθες κατηγορίες ελαιολάδων δεν ανήκουν στα παρθένα ελαιόλαδα:

1. Το **εξευγενισμένο / ραφιναρισμένο ελαιόλαδο (refined olive oil)**, είναι το προϊόν που προκύπτει από τον εξευγενισμό ελαττωματικού παρθένου ελαιολάδου (π.χ. μειονεκτικού ελαιολάδου) και εμφανίζει μέγιστο βαθμό οξύτητας έως 0,3%. Η πλειοψηφία (> 50%) του λαδιού που παράγεται στη λεκάνη της Μεσογείου, αποτελεί χαμηλής ποιότητας ελαιόλαδο που πρέπει να εξευγενιστεί προκειμένου να παραχθεί ένα εδωδιμο προϊόν.
2. Το μίγμα **εξευγενισμένου και παρθένου ελαιολάδου**, με βαθμό οξύτητας έως 1%.
3. Το **ακατέργαστο πυρηνέλαιο (crude oil – pomace oil)**, είναι το έλαιο που παράγεται από τους ελαιοπυρήνες (πολτός).
4. Το **εξευγενισμένο πυρηνέλαιο (refined olive pomace oil)**, που αποτελεί μίγμα εξευγενισμένου ακατέργαστου πυρηνελαίου με παρθένο ελαιόλαδο, με επίπεδο οξύτητας μπορεί έως 1%.

1.8.4 Χημική σύσταση ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο αποτελείται από ένα σαπωνοποιήσιμο κλάσμα (κύριο) και ένα μη σαπωνοποιήσιμο (δευτερεύον) κλάσμα (Εικόνα 1.22). Το κύριο κλάσμα αντιστοιχεί περίπου στο 98% του συνολικού του βάρους και αποτελείται κατά βάση από τριγλυκερίδια (99% του σαπωνοποιήσιμου κλάσματος) (Jiménez-Sánchez et al. 2022; Reboredo-Rodríguez et al.

2018). Τα κύρια λιπαρά οξέα στο κλάσμα των τριγλυκεριδίων είναι τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, στα οποία αποδίδονται οι θρεπτικές αξίες του ΕVOO, με κυρίαρχο το ελαϊκό οξύ, η συγκέντρωση του οποίου κυμαίνεται από 55% έως 83% του συνολικού κλάσματος των λιπαρών οξέων (Reboredo-Rodríguez et al. 2018; Servili et al. 2014). Ακολουθεί ένα κορεσμένο λιπαρό οξύ, το παλμιτικό οξύ (7,5-20%) και ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ, το λινελαϊκό οξύ (2,5-21%), το οποίο αντιπροσωπεύει το βασικό και το πιο άφθονο πολυακόρεστο λιπαρό οξύ στη Μεσογειακή διατροφή (Reboredo-Rodríguez et al. 2018; Servili et al. 2014).

Το δευτερεύον κλάσμα αντιπροσωπεύει περίπου το 2% του συνολικού βάρους του ελαιολάδου και αποτελείται από ένα σύνθετο σύνολο δευτερευόντων ενώσεων, που περιλαμβάνει πάνω από 230 χημικές ενώσεις, οι οποίες κατηγοριοποιούνται ως αλειφατικές και τριτερπενικές αλκοόλες, στερόλες, υδρογονάνθρακες, πτητικές ενώσεις και αντιοξειδωτικά (καροτενοειδή και πολυφαινολικές ενώσεις) (Casas, Estruch, and Sacanella 2017; Jiménez-Sánchez et al. 2022; Reboredo-Rodríguez et al. 2018; Servili et al. 2014).



Εικόνα 1.22: Χημική σύσταση ελαιολάδου.

1.8.5 Ελαιόλαδο και υγεία

Πληθώρα Ελλήνων φιλοσόφων ασχολήθηκαν με τις θεραπευτικές ιδιότητες των καρπών του δένδρου της ελιάς. Από το 4000 π.Χ. η χρήση του ελαιόλαδου για θεραπευτικούς σκοπούς είναι γνωστή, ενώ ο Ιπποκράτης αναφερόμενος σε περισσότερες από 60 φαρμακευτικές ιδιότητές του, περιγράφει το ελαιόλαδο σαν τέλειο θεραπευτικό. Η Μεσογειακή διατροφή θεωρείται ιδανικό διατροφικό μοντέλο και το βιολογικό όφελός της είναι συνδεδεμένο με την υψηλή περιεκτικότητα σε ελαιόλαδο, φρούτα, λαχανικά, όσπρια και δημητριακά. Πολυάριθμες μελέτες αποδεικνύουν ότι το πρότυπο της Μεσογειακής διατροφής συνδέεται με αυξημένο προσδόκιμο ζωής και με μειωμένη εμφάνιση χρόνιων φλεγμονωδών ασθενειών, όπως οι καρδιοαγγειακές νόσοι και ορισμένοι τύποι καρκίνων (Buckland et al. 2013; Couto et al. 2011; Mentella et al. 2019; Serra et al. 2021; Tuttolomondo

et al. 2019). Το θετικό βιολογικό αποτύπωμα της Μεσογειακής διατροφής φαίνεται να σχετίζεται με το ελαιόλαδο που αποτελεί τη βασική πηγή λίπους στο μοντέλο αυτό. Αυτό που το καθιστά πολύτιμο, συγκριτικά με άλλα φυτικά έλαια, είναι η απaráμιλλη γεύση του σε συνδυασμό με την υψηλή διατροφική του αξία. Πράγματι, ένας αυξανόμενος αριθμός επιδημιολογικών και πειραματικών μελετών φανερώνουν ότι το ελαιόλαδο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων, όπως η αθηροσκλήρωση (Nocella et al. 2017; Yubero-Serrano et al. 2019), νευρολογικών διαταραχών, όπως το *Alzheimer* (Angeloni et al. 2017; Román et al. 2019), του διαβήτη (Schwingshackl et al. 2017; Yubero-Serrano et al. 2019), αλλά και ορισμένων αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και ο συστηματικός ερυθρεμάτης (Aparicio-Soto et al. 2016). Επίσης, το ελαιόλαδο μπορεί να λειτουργήσει και ως ασπίδα στην πρόληψη του καρκίνου του παχέος εντέρου, του μαστού και των ωοθηκών (Borzì et al. 2019; De Cicco et al. 2019), ενώ έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει τόσο στη διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων αρτηριακής πίεσης (Casas et al. 2017), όσο και στην προστασία των λιπιδίων του αίματος (LDL) από το οξειδωτικό στρες (Castañer et al. 2011; Servili et al. 2014). Όλες αυτές οι ευεργετικές ιδιότητες του ελαιολάδου, και ιδιαίτερα του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου, έχουν βρεθεί ότι σχετίζονται ιδιαίτερα με το περιεχόμενό του σε βιοδραστικούς δευτερογενείς μεταβολίτες και συγκεκριμένα σε φαινολικές ενώσεις / πολυφαινόλες / βιοφαινόλες, οι οποίες εμφανίζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (Servili et al. 2014).

1.8.6 Βιοφαινόλες / Πολυφαινόλες ελαιολάδου

1.8.6.1 Γενικά στοιχεία

Οι πολυφαινόλες είναι μία μεγάλη και ετερογενής κατηγορία χημικών ενώσεων, χαμηλού μοριακού βάρους. Αποτελούν προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των υδατανθράκων, των λιπών και των αμινοξέων των φυτών και συμβάλλουν στην αύξηση, την ανάπτυξη και την άμυνα του φυτικού οργανισμού (Vermerris and Nicholson 2006). Οι περισσότερες πολυφαινόλες εμφανίζονται στη φύση με τη μορφή εστέρων ή γλυκοζιτών παρά ως ελεύθερες ενώσεις (Manach et al. 2004).

Ο όρος «βιοφαινόλες» επινοήθηκε για πρώτη φορά από τους *Romeo* και *Uccella* το 1996 για να δηλώσει τις βιοδραστικές φαινόλες στις ελιές, αντικαθιστώντας τον πιο κοινό και λιγότερο ακριβή χημικά όρο «πολυφαινόλες», ο οποίος είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος όρος για να περιγράψει τις φυτικές φαινολικές ενώσεις. Ο όρος «βιοφαινόλες» αποτελεί μια πληρέστερη και χημικά ακριβή έκφραση για να περιγράψει τις φυτικές φαινόλες, από τα πολύπλοκα πολυμερή μόρια, ενώ το πρόθεμα «βιο-» υποδηλώνει

τη βιολογική προέλευση σε αντίθεση με τις συνθετικές ενώσεις. Πρόκειται λοιπόν για έναν όρο «ομπρέλα» που αναφέρεται σε όλα τα φαινολικά μόρια που έχουν φυτική προέλευση (Obied and Obied 2013). Στη φύση υπάρχουν περίπου 8000 ενώσεις που ανήκουν στις βιοφαινόλες. Μέχρι σήμερα, περισσότερες από 36 φαινολικές ενώσεις έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί από δείγματα παρθένου ελαιολάδου, αλλά δεν εντοπίζονται όλες σε κάθε λάδι (Gorzynik-Debicka et al. 2018; Jimenez-Lopez et al. 2020; Reboledo-Rodríguez et al. 2018).

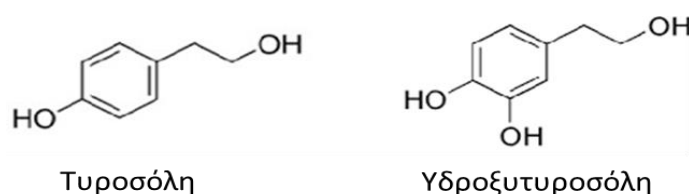
1.8.6.2 Ταξινόμηση των βιοφαινολών του ελαιολάδου

Οι βιοφαινόλες αποτελούν μια μεγάλη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών (χημικές ενώσεις με χαμηλό μοριακό βάρος), οι οποίες αποτελούνται από έναν τουλάχιστον αρωματικό βενζολικό δακτύλιο, ο οποίος φέρει μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες (Gorzynik-Debicka et al. 2018). Στο παρθένο ελαιόλαδο έχει διαπιστωθεί η παρουσία μεγάλου αριθμού φαινολικών ενώσεων στο πολικό φαινολικό κλάσμα του. Πρόκειται για ένα πολύπλοκο μίγμα ενώσεων με διαφορετικές χημικές δομές, το οποίο παραλαμβάνεται κατά την εκχύλιση του ελαιολάδου με πολικούς διαλύτες. Τα πολικά φαινολικά συστατικά σχετίζονται με τη σταθερότητα του ελαίου, αλλά και τις βιολογικές του ιδιότητες. Περίπου 50 ενώσεις που υπάρχουν στο φαινολικό κλάσμα έχουν διαχωριστεί και ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα (Cerretani, Tullia, et al. 2009). Οι πολικές φαινολικές ενώσεις μπορούν να ταξινομηθούν σε διαφορετικές χημικές κατηγορίες, ανάλογα με τη χημική τους δομή και λαμβάνοντας υπόψη κυρίως τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων και τα δομικά στοιχεία που συνδέουν τους δακτυλίους μεταξύ τους (Angelis et al. 2017; Cerretani, Tullia Toschi, and Bendini 2009; Diamantakos et al. 2021; Kalogeropoulos and Tsimidou 2014; Pedan et al. 2019). Μέχρι στιγμής έξι βασικές χημικές οικογένειες έχουν αναφερθεί στο παρθένο ελαιόλαδο, οι οποίες αναλύονται παρακάτω:

1. Απλές φαινόλες

Οι φαινολικές αλκοόλες, είναι αρωματικές οργανικές ενώσεις στις οποίες μία (τουλάχιστον) υδροξυλομάδα συνδέεται άμεσα με ένα βενζολικό δακτύλιο. Οι κύριες φαινολικές αλκοόλες που αναγνωρίζονται στο παρθένο ελαιόλαδο είναι η υδροξυτυροσόλη [HT, 3,4-διυδροξυφαινυλαιθανόλη (3,4-DHPEA)] και η τυροσόλη [T, p-υδροξυφαινυλαιθανόλη (p-HPEA)], οι οποίες εμφανίζουν αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Εικόνα 1.23). Οι ενώσεις αυτές, είναι οι πιο άφθονες και αντιπροσωπευτικές φαινολικές αλκοόλες στο ελαιόλαδο (90–95%) και, ενώ οι συγκεντρώσεις

τους στα «φρέσκα» δείγματα είναι συνήθως χαμηλές, αυξάνονται με τον προχωρημένο χρόνο αποθήκευσης, λόγω της υδρόλυσης που υφίστανται τα σεκοϊριδοειδή, ολεωρωπεΐνη (OLE) και άγλυκο του λιγκοτροσίδη (LA) (Ajal et al. 2021; Bouguerra Neji and Bouaziz 2022). Η διαφορά των T και HT, έγκειται σε μία επιπλέον ομάδα υδροξυλίου στη μέτα-θέση που εμφανίζει η HT, γεγονός που την κάνει και βιολογικά πιο ισχυρή, καθώς το μόριο αυτό έχει συσχετιστεί με αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές και αντιγηραντικές δραστηριότητες, ενώ συμβάλει και στην πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων (Ajal et al. 2021; Marković et al. 2019; Rodríguez-Morató et al. 2015; Serreli and Deiana 2018). Ειδικότερα, η HT είναι η καλύτερα μελετημένη φαινόλη του ελαιολάδου σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα, έχοντας δείξει αντιφλεγμονώδεις, αντιαθηρογόνες και αντιθρομβωτικές ιδιότητες. Μελέτες *in vitro* δείχνουν ότι εκτός από την αντιοξειδωτική της δράση, μπορεί να βελτιώσει την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, καθώς και το λιπιδικό και το αιμοστατικό προφίλ ασθενών. Επίσης, το μόριο αυτό αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και στη γονιδιακή έκφραση και, επομένως, θα μπορούσε να έχει αντικαρκινικές ιδιότητες. Ωστόσο, παρόλο που τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι το EVOO, δρώντας σε τοπικό και συστηματικό επίπεδο, βελτιώνει συμπτώματα σε χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους, δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για την επίτευξη συγκεκριμένων διατροφικών κατευθυντήριων γραμμών (Bertelli et al. 2020; Santangelo et al. 2017).



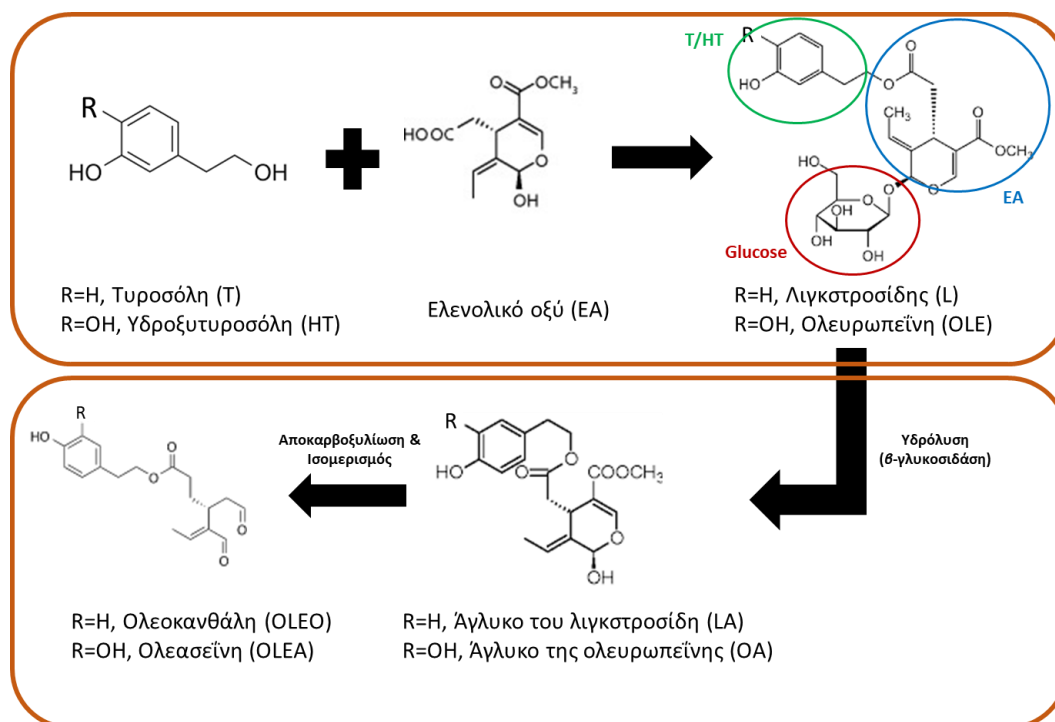
Εικόνα 1.23: Χημική δομή τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης (τροποποίηση από: Serreli et. al 2018).

2. Σεκοϊριδοειδή

Τα σεκοϊριδοειδή αποτελούν την πλειονότητα των βιοδραστικών βιοφαινολών στο ελαιόλαδο. Είναι μια ομάδα ενώσεων που απαντώνται και στα 500 είδη φυτών της οικογένειας *Oleaceae*, συμπεριλαμβανομένης και της ευρωπαϊκής ελιάς (*Olea europaea* L.). Τα σεκοϊριδοειδή προέρχονται από τον δευτερογενή μεταβολισμό των τερπενίων. Τα περισσότερα σεκοϊριδοειδή στο ελαιόλαδο αποτελούν προϊόντα υδρόλυσης της ολεωρωπεΐνης (OLE) και του λιγκοτροσίδη, τα οποία όταν έρχονται σε επαφή με τη β-γλυκοσιδάση μετατρέπονται στις αντίστοιχες άγλυκες μορφές ολεωρωπεΐνης [HT συνδεδεμένη με ελενολικό οξύ, (3,4-DHPEA-EA)] και λιγκοτροσίδη [T συνδεδεμένη με

ελενολικό οξύ, (p-HPEA-EA)] (Εικόνα 1.24). Αυτές οι δύο μορφές είναι ασταθείς στο ελαιόλαδο (Ajal et al. 2021; Romani et al. 2019).

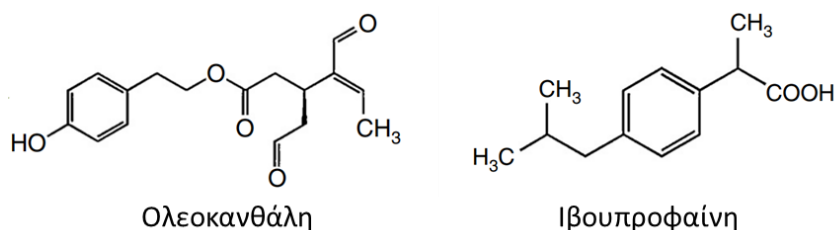
Ειδικότερα, κατά τις διεργασίες σύνθλιψης και μάλαξης για την παραγωγή ελαιολάδου, λαμβάνουν χώρα διάφορες ενζυμικές και μη ενζυμικές αντιδράσεις υδρόλυσης και οξειδωσης που προκαλούν αρκετές αλλαγές στη χημική δομή των φυσικών φαινολών του ελαιοκάρπου, με αποτέλεσμα τη δημιουργία νέων παράγωγων σεκοϊριδοειδών. Μεταξύ αυτών των ενζύμων, η β-γλυκοσιδάση φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στον μετασχηματισμό αυτών των ενώσεων σε διάφορα παράγωγα σεκοϊριδοειδών, όπως διαλδεϋδικές μορφές αποκαρβοξυμεθυλελενολικού οξέος εστεροποιημένου με τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη, με πιο χαρακτηριστικές την ολεοκανθάλη [T συνδεδεμένη με διαλδεϋδική μορφή ελενολικού οξέος (p-HPEA-EDA)] και την ολεασεΐνη [HT συνδεδεμένη με διαλδεϋδική μορφή ελενολικού οξέος (3,4-DHPEA-EDA)], αντίστοιχα (Εικόνα 1.24). Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγεί την ταχεία μείωση των συγκεντρώσεων της ολευρωπεΐνης και του λιγκτροσίδη που παρατηρείται κατά τη μετάβαση από τον καρπό της ελιάς στο αντίστοιχο λάδι. Επίσης, είναι γνωστό ότι σε υδρόλυση βασίζεται και η απελευθέρωση υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης στο παρθένο ελαιόλαδο από σύνθετα σεκοϊριδοειδή, κατά την αποθήκευση (Ajal et al. 2021; Oliverio et al. 2021). Συνολικά, δείγματα παρθένου ελαιολάδου με αυξημένα επίπεδα σεκοϊριδοειδών εμφανίζουν μεγαλύτερη αντοχή στην οξείδωση (υψηλότερη οξειδωτική σταθερότητα), υψηλότερη ένταση πικρίας και έχουν



Εικόνα 1.24: Αναπαράσταση των βασικών βιοσυνθετικών μονοπατιών για την παραγωγή ολεασεΐνης (OLEA) και ολεοκανθάλης (OLEO).

συσχετιστεί με σημαντικές ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου (Emma et al. 2021).

Η ολευρωπεΐνη, περιέχεται κυρίως στα φύλλα της ελιάς και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις στο ελαιόλαδο, ωστόσο μελέτες κάνουν αναφορά για τη θετική δράση της σε καρδιαγγειακές παθήσεις (Oliverio et al. 2021; Rigacci et al. 2017). Από την άλλη πλευρά η ολεοκανθάλη και η ολεασεΐνη, αν και εντοπίζονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, είναι αρκετά ασταθή μόρια, καθώς με τον χρόνο διασπώνται και μετατρέπονται σε τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη, αντίστοιχα. Τα μόρια αυτά εμφανίζουν αρκετές δυσκολίες στην απομόνωση και στη σύνθεσή τους, γεγονός που έχει καθυστερήσει αρκετά την ερευνητική διαδικασία για την αξιολόγηση της ασφάλειας και των βιολογικών τους ιδιοτήτων. Παρόλα αυτά η ολεοκανθάλη αποτελεί ένα υποσχόμενο μόριο, καθώς οι έως τώρα μελέτες έχουν δείξει ότι θα μπορούσε να συμβάλει στον έλεγχο των μεταστατικών καρκίνων, όπως επίσης και στην καταπολέμηση της νόσου *Alzheimer* (Batarseh and Kaddoumi 2017). Το μόριο αυτό ευθύνεται για το χαρακτηριστικό «κάψιμο» που προκαλεί το ελαιόλαδο στο λαιμό. Έρευνα αναφέρει ότι δρα ως ένα φυσικό αντιφλεγμονώδες που εμφανίζει ανάλογη δράση με αυτή της ιβουπροφαίνης, η οποία αποτελεί δραστική ουσία πολλών παυσίπονων και αντιπυρετικών, χωρίς ωστόσο να υπάρχει καμία δομική ομοιότητα μεταξύ των δυο ουσιών (Εικόνα 1.25) (Beauchamp et al. 2005).



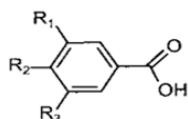
Εικόνα 1.25: Χημική δομή ολεοκανθάλης και ιβουπροφαίνης (τροποποίηση από: Beauchamp et. al 2005).

3. Φαινολικά οξέα

Ο όρος «φαινολικά οξέα» αναφέρεται στις φαινολικές ενώσεις που έχουν μία ομάδα καρβοξυλικού οξέος. Διακρίνονται κυρίως σε δύο υποκατηγορίες: τα υδροξυβενζοϊκά οξέα που προέρχονται από το βενζοϊκό οξύ (δομή C₆-C₁) και συναντώνται κυρίως στα κόκκινα φρούτα, τα κρεμμύδια και το τσάι και τα υδροξυκινναμωμικά οξέα (δομή C₆-C₃), που προέρχονται από το κινναμωμικό οξύ και συναντώνται κυρίως στη φλούδα των ώριμων φρούτων και σε φρούτα με όξινο περιβάλλον (Εικόνα 1.26) (Manach et al. 2004). Τα φαινολικά οξέα που ανιχνεύονται πιο συχνά στο παρθένο ελαιόλαδο είναι: τα p- και o-κουμαρικά, το p-υδροξυβενζοϊκό, το καφεϊκό, το γαλλικό, το κινναμωμικό, το βανιλλικό, το

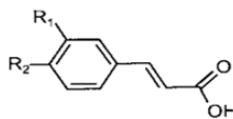
συριγγικό και το φερουλικό οξύ. Σε σύγκριση με άλλες χημικές κατηγορίες, τα φαινολικά οξέα βρίσκονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις στο παρθένο ελαιόλαδο. Ωστόσο, αυτές οι ενώσεις αναγνωρίζονται ως ισχυρά φυσικά αντιοξειδωτικά, που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε βιολογικές δραστηριότητες και σε αισθητηριακά χαρακτηριστικά του παρθένου ελαιολάδου (Ajal et al. 2021).

Υδροξυβενζοϊκά οξέα



R1 = R2 = OH, R3 = H : Πρωτοκατεχουϊκό οξύ
R1 = R2 = OH : Γαλλικό οξύ

Υδροξυκινναμωμικά οξέα

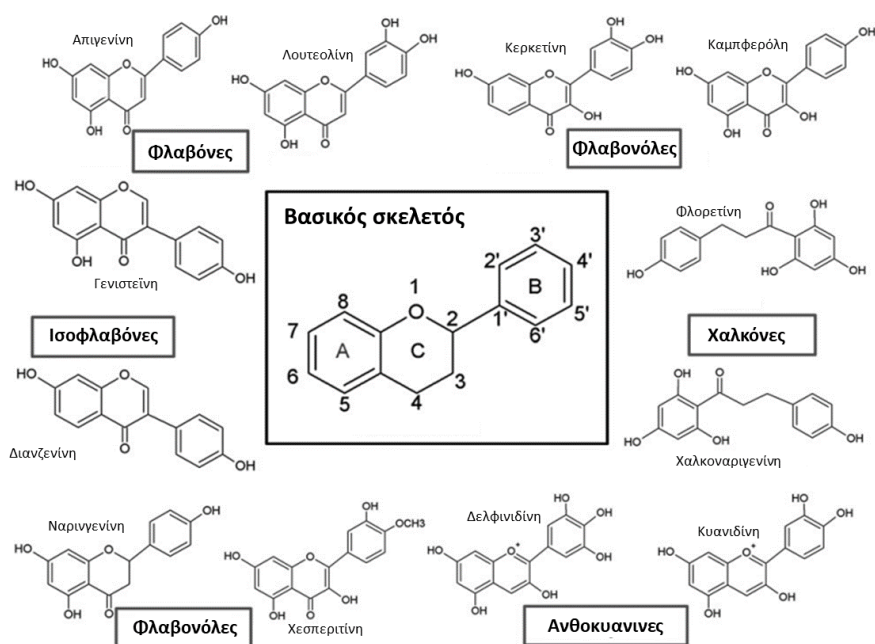


R1 = OH : Κουμαρικό οξύ
R1 = R2 = OH : Καφεϊκό οξύ
R1 = OCH3, R2 = OH : Φερουλικό οξύ

Εικόνα 1.26: Χημικές δομές φαινολικών οξέων (τροποποίηση από: Manach et. al 2004).

4. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή αποτελούν μια μεγάλη ομάδα περίπου 4000 φαινολικών ενώσεων και είναι γνωστές για τις ευεργετικές τους επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου. Διαθέτουν δύο αρωματικούς δακτυλίους που συνδέονται με μια γραμμική αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα (δομή C₆-C₃-C₆). Τα φλαβονοειδή ανάλογα με τον υποκαταστάτη που βρίσκεται στον

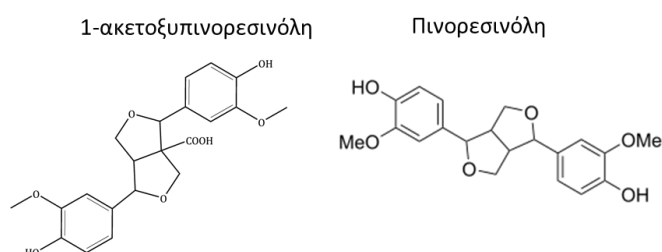


Εικόνα 1.27: Βασική δομή σκελετού των φλαβονοειδών και των κατηγοριών τους (τροποποίηση από: Panche et. al 2016).

πυρονικό δακτύλιο διακρίνονται στις φλαβονόλες, στις φλαβόνες, στις ισοφλαβόνες, στις φλαβανόνες και στις ανθοκυανιδίνες (Εικόνα 1.27) (Panche, Diwan, and Chandra 2016; Vermerris and Nicholson 2006). Τα κύρια φλαβονοειδή στο παρθένο ελαιόλαδο είναι η λουτεολίνη, η απιγενίνη και η μεθοξυλουτεολίνη, η οποία συναντάται σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση (Ajal et al. 2021; Romani et al. 2019).

5. Λιγνάνες

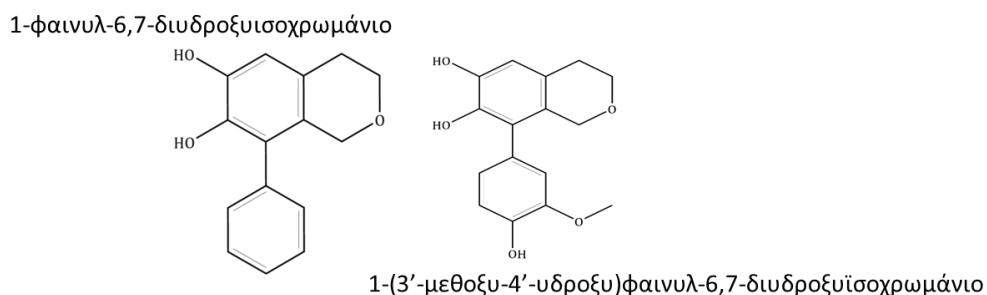
Η χημική δομή αυτών των μεταβολιτών προκύπτει από το συνδυασμό δύο μορίων φαινυλοπροπανίου (δομή C₆ - C₃). Οι φυτικές λιγνάνες μεταβολίζονται από την εντερική μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου σε εντεροδιόλη και εντερολακτόνη. Οι κύριες λιγνάνες που εντοπίζονται στο παρθένο ελαιόλαδο είναι η 1-ακετοξυπινορεσινόλη και η πινορεσινόλη (Εικόνα 1.28) (Ajal et al. 2021; Romani et al. 2019).



Εικόνα 1.28: Χημική δομή βασικών λιγνάνων που ανιχνεύονται στο ελαιόλαδο (τροποποίηση από: Romani et. al 2019).

6. Υδροξυ-ισοχρωμάνια

Οι ενώσεις αυτές εντοπίζονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις και σχηματίζονται κυρίως κατά το στάδιο της μάλαξης, μέσω αλληλεπίδρασης υδροξυτυροσόλης και αρωματικών αλδεϋδών. Κυρίως δύο υδροξυ-ισοχρωματικές ενώσεις ανιχνεύονται στο παρθένο ελαιόλαδο, το 1-φαινυλ-6,7-διυδροξυισοχρωμάνιο και το 1-(3'-μεθοξυ-4'-υδροξυ)φαινυλ-6,7-διυδροξυισοχρωμάνιο (Εικόνα 1.29) (Ajal et al. 2021).



Εικόνα 1.29: Χημική δομή βασικών υδροξυ-ισοχρωματικών ενώσεων που ανιχνεύονται στο ελαιόλαδο (τροποποίηση από: Ajal et. al 2021).

1.8.6.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο

Το παρθένο ελαιόλαδο εμφανίζει διακυμάνσεις τόσο ως προς τη σύσταση του φαινολικού κλάσματος, όσο και ως προς τη συγκέντρωση των επιμέρους φαινολικών του συστατικών. Η περιεκτικότητα του σε βιοφαινόλες κυμαίνεται από 0,02 έως 1000 mg/kg (Reboredo-Rodríguez et al. 2018; Rodríguez-Morató et al. 2015; Serreli and Deiana 2018). Στους βασικότερους παράγοντες που διαμορφώνουν το φαινολικό προφίλ του παρθένου ελαιολάδου ανήκουν η καλλιεργούμενη ποικιλία, οι εδαφοκλιματικές συνθήκες, οι καλλιεργητικές πρακτικές που χρησιμοποιούνται, ο χρόνος συγκομιδής, το στάδιο ωρίμανσης του καρπού κατά τη συγκομιδή, οι τεχνολογίες επεξεργασίας και οι συνθήκες αποθήκευσης. Δεδομένα κλινικών και πειραματικών μελετών αναδεικνύουν ότι η αποτελεσματική βιολογική δράση του ελαιολάδου εξαρτάται από τη βιοδιαθεσιμότητα των βιοφαινολών (Ajal et al. 2021; Castillo-Luna et al. 2021; Kalogeropoulos and Tsimidou 2014; Serreli and Deiana 2018).

1.8.6.4 Βιοδιαθεσιμότητα και απορρόφηση βιοφαινολών στον ανθρώπινο οργανισμό

Τα προϊόντα της ελιάς, που είναι πλούσια σε βιοφαινόλες, συγκαταλέγονται στα πιο μελετημένα τρόφιμα τόσο ως προς τη χημική τους σύνθεση, όσο και για τις ευεργετικές τους ιδιότητες στην υγεία. Παρόλα αυτά υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα για τη βιοδιαθεσιμότητά τους. Η συγκέντρωση των βιοφαινολών του ελαιολάδου, η σύστασή τους, καθώς και ο βαθμός απορρόφησής τους και ο ρυθμός μεταβολισμού τους από τον οργανισμό, αποτελούν παράγοντες υψίστης σημασίας για τον προσδιορισμό των επιδράσεών τους στην υγεία. Είναι ζωτικής σημασίας να γίνει κατανοητή η βιομετατροπή μιας μητρικής ένωσης σε άλλα ανάλογα ή παράγωγα που θα μπορούσαν ενδεχομένως να λειτουργήσουν ως συνεργοί ή/και ανταγωνιστές στην επίδειξη μιας βιολογικής λειτουργίας (Νίκου et al. 2022). Η βιοδιαθεσιμότητα των βιοφαινολών προσδιορίζεται με τη μέτρηση της συγκέντρωσής τους στα βιολογικά υγρά, κυρίως στο πλάσμα και στα ούρα, ενώ ο μεταβολισμός λαμβάνει χώρα σε διάφορους ιστούς, εκ των οποίων το ήπαρ και το έντερο είναι οι κύριες θέσεις για ενώσεις που χορηγούνται από το στόμα (Νίκου et al. 2022; Reboredo-Rodríguez et al. 2018). Παρά την πληθώρα των βιβλιογραφικών δεδομένων που αφορούν στη βιολογική τους δραστηριότητα σε *in vitro*, *in vivo* και κλινικές δοκιμές, οι μελέτες που επικεντρώνονται στη βιοδιαθεσιμότητα και τον μεταβολισμό τους είναι αρκετά περιορισμένες.

Στην περίπτωση του παρθένου ελαιολάδου, οι περισσότερες έρευνες έχουν επικεντρωθεί σε συγκεκριμένες βιοφαινολικές ενώσεις όπως η ολεωρωπεΐνη, η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη και τα παράγωγά τους, καθώς οι ενώσεις αυτές συνδέονται με υψηλή βιοδραστικότητα (Ajal et al. 2021; Nikou et al. 2022). Η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη έχει αποδειχθεί ότι είναι οι πιο απορροφήσιμες φαινολικές ενώσεις στον εντερικό σωλήνα, με το ποσοστό απορρόφησης που κυμαίνεται 40 έως 95% (Ajal et al. 2021). Επίσης, επιστημονική μελέτη αναφέρει, ότι οι ποσότητες υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης που φτάνουν στο λεπτό έντερο μετά τη διέλευση μέσω του όξινου περιβάλλοντος του στομάχου, είναι σημαντικά υψηλότερες από αυτές που υπήρχαν αρχικά στο παρθένο ελαιόλαδο που καταναλώθηκε (Ajal et al. 2021; Corona et al. 2006).

Η ιδιόμορφη χημική δομή των σεκοϊριδοειδών εμποδίζει το σχεδιασμό μελετών μεταβολισμού, λόγω των δυσκολιών απομόνωσης και ανίχνευσης τους. Τα μόρια αυτά υφίστανται σημαντικές μεταβολές στις περιοχές του στομάχου, του δωδεκαδακτύλου και του παχέος εντέρου, με ποσοστό ανάκτησης στο δωδεκαδακτυλικό επίπεδο που κυμαίνεται μεταξύ 7% και 34% (Ajal et al. 2021). Η γλυκοζυλίωση και η διάσπαση των γλυκοσιδικών δεσμών συμμετέχουν στην απορρόφηση των σεκοϊριδοειδών και πιστεύεται ότι μερικά από αυτά, όπως η ολεασεΐνη, απορροφώνται στο λεπτό έντερο με παθητική διάχυση. Η ολεοκανθάλη έχει βρεθεί ότι εμφανίζει χαμηλά ποσοστά απορρόφησης από το στόμα (16%), ενώ έρευνες έχουν δείξει ότι υψηλότερα επίπεδα ολεοκανθάλης φτάνουν στο ανθρώπινο πλάσμα απ' ό,τι στους αρουραίους (López-yerena et al. 2020). Ωστόσο, η βιοδιαθεσιμότητα και των δύο έχει μελετηθεί ελάχιστα είτε σε *in vitro* μοντέλα, είτε σε προκλινικές και κλινικές δοκιμές. Οι περισσότερες έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην ολεωρωπεΐνη και τις άγλυκες μορφές της, όπου και σε αυτή την περίπτωση, ο μηχανισμός απορρόφησης εξακολουθεί να παραμένει ασαφής, αν και αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι ασκεί τις βιολογικές της επιδράσεις μέσω της μετατροπή της σε υδροξυτυροσόλη (Ajal et al. 2021; Lozano-Castellón et al. 2020).

Συνολικά, οι μηχανισμοί με τους οποίους λαμβάνει χώρα η απορρόφηση των βιοφαινολών μετά τη λήψη τους από το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο, δεν έχουν αποσαφηνισθεί πλήρως. Σύμφωνα με μελέτες σε ανθρώπους, η εντόπιση δευτερογενών μεταβολιτών στο πλάσμα και τα ούρα αποδίδεται σε διαδικασίες υδρογόνωσης, ενυδάτωσης, υδροξυλίωσης και γλυκουρονιδίωσης (Lozano-Castellón et al. 2020). Ωστόσο, απαιτούνται περισσότερες έρευνες σχετικά με τις διαδικασίες απορρόφησης και μεταβολισμού, οι οποίες θα ρίξουν φως στη βιοδιαθεσιμότητα αυτών των μεταβολιτών και στο επίπεδο συγκέντρωσης τους στο πλάσμα.

1.8.6.5 Γνωμοδότηση της Ευρωπαϊκής Επιτροπής Ασφάλειας Τροφίμων (EFSA) για τις βιοφαινόλες του ελαιόλαδου

Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή Ασφάλειας Τροφίμων (European Food Safety Association - EFSA) αναγνώρισε μέσω του Ισχυρισμού Υγείας, τη θετική δράση των βιοφαινολών του ελαιολάδου, η οποία περιγράφεται στο Άρθρο 13 του Κανονισμού (ΕΕ) αριθμ. 1924/2006 (EFSA 2011). Οι ισχυρισμοί αυτοί αφορούν στη συμβολή των πολυφαινολικών ενώσεων της ελιάς ως προς:

- την προστασία των λιπιδίων του αίματος (LDL) από το οξειδωτικό στρες
- τη διατήρηση φυσιολογικών επιπέδων HDL- χοληστερόλης στο αίμα
- τη διατήρηση φυσιολογικών επιπέδων πίεσης στο αίμα
- τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες
- την υγεία του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος
- τη διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας του γαστρεντερικού σωλήνα
- την άμυνα του οργανισμού έναντι εξωγενών παραγόντων

Ωστόσο, μέσω του Ισχυρισμού Υγείας που περιλαμβάνεται στον Ευρωπαϊκό Κανονισμό 432 / 2012 , μόνο στην περίπτωση της οξειδωτικής προστασίας των λιποπρωτεϊνών χαμηλής



Εικόνα 1.30: Ευρωπαϊκή Επιτροπή Ασφάλειας Τροφίμων (τροποποίηση από: EFSA 2011).

πυκνότητας (LDL) υφίσταται επιβεβαιωμένος συσχετισμός μεταξύ της κατανάλωσης πολυφαινολών ελαιολάδου (υδροξυτυροσόλη και παράγωγα αυτής με καθορισμένη περιεκτικότητα) (COMMISSION REGULATION (EU) 2012). Ειδικότερα, η ελάχιστη ημερήσια κατανάλωση υδροξυτυροσόλης και των

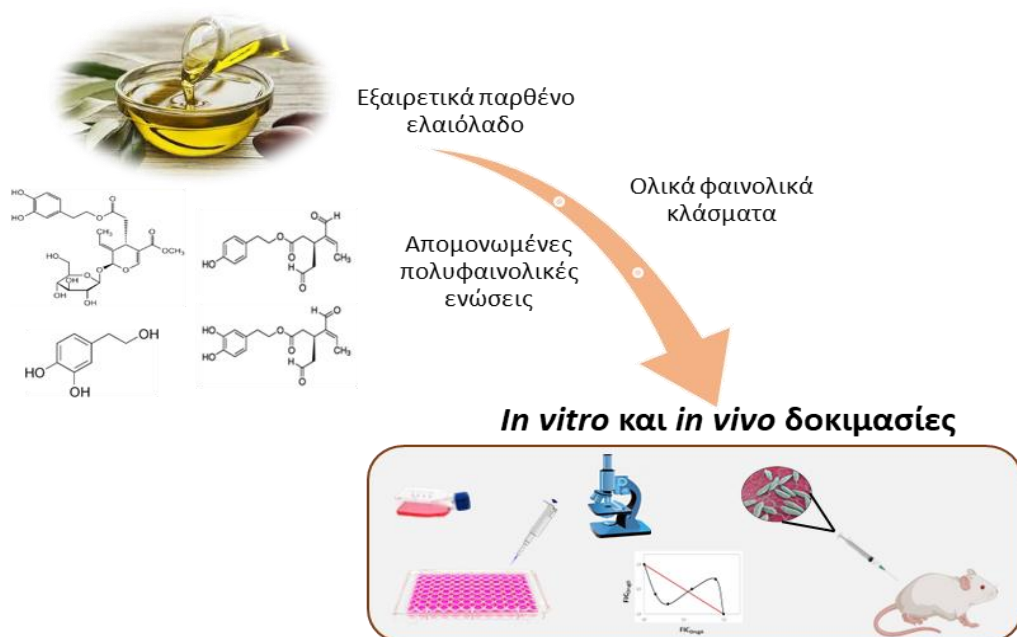
παραγώγων της (π.χ. σύμπλεγμα ολεωρωπεΐνης και τυροσόλη) που έδειξε σημαντική επίδραση στην υπεροξείδωση LDL, ήταν τα 5 mg ανά 20 g ελαιολάδου. Όσον αφορά στους υπόλοιπους ισχυρισμούς υγείας της EFSA, τα μέχρι στιγμής δεδομένα που παρέχονται είναι ανεπαρκή ώστε να τους τεκμηριώσουν.

2. Σκοπός

Η Μεσογειακή διατροφή αποτελεί ένα από τα πιο μελετημένα διατροφικά πρότυπα παγκοσμίως, καθώς έχει συνδεθεί με ένα ευρύ φάσμα ευεργετικών επιδράσεων στην υγεία. Το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο, αποτελεί βασικό συστατικό της και χαρακτηρίζεται για την υψηλή διατροφική του αξία και τον πλούτο του σε βιοενεργά μόρια. Από αυτά, στο μικροσκόπιο της διεθνούς επιστημονικής κοινότητας βρίσκονται το ολικό φαινολικό κλάσμα του και οι πολυφαινόλες που αποτελούν μέρος αυτού, καθώς αποδεικνύουν διαρκώς πως σχετίζονται με αντιοξειδωτικά, αντιμικροβιακά και αντιφλεγμονώδη οφέλη για την υγεία.

Η λειψμανίαση, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, χαρακτηρίζεται ως παραμελημένο τροπικό νόσημα, που αποτελεί και παγκόσμια απειλή, καθώς είναι ταυτόχρονα αναδυόμενη ζωοανθρωπονόσος σε περιοχές όπως η Νότια Ευρώπη. Μέχρι σήμερα, δεν έχει βρεθεί αποτελεσματικό εμβόλιο για την αντιμετώπισή της, ενώ οι τρέχουσες χημειοθεραπείες εμφανίζουν σημαντικά μειονεκτήματα, όπως τοξικότητα, ανάπτυξη αντοχής του παρασίτου και υψηλό κόστος. Το γεγονός ότι ο επιπολασμός της λειψμανίασης στους σκύλους στη Νότια Ευρώπη είναι πολύ υψηλότερος από τον αντίστοιχο στον άνθρωπο, οδήγησε το επιστημονικό ενδιαφέρον στη διερεύνηση του ρόλου της Μεσογειακής διατροφής, ειδικότερα των συστατικών του ελαιολάδου, στην πρόληψη και θεραπεία της νόσου.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η συγκριτική μελέτη της αντιλειψμανιακής αποτελεσματικότητας δύο ολικών φαινολικών κλασμάτων (total phenolic fraction, TPF), των TPF1 και TPF2, διαφορετικής φαινολικής σύνθεσης, και τεσσάρων



Εικόνα 2.1. Γραφική απεικόνιση της πειραματικής πορείας της διδακτορικής διατριβής.

απομονωμένων πολυφαινολικών ενώσεων, της ολευρωπεΐνης (OLE), της υδροξυτυροσόλης (HT), της ολεασεΐνης (OLEA) και της ολεοκανθάλης (OELO), που προέρχονται από το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο.

Οι ουσίες αυτές θα αξιολογηθούν *in vitro* ως προς τη δραστηριότητά τους, έναντι των παρασίτων του γένους *Leishmania*, ενώ θα μελετηθεί και η συνδυαστική τους δράση με το πρότυπο αντιλεϊσμάνιακό φάρμακο μιλτεφοσίνη (HePC), με στόχο την εφαρμογή συνδυαστικών θεραπευτικών σχημάτων με χαμηλότερες απαιτούμενες δόσεις του πρότυπου φαρμάκου. Τα αποτελέσματα που θα αναδειχθούν ως τα πλέον υποσχόμενα, θα χρησιμοποιηθούν για τη διερεύνηση τόσο μορίων κυτταρικής σηματοδότησης, όσο και για τη γονιδιακή έκφραση παραγόντων, ενδεικτικών των ανοσολογικών μηχανισμών που ρυθμίζουν τη θεραπεία της νόσου. Ιδιαίτερη έμφαση θα δοθεί στη συγκριτική μελέτη των δύο ολικών φαινολικών κλασμάτων, καθώς ως πιο φθηνές και εύκολα προσβάσιμες πηγές, μπορούν να ανοίξουν ένα νέο πεδίο στην έρευνα για την αντιμετώπιση χρόνιων φλεγμονωδών νοσημάτων. Ειδικότερα, θα διερευνηθεί ο τύπος του επαγόμενου κυτταρικού θανάτου μέσω εκτίμησης μορφολογικών και βιοχημικών δεικτών. Τέλος, το φυσικό προϊόν που θα έχει την πιο υποσχόμενη μονήρη και συνδυαστική δράση κατά την *in vitro* αξιολόγηση, θα αξιολογηθεί περαιτέρω σε *in vivo* πειραματικά μοντέλα δερματικής λεϊσμανίασης των γενετικά ευαίσθητων BALB/c ποντικών.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Φυσικά προϊόντα

3.1.1 Εκχύλιση εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου

Δύο διακριτά δείγματα εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου (extra virgin olive oil, EVOO), EVOO-1 και EVOO-2, επιλέχθηκαν προς μελέτη με κριτήριο τη διαφορετική περιεκτικότητά τους ως προς τις πολυφαινόλες υδροξυτυροσόλη (HT), τυροσόλη (T), ολεασειίνη (OLEA) και ολεοκανθάλη (OLEO). Τα δείγματα της παρούσας μελέτης, EVOO-1 και EVOO-2, προήλθαν από την Κορωνέικη ποικιλία και συλλέχθηκαν κατά την περίοδο συγκομιδής 2020 -2021 από δύο διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας, την Πελοπόννησο (Αρκαδία) και την Κρήτη (Ηράκλειο), αντίστοιχα. Αμέσως μετά την άφιξή τους στο Εργαστήριο του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής, του Πανεπιστημίου ΕΚΠΑ, υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση (Heraeus Multifuge 3S, Thermo Scientific, Massachusetts, USA), προκειμένου να αποφευχθεί η συσσώρευση ιζήματος που οδηγεί σε ταχεία αποσύνθεση των βιοφαινολών. Στη συνέχεια, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε αδιαφανή, υαλώδη φιαλίδια σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να επιτευχθεί η χημική τους σταθερότητα.

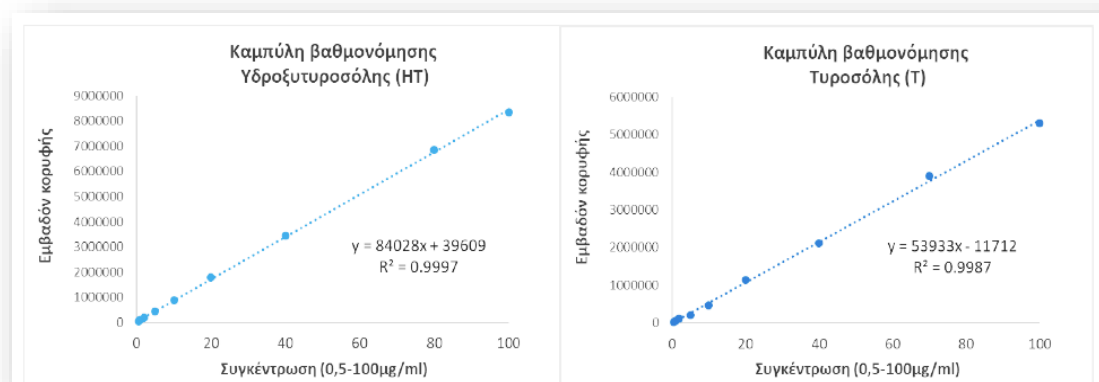
Στη συνέχεια, ακολούθησε η εκχύλιση των δειγμάτων EVOO-1 και EVOO-2, από την οποία προέκυψαν δύο διακριτά εκχυλίσματα πολυφαινολών (ολικά φαινολικά κλάσματα, total phenolic fraction, TPF), τα TPF1 και TPF2, αντίστοιχα. Η επιλογή της ενδεδειγμένης μεθόδου εκχύλισης βασίστηκε στο κριτήριο της βέλτιστης αποτελεσματικότητας με την υψηλότερη απόδοση εκχυλίσματος, και αποτελεί την τροποποιημένη μέθοδο εκχύλισης του ελαιολάδου κατά το Διεθνές Συμβούλιο Ελιάς (International Olive Council, IOC), σύμφωνα με τις αναλυτικές συνθήκες που αναφέρονται στη μέθοδο IOC / T.20 / Doc No 29 (IOC 2009). Ειδικότερα, σε δοκιμαστικό σωλήνα των 100 mL (ISOLAB Laborgeräte GmbH, Eschau, Germany), 20 g EVOO-1 / EVOO-2 και 50 mL MeOH / H₂O (80:20, v/v) αναμίχθηκαν με ανάδευση τύπου vortex (IKA-Werke GmbH, Staufen, Germany) για περίπου 2 λεπτά. Ύστερα, το μίγμα τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για 25 λεπτά. Η υδροαλκοολική φάση εξατμίστηκε υπό συνθήκες κενού και φυγοκέντρησης στους 30 °C (GeneVac HT-4X) και τα αποξηραμένα εκχυλίσματα (TPFs) που προέκυψαν αποθηκεύτηκαν σε υαλώδη φιαλίδια στους -20 °C μέχρι την ανάλυση.

Τα φαινολικά κλάσματα TPF μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας, του Τμήματος Μικροβιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ (ΕΙΠ, Αθήνα), διαλυτοποιήθηκαν σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) (AppliChem, Germany), και

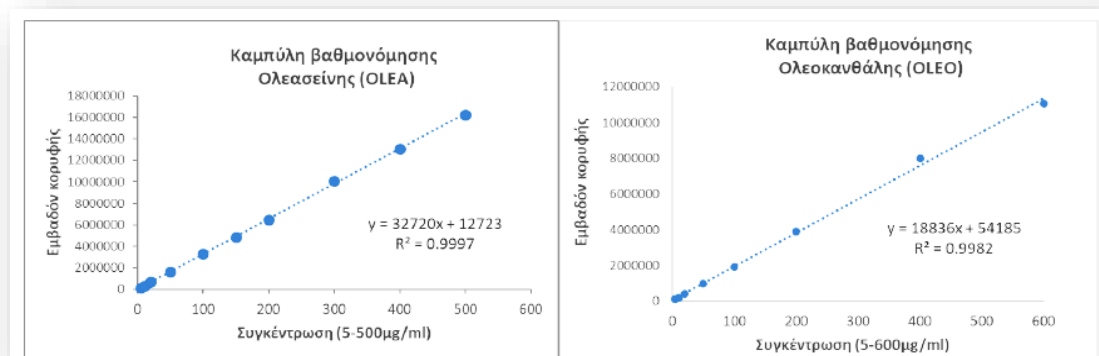
αραιώθηκαν περαιτέρω σε μέσο κυτταροκαλλιέργειας κατά τις διάφορες δοκιμασίες. Τα διαλυτοποιημένα εκχυλίσματα αποθηκεύτηκαν στους -80 °C μέχρι τη χρήση τους.

3.1.2 Ανάλυση και ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών των κλασμάτων

Ο προσδιορισμός του βιοφαινολικού περιεχομένου των TPF1 και TPF2 πραγματοποιήθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης σε σειρά με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection, HPLC-DAD). Κλάσμα του ξηρού εκχυλίσματος (TPF) διαλύθηκε σε MeOH / H₂O (80:20, v/v), διηθήθηκε και προωθήθηκε σε ανάλυση HPLC-DAD. Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες ουσίες που διατίθενται στη βιβλιοθήκη φυσικών προϊόντων του Εργαστηρίου του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του Τμήματος Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ. Ειδικότερα ο διαχωρισμός στις επιμέρους ουσίες πραγματοποιήθηκε σε στήλη Spherisorb Discovery HS C18 αντίστροφης φάσης (250 × 4,6 mm, 5 μm, Supelco), χρησιμοποιώντας μια κινητή φάση που αποτελούνταν από 0,2% υδατικό ορθοφωσφορικό οξύ (Α) και MeOH / ACN (50:50 v/v) (Β), με ρυθμό ροής 1 mL/min, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η εφαρμοζόμενη βαθμιδωτή έκλυση διαμορφώθηκε ως εξής: 0 min: 96% Α και 4% Β, 40 λεπτά: 50% Α και 50%



Εικόνα 3.1. Καμπύλες βαθμονόμησης υδροξυτυροσόλης (HT) (0,5-100 μg/mL) και τυροσόλης (T) (0,5-100 μg/mL).



Εικόνα 3.2. Καμπύλες βαθμονόμησης ολεασεΐνης (OLEA) (5-500 μg/mL) και ολεοκανθάλης (OLEO) (5-600 μg/mL).

B, 45 λεπτά: 40% A και 60% B, 60 λεπτά: 0% A και 100% B, 70 λεπτά: 0% A και 100% B, 72 λεπτά: 96% A και 4% B και 82 λεπτά: 96% A και 4% B. Τα χρωματογραφήματα παρακολούθηθηκαν στα 280 nm.

Τα επίπεδα συγκέντρωσης των κύριων βιοφαινολών προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της καμπύλης αναφοράς. Ειδικότερα, για τους υπολογισμούς χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες καμπύλες βαθμονόμησης για τις εξής πρότυπες βιοφαινόλες: HT, T, OLEA και OLEO. Οι πρότυπες καμπύλες των HT και T αποτελούνταν από 9 σημεία, ενώ οι OLEA και OLEO ποσοτικοποιήθηκαν σύμφωνα με καμπύλες βαθμονόμησης 8 και 10 σημείων, αντίστοιχα (Εικόνες 3.1 και 3.2). Οι αντίστοιχες εξισώσεις που προέκυψαν είναι: $y=84028x + 39609$ ($r^2=0,9997$) για την HT, $y=53933x - 11712$ ($r^2=0,9987$) για την T, $y=32720x + 12723$ ($r^2=0,9997$) για την OLEA και $y=18836x + 54185$ ($r^2=0,9982$) για την OLEO. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε mg/g TPF. Τα πρότυπα αναφοράς HT και T αγοράστηκαν από την ExtraSynthase (Lyon Nord, Γαλλία), ενώ τα αντίστοιχα πρότυπα OLEO και OLEA αγοράστηκαν από τη Pharmagnose SA (Οινόφυτα, Ελλάδα). Τα διαλύματα των πρότυπων αποθηκεύτηκαν στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι τη χρήση τους.

3.1.3 Απομονωμένες βιοφαινολικές ενώσεις ελαιολάδου και φάρμακα αναφοράς

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε επιπλέον η αντιεϊσμμανιακή δράση τεσσάρων χημικά καθαρών φαινολών, οι οποίες απομονώθηκαν από φύλλα ελιάς (*Olea europaea* L.) και από εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο (EVOO). Οι ουσίες αυτές χορηγήθηκαν από το Εργαστήριο του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του Τμήματος Φαρμακευτικής Αθηνών. Πρόκειται για τη φαινολική αλκοόλη υδροξυτυροσόλη (HT), καθώς και για τα σεκοϊριδοειδή ολεωρωπεΐνη (OLE), ολεασεΐνη (OLEA) και ολεοκανθάλη (OLEO). Ως διαλύτης της OLE και της HT χρησιμοποιήθηκε το απεσταγμένο νερό, ενώ η OLEA και η OLEO διαλυτοποιήθηκαν σε DMSO (AppliChem, Germany). Κάθε ουσία αραιώθηκε περαιτέρω σε μέσο κυτταροκαλλιέργειας κατά τις διάφορες δοκιμασίες. Η τελική συγκέντρωση του DMSO, οπουδήποτε αυτό χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης, ήταν πάντα μικρότερη από 0,1% σε όλες τις πειραματικές δοκιμασίες. Οι διαλυτοποιημένες ουσίες αποθηκεύτηκαν στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι τη χρήση τους.

Ως φάρμακο αναφοράς, για όλες τις *in vitro* και *in vivo* πειραματικές δοκιμασίες της παρούσας διατριβής, χρησιμοποιήθηκε η μιλτεφοσίνη (HePC) (Milteforan® - Virbac), η οποία αραιώθηκε περαιτέρω σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (1x) (Παράρτημα I) και αποθηκεύτηκε στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι τη χρήση της.

3.2 Κυτταροκαλλιέργειες

Όλες οι πειραματικές δοκιμασίες εκτελέστηκαν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής βιοασφάλειας τύπου II (Telstar, Bio-IIA, Madrid, Spain).

3.2.1 *In vitro* καλλιέργειες των παρασίτων *Leishmania*

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν δύο είδη παρασίτων *Leishmania*, το σπλαγχοτροπικό είδος *L. infantum* (ζυμόδεμα GH8, στέλεχος MHOM/GR/2001/GH8) και το δερμοτροπικό είδος *L. major* (ζυμόδεμα LV39, στέλεχος MRHO/SU/59/P). Τα στελέχη προήλθαν από τη βιοτράπεζα στελεχών του πρωτόζωου, που διατηρείται στο Εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ και αποτελούν αντιπροσωπευτικά δείγματα στελεχών από κλινικά δείγματα ανθρώπων.

Οι *in vitro* καλλιέργειες των παρασίτων *L. infantum* και *L. major* πραγματοποιούνταν σε αποστειρωμένες φιάλες κυτταροκαλλιέργειας όγκου 25 mL, με αεροστεγές πώμα (SPL Life Sciences, Korea), παρουσία πλήρους θρεπτικού υλικού RPMI-1640 (PAN-Biotech, Germany), (Παράρτημα I). Οι φιάλες τοποθετούνταν σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 26 °C, απουσία CO₂ (Sanyo mir-253 Electronic Biomedical, Osaka, Japan).

Όταν η καλλιέργεια βρισκόταν στη στατική φάση ανάπτυξης, πραγματοποιούνταν ανακαλλιέργεια με τον ενοφθαλμισμό $2,5 \times 10^7$ παρασίτων σε 10 mL πλήρους θρεπτικού υλικού RPMI-1640. Η στατική φάση ανάπτυξης των παρασίτων (3^η έως 5^η μέρα καλλιέργειας)



Εικόνα 3.3. Αιματοκυτταρόμετρο τύπου Malassez (αριστερά) και περιοχή καταμέτρησης κυττάρων (δεξιά).

προσδιορίστηκε μετά από καθημερινή καταμέτρηση του αριθμού των παρασίτων, σε αιματοκυτταρόμετρο τύπου Malassez (Εικόνα 3.3) με τη βοήθεια διοφθάλμιου οπτικού μικροσκοπίου (Laborlux D, Leitz, Germany). Η καταμέτρηση των παρασίτων πραγματοποιούνταν με τη χρήση διαλύματος

χρωστικής Trypan Blue 0,4 % w/v (Sigma Aldrich, USA) (Παράρτημα I), σε αραιώση 1:20. Οι καλλιέργειες των προμαστιγωτών μορφών τους, περιορίζονταν στον ελάχιστο απαραίτητο αριθμό ανακαλλιεργειών, ο οποίος δεν ξεπερνούσε τις δέκα.

3.2.2 *In vitro* καλλιέργειες κυττάρων θηλαστικών

Για τους πειραματικούς σκοπούς της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε η αθανατοποιημένη κυτταρική σειρά μακροφάγων J774A.1, προερχόμενη από ενήλικα ποντίκια της αιμομικτικής φυλής BALB/c (ATCC No: TIB-67, Rockville, Maryland, USA).

Η καλλιέργεια των μακροφάγων πραγματοποιούνταν σε αποστειρωμένες φιάλες κυτταροκαλλιέργειας, όγκου 25 mL, με πώμα που περιείχε φίλτρο (ThermoFisher Scientific, USA), παρουσία πλήρους θρεπτικού υλικού RPMI-1640 (Παράρτημα Ι). Οι φιάλες τοποθετούνταν σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37 °C, σε περιβάλλον 5% CO₂ και 95% υγρασίας (Galaxy 170S, Eppendorf, UK).

Η ανακαλλιέργεια πραγματοποιούνταν σχεδόν κάθε 4 ημέρες, όταν η συρροή των κυττάρων έφτανε το 80% - 90%, κατά προσέγγιση. Η αποκόλληση των κυττάρων πραγματοποιούνταν μηχανικά με ειδικό εργαλείο αποκόλλησης (cell scraper) (Nunc, Roskilde, Denmark), παρουσία φρέσκου θρεπτικού υλικού RPMI-1640 και κατόπιν το κυτταρικό εναίωρημα μοιραζόταν ισόποσα σε τρεις νέες φιάλες κυτταροκαλλιέργειας, παρουσία πλήρους θρεπτικού υλικού και τελικού όγκου 10 mL.

3.3 Διατήρηση και επανάκτηση μολυσματικής ικανότητας ευκαρυωτικών οργανισμών και θηλαστικών κυττάρων

3.3.1 Ενίσχυση της μολυσματικής ικανότητας του παρασίτου *Leishmania* spp. σε ζωικά μοντέλα

Η μολυσματική και πολλαπλασιαστική ικανότητα των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *Leishmania* τείνουν να φθίνουν τόσο με το πέρασμα του χρόνου, όσο και με τις πολλαπλές ανακαλλιέργειες (HAYFLICK 1965; Pazolli and Stewart 2008). Έτσι, η διατήρηση ή/και η ενίσχυση της μολυσματικής τους ικανότητας επιτυγχάνεται μέσω της περιοδικής χορήγησης των παρασίτων σε θηλυκά ποντίκια της αιμομικτικής φυλής BALB/c, ηλικίας 6-8 εβδομάδων. Η μόλυνση των ζώων εργαστηρίου πραγματοποιούνταν με προμαστιγώτες εκθετικής φάσης ανάπτυξης, είτε υποδόρια (subcutaneously, s.c.) στο πέλμα των ποντικών (10⁶ προμαστιγωτές μορφές *L. major* σε 0,025 mL αποστειρωμένου διαλύματος PBS), είτε ενδοφλέβια (intravenously, i.v.) στην αριστερή ουραία φλέβα με χρήση βελόνας διαμέτρου 29G (10⁷ προμαστιγωτές μορφές *L. infantum* σε 0,1 mL διαλύματος PBS) (Παράρτημα Ι). Μετά την παρέλευση 2-3 μηνών, τα ποντίκια θανατώνονταν με αυχενική εξάρθρωση κατόπιν αναισθησίας σε ατμούς CO₂. Ακολουθούσε ασηπτική απομόνωση και ομογενοποίηση, είτε του ιγνυακού λεμφαδένα (στην περίπτωση της μόλυνσης με *L. major*), είτε του σπλήνα (μόλυνση με *L. infantum*) και μέρος του ομογενοποιημένου (έως 0,5 mL) ενοφθαλμιζόταν σε 10 mL πλήρους θρεπτικού υλικού RPMI-1640, σε αποστειρωμένες φιάλες κυτταροκαλλιέργειας όγκου 25 mL και τοποθετούνταν σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 26 °C, απουσία CO₂ (Sanyo mir-253 Electronic Biomedical, Osaka, Japan).

Ακολουθούσε καθημερινή παρακολούθηση στο οπτικό ανάστροφο μικροσκόπιο (Olympus, Tokyo, Japan) και μετά την πάροδο τριών περίπου ημερών, επιβεβαιωνόταν η ανάπτυξη των προμαστιγωτών μορφών. Για την ανάπτυξη και συντήρηση της καλλιέργειας ακολουθήθηκαν τα βήματα που περιεγράφηκαν προηγουμένως στην παράγραφο 3.2.1.

3.3.2 Μακροχρόνια συντήρηση του παρασίτου *Leishmania spp.* και κυττάρων θηλαστικών σε υγρό άζωτο

Η μακροχρόνια διατήρηση των παρασίτων και των μακροφάγων πραγματοποιούνταν μέσω κρυογονικής αποθήκευσής τους στο υγρό άζωτο (-196°C, LN2). Ειδικότερα, το καλλιεργητικό υλικό που περιείχε τον επιθυμητό αριθμό προμαστιγωτών εκθετικής φάσης ανάπτυξης ή μακροφάγων (περίπου 2×10^7 κύτταρα / mL για κάθε περίπτωση), φυγοκεντρούνταν στις 1600 rpm και 1300 rpm, αντίστοιχα (GPR Centrifuge, BECKMAN, Fullerton, CA, USA), για 10 λεπτά στους 26 °C. Ακολουθούσαν τρεις διαδοχικές εκπλύσεις με διάλυμα PBS στις ίδιες συνθήκες. Στη συνέχεια τα κυτταρικά ιζήματα επαναιωρούνταν ήπια σε διάλυμα κατάψυξης (70% v/v RPMI-1640, 20% v/v FBS, 10% v/v DMSO), και τοποθετούνταν σε κρυογονικά φιαλίδια (Nunc, Roskilde, Denmark). Η τελική συγκέντρωση ήταν 4×10^7 παράσιτα / mL και 2×10^7 μακροφάγα / mL. Τα φιαλίδια τοποθετούνταν σε ειδικό δοχείο (cryobox), το οποίο περιείχε ισοπροπυλική αλκοόλη, στους -80 °C για 24 ώρες και ακολούθως μεταφέρονταν στο υγρό άζωτο (LN2).

3.3.3 Ανάκτηση ευκαρυωτικών οργανισμών και θηλαστικών κυττάρων

Σε αντίθεση με τη διαδικασία κατάψυξης, η απόψυξη των κυττάρων πρέπει να πραγματοποιείται με ταχείς ρυθμούς, έτσι ώστε να αποφευχθούν τυχόν αλλοιώσεις στα κύτταρα που αποψύχονται. Συγκεκριμένα, τα κρυογονικά φιαλίδια (Nunc, Roskilde, Denmark) που περιείχαν παράσιτα ή μακροφάγα μεταφέρονταν ταχέως σε προθερμασμένο υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C (LabTech, Daihan LabTech, Korea). Ακολουθούσε μεταφορά των κυττάρων σε πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI-1640 και επώαση των παρασίτων για 30 λεπτά, στους 26 °C και αντίστοιχα των μακροφάγων στους 37 °C για 24 ώρες. Μετά τη λήξη των παραπάνω χρονικών διαστημάτων, πραγματοποιούνταν έκπλυση των παρασίτων και των μακροφάγων, και επαναιώρηση σε 10 mL πλήρους θρεπτικού μέσου RPMI-1640 και τοποθέτηση στους 26 °C και στους 37 °C, αντίστοιχα.

3.4 *In vitro* μελέτη της κυτταρικής επιβίωσης / πολλαπλασιασμού στις προμαστιγωτές και αμαστιγωτές μορφές του γένους *Leishmania* με τη μέθοδο της ρεσαζουρίνης

Η ρεσαζουρίνη (resazurin, 7-υδροξυ-3H-φαινοξαζιν-3-όνη 10-οξειδίο) αποτελεί έναν οξειδοαναγωγικό δείκτη (M.W. = 251,17) χαμηλής κυτταροτοξικότητας, που χρησιμοποιείται ευρέως σε δοκιμασίες που στοχεύουν στον ποσοτικό προσδιορισμό του αριθμού ζωντανών



Εικόνα 3.4. *In vitro* έλεγχος της κυτταρικής επιβίωσης / πολλαπλασιασμού σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 96 επίπεδων φρεατίων με την μέθοδο της ρεσαζουρίνης. Το ροζ χρώμα φανερώνει τη μεταβολική δραστηριότητα της ρεσαζουρίνης (ζωντανά κύτταρα).

κυττάρων, καθώς και στην παρακολούθηση της μεταβολικής δραστηριότητας. Συγκεκριμένα, η ρεσαζουρίνη (μπλε, μη φθορίζουσα) μπορεί να αναχθεί από μεταβολικά ενδιάμεσα των ζωντανών κυττάρων, σε ρεσορουφίνη (resorufin, 7-υδροξυ-3H-φαινοξαζιν-3-όνη) (ροζ φθορίζουσα) (Εικόνα 3.4). Η ποσότητα της

ρεσορουφίνης που παράγεται είναι ευθέως ανάλογη με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων. Η ρεσορουφίνη έχει Ex/Em 530-560 / 590 nm και μέση απορρόφηση στα 570 nm (Gong et al. 2020). Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της οπτικής απορρόφησης (OD) των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο (MRX, DYNATECH Laboratories, Guernsey, England) στα 570nm, χρησιμοποιώντας ως φίλτρο αναφοράς τα 630nm.

3.4.1 Έλεγχος δραστηριότητας των βιοφαινολικών ενώσεων στην κυτταρική επιβίωση / πολλαπλασιασμό προμαστιγωτών *Leishmania*

Η αντιλεϊσμανιακή δράση των φυσικών προϊόντων έναντι των προμαστιγωτών μορφών *L. infantum* και *L. major* αξιολογήθηκε μέσω της δοκιμασίας της ρεσαζουρίνης. Αναλυτικότερα, προμαστιγώτες εκθετικής φάσης ανάπτυξης (2×10^6 *L. infantum* και $2,5 \times 10^6$ *L. major* ανά φρεάτιο) επιστρώθηκαν σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 96 φρεατίων επίπεδου πυθμένα (Nunc, ThermoFisher Scientific, USA) και τελικού όγκου 200 μ L. Ο ενδεδειγμένος αριθμός προμαστιγωτών προσδιορίστηκε μετά από προκαταρκτικά πειράματα. Στη συνέχεια, οι προμαστιγώτες εκτέθηκαν σε αυξανόμενο εύρος συγκεντρώσεων των φυσικών προϊόντων. Κάθε συγκέντρωση φυσικού προϊόντος ελέγχθηκε εις τριπλούν. Τα εύρη συγκεντρώσεων για τα πολυφαινολικά εκχυλίσματα ήταν 800 - 1500 μ g/mL και 100 - 850 μ g/mL για τα TPF1 και TPF2, αντίστοιχα. Τα χρησιμοποιούμενα εύρη συγκεντρώσεων για τις απομονωμένες βιοφαινολικές ενώσεις ήταν 100 - 350 μ g/mL για την OLE, 150 - 450 μ g/mL για την HT, 200 - 650 μ g/mL για την OLEA και 100 - 400 μ g/mL για την OLEO. Η ομάδα αρνητικού ελέγχου αποτελούνταν από παράσιτα που δεν δέχτηκαν την επίδραση κάποιας ουσίας, ενώ η ομάδα

θετικού ελέγχου αποτελούνταν από παράσιτα που δέχτηκαν την επίδραση του φαρμάκου αναφοράς, της μιλτεφοσίνης (Milteforan® - Virbac) (2,48 µg/mL για *L. infantum* και 3,38 µg/mL για το *L. major*). Παράλληλα υπήρχαν φρεάτια που περιείχαν μόνο καλλιεργητικό υλικό (τυφλό). Οι πλάκες επώαστηκαν στους 26 °C (Sanyo mir-253 Electronic Biomedical, Osaka, Japan), για 65 ώρες και στη συνέχεια προστέθηκαν 20 µL διαλύματος ρεσαζουρίνης (20 µg/mL) και οι πλάκες επώαστηκαν περαιτέρω για 24 ώρες στους 26 °C. Η μεταβολική δραστηριότητα των παρασίτων προσδιορίστηκε με φωτομέτρηση, όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.4, και ακολούθησε σύγκριση των τιμών οπτικής απορρόφησης (ODs) που προσδιορίστηκε στα φρεάτια με τα υπό εξέταση δείγματα, σε σχέση με τα φρεάτια του θετικού και αρνητικού μάρτυρα. Η σύγκριση αυτή επέτρεψε τον υπολογισμό της κατάλληλης συγκέντρωσης του φυσικού προϊόντος που μειώνει το μεταβολικό ρυθμό και σε προέκταση τον αριθμό των προμαστιγωτών κατά 50% (IC₅₀ - inhibitory concentration 50%). Οι τιμές IC₅₀s προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια καμπυλών δόσης-απόκρισης με τη χρήση του λογισμικού Excel 2016. Το ποσοστό (%) των μεταβολικά ενεργών προμαστιγωτών υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τη μέση τιμή αρνητικού ελέγχου ως ενδεικτική της 100% επιβίωσης. Τα δεδομένα κανονικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τον τύπο:

$$\% \text{ επιβίωσης} = (\text{OD δείγματος} - \text{OD τυφλού}) / (\text{OD ομάδας αρνητικού ελέγχου} - \text{OD τυφλού}) \times 100$$

3.4.2 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας σε μακροφάγα J774A.1

Μακροφάγα J774A.1 (4×10^4 κύτταρα / φρεάτιο) επιστρώθηκαν σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 96 φρεατίων επίπεδου πυθμένα (Nunc, ThermoFisher Scientific, USA) και επώαστηκαν σε θάλαμο θερμοκρασίας 37 °C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ και 95% υγρασία (Galaxy 170S, Eppendorf, UK), για 18 ώρες, ώστε να επιτευχθεί η προσκόλλησή τους. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο υλικό και προστέθηκε το υπό εξέταση φυσικό προϊόν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Αναλυτικότερα, τα πολυφαινολικά κλάσματα TPF1 και TPF2 προστέθηκαν στα εύρη 150 - 350 µg/mL και 60 - 220 µg/mL, αντίστοιχα, ενώ οι απομονωμένες βιοφαινολικές ενώσεις μελετήθηκαν στα εύρη 100 - 400 µg/mL, 80 - 250 µg/mL, 10 - 200 µg/mL και 10 - 100 µg/mL για OLE, HT, OLEA και OLEO, αντίστοιχα. Οι πλάκες επώαστηκαν στους 37 °C για 72 ώρες, και στη συνέχεια προστέθηκαν 5 µL ρεσαζουρίνης (20 µg/mL) σε κάθε φρεάτιο για 4 έως 8 ώρες κατά προσέγγιση και ακολούθησε φωτομέτρηση όπως αναφέρεται παραπάνω (ενότητα 3.4). Μακροφάγα που δέχτηκαν την επίδραση της μιλτεφοσίνης (28,5 µg/mL) χρησιμοποιήθηκαν ως θετικός μάρτυρας, ενώ μακροφάγα που δέχτηκαν μόνο την επίδραση του πλήρους θρεπτικού υλικού χρησιμοποιήθηκαν ως

αρνητικός μάρτυρας. Σύγκριση των τιμών οπτικής απορρόφησης των μακροφάγων που δέχτηκαν την επίδραση φυσικών προϊόντων με τις αντίστοιχες οπτικές απορροφήσεις του θετικού και αρνητικού μάρτυρα, επέτρεψε τον προσδιορισμό της μέσης κυτταροτοξικής συγκέντρωσης (cytotoxic concentration 50%, CC₅₀). Τα δεδομένα κανονικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τον προαναφερθέντα τύπο της παραγράφου 3.4.1.

3.4.3 Έλεγχος δραστηριότητας των βιοφαινολών στην κυτταρική επιβίωση / πολλαπλασιασμό ενδοκυττάρων αμαστιγωτών *Leishmania*

Μακροφάγα J774A.1 (5×10^4 κύτταρα / φρεάτιο) επιστρώθηκαν σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 96 επίπεδων φρεατίων (Nunc, ThermoFisher Scientific, USA) παρουσία πλήρους θρεπτικού υλικού RPMI-1640 και επώασθηκαν για 18 ώρες, σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας στους 37 °C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ και 95% υγρασίας (Galaxy 170S, Erpendorf, UK), ώστε να επιτευχθεί η προσκόλλησή τους. Ακολούθησε απομάκρυνση του υπερκείμενου υλικού και προσθήκη $7,5 \times 10^5$ μετακυκλικών προμαστιγωτών ανά φρεάτιο, (αναλογία μακροφάγων : παρασίτων 1:15) σε τελικό όγκο 200 μL φρέσκου καλλιεργητικού υλικού ανά φρεάτιο. Οι πλάκες τοποθετήθηκαν στους 37 °C για 48 ώρες, ώστε να πραγματοποιηθεί η κυτταρική μόλυνση. Στη συνέχεια το υπερκείμενο υλικό από κάθε φρεάτιο απομακρύνθηκε και ακολούθησε έκλυση των προσκολλημένων κυττάρων εις τριπλούν, με προθερμασμένο καλλιεργητικό υλικό σε υδατόλουτρο στους 37 °C (LabTech, Daihan LabTech, Korea), έτσι ώστε να απομακρυνθούν όσα παράσιτα δεν εισήλθαν στα μακροφάγα. Ακολούθησε η προσθήκη των φυσικών προϊόντων εις τριπλούν, σε αυξανόμενο εύρος συγκεντρώσεων. Αναλυτικότερα, το υπό μελέτη εύρος συγκεντρώσεων των πολυφαινολικών κλασμάτων ήταν 80 - 300 μg/mL για το TPF1 και 20 - 200 μg/mL για το TPF2, αντίστοιχα, ενώ οι απομονωμένες βιοφαινολικές ενώσεις μελετήθηκαν στις συγκεντρώσεις 100 - 500 μg/mL για την OLE, 40 - 300 μg/mL για την HT, 5 - 40 μg/mL για την OLEA και 5 - 60 μg/mL για την OLEO. Ως φάρμακο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η HePC (1,6 μg/mL για *L. infantum* και 2,4 μg/mL για το *L. major*), ενώ παράλληλα, υπήρχαν φρεάτια που περιείχαν μολυσμένα μακροφάγα χωρίς προσθήκη φαρμακευτικού παράγοντα (θετικός μάρτυρας) και μη μολυσμένα μακροφάγα χωρίς προσθήκη ουσιών (εσωτερικός θετικός μάρτυρας). Οι πλάκες επώαστηκαν περαιτέρω για 48 ώρες στους 37 °C και ακολούθως αφαιρέθηκε το υπερκείμενο υλικό και προκλήθηκε διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών, με την προσθήκη 150 μL διαλύματος ρήξης (0,01 % SDS και 0,048 % ρυθμιστικό διάλυμα HEPES (Biowest, USA), σε διάλυμα RPMI-1640) (Παράρτημα Ι). Οι πλάκες επώαστηκαν για 40 περίπου λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 1200 rpm (GPR Centrifuge,

BECKMAN, Fullerton, CA, USA), για 10 λεπτά, στους 26 °C. Στο διάστημα αυτό τα μακροφάγα λύθηκαν, ενώ οι αμαστιγωτές μορφές των παρασίτων που απελευθερώθηκαν παρέμειναν ανέπαφες. Στη συνέχεια, σε κάθε φρεάτιο προστέθηκαν 200 μL θρεπτικού υλικού Schneider's (Παράρτημα I) εμπλουτισμένο με 20% FBS (Biowest, USA) και οι πλάκες επώαστηκαν περαιτέρω στους 26 °C (Sanyo mir-253 Electronic Biomedical, Osaka, Japan), για 72 ώρες, ώστε να επιτευχθεί ο μετασχηματισμός των βιώσιμων αμαστιγωτών μορφών σε προμαστιγωτές στον θετικό μάρτυρα. Τέλος, σε κάθε φρεάτιο προστέθηκαν 5 μL πρεσαζουρίνης (60 μg/mL) και οι πλάκες επώαστηκαν περαιτέρω στους 26 °C για περίπου 24 ώρες και ακολούθησε φωτομέτρηση όπως περιεγράφηκε στην παράγραφο 3.4.

Η σύγκριση των τιμών οπτικής απορρόφησης (ODs) στα φρεάτια με τα φυσικά προϊόντα σε σχέση με τα φρεάτια-μάρτυρες, επιτρέπει τον υπολογισμό της μέσης ανασταλτικής συγκέντρωσης του εκάστοτε φυσικού προϊόντος, (inhibitory concentration, IC₅₀). Ο θετικός μάρτυρας αντιπροσωπεύει το 100% της επιβίωσης των παρασίτων, ενώ ο εσωτερικός θετικός μάρτυρας χρησιμοποιείται ώστε να επαληθευτεί η πλήρης λύση των μακροφάγων.

Οι τιμές IC₅₀s προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια καμπυλών δόσης-απόκρισης που δημιουργήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Excel 2016. Το ποσοστό (%) των μεταβολικά ενεργών παρασίτων υπολογίστηκε με τον τύπο:

$$\% \text{ επιβίωσης} = (\text{OD δείγματος} - \text{OD εσωτερικού θετικού μάρτυρα}) / (\text{OD θετικού μάρτυρα}) \times 100$$

3.5 Επιδράσεις των ολικών φαινολικών κλασμάτων στην κινητική ανάπτυξης των παρασίτων του γένους *Leishmania*

Προμαστιγώτες *L. infantum* και *L. major* εκθετικής φάσης ανάπτυξης επώαστηκαν με τα TPF1 και TPF2 σε συγκεντρώσεις που αντιστοιχούσαν στις τιμές IC₅₀ και 2 x IC₅₀. Η αρνητική ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από παράσιτα που δε δέχτηκαν την επίδραση κάποιου φαρμακευτικού παράγοντα, ενώ η θετική ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από προμαστιγώτες που δέχτηκαν την επίδραση της μλτεφοσίνης σε συγκέντρωση που αντιστοιχεί στην τιμή IC₅₀. Η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός των παρασίτων προσδιορίστηκαν μέσω διαφορικής μέτρησης νεκρών και ζωντανών προμαστιγωτών σε διαστήματα 24 ωρών, για 3 συνεχόμενες ημέρες, με τη βοήθεια της χρωστικής αποκλεισμού Trypan Blue 0,4 % w/v (Sigma Aldrich, USA) σε αιματοκυτταρόμετρο τύπου Malassez, όπως περιεγράφηκε προηγουμένως στην παράγραφο 3.2.1. Αντίστοιχα, η μορφολογία των προμαστιγωτών, μελετήθηκε κατά την τρίτη ημέρα της επίδρασης των φυσικών προϊόντων σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης με αντικειμενικό φακό 40x (Leica DMi1 inverted microscope).

3.6 Ποσοτικός προσδιορισμός των παραγόμενων ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS - reactive oxygen species) από τη δράση των ολικών φαινολικών κλασμάτων σε προμαστιγώτες *Leishmania spp.*

Η επαγόμενη, από την επίδραση των υπό μελέτη φυσικών προϊόντων, κυτταροπλασματική παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) στο σύστημα των εξωκυττάρων προμαστιγωτών μορφών *Leishmania*, προσδιορίστηκε με τη βοήθεια του φθορίζοντα ανιχνευτή 6-καρβόξυ-2',7'-διοξικής διχλωροφλουορεσκίνης (carboxy-H₂DCFDA, Life Technologies, NY, USA) μέσω κυτταρομετρία ροής (FACSCalibur, Becton-Dickinson, San Jose, CA). Η μετατροπή της μη φθορίζουσας χρωστικής ουσίας, κατόπιν οξειδωσης, στην εξαιρετικά φθορίζουσα 2',7'-διχλωροφλουορεσκεΐνη (DCF), επιτρέπει την ποσοτική αξιολόγηση των ενεργών ριζών οξυγόνου σε δείγματα ζωντανών κυττάρων (Eruslanov and Kusmartsev 2010).

Προμαστιγώτες *L. infantum* και *L. major*, εκθετικής φάσης ανάπτυξης, εκτέθηκαν για 72 ώρες στα TPF1 και TPF2 σε συγκεντρώσεις που αντιστοιχούσαν στις τιμές IC₅₀ και 2 x IC₅₀. Καλλιέργεια παρασίτων που δε δέχτηκε την επίδραση κάποιου φαρμακευτικού παράγοντα και καλλιέργεια που δέχτηκε την επίδραση της HePC (IC₅₀), αποτέλεσαν την αρνητική και τη θετική ομάδα ελέγχου, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, 5 x 10⁶ παράσιτα απομακρύνθηκαν από κάθε πειραματική ομάδα και φυγοκεντρήθηκαν (GPR Centrifuge, BECKMAN, Fullerton, CA, USA) στις 1600 rpm, για 10 λεπτά. Ακολούθησαν δύο εκπλύσεις με PBS (1x) (Παράρτημα I) και τα παράσιτα επώασθησαν με 20 μM H₂DCFDA για 20 λεπτά στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂, 1 mM) χρησιμοποιήθηκε ως θετικός επαγωγέας ROS για τα παράσιτα που δε δέχτηκαν κάποια ουσία, τα οποία επώασθησαν αντίστοιχα για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι. Στη συνέχεια, τα δείγματα (20.000 προμαστιγώτες / ομάδα) αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής και τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού FlowJo V.10.0.8 (BD, Ashland, OR).

3.7 Προσδιορισμός επαγόμενου κυτταρικού θανάτου σε προμαστιγώτες του γένους *Leishmania* ύστερα από μονήρεις επιδράσεις με τα ολικά φαινολικά κλάσματα

Η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης (PS), ενός ανιονικού φωσφολιπιδίου που καταλαμβάνεται στο εσωτερικό φύλλο της μεμβράνης του πλάσματος βιώσιμων κυττάρων, και η ακεραιότητα της πλασματικής κυτταρικής μεμβράνης, ελέγχθηκαν με τη βοήθεια της διπλής χρώσης με ανεξίνη V-FITC (annexin V - fluorescein isothiocyanate) και ιωδιούχο προπίδιο (propidium iodide, PI) (BioLegend, San Diego, CA) και αναλύθηκαν με

κυτταρομετρία ροής. Ειδικότερα, καλλιέργειες προμαστιγωτών *L. infantum* και *L. major* εκθετικής φάσης ανάπτυξης, επώαστηκαν με τα TPF1 και TPF2, για 72 ώρες, σε συγκεντρώσεις που αντιστοιχούν στις τιμές IC_{50} και $2 \times IC_{50}$. Η ομάδα θετικού ελέγχου αποτελούνταν από παράσιτα που επώαστηκαν με HePC (IC_{50}), ενώ η ομάδα αρνητικού ελέγχου αποτελούνταν από παράσιτα που δε δέχτηκαν την επίδραση κάποιου φαρμακευτικού παράγοντα. Παράσιτα που επώαστηκαν με 1% v/v Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany), για 5 λεπτά, αποτέλεσαν τον θετικό μάρτυρα για τον επαγόμενο κυτταρικό θάνατο. Τα παράσιτα επισημάνθηκαν με ανεξίνη και (PI), χρησιμοποιώντας το κιτ ανίχνευσης ανεξίνη V-FITC και PI (BioLegend, San Diego, CA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εν συντομία, 1×10^6 προμαστιγώτες / ομάδα φυγοκεντρήθηκαν στις 1600 rpm (GPR Centrifuge, BECKMAN, Fullerton, CA, USA), για 10 λεπτά, εκπλύθηκαν δύο φορές σε PBS (1x) (Παράτημα I) και επαναιωρήθηκαν σε 100 μL ρυθμιστικού διαλύματος δέσμησης ανεξίνης V (Annexin V Binding Buffer), 5 μL ανεξίνης V-FITC και 10 μL διαλύματος PI. Τα παράσιτα επώαστηκαν για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προστατευμένα από το φως. Στο τέλος της περιόδου επώασης, σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 400 μL ρυθμιστικού διαλύματος δέσμησης ανεξίνης V και τα δείγματα (20.000 προμαστιγώτες / ομάδα) αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με τη χρήση του λογισμικού FlowJo V.10.0.8 (BD, Ashland, OR).

Τα κύτταρα ταξινομήθηκαν φαινοτυπικά ως εξής: **πρώιμα αποπτωτικά** (ανεξίνη V-FITC⁺/PI⁻), **όψιμα αποπτωτικά**, (ανεξίνη V-FITC⁺/PI⁺), **νεκρωτικά** (ανεξίνη V-FITC⁻/PI⁺). Κύτταρα αρνητικά και στις δύο χρώσεις θεωρούνται **υγιή** (ανεξίνη V-FITC⁻/PI⁻) (Karampetsou et al. 2021).

3.8 *In situ* σήμανση κατακερματισμένων τμημάτων DNA μέσω της δοκιμασίας TUNEL σε προμαστιγώτες του γένους *Leishmania* ύστερα από επιδράσεις με ολικά φαινολικά κλάσματα

Η τεχνική TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP Nick End Labeling) στηρίζεται στη σύνδεση του ενζύμου TdT με τα 3'-OH άκρα των θραυσμάτων DNA (Kyrylkova et al. 2012; Lawry 2004; Majtnerová and Roušar 2018). Το dUTP εφόσον συζευχθεί με φθορίζουσα χρωστική μπορεί να χρησιμοποιηθεί για άμεση ανίχνευση θραυσμάτων DNA με μικροσκοπία φθορισμού ή κυτταρομετρία ροής.

Για την τεχνική TUNEL χρησιμοποιήθηκε η εμπορικά διαθέσιμη συσκευασία αντιδραστήριων CFTM 488A TUNEL Assay, Biotium (Fremont, CA, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Καλλιέργειες προμαστιγωτών *L. infantum* και *L. major* εκθετικής

φάσης ανάπτυξης, επωάστηκαν με τα TPF1 και TPF2 για 72 ώρες, σε συγκεντρώσεις αντίστοιχες των τιμών IC_{50} και $2 \times IC_{50}$. Οι προμαστιγώτες που δε δέχτηκαν την επίδραση κάποιας ουσίας και αυτοί που επωάστηκαν με HePC (IC_{50}) αποτέλεσαν την αρνητική και τη θετική ομάδα ελέγχου, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, 2×10^6 παράσιτα ανά πειραματική ομάδα, συλλέχθηκαν μέσω φυγοκέντρησης στις 1600 rpm (GPR Centrifuge, BECKMAN, Fullerton, CA, USA), για 10 λεπτά και εκπλύθηκαν δύο φορές με 1 mL PBS (1x) (Παράρτημα I). Τα παράσιτα μονιμοποιήθηκαν με προσθήκη 4% φορμαλδεΐδης / PBS και επωάστηκαν στους 4 °C για 30 λεπτά. Μετέπειτα, επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα διαπερατότητας που περιείχε 0,2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) και επωάστηκαν για άλλα 30 λεπτά της ώρας σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα εκπλύθηκαν άλλες δύο φορές σε PBS (1x), επαναιωρήθηκαν σε 100 μL ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης (TUNEL Equilibration Buffer) και επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Ύστερα, το ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης απομακρύνθηκε και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 50 μL μίγματος αντίδρασης TdT (TdT Enzyme and TUNEL Reaction Buffer) και επωάστηκαν περαιτέρω στους 37 °C για 60 λεπτά, προστατευμένα από το άμεσο φως. Στη συνέχεια, τα κύτταρα εκπλύθηκαν τρεις φορές σε PBS (1x) που περιείχε 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany), και 5 mg/mL BSA (Bovine Serum Albumin - Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) (Παράρτημα I). Τα δείγματα αναλύθηκαν στο FACSCalibur μέσω του λογισμικού Cell Quest (BD, San Jose, CA, USA) και τα δεδομένα αξιολογήθηκαν με το λογισμικό FlowJo V.10.0.8 (BD, Ashland, OR).

3.9 Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε η εμπορικά διαθέσιμη τυποποιημένη συσκευασία απομόνωσης DNA Mini Kit (Qiagen, Germany). Ειδικότερα, προμαστιγώτες (5×10^6 παράσιτα/mL) φυγοκεντρήθηκαν στις 1600 rpm (GPR Centrifuge, BECKMAN, Fullerton, CA, USA), ύστερα από 72 ώρες επίδρασης με τις IC_{50} τιμές των HePC, TPF1 και TPF2. Έπειτα, το κυτταρικό ίζημα υποβλήθηκε σε διαδικασία απομόνωσης του ολικού γονιδιωματικού DNA μέσω κολώνας, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (DNA Mini Kit, Qiagen, Germany). Στη συνέχεια, για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 260 nm σε φασματοφωτόμετρο NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, USA), μέσω της οποίας προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του DNA σε κάθε δείγμα και ελέγχθηκε η καθαρότητα του DNA μέσω του προσδιορισμού του λόγου OD_{260nm}/OD_{280nm} . Τέλος, τα δείγματα DNA αποθηκεύτηκαν στους -80 °C.

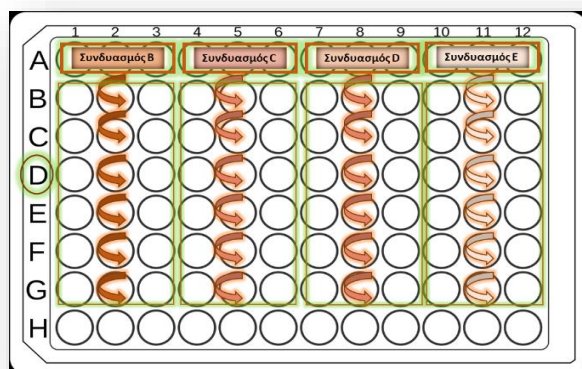
3.10 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Το απομονωμένο DNA κάθε δείγματος (όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3.9), διαχωρίστηκε μέσω εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% w/v. Το πήκτωμα παρασκευάστηκε με διαλυτοποίηση της αγαρόζης (BDH, England) σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE (1x) (Παράρτημα Ι) και μεταφέρθηκε σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (Mini-sub DNA Electroforesis Cell, Bio-Rad, Richmond, CA, USA). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στις θέσεις υποδοχής του πηκτώματος και στη συνέχεια εφαρμόστηκε η κατάλληλη ηλεκτρική τάση (120 V) για 50 λεπτά. Με το πέρας της διαδικασίας, το πήκτωμα οπτικοποιήθηκε σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (Bio-Rad, USA). Παράλληλα με τα προς εξέταση δείγματα DNA τοποθετήθηκε και ο μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών (100bp DNA ladder), έτσι ώστε να μπορεί να γίνει η εκτίμηση των αποτελεσμάτων.

3.11 *In vitro* αλληλεπίδραση των βιοφαινολών και της HePC σε παράσιτα του γένους *Leishmania*

3.11.1 Αξιολόγηση της συνδυαστικής αλληλεπίδρασης των βιοφαινολών με τη μιλτεφοσίνη, σε προμαστιγώτες *Leishmania*

Η αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης των υπό μελέτη βιοφαινολών με τη HePC στο σύστημα των εξωκυττάρων προμαστιγωτών, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της τροποποιημένης



Εικόνα 3.5. Αναπαράσταση του τρόπου με τον οποίο τοποθετούνται οι συνδυασμοί στα *in vitro* πειραματικά πρωτόκολλα για τον προσδιορισμό του είδους των αλληλεπιδράσεων από τη συνδυαστική δράση φαρμάκων. Τα βελάκια επισημαίνουν τις διαδοχικές αραιώσεις.

μεθόδου ισοβολογράμματος (Fivelman, Adagu, and Warhurst 2004; Mondêgo-Oliveira et al. 2021). Ο προσδιορισμός της τιμής IC_{50} για κάθε ουσία (TPF1, TPF2, OLE, HT, OLEA, OLEO και HePC), (όπως περιεγράφηκε στην παράγραφο 3.4), ήταν προϋπόθεση για την υλοποίηση της συγκεκριμένης δοκιμασίας. Με γνώμονα την τιμή αυτή, υπολογίστηκε η κορυφαία

συγκέντρωση (top concentration) κάθε ουσίας, προκειμένου η τιμή IC₅₀ να εντοπίζεται κατά προσέγγιση στο μέσο 6 διαδοχικών αραιώσεων (Εικόνα 3.5).

Έτσι, όσον αφορά στους συνδυασμούς της HePC με τα TPF1 ή TPF2, οι κορυφαίες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 20 µg/mL για τη HePC, 8800 µg/mL για το TPF1 και 2500 µg/mL για το TPF2 για το σπλαγχνικό μοντέλο της νόσου (*L. infantum*) και 28 µg/mL

Πίνακας 4. Κορυφαίες συγκεντρώσεις (top concentrations) που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον προσδιορισμό της φύσης της αλληλεπίδρασης σε προμαστιγώτες *Leishmania* spp.

ΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΚΟΡΥΦΑΙΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ (µg /mL)	
	<i>L. infantum</i>	<i>L. major</i>
TPF1	8800	7700
TPF2	2500	2000
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ		
OLE	1400	2100
HT	2100	3200
OLEA	2500	4500
OLEO	1600	2400
ΦΑΡΜΑΚΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ		
HePC	20	28

για τη HePC, 7700 µg/mL για το TPF1 και 2000 µg/mL για το TPF2 για το δερματικό μοντέλο (*L. major*) (Πίνακας 4). Στη συνέχεια, μελετήθηκαν εις τριπλούν οι εξής αναλογίες HePC : φυσικού προϊόντος: 4:1, 3:2, 2:3 και 1:4 και ακολούθησαν 6 διαδοχικές αραιώσεις για κάθε αναλογία (Εικόνα 3.5). Ειδικότερα, οι συσχετίσεις ορίστηκαν ως εξής: η αναλογία 4:1 ισοδυναμεί με τον συνδυασμό Β (80% HePC + 20% TPF), η 3:2 με τον συνδυασμό C (60% HePC + 40% TPF), η 2:3 με τον συνδυασμό D (40%

HePC + 60% TPF) και η 1:4 με τον συνδυασμό Ε (20% HePC + 80% TPF) (Παράρτημα II). Οι συνδυασμοί Α και F αντιπροσώπευαν το 100% (κορυφαία συγκέντρωση) της HePC και της εξεταζόμενης ουσίας, αντίστοιχα (ενότητα 3.4).

Με τον ίδιο τρόπο προσδιορίστηκαν και οι ακόλουθες κορυφαίες συγκεντρώσεις για κάθε πολυφαινολική ένωση για κάθε στέλεχος *Leishmania*: 1400 µg/mL για την OLE, 2100 µg/mL για την HT, 2500 µg/mL για την OLEA, και 1600 µg/mL για την OLEO για το στέλεχος *L. infantum* και 2100 µg/mL για την OLE, 3200 µg/mL για την HT, 4500 µg/mL για την OLEA και 2400 µg/mL για την OLEO για το στέλεχος *L. major* (Πίνακας 4). Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η δοκιμασία της ρεσαζουρίνης (παράγραφος 3.4), όπου ύστερα από 72 ώρες επώασης των προμαστιγωτών με τους συνδυασμούς, ελήφθη μια νέα τιμή IC₅₀ για κάθε ουσία κάθε επιμέρους συνδυασμού, η οποία βοήθησε στον προσδιορισμό του είδους της αλληλεπίδρασης, όπως αναλύεται παρακάτω στην παράγραφο 3.11.3.

3.11.2 Αξιολόγηση της συνδυαστικής αλληλεπίδρασης των βιοφαινολών με τη μιλτεφοσίνη, σε αμαστιγώτες *Leishmania*

Ομοίως, οι πειραματικές προσεγγίσεις σε αμαστιγώτες του γένους *Leishmania* βασίστηκαν στην τροποποιημένη μέθοδο ισοβολογράμματος και υλοποιήθηκαν με βάση την οξειδοαναγωγική αντίδραση της ρεσαζουρίνης, όπως αναλύεται στην παράγραφο 3.4.3. Αρχικά, υπολογίστηκε η κορυφαία συγκέντρωση (top concentration) για κάθε ουσία και στη

Πίνακας 5. Κορυφαίες συγκεντρώσεις (top concentrations) που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον προσδιορισμό της φύσης της αλληλεπίδρασης σε αμαστιγώτες *Leishmania* spp.

ΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΚΟΡΥΦΑΙΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ (µg/mL)	
	<i>L. infantum</i>	<i>L. major</i>
TRF1	1600	1120
TRF2	800	600
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ		
OLEO	310	215
ΦΑΡΜΑΚΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ		
HePC	12	18

συνέχεια, διερευνήθηκαν εις τριπλούν οι εξής αναλογίες HePC : φυσικού προϊόντος: 4:1, 3:2, 2:3 και 1:4. Τα φυσικά προϊόντα που μελετήθηκαν στο σύστημα των ενδοκυττάρων αμαστιγωτών *Leishmania* είναι τα πολυφαινολικά κλάσματα TRF1 και TRF2, και η απομονωμένη OLEO (Παράρτημα II). Ειδικότερα, οι κορυφαίες συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν στις ακόλουθες τιμές: 12 µg/mL, 1600 µg/mL, 800 µg/mL και 310 µg/mL, για τις ενώσεις HePC, TRF1, TRF2 και

OLEO, αντίστοιχα, για το *L. infantum*. Αναλόγως, οι αντίστοιχες κορυφαίες συγκεντρώσεις για το *L. major* προσδιορίστηκαν στα 18 µg/mL, 1120 µg/mL, 600 µg/mL και 215 µg/mL (Πίνακας 5). Μετά από 48 ώρες επώασης με τους συνδυασμούς των φαρμάκων, ελήφθησαν οι νέες τιμές IC₅₀ για κάθε ουσία μεμονωμένα σε κάθε επιμέρους συνδυασμό και ακολούθησε ο προσδιορισμός του είδους της αλληλεπίδρασης, όπως αναλύεται στην παράγραφο 3.11.3.

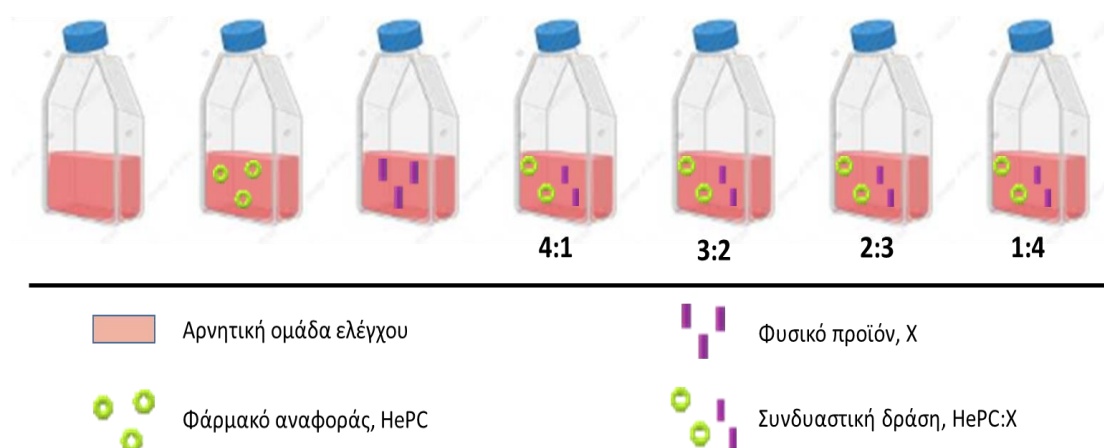
3.11.3 Προσδιορισμός του δείκτη κλασματικής ανασταλτικής συγκέντρωσης και κατασκευή καμπύλης ισοβολογράμματος

Η αξιολόγηση των φαρμακευτικών αλληλεπιδράσεων πραγματοποιήθηκε μέσω του προσδιορισμού του δείκτη κλασματικής ανασταλτικής συγκέντρωσης (fractional inhibitory concentration index, FICI). Οι επιμέρους κλασματικές ανασταλτικές συγκεντρώσεις (FIC) κάθε ουσίας σε κάθε επιμέρους συνδυασμό, υπολογίστηκαν ως ο λόγος της τιμής IC₅₀ κάθε φαρμάκου στον συνδυασμό προς την τιμή IC₅₀ της μονήρους δράσης του φαρμάκου (FIC = IC₅₀ φαρμάκου στον συνδυασμό / IC₅₀ μονήρους δράσης του φαρμάκου). Οι καμπύλες ισοβολογράμματος κατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας τις τιμές FIC κάθε αναλογίας φαρμάκου (π.χ. τιμές FIC_{TRF} στον x-άξονα και τιμές FIC_{HePC} στον y-άξονα). Στη συνέχεια, υπολογίστηκε το άθροισμα των τιμών FIC (ΣFIC) για κάθε συνδυασμό (π.χ. ΣFIC_(συνδυασμού Β) = FIC_{TRF} στον συνδυασμό Β + FIC_{HePC} στον συνδυασμό Β). Τέλος, προσδιορίστηκε ο δείκτης κλασματικής

ανασταλτικής συγκέντρωσης (FICI) ως ο μέσος όρος των ΣFICs. Οι τιμές FICI χρησιμοποιήθηκαν για να ταξινομηθεί το είδος της αλληλεπίδρασης ως συνεργιστική (FICI \leq 0,5), αθροιστική (0,5 < FICI \leq 1), αδιάφορη (1 < FICI < 2) και ανταγωνιστική (FICI \geq 2) (ESCMID 2000; Fratini et al. 2017). Όλες οι πειραματικές δοκιμασίες πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές.

3.11.4 Έλεγχος παραγωγής ROS από προμαστιγώτες του γένους *Leishmania* μετά από τη συνδυαστική επίδραση βιοφαινολών και μυλτεφοσίνης

Προμαστιγώτες *L. infantum* και *L. major*, εκθετικής φάσης ανάπτυξης, εκτέθηκαν για 72 ώρες με τους συνδυασμούς HePC-TPF1, HePC-TPF2 και HePC-OLEO, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.6. Η πειραματική προσέγγιση που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό των ROS, είναι ίδια με αυτή που περιεγράφηκε στην ενότητα 3.6. Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού FlowJo V.10.0.8 (BD, Ashland, OR).



Εικόνα 3.6. Σχηματική αναπαράσταση των ομάδων που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της παραγωγής ROS, ύστερα από τη μονήρη και τη συνδυαστική δράση ουσιών σε προμαστιγώτες του γένους *Leishmania*.

3.12 Διερεύνηση των ανοσοτροποποιητικών ιδιοτήτων των βιοφαινολών στο *in vitro* σύστημα των μολυσμένων μακροφάγων

3.12.1 Απομόνωση RNA

Μακροφάγα J774A.1 (3×10^6 κύτταρα / φρεάτιο) επιστρώθηκαν, παρουσία πλήρους θρεπτικού υλικού RPMI-1640, σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 24 επίπεδων φρεατίων (Sarstedt, Newton, NC) και επώαστηκαν για 18 ώρες σε θάλαμο με σταθερή θερμοκρασία 37 °C, ατμόσφαιρας 5% CO₂ και υγρασίας 95% (Galaxy 170S, Eppendorf, UK). Μετέπειτα, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο υλικό και προστέθηκαν $4,5 \times 10^7$ προμαστιγώτες

(*L. infantum* ή *L. major*) εκθετικής φάσης ανάπτυξης ανά φρεάτιο (αναλογία μακροφάγων : παρασίτων 1:15), σε τελικό όγκο 1 mL. Οι πλάκες τοποθετήθηκαν στους 37 °C για άλλες 48 ώρες, ώστε να πραγματοποιηθεί η μόλυνση. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο υλικό από κάθε φρεάτιο απομακρύνθηκε και ακολούθησε έκπλυση των προσκολλημένων κυττάρων εις τριπλούν, με προθερμασμένο RPMI-1640 στους 37 °C (LabTech, Daihan LabTech, Korea), έτσι ώστε να απομακρυνθούν όσα παράσιτα δεν είχαν εισέλθει στα μακροφάγα. Ακολούθησε η προσθήκη των πολυφαινολικών κλασμάτων TPF1 και TPF2, της OLEO και της HePC στις συγκεντρώσεις που αντιστοιχούσαν στις IC₅₀ τιμές τους. Επίσης, ελέγχθηκαν επιλεγμένοι συνδυασμοί των βιοφαινολών αυτών με τη μιλτεφοσίνη. Ως πιο υποσχόμενοι θεωρήθηκαν οι συνδυασμοί που οδήγησαν σε μεγαλύτερη μείωση της δόσης της μιλτεφοσίνης σε σχέση με τη μονήρη δράση της (συνδυασμοί E, Παράρτημα II). Παράλληλα στις πλάκες, υπήρχαν φρεάτια με μη μολυσμένα μακροφάγα που δε δέχτηκαν την επίδραση κάποιας ουσίας και φρεάτια με μολυσμένα μακροφάγα που επώαστηκαν με LPS (1 µg/mL) και IFN-γ (1 ng/mL), ή μολυσμένα μακροφάγα που δεν δέχτηκαν την επίδραση κάποιας ουσίας. Η επώαση των μακροφάγων με τις υπό μελέτη ουσίες διήρκησε 48 ώρες και ακολούθησε η διαδικασία απομόνωσης του RNA με τη χρήση της εμπορικά διαθέσιμης τυποποιημένης συσκευασίας απομόνωσης RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Ειδικότερα, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν (KUBOTA, Tokyo, Japan) στις 3400 rpm για 10 λεπτά, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και στη συνέχεια, το κυτταρικό ίζημα υποβλήθηκε σε διαδικασία απομόνωσης ολικού RNA σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή του εμπορικού kit απομόνωσης RNeasy.

Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η συγκέντρωσή του απομονωμένου RNA μέσω μέτρησης της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 260 nm, σε φασματοφωτόμετρο (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) με την εφαρμογή της σχέσης: 1 μονάδα OD₂₆₀ = 40 µg RNA/mL δείγματος. Μέσω του λόγου OD_{260nm}/OD_{280nm} ελέγχθηκε η καθαρότητα των δειγμάτων και δεκτά θεωρήθηκαν εκείνα που παρουσίασαν λόγο μεγαλύτερο του 2. Τέλος τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80 °C.

3.12.2 Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time RT-PCR)

Για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, με τη χρήση αντίστροφης μεταγραφάσης σε πραγματικό χρόνο (real time RT-PCR). Η τεχνική RT-PCR πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε η αντίστροφη μεταγραφή του RNA των μεταγραφικών στοιχείων του

κυττάρου σε cDNA βιβλιοθήκη με τη χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης SuperScript II (Invitrogen - Molecular Probes™) και των εκκινητών oligo-dT (Promega, WI, USA), οι οποίοι υβριδοποιούνται με τις poly(A) ουρές στο 3'- άκρο των mRNA μορίων, επιτυγχάνοντας έτσι την αντιγραφή μόνο των mRNA μεταγραφικών στοιχείων. Ειδικότερα, για το κάθε δείγμα που αναφέρεται στην ενότητα 3.12, σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες erpendorf των 0,2mL τοποθετήθηκαν 500 μg/mL oligodT και 50 ng από το υπόστρωμα mRNA, 10 mM dNTPs (dATP,dCTP,dGTP,dTTP) και ddH₂O, έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 12 μL. Το μίγμα επωάστηκε στους 65 °C, για 5 λεπτά. Ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή και ακολούθως προστέθηκαν ρυθμιστικό διάλυμα 5x, 0,1 M DTT, 40 U/μL RNaseOUT™ και 200U του ενζύμου SuperScript II RT. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν 42 °C για 50 λεπτά και 70 °C για 15 λεπτά της ώρας. Το cDNA που προέκυψε διατηρήθηκε στους -20 °C.

Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε η PCR πραγματικού χρόνου, κατά την οποία χρησιμοποιήθηκε η εμπορικά διαθέσιμη συσκευασία SYBR Green PCR Master Mix (Kapa Biosystems, USA) και εκτελέστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ειδικότερα, σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες erpendorf των 0,2 mL, τοποθετήθηκε το προς εξέταση μίγμα PCR, τελικού όγκου 20 μL. Το μίγμα περιείχε τον εκάστοτε εκκινητή (10 μM) (reverse και forward), το υπόστρωμα cDNA (20 ng), το SYBR Green και ρυθμιστικό διάλυμα (SYBR Green master mixture, 10 μL) και ddH₂O, όπου αυτό ήταν απαραίτητο. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ειδικά σχεδιασμένοι εκκινητές “QuantiTect Primer Assays” (Qiagen, Hilden, Germany). Όλα τα δείγματα ελέγχθηκαν εις διπλούν. Τα μεταγραφικά στοιχεία (mRNA) που ελέγχθηκαν είναι η ιντερλευκίνη 10 (IL-10), η ιντερλευκίνη 1β (IL-1β), ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α (TNF-α), ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β (TGF-β), η επαγόμενη συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (iNOS ή NOS2), και η δεϋδρογονάση της γλυκεραλδεΐδης της 3-φωσφατάσης (GAPDH) που αποτέλεσε το γονίδιο αναφοράς.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή (AriaMx, Agilent, USA) στις ακόλουθες συνθήκες: α) αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων στους 94 °C για 10 λεπτά, β) 40 κύκλοι ενίσχυσης που αποτελούνται από το στάδιο της αποδιάταξης των δίκλωνων μορίων στους 94 °C για 10 δευτερόλεπτα και το στάδιο της υβριδοποίησης των εκκινητών και του πολυμερισμού των νεοσυντιθέμενων νουκλεϊκών αλυσίδων στους 60 °C για 30 δευτερόλεπτα. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων ενίσχυσης γονιδίων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ΔΔCt.

3.13 *In vivo* αξιολόγηση της αντιπαρασιτικής και ανοσοτροποποιητικής δράσης φυσικών προϊόντων σε ζωικά μοντέλα δερματικής λεισμανίασης

Η διατήρηση των ζώων εργαστηρίου και ο *in vivo* πειραματισμός πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες SPF (Specific Pathogen Free) στις εγκαταστάσεις του Τμήματος Ζωικών Προτύπων Βιοϊατρικής Έρευνας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ (ΕΙΠ, Αθήνα, Ελλάδα), οι οποίες είναι αδειοδοτημένες από τη Δ/ση Αγροτικής και Κτηνιατρικής Πολιτικής (ΔΑΚΠ) της Περιφέρειας Αττικής με κωδικούς αδειών EL25BIO011, EL25BIO012 και EL25BIO013. Τα ζώα εργαστηρίου λαμβάνουν εμπορική τροφή σε μορφή σβόλων (pellets GLP προδιαγραφών) και νερό *ad libitum* και στεγάζονται σε χώρους που διατηρούν σταθερή θερμοκρασία 22±2 °C, σχετική υγρασία 40-70% και κύκλο φωτός/σκότους 12 ωρών. Οι χειρισμοί συμβάδιζαν με τις διατάξεις του Π.Δ. 56/2013 και της Ευρωπαϊκής Οδηγίας 2010/63/EU, τις αρχές ορθής και ηθικής χρήσης ζώων εργαστηρίου 3+1R: Replacement, Reduction, Refinement και Responsibility και τις κατευθυντήριες γραμμές που αναφέρονται στα PREPARE (Planning Research and Experimental Procedures on Animals: Recommendations for Excellence), ARRIVEs (Animal Research: Reporting in vivo experiments) και ARRIGE (Association for Responsible Research and Innovation in Genome Editing). Στη συγκεκριμένη μελέτη για την εγκατάσταση των μοντέλων της πειραματικής δερματικής λεισμανίασης, χρησιμοποιήθηκε η αιμομικτική φυλή BALB/c θηλυκών ποντικών (20 - 25 g), ηλικίας 7 - 9 εβδομάδων και το πρωτόκολλο πειραματισμού (Α.Π. 440608/18-05-2022) εγκρίθηκε από την ΔΑΚΠ.

3.13.1 Πειραματικό πρωτόκολλο για την αξιολόγηση της θεραπευτικής δράσης της ολεοκανθάλης έναντι της δερματικής λεισμανίασης

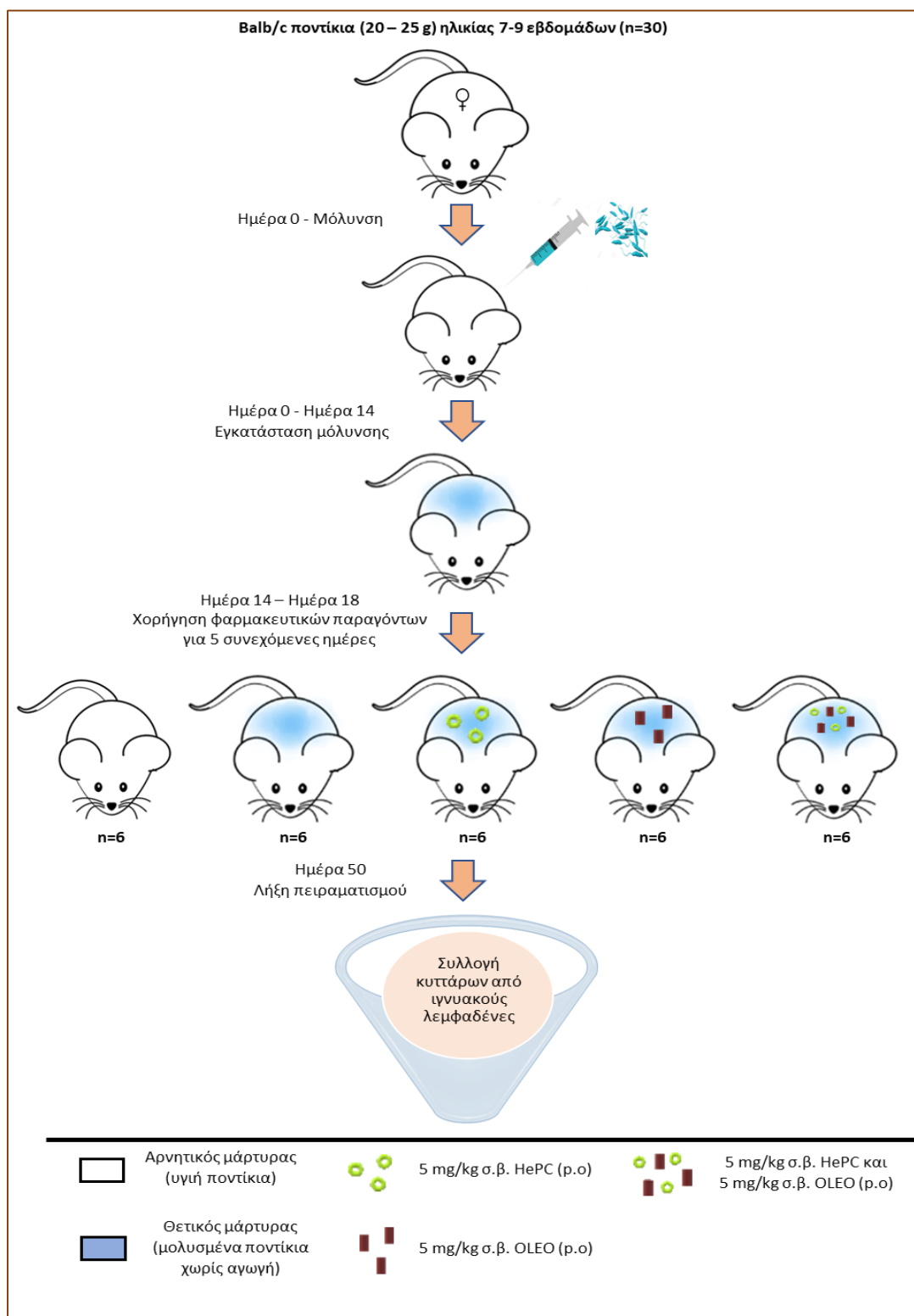
Θηλυκά ποντίκια της αιμομικτικής φυλής BALB/c, μολύνθηκαν μέσω υποδόριας (s.c., subcutaneous) χορήγησης με 10⁶ προμαστιγωτές μορφές *L. major* με τη χρήση βελόνας

Πίνακας 6. Πειραματικές ομάδες για την αξιολόγηση της θεραπευτικής μονήρους δράσης της ολεοκανθάλης και συνδυαστικής με τη μιλτεφοσίνη, έναντι της δερματικής λεισμανίασης.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ (n = 6/ ομάδα)	ΗΜΕΡΑ 0	ΗΜΕΡΑ 14-18	ΗΜΕΡΑ 50
	Μόλυνση με προμαστιγώτες <i>L. major</i>	Καθημερινή θεραπεία διάρκειας 5 ημερών	Αξιολόγηση της θεραπευτικής δράσης
1 (αρνητική ομάδα ελέγχου)	x	x	Λήξη πειραματισμού
2 (θετική ομάδα ελέγχου)	+	x	Λήξη πειραματισμού
3 (OLEO, δόση 5 mg/kg σ.β.)	+	+	Λήξη πειραματισμού
4 (HePC, δόση 5 mg/kg σ.β.)	+	+	Λήξη πειραματισμού
5 (συνδυαστική χορήγηση OLEO και HePC)	+	+	Λήξη πειραματισμού

διαμέτρου 29G, στο αριστερό πέλμα των ζώων (Παράρτημα Ι). 14 ημέρες μετά την εγκατάσταση της πειραματικής μόλυνσης, τα ζώα χωρίστηκαν τυχαία σε 5 πειραματικές ομάδες (n = 6). Η

αρνητική ομάδα ελέγχου (ομάδα 1) αποτελούνταν από υγιή ποντίκια, η θετική ομάδα ελέγχου (ομάδα 2) από μολυσμένα ποντίκια που δεν έλαβαν θεραπεία, ενώ οι ομάδες ενδιαφέροντος αποτελούνταν από ζώα που έλαβαν μονήρη αγωγή με OLEO (5 mg/kg



Εικόνα 3.7. Σχηματική αναπαράσταση του πειραματικού πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκε για την αξιολόγηση της θεραπευτικής δράσης της ολεοκανθάλης, σε *in vivo* πειραματικό μοντέλο δερματικής λείψμανιάσης.

σωματικού βάρους) (ομάδα 3), με HePC (Milteforan® - Virbac) (5 mg/kg σωματικού βάρους) (ομάδα 4) και συνδυαστική αγωγή HePC-OLEO (HePC: 5 mg/kg σωματικού βάρους και OLEO: 5 mg/kg σωματικού βάρους) (ομάδα 5) (Πίνακας 6). Έτσι, Η θεραπεία χορηγούνταν για 5 συνεχόμενες ημέρες, ανά 24 ώρες. Η χορήγηση των φαρμακευτικών παραγόντων πραγματοποιήθηκε από το στόμα (p.o., per os) με τη χρήση ειδικής συσκευής (gavager). 50 ημέρες μετά την εγκατάσταση της μόλυνσης, η πειραματική διαδικασία διακόπηκε και πραγματοποιήθηκε λήψη των ιγνυακών λεμφαδένων υπό ασηπτικές συνθήκες, με στόχο τη διερεύνηση της ανοσοβιολογικής δράσης του φαρμακευτικού σχήματος μέσω αξιολόγησης του παρασιτικού φορτίου στα όργανα-στόχους. Παράλληλα, καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιούνταν μέτρηση της διόγκωσης του πέλματος σε εβδομαδιαία συχνότητα, με τη χρήση παχύμετρου (dial gauge caliper, Mitutoyo) (Εικόνα 3.7), ενώ καθημερινά παρακολουθούνταν η ευζωία των ζώων.

3.13.2 Προσδιορισμός του παρασιτικού φορτίου σε ιγνυακούς λεμφαδένες με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων

Ο προσδιορισμός του παρασιτικού φορτίου σε ιγνυακούς λεμφαδένες, πραγματοποιήθηκε 32 ημέρες μετά τη λήξη της θεραπείας, με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Ειδικότερα, οι ιγνυακοί λεμφαδένες τοποθετήθηκαν σε κωνικούς προζυγισμένους αποστειρωμένους πλαστικούς σωλήνες των 15 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Germany), που περιείχαν ψυχρό θρεπτικό μέσο RPMI-1640 και ζυγίστηκαν προκειμένου να υπολογιστεί το βάρος τους. Ακολούθησε απομόνωση μικρού ιστοτεμαχίου και εκτίμηση του βάρους του (10 - 20 mg) σε αναλυτικό ζυγό. Στη συνέχεια, τα ιστοτεμάχια ομογενοποιήθηκαν σε τρυβλία διαμέτρου 100 mm (ThermoFisher Scientific, USA) και επαναιωρήθηκαν σε φρέσκο θρεπτικό υλικό Schneider's (Sigma, St. Louis, MO, USA) εμπλουτισμένο με 20% v/v FBS (Gibco, Paisley, H.B.), σε τελική αραιώση 1 mg/mL. Στη συνέχεια, 200 μL του ομογενοποιημένου επιστρώθηκαν εις τετραπλούν σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 96 επίπεδων φρεατίων (Sarstedt, Nümbrecht, Germany), και σύμφωνα με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, πραγματοποιήθηκαν 11 διαδοχικές αραιώσεις. Οι πλάκες τοποθετήθηκαν στους 26 °C και 7 – 10 ημέρες αργότερα πραγματοποιήθηκε η τιτλοποίηση του παρασίτου μετά από παρακολούθηση της ανάπτυξης των προμαστιγωτών σε ανάστροφο μικροσκόπιο (Olympus, Tokyo, Japan). Το παρασιτικό φορτίο ορίστηκε μέσω της παρακάτω εξίσωσης: **Παρασιτικό Φορτίο Οργάνου = (1 / αραιώση) x βάρος οργάνου (mg).**

3.14 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων και χρήση λογισμικών προγραμμάτων

Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, είναι αντιπροσωπευτικά τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων *in vitro* πειραματικών διαδικασιών, όπου σε καθένα από αυτά κάθε ουσία ελέγχθηκε εις τριπλούν. Στην *in vivo* πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν ομάδες των 6 ζώων και η διαδικασία υλοποιήθηκε μία φορά. Τα αποτελέσματα παρατίθενται ως μέσος όρος (M.O.) \pm την τυπική απόκλιση (Standard Deviation, SD). Οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές αναδείχθηκαν με τη χρήση του μη-παραμετρικού εργαλείου Mann-Whitney και η πιθανότητα $p \leq 0,050$ θεωρήθηκε ως ενδεικτική στατιστικής σημαντικότητας. Οι στατιστικές επεξεργασίες έγιναν με τη βοήθεια των λογισμικών IBM SPSS Statistics 23 και Microsoft® Excel® 2016. Για τον σχεδιασμό των γραφημάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software, Inc, San Diego, California), ενώ η επεξεργασία των εικόνων έγινε με το λογισμικό Adobe Photoshop CS3 (San Jose, CA, USA). Τέλος, η συγγραφή της παρούσας διατριβής υλοποιήθηκε με τη βοήθεια του Microsoft® Word 2016.

4. Αποτελέσματα

4.1 Προέλευση και απομόνωση πολυφαινολικών κλασμάτων

Το ελαιόλαδο αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της Μεσογειακής διατροφής και χαρακτηρίζεται ως ένα υψηλής αξίας διατροφικό στοιχείο που συνδέεται με σημαντικές ευεργετικές επιδράσεις για την υγεία (El and Karakaya 2009; Ghanbari et al. 2012; Nocella et al. 2017). Χαρακτηρίζεται ως ένα εξαιρετικά πολυσύνθετο σύνολο μορίων που αποτελείται κυρίως από λιπόφιλα συστατικά (95 - 97% του συνολικού του βάρους), πλούσια σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (monounsaturated fatty acids, MUFA). Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες αποδίδουν τις υποσχόμενες βιολογικές του ιδιότητες και στην πολυφαινολική του σύνθεση, η οποία αν και εντοπίζεται σε πολύ μικρότερο ποσοστό (3 - 5%), έχει προσελκύσει το επιστημονικό ενδιαφέρον (Bongiorno et al. 2021; Νίκου et al. 2019). Μερικά από τα πιο αντιπροσωπευτικά μόρια των πολυφαινολών αποτελούν η τυροσόλη (T) και η υδροxyτυροσόλη (HT) και τα σεκοϊριδοειδή ολεοκανθάλη (OLEO) και ολεασεΐνη (OLEA). Επιπλέον, την τελευταία δεκαετία, έχει αποδοθεί ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον στη μελέτη του ολικού φαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου (total phenolic fraction, TPF) (Angelis et al. 2017; Νίκου et al. 2019, 2020), η χημική σύνθεση του οποίου ποικίλει και επηρεάζεται από παράγοντες, όπως η γεωγραφική περιοχή, η ποικιλία, το κλίμα και η περίοδος συγκομιδής (Agiomyrgianaki, Petrakis, and Dais 2012; Quintero-Flórez et al. 2018).

Κατά τη διάρκεια εκτέλεσης της παρούσας διατριβής, αρχικά απομονώθηκαν δύο πολυφαινολικά κλάσματα (TPF1 και TPF2) από ελληνικά δείγματα Εξαιρετικά Παρθένου Ελαιολάδου (extra virgin olive oil, EVOO), στα οποία προσδιορίστηκε η χημική τους σύσταση και ακολούθως διερευνήθηκαν οι αντιλεϊσμμανιακές τους ιδιότητες. Τα δείγματα EVOOs που επιλέχθηκαν ήταν αντιπροσωπευτικά από τις κύριες ελαιοπαραγωγικές περιοχές της Ελλάδας, την Πελοπόννησο (Αρκαδία) και την Κρήτη (Ηράκλειο), αντίστοιχα.

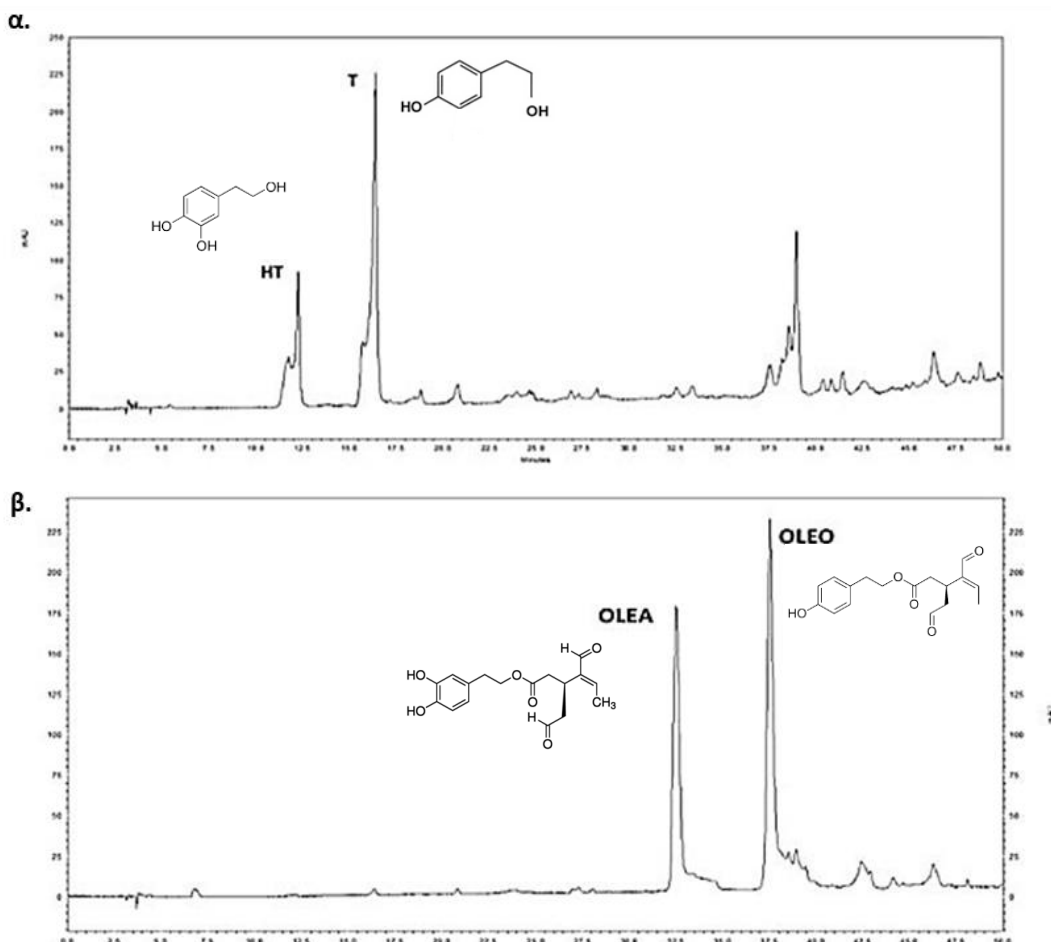
4.2. Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των πολυφαινολικών κλασμάτων

Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των πολυφαινολικών κλασμάτων TPF1 και TPF2 πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ, με τη χρήση προτύπων αναφοράς που διατίθενται στη βιβλιοθήκη φυσικών προϊόντων του εργαστηρίου.

Πίνακας 7. Φαινολική σύνθεση των αναλυόμενων πολυφαινολικών κλασμάτων TPF1 και TPF2.

Φαινολικά Μόρια	TPF1	TPF2	Πρότυπα Γραμμικότητας Φαινολικών Μορίων		
	mg/g του κλάσματος (\pm SD, n = 3)		Εξίσωση γραμμικής παλινδρόμησης	Συντελεστής προσδιορισμού (r^2)	Εύρος συγκεντρώσεων (μ g/mL)
HT	7,02 (\pm 0,4)	5,01 (\pm 0,2)	$\gamma = 84028x + 39609$	0,9997	0,5 - 100
T	42,07 (\pm 0,2)	12,03 (\pm 0,1)	$\gamma = 53933x - 11712$	0,9987	0,5 - 100
OLEA	Δεν ανιχνεύθηκε	144,12 (\pm 5,4)	$\gamma = 32720x + 12723$	0,9997	5 - 500
OLEO	Δεν ανιχνεύθηκε	301,24 (\pm 6,5)	$\gamma = 18836x + 54185$	0,9982	5 - 500

Το φυτοχημικό προφίλ των TPF1 και TPF2 προσδιορίστηκε με την ποσοτικοποίηση της HT, της T, της OLEA και της OLEO. Το TPF1 αναδείχθηκε πλούσιο σε HT και T, ενώ το TPF2 ήταν κυρίως εμπλουτισμένο σε OLEA και OLEO (Εικόνα 4.1). Αναλυτικότερα, η περιεκτικότητά του TPF1 σε HT και T προσδιορίστηκε στα 7,02 και 42,07 mg/g εκχυλίσματος ελαιολάδου αντίστοιχα, ενώ τα επίπεδα συγκέντρωσης των OLEA και OLEO ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου HPLC-DAD (Πίνακας 7). Αντιστοίχως, η ανάλυση του TPF2, ανέδειξε όμοια περιεκτικότητα σε HT και T (5,01 και 12,03 mg/g εκχυλίσματος, αντίστοιχα), ενώ η OLEA



Εικόνα 4.1. Χρωματογράφημα HPLC-DAD των αναλυόμενων εκχυλισμάτων ελαιολάδου στα 280 nm. Η ανάλυση (α) αντιστοιχεί στο φαινολικό κλάσμα TPF1 (πλούσιο σε HT και T) και η (β) στο TPF2 (πλούσιο σε OLEA και OLEO).

και το δομικά συγγενές της μόριο OLEO ήταν σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα (144,12 και 301,24 mg/g εκχυλίσματος ελαιολάδου, αντίστοιχα) (Πίνακας 7).

4.3 Αξιολόγηση της *in vitro* αντιπαρασιτικής δράσης των βιοφαινολικών συστατικών του ελαιολάδου έναντι προμαστιγωτών και αμαστιγωτών μορφών του γένους *Leishmania*

Οι πρωτοζωονόσοι εμφανίζουν τη σημαντικότερη επίπτωση κυρίως στους φτωχούς και περιθωριοποιημένους πληθυσμούς των τροπικών και υποτροπικών χωρών. Συνεπώς, η ανάγκη ανάπτυξης αποτελεσματικότερων και συγχρόνως οικονομικότερων θεραπευτικών προσεγγίσεων είναι επιτακτική, προσανατολίζοντας την επιστημονική κοινότητα στην αναζήτηση νέων δραστικών ενώσεων προερχόμενων από φυσικά προϊόντα (Carter et al. 2021; Kumari et al. 2021; Passero et al. 2021; Pereira et al. 2021). Σήμερα, πληθώρα φυσικών προϊόντων αξιολογούνται ως πιθανά αντιπαρασιτικά φάρμακα, κυρίως για ασθένειες όπως η ελονοσία, η τρυπανοσωμίαση και η λείσμανίαση, καθώς οι τρέχουσες χημειοθεραπείες περιλαμβάνουν φάρμακα με σοβαρά μειονεκτήματα όπως τοξικότητα, μεταβλητή αποτελεσματικότητα και ανάπτυξη αντοχής (Alviano et al. 2012; Gervazoni et al. 2020; Sen and Chatterjee 2011).

Στη συγκεκριμένη διατριβή μελετήθηκαν 6 βιοδραστικές ουσίες (ολικά φαινολικά κλάσματα και απομονωμένες πολυφαινόλες), προερχόμενες από το EVOO. Στην πρώτη ενότητα της παρούσας μελέτης, οι ουσίες αυτές αξιολογήθηκαν *in vitro* ως προς τη δραστηριότητα τους έναντι των παρασίτων του γένους *Leishmania*, σε προμαστιγώτες και σε υποχρεωτικά ενδοκυττάρια αμαστιγώτες.

4.3.1 Αξιολόγηση της αντιπαρασιτικής δραστηριότητας των βιοφαινολών έναντι προμαστιγωτών μορφών του γένους *Leishmania*

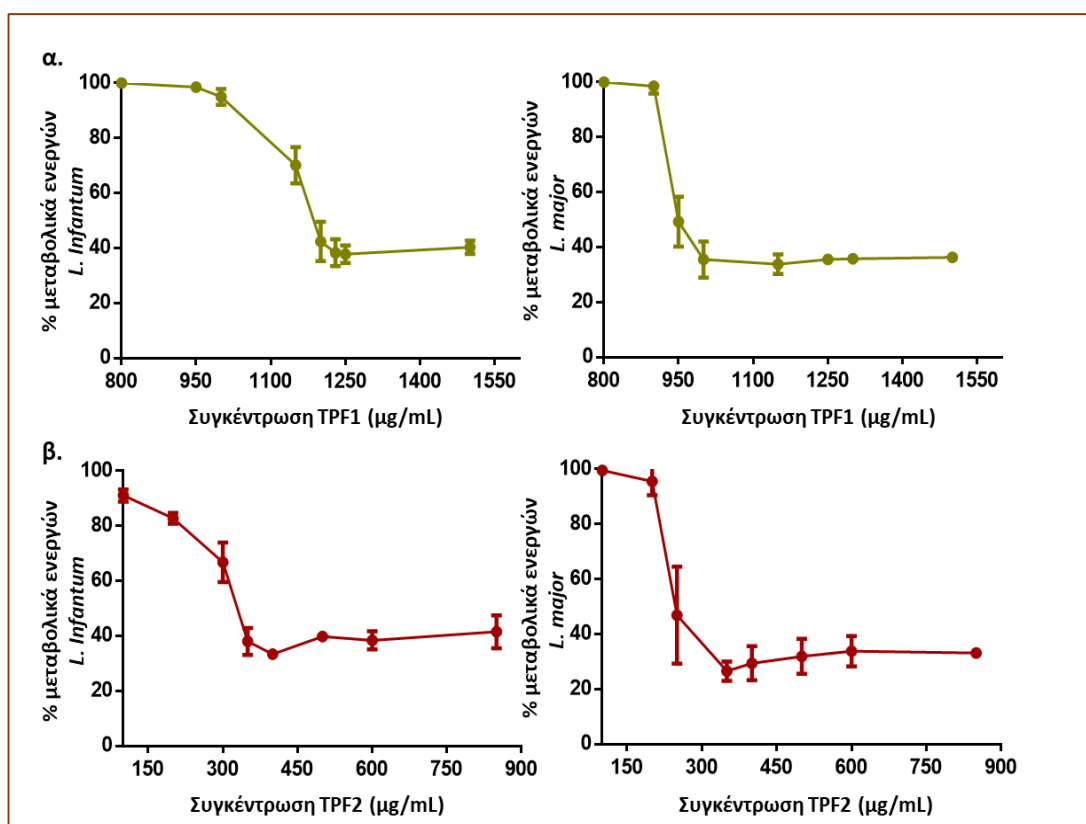
Πρόσφατες επιστημονικές μελέτες έχουν αναδείξει την αντιλειτουργική δράση ορισμένων εκχυλισμάτων και φαινολικών ενώσεων προερχόμενων από το EVOO (Karampetsou et al. 2021, 2022; Koutsoni et al. 2018; Kyriazis et al. 2013, 2016, 2017; Nikou et al. 2019). Τα αποτελέσματα αυτά παρακίνησαν το ενδιαφέρον για την περαιτέρω διερεύνησή τους. Στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκε η λείσμανιοκτόνος δράση δύο ολικών φαινολικών κλασμάτων, των TPF1 και TPF2, τα οποία διέφεραν ως προς την πολυφαινολική τους σύσταση, καθώς και τεσσάρων καθαρών φαινολικών ενώσεων, της OLE, της HT, της OLEA και της OLEO. Η αντιλειτουργική δράση των προαναφερθέντων βιοδραστικών ουσιών αρχικά διερευνήθηκε στο σύστημα των εξωκυττάρια προμαστιγωτών

μορφών δύο αντιπροσωπευτικών ειδών του γένους *Leishmania*, του *L. infantum* και του *L. major*, τα οποία σχετίζονται με τη σπλαγχνική και τη δερματική μορφή της νόσου, αντίστοιχα.

Η μονήρης επίδραση των TPF1 και TPF2 σε προμαστιγώτες *L. infantum* και *L. major* αξιολογήθηκε μετά από έκθεσή τους σε διάφορες αυξανόμενες συγκεντρώσεις των φαινολικών κλασμάτων, για 72 ώρες, με τη βοήθεια της οξειδοαναγωγικής αντίδρασης της ρεσαζουρίνης. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν πως και τα δύο πολυφαινολικά κλάσματα είναι ικανά να επάγουν μια δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση στη βιωσιμότητα των προμαστιγωτών *L. infantum* και *L. major* (Εικόνα 4.2). Οι τιμές IC_{50} των TPF1 και TPF2 προσδιορίστηκαν στα $1186,5 \pm 45,8$ και $322,6 \pm 18,9$ $\mu\text{g/mL}$, αντίστοιχα, για το σπλαγχνικό στέλεχος *L. infantum*, ενώ οι αντίστοιχες τιμές για το δερματικό στέλεχος *L. major* προσδιορίστηκαν στα $976 \pm 21,6$ $\mu\text{g/mL}$

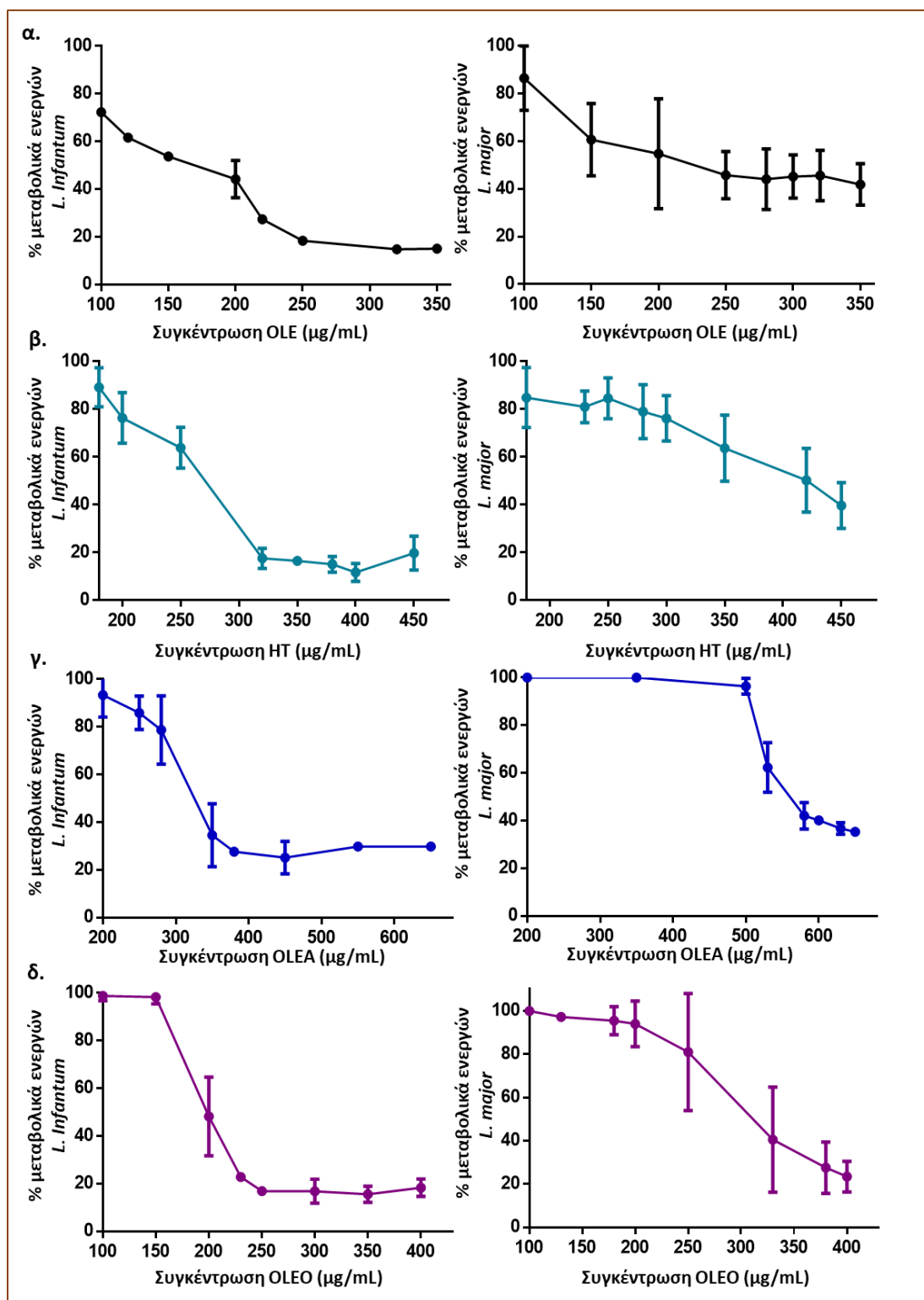
Πίνακας 8. Αντιπαρασιτική δράση βιοφαινολών και μυλτεφοσίνης έναντι των προμαστιγωτών μορφών των παρασίτων *Leishmania* spp., εκθετικής φάσης ανάπτυξης.

ΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΚΛΑΣΜΑΤΑ	IC_{50} προμαστιγωτών \pm SD ($\mu\text{g/mL}$)	
	<i>L. infantum</i>	<i>L. major</i>
TPF1	$1186,5 \pm 45,8$	$976 \pm 21,6$
TPF2	$322,6 \pm 18,9$	$252,6 \pm 30,2$
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ		
OLE	$177,4 \pm 30$	$267,2 \pm 37,8$
HT	$269,6 \pm 21,4$	$405,7 \pm 39,8$
OLEA	$323,7 \pm 18,5$	$571 \pm 19,4$
OLEO	$206,3 \pm 4,6$	$306,4 \pm 45,4$
ΦΑΡΜΑΚΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ		
HePC	$2,5 \pm 0,2$	$3,38 \pm 0,3$



Εικόνα 4.2. Ανασταλτική δράση των ολικών φαινολικών κλασμάτων έναντι προμαστιγωτών μορφών *Leishmania* spp. Ποσοστό μεταβολικά ενεργών παρασίτων ύστερα από 72 ώρες επώασης με το TPF1 (α) και το TPF2 (β). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές (\pm SD) τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

και στα $252,6 \pm 30,2 \mu\text{g/mL}$ (Πίνακας 8). Όπως αναδεικνύεται από τις τιμές IC_{50} , το TPF2 αναδείχθηκε ως δραστικότερο φαινολικό κλάσμα έναντι και των δύο ειδών *Leishmania*.



Εικόνα 4.3. Ανασταλτική δράση απομονωμένων βιοφαινολικών ενώσεων έναντι προμαστιγωτών μορφών *Leishmania* spp. Ποσοστό μεταβολικά ενεργών παρασίτων ύστερα από 72 ώρες επώασης με OLE (α), HT (β), OLEA (γ) και OLEO (δ). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές (\pm SD) τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

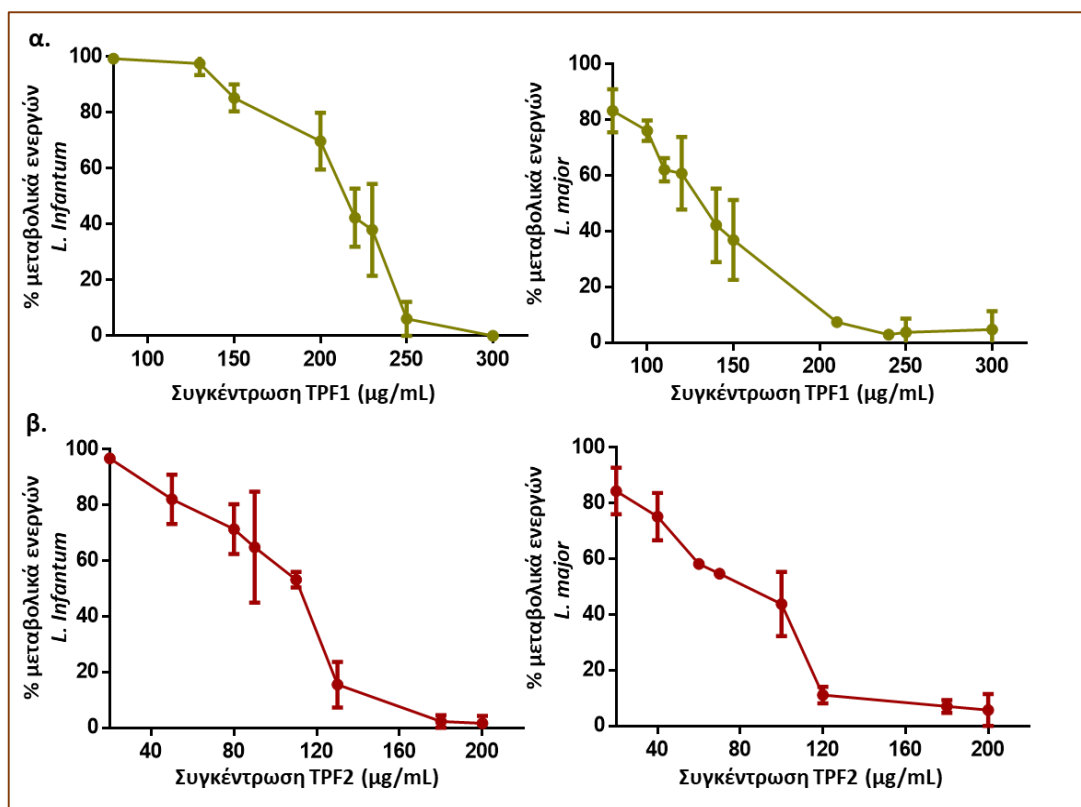
Επιπλέον, παρατηρήθηκε ανάλογη δόσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση των καθαρών φαινολικών ενώσεων OLE, HT, OLEA και OLEO έναντι των προμαστιγωτών μορφών *L. infantum* και *L. major* (Εικόνα 4.3). Οι τιμές IC₅₀ έναντι του στελέχους *L. infantum*, προσδιορίστηκαν στα 177,4 ± 30 µg/mL για την OLE, στα 269,6 ± 21,4 µg/mL για την HT, στα 323,7 ± 18,5 µg/mL για την OLEA και στα 206,3 ± 4,6 µg/mL για την OLEO. Ομοίως, οι τιμές IC₅₀ για τις OLE, HT, OLEA και OLEO έναντι των προμαστιγωτών *L. major* προσδιορίστηκαν στα 267,2 ± 37,8 µg/mL, 405,7 ± 39,8 µg/mL, 571 ± 19,4 µg/mL και 306,4 ± 45,4 µg/mL, αντίστοιχα (Πίνακας 8).

Μεταξύ των τεσσάρων καθαρών φαινολικών ενώσεων, η OLE και η OLEO αναδείχθηκαν ως δραστικότερες έναντι και των δύο στελεχών *Leishmania*. Η HePC χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας σε όλες τις δοκιμασίες και η μέση ανασταλτική της συγκέντρωση προσδιορίστηκε στα 2,5 ± 0,2 µg/mL και 3,38 ± 0,3 µg/mL, για τα στελέχη *L. infantum* και *L. major*, αντίστοιχα (Πίνακας 8).

4.3.2 Αξιολόγηση της αντιπαρασιτικής δραστηριότητας των βιοφαινολών έναντι ενδοκυττάρων αμαστιγωτών μορφών του γένους *Leishmania*

Όπως αναλύθηκε στην εισαγωγή της παρούσας διατριβής (ενότητα 1.2), τα παράσιτα του γένους *Leishmania* είναι υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα που επιβιώνουν και πολλαπλασιάζονται στο ενδοκυττάριο περιβάλλον του σπονδυλωτού ξενιστή τους με την αμαστιγωτή μορφή (Batista et al. 2020; Sunter and Gull 2017). Συνεπώς, ως δεύτερος στόχος τέθηκε η αξιολόγηση της αντιλεϊσμανιακής δράσης των βιοφαινολών στο σύστημα των ενδοκυττάρων αμαστιγωτών μορφών των στελεχών *L. infantum* και *L. major*.

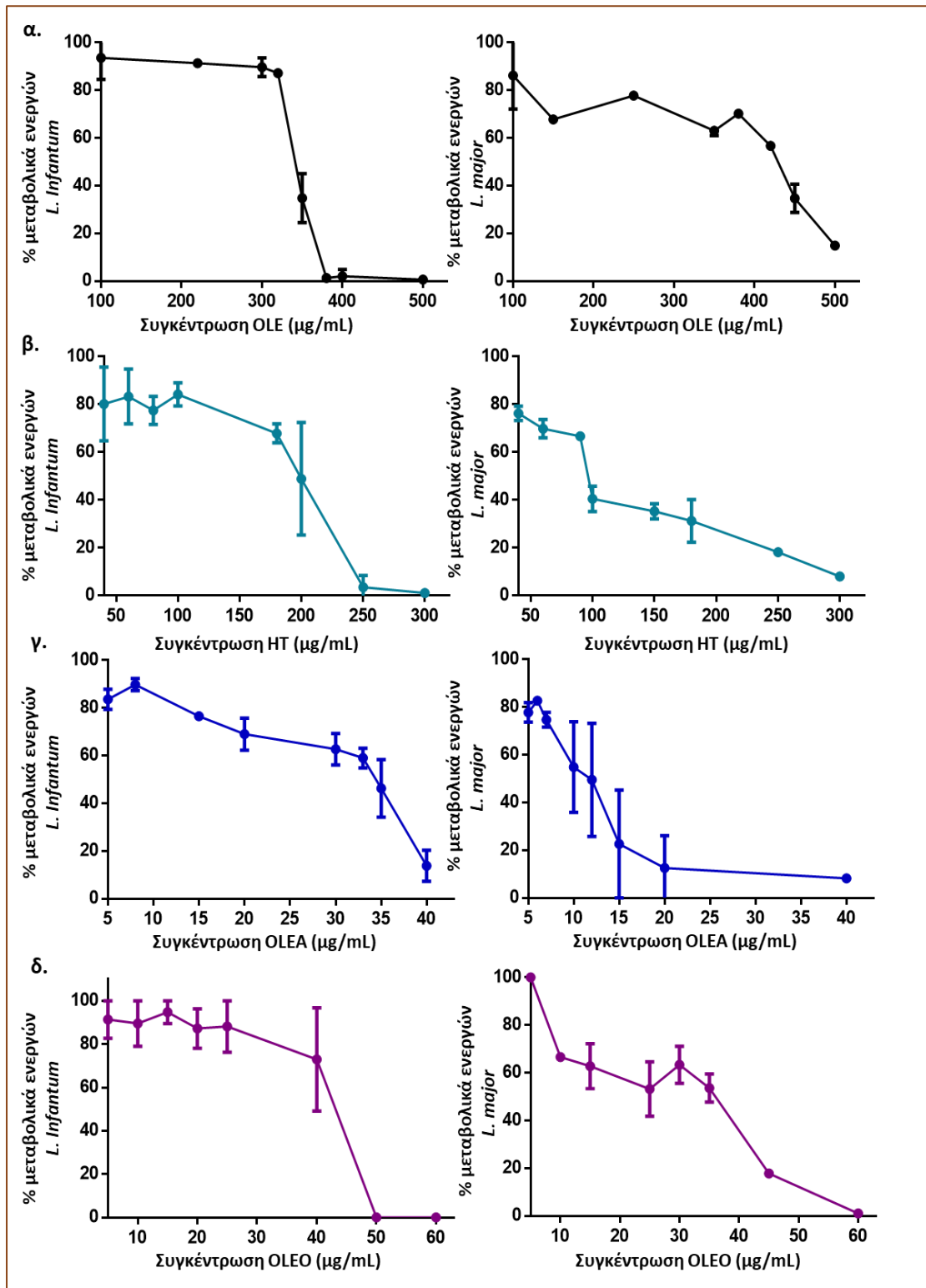
Αναλυτικότερα, σε *in vitro* σύστημα *Leishmania* - μολυσμένων μακροφάγων, αξιολογήθηκε η μονήρης επίδραση των TPF1 και TPF2 στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοκυττάρων αμαστιγωτών, μετά από έκθεσή τους σε διάφορες αυξανόμενες συγκεντρώσεις των πολυφαινολικών κλασμάτων για 48 ώρες, με τη βοήθεια της οξειδοαναγωγικής αντίδρασης της ρεσαζουρίνης. Παρατηρήθηκε σημαντική δόσοεξαρτώμενη αναστολή ανάπτυξης των ενδοκυττάρων αμαστιγωτών και για τα δύο είδη *Leishmania* και η δράση αυτή συνοψίζεται στην Εικόνα 4.4. Οι τιμές IC₅₀ των TPF1 και TPF2 προσδιορίστηκαν στα 207 ± 6,6 µg/mL και 105 ± 10 µg/mL για το *L. infantum*, αντίστοιχα, και στα 142,3 ± 28,2 µg/mL και 76,1 ± 14,5 µg/mL για το *L. major* (Πίνακας 9). Όπως αναδεικνύεται από τις τιμές IC₅₀, το TPF2 αναδείχθηκε ως δραστικότερο φαινολικό κλάσμα έναντι και των δύο ειδών *Leishmania*, όπως παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των προμαστιγωτών.



Εικόνα 4.4. Ανασταλτική δράση των ολικών φαινολικών κλασμάτων έναντι αμαστιγωτών μορφών *Leishmania* spp. Ποσοστό μεταβολικά ενεργών παρασίτων ύστερα από 48 ώρες επώασης με TPF1 (α) και TPF2 (β). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές (\pm SD) τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

Επιπλέον, όμοια δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση έναντι των αμαστιγωτών *Leishmania* εμφάνισαν και οι τέσσερις απομονωμένες βιοφαινολικές ενώσεις (Εικόνα 4.5). Ως δραστικότερες αναδείχθηκαν η OLEA και η OLEO και για τα δύο είδη του παρασίτου, με την τιμή IC_{50} να ανέρχεται στα $28,9 \pm 2,4$ $\mu\text{g/mL}$ και $38,6 \pm 5,4$ $\mu\text{g/mL}$, αντίστοιχα, στην περίπτωση του *L. infantum* και στα $11,4 \pm 8,1$ $\mu\text{g/mL}$ και $27 \pm 7,3$ $\mu\text{g/mL}$ στην περίπτωση του *L. major* (Πίνακας 8). Λιγότερο δραστικές εμφανίστηκαν η OLE και η HT με τις τιμές IC_{50} να προσδιορίζονται στα $319,5 \pm 20,5$ $\mu\text{g/mL}$ και $154,1 \pm 31,6$ $\mu\text{g/mL}$ αντίστοιχα, για το *L. infantum* και $307,8 \pm 25,7$ και $114,2 \pm 7,5$ $\mu\text{g/mL}$ αντίστοιχα, για το *L. major* (Πίνακας 9).

Ως θετικός μάρτυρας δραστικότητας χρησιμοποιήθηκε η HePC, η οποία εμφανίζει ισχυρή αντιαμαστιγωτική δράση έναντι τόσο του *L. infantum* όσο και του *L. major*, με τις τιμές IC_{50} να ανέρχονται στα $1,6 \pm 0,8$ και $2,4 \pm 0,2$ $\mu\text{g/mL}$, αντίστοιχα (Πίνακας 9).



Εικόνα 4.5. Ανασταλτική δράση απομονωμένων βιοφαινολικών ενώσεων έναντι αμαστιγωτών μορφών *Leishmania* spp. Ποσοστό μεταβολικά ενεργών παρασίτων ύστερα από 48 ώρες επώασης με OLE (α), HT (β), OLEA (γ) και OLEO (δ). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές (\pm SD) τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

4.3.3 Έλεγχος κυτταροτοξικής δράσης των βιοφαινολών σε μακροφάγα της κυτταρικής σειράς J774A.1

Για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας των βιοφαινολικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά J774A.1 και αξιολογήθηκε η μονήρης επίδραση των βιοφαινολών στην επιβίωση των μακροφάγων μετά από 72 ώρες έκθεσης των κυττάρων σε διαφορετικές αυξανόμενες συγκεντρώσεις των φυσικών προϊόντων. Η τιμή της μέσης κυτταροτοξικής συγκέντρωσης (CC_{50}) προσδιορίστηκε στα $270,2 \pm 8,1$ $\mu\text{g/mL}$ για το TPF1 και στα $157,6 \pm 2,2$ $\mu\text{g/mL}$ για το TPF2 (Πίνακας 9). Αντιστοίχως, οι τιμές CC_{50} των καθαρών ενώσεων προσδιορίστηκαν στα $268,2 \pm 9$, $125,5 \pm 16,3$, $46,6 \pm 7,5$ και $160,7 \pm 19,3$ $\mu\text{g/mL}$, για τις OLE, OLEA, OLEO και HT, αντίστοιχα. Τέλος, το αντιλείσμανιακό φάρμακο HePC, παρουσίασε τιμή CC_{50} στα $28,5 \pm 3,7$ $\mu\text{g/mL}$ (Πίνακας 9).

Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε ο δείκτης εκλεκτικότητας (Selectivity index, SI), ο οποίος υπολογίζεται με τη βοήθεια του τύπου $SI = CC_{50} / IC_{50}$ αμαστιγωτών και επιτρέπει την εξαγωγή συμπερασμάτων ως προς την εκλεκτική δράση ενός φαρμακευτικού προϊόντος έναντι των αμαστιγωτών. Συγκεκριμένα, όταν ο δείκτης SI είναι μικρότερος της μονάδας ($SI < 1$), το φαρμακευτικό προϊόν αναστέλλει την ανάπτυξη των μακροφάγων σε συγκέντρωση μικρότερη από την αντίστοιχη συγκέντρωση ανάπτυξης των αμαστιγωτών. Αντίθετα, όταν ο δείκτης SI είναι μεγαλύτερος της μονάδας ($SI > 1$), η συγκέντρωση αναστολής ανάπτυξης των αμαστιγωτών είναι μικρότερη από την αντίστοιχη της μέσης συγκέντρωσης κυτταροτοξικότητας και η δράση του φαρμακευτικού προϊόντος θεωρείται εκλεκτότερη έναντι των παρασίτων και κατά συνέπεια μπορεί να θεωρηθεί ως ένα δυνητικά υποσχόμενο προϊόν στη θεραπεία της λείσμανίασης. Συνεπώς, όσο πιο μεγάλος είναι ο δείκτης SI τόσο

Πίνακας 9. Κυτταροτοξική και αντιπαρασιτική δράση βιοφαινολών και μιλτεφοσίνης έναντι αμαστιγωτών μορφών των παρασίτων *Leishmania* spp.

ΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΚΛΑΣΜΑΤΑ	CC_{50} \pm SD ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} αμαστιγωτών \pm SD ($\mu\text{g/mL}$)			
	J774A.1	<i>L. infantum</i>	SI	<i>L. major</i>	SI
TPF1	$270,2 \pm 8,1$	$207 \pm 6,6$	1,3	$142,3 \pm 28,2$	1,9
TPF2	$157,6 \pm 2,2$	105 ± 10	1,5	$76,1 \pm 14,5$	2,1
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ					
OLE	$268,2 \pm 9$	$319,5 \pm 20,5$	0,8	$307,8 \pm 25,7$	0,9
HT	$160,7 \pm 19,3$	$154,1 \pm 31,6$	1,04	$114,2 \pm 7,5$	1,4
OLEA	$125,5 \pm 16,3$	$28,9 \pm 2,4$	4,3	$11,4 \pm 8,1$	11
OLEO	$46,6 \pm 7,5$	$38,6 \pm 5,4$	1,2	$27 \pm 7,3$	1,7
ΦΑΡΜΑΚΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ					
HePC	$28,5 \pm 3,7$	$1,6 \pm 0,8$	17,8	$2,4 \pm 0,2$	11,9

πιο εκλεκτική δράση έχει ένα φαρμακευτικό προϊόν έναντι των αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου, με τα οποία η νόσος εξαπλώνεται εντός του μολυσμένου θηλαστικού. Με βάση τα παραπάνω αλλά και όσα αναγράφονται στον Πίνακα 9, φάνηκε πως όλα τα προς εξέταση φυσικά προϊόντα (ολικά φαινολικά κλάσματα και απομονωμένες πολυφαινόλες) εμφάνισαν εκλεκτικότητα έναντι των αμαστιγωτών *Leishmania* spp., με εξαίρεση την OLE, της οποίας ο δείκτης εκλεκτικότητας βρέθηκε οριακά μικρότερος της μονάδας.

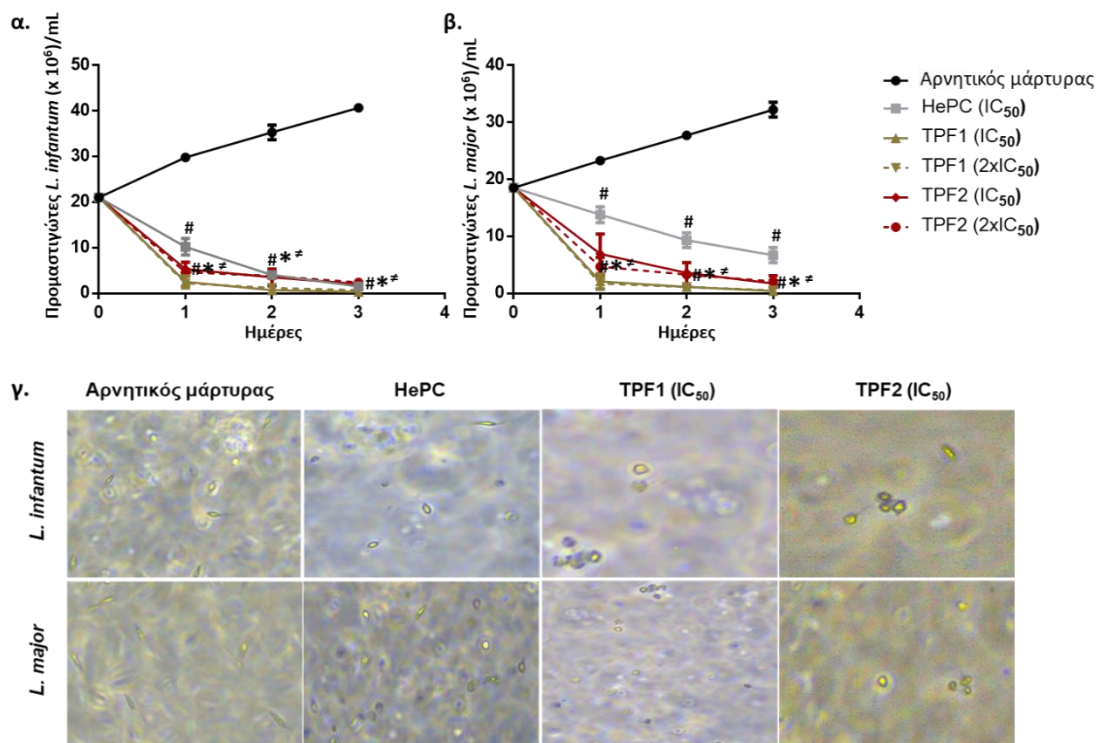
4.4 Συγκριτική αξιολόγηση της αντιλεϊσμανιακής δράσης των ολικών φαινολικών κλασμάτων

Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα που προέκυψαν από την *in vitro* αξιολόγηση της αντιπαρασιτικής δραστηριότητας των βιοφαινολών, ώθησαν στην περαιτέρω επικέντρωση του ερευνητικού ενδιαφέροντος στα δύο ολικά φαινολικά κλάσματα, TPF1 και TPF2, καθώς η απομόνωσή τους βασίζεται σε απλούστερες και οικονομικότερες τεχνικές συγκριτικά με αυτές που απαιτούνται για την απομόνωση των καθαρών ενώσεων. Επιπλέον, προηγούμενες μελέτες, φανέρωσαν την ισχυρή αντιλεϊσμανιακή δράση ενός TPF (Karampetsou et al. 2021; Koutsoni et al. 2018), διαφορετικής πολυφαινολικής σύνθεσης από αυτά της παρούσας μελέτης, συνηγορώντας στην ανάγκη περαιτέρω μελέτης τέτοιων κλασμάτων. Προς αυτή την κατεύθυνση, πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη της δραστηριότητας και του μηχανισμού δράσης των δύο πολυφαινολικών κλασμάτων, TPF1 και TPF2, σε *in vitro* συστήματα προμαστιγωτών του γένους *Leishmania*.

4.4.1 Ποσοτικός προσδιορισμός του ρυθμού ανάπτυξης των προμαστιγωτών του γένους *Leishmania* κατόπιν έκθεσής τους στα ολικά φαινολικά κλάσματα

Καλλιέργειες προμαστιγωτών μορφών *L. infantum* και *L. major*, εκθετικής φάσης ανάπτυξης, επώαστηκαν για 72 ώρες με τα TPF1 και TPF2, σε δύο διακριτές συγκεντρώσεις αντίστοιχες των τιμών IC_{50} και $2 \times IC_{50}$. Καλλιέργειες προμαστιγωτών που δέχτηκαν την επίδραση της HePC, στη συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο IC_{50} , αποτελούσαν τον θετικό μάρτυρα, ενώ καλλιέργειες προμαστιγωτών σε πλήρες θρεπτικό υλικό αποτέλεσαν τον αρνητικό μάρτυρα. Οι καμπύλες ανάπτυξης προσδιορίστηκαν με την καθημερινή διαφορική καταμέτρηση νεκρών και ζωντανών παρασίτων (Εικόνα 4.6).

Όπως αναδεικνύεται από τις καμπύλες ανάπτυξης, τα TPF1 και TPF2 επέδρασαν αρνητικά στην ανάπτυξη του πληθυσμού των παρασίτων *Leishmania*. Αναλυτικότερα, οι *L. infantum* και *L. major* προμαστιγώτες της αρνητικής ομάδας ελέγχου παρουσίασαν τον αναμενόμενο εκθετικό ρυθμό ανάπτυξης, ενώ τα παράσιτα που δέχτηκαν την επίδραση των TPF1 και TPF2,



Εικόνα 4.6. Επίδραση των ολικών φαινολικών κλασμάτων στην κινητική ανάπτυξης του παρασίτου του γένους *Leishmania*. Προμαστιγώτες *L. infantum* (α) και *L. major* (β) εκθετικής φάσης επώαση με τα TPF1 και TPF2 για 72 ώρες. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές (\pm SD) τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων. Τα σύμβολα των (*) και (#) υποδεικνύουν στατιστικές σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τις ομάδες θετικού (επίδραση με HePC) και αρνητικού ελέγχου (χωρίς την προσθήκη κάποιας ουσίας), αντίστοιχα. Σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιδράσεων TPF1 και TPF2 υποδεικνύονται με (#). (γ) Προσδιορισμός της μορφολογίας των προμαστιγωτών με μικροσκοπία αντίθεσης φάσης (μεγέθυνση 40x).

εμφάνισαν ανάλογες καμπύλες ανάπτυξης με τον θετικό μάρτυρα, όπου παρατηρήθηκε δραματική μείωση του πληθυσμού τους από τις πρώτες 24 ώρες. Η ανασταλτική επίδραση των TPF1 και TPF2 ήταν σημαντικά υψηλότερη συγκριτικά με τη HePC και για τα δύο είδη *Leishmania* ($p \leq 0,050$). Ειδικότερα, οι προμαστιγώτες *L. infantum* και *L. major* που δέχτηκαν την επίδραση του TPF1 στη συγκέντρωση IC_{50} για 24 ώρες, παρουσίασαν σημαντική μείωση του πληθυσμού τους κατά 88,1% και 88,6% και κατά 89,8% και 90,8% στη συγκέντρωση $2 \times IC_{50}$. Οι αντίστοιχες μειώσεις του πληθυσμού των *L. infantum* και *L. major* μετά την επίδραση της HePC ήταν 51,7% και 25,4%. Ομοίως, οι προμαστιγώτες *L. infantum* και *L. major* που δέχτηκαν την επίδραση του TPF2 στη συγκέντρωση IC_{50} για 24 ώρες, παρουσίασαν μείωση του πληθυσμού τους κατά 75% και 62,7% και κατά 78,3% και 74,6% στη συγκέντρωση $2 \times IC_{50}$, αντίστοιχα.

Επίσης, αξίζει να σημειωθεί πως η επίδραση των TPF1 και TPF2 στην ανάπτυξη του πληθυσμού των παρασίτων *Leishmania* παρουσίασε σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο φαινολικών κλασμάτων και για τα δύο είδη *Leishmania* ($p \leq 0,050$). Αναλυτικότερα, η επίδραση του TPF1 σε συγκέντρωση IC_{50} για 24 ώρες, προκάλεσε κατά 1,2 και 1,4 φορές

μεγαλύτερη μείωση του πληθυσμού των *L. infantum* και *L. major* παρασίτων, σε σύγκριση με το TPF2.

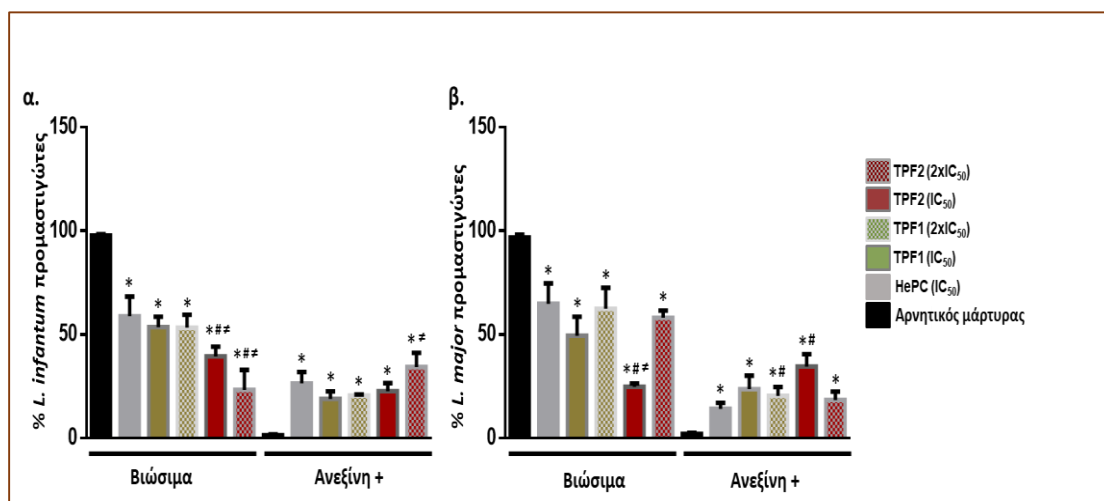
Τα αποτελέσματα που αναδείχθηκαν με την παραπάνω τεχνική, επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω με τη λήψη φωτογραφιών σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης, για τις προαναφερθέντες καλλιέργειες προμαστιγωτών *L. infantum* και *L. major*, όπου παρατηρούνται εμφανείς μορφολογικές αλλαγές συρρίκνωσης των προμαστιγωτών μετά από 72 ώρες επώασης με τα TPF1 και TPF2 (Εικόνα 4.6).

4.4.2 Διερεύνηση του επαγόμενου κυτταρικού θανάτου σε παράσιτα του γένους *Leishmania*

Η διερεύνηση του πιθανού μηχανισμού δράσης των πολυφαινολικών κλασμάτων TPF1 και TPF2, πραγματοποιήθηκε με τη μελέτη βιοχημικών χαρακτηριστικών του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση). Αρχικά πραγματοποιήθηκε η τεχνική διπλής χρώσης ιωδιούχου προπιδίου (PI) και ανεξίνης V συζευγμένης με ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC), που αποτελεί μια τυπική μέθοδο για τον προσδιορισμό της απόπτωσης από πιθανές παρασιτοκτόνες ουσίες. Σε φυσιολογικά κύτταρα, η φωσφατιδυλοσερίνη περιορίζεται στην εσωτερική στιβάδα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, ενώ μετακινείται προς την κυτταρική επιφάνεια κατά την απόπτωση, όπου και αναγνωρίζεται από τα στρατολογημένα φαγοκύτταρα. Η ανεξίνη V είναι μία κυτταρική πρωτεΐνη που συνδέεται με τη φωσφατιδυλοσερίνη που έχει μετατοπιστεί στο εξωτερικό πέταλο της κυτταρικής μεμβράνης, κατά τη διάρκεια της αποπτωτικής διεργασίας. Το PI αποτελεί μία φθορίζουσα χρωστική, η οποία συνδέεται στα νουκλεονικά οξέα και διεισδύει στην κυτταροπλασματική μεμβράνη μόνο όταν αυτή καταστραφεί, γεγονός που προκύπτει στα τελευταία στάδια της απόπτωσης ή στη νέκρωση (Vermes et al. 1995). Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε χρώση με ανεξίνη V-FITC και PI προκειμένου να αξιολογηθούν τόσο η μετατόπιση της φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική κυτταροπλασματική μεμβράνη, όσο και η ακεραιότητα της πλασματικής μεμβράνης, με τη βοήθεια κυτταρομετρίας ροής.

Αναλυτικότερα, προμαστιγώτες *L. infantum* και *L. major* εκθετικής φάσης ανάπτυξης επωάστηκαν με τα TPF1 και TPF2 στις συγκεντρώσεις IC_{50} και $2 \times IC_{50}$, για 72 ώρες. Η επίδραση των TPF1 και TPF2 σε συγκέντρωση αντίστοιχη των IC_{50} , οδήγησε σε σημαντική μείωση του ποσοστού των ζώντων προμαστιγωτών *L. infantum* (ανεξίνη V/PI) από 97,8 % όπως παρατηρήθηκε στον αρνητικό μάρτυρα, σε 53,5 % και 39,4 %, αντίστοιχα ($p \leq 0,050$) (Εικόνα 4.7), ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά από τις επιδράσεις με τη συγκέντρωση $2 \times IC_{50}$, ανήλθαν στο 53,4% και 23,3% ($p \leq 0,050$). Ομοίως, οι ανάλογες επωάσεις των προμαστιγωτών *L. major* με τις IC_{50} τιμές των TPF1 και TPF2, οδήγησαν σε μείωση των ζώντων πληθυσμών από 96,8 %

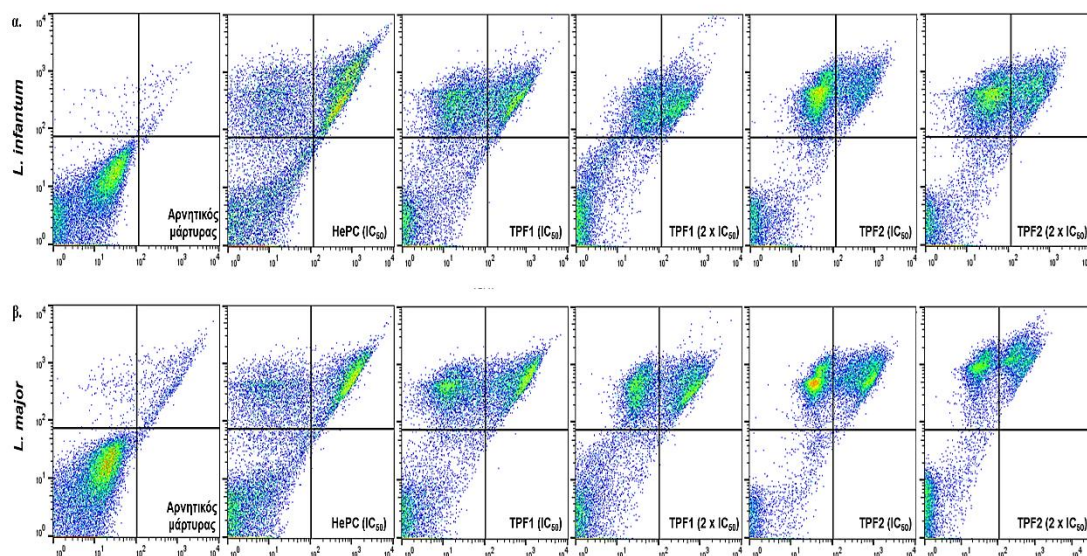
(αρνητικός μάρτυρας) σε 49,4 % και 24,8 %, αντίστοιχα ($p \leq 0,050$), ενώ τα ανάλογα ποσοστά από τις επιδράσεις με τις $2 \times IC_{50}$ συγκεντρώσεις βρέθηκαν 62,4 % και 58,1 % ($p \leq 0,050$) (Εικόνα 4.8). Επιπλέον, η επίδραση των πολυφαινολικών κλασμάτων επέφερε σημαντική αύξηση στο ποσοστό των αποπτωτικών παρασίτων (ανεξίνη V^+) σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα που δε δέχτηκε την επίδραση κάποιας ουσίας ($p \leq 0,050$) (Εικόνα 4.7). Πιο συγκεκριμένα, το ποσοστό των αποπτωτικών *L. infantum* προμαστιγωτών ανήλθε στο 18,9% και 22,7% μετά την επίδραση των TPF1 και TPF2 σε συγκέντρωση IC_{50} , αντίστοιχα, σε σύγκριση με το 1,4% που σημειώθηκε για τα παράσιτα που δε δέχτηκαν την επίδραση κάποιας ουσίας ($p = 0,021$). Ομοίως, τα αντίστοιχα ποσοστά για το στέλεχος *L. major* ήταν 23,6% και 34,5% έναντι του 2,7% του αρνητικού μάρτυρα ($p = 0,034$). Ανάλογη ήταν και η επίδραση των συγκεντρώσεων $2 \times IC_{50}$ των πολυφαινολικών κλασμάτων και για τα δύο στελέχη του παρασίτου ($p \leq 0,050$) (Εικόνα 4.7).



Εικόνα 4.7. Αλλαγές στην έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης σε προμαστιγωτές *Leishmania* spp. που δέχτηκαν επίδραση με τα TPF1 και TPF2, για 72 ώρες. Προμαστιγωτές *L. Infantum* (α) και *L. major* (β) επισημάνθηκαν με ανεξίνη V-FITC και PI. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές (\pm SD) ζώντων (ανεξίνης V-/PI-) και αποπτωτικών παρασίτων (ανεξίνης V^+) σε ραβδογράμματα και είναι αντιπροσωπευτικά τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων. Τα σύμβολα των (*) και (#) υποδεικνύουν στατιστικές σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τις ομάδες αρνητικού (χωρίς επίδραση με κάποιον παράγοντα) και θετικού (επίδραση με HePC) ελέγχου, αντίστοιχα. Σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιδράσεων TPF1 και TPF2 υποδεικνύονται με (#).

Επιπλέον, είναι αξιοσημείωτο ότι η επίδραση των κλασμάτων TPF1 και TPF2 επέφερε όμοια ή κατά περίπτωση σημαντικά μεγαλύτερη αύξηση του ποσοστού των αποπτωτικών παρασίτων σε σύγκριση με το φάρμακο αναφοράς HePC. Ενδεικτικά κυτταρογράμματα με τα αντίστοιχα τεταρτημόρια απεικόνισης των υγιών (ανεξίνη V-/PI-), των πρώιμων αποπτωτικών (ανεξίνη V^+ /PI-), των όψιμων αποπτωτικών (ανεξίνη V^+ /PI+) και των νεκρωτικών (ανεξίνη V-/PI+) προμαστιγωτών παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.8. Το Triton X-100 χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας νέκρωσης οδηγώντας το 45,9% και το 49,3% των *L. infantum* και *L. major*

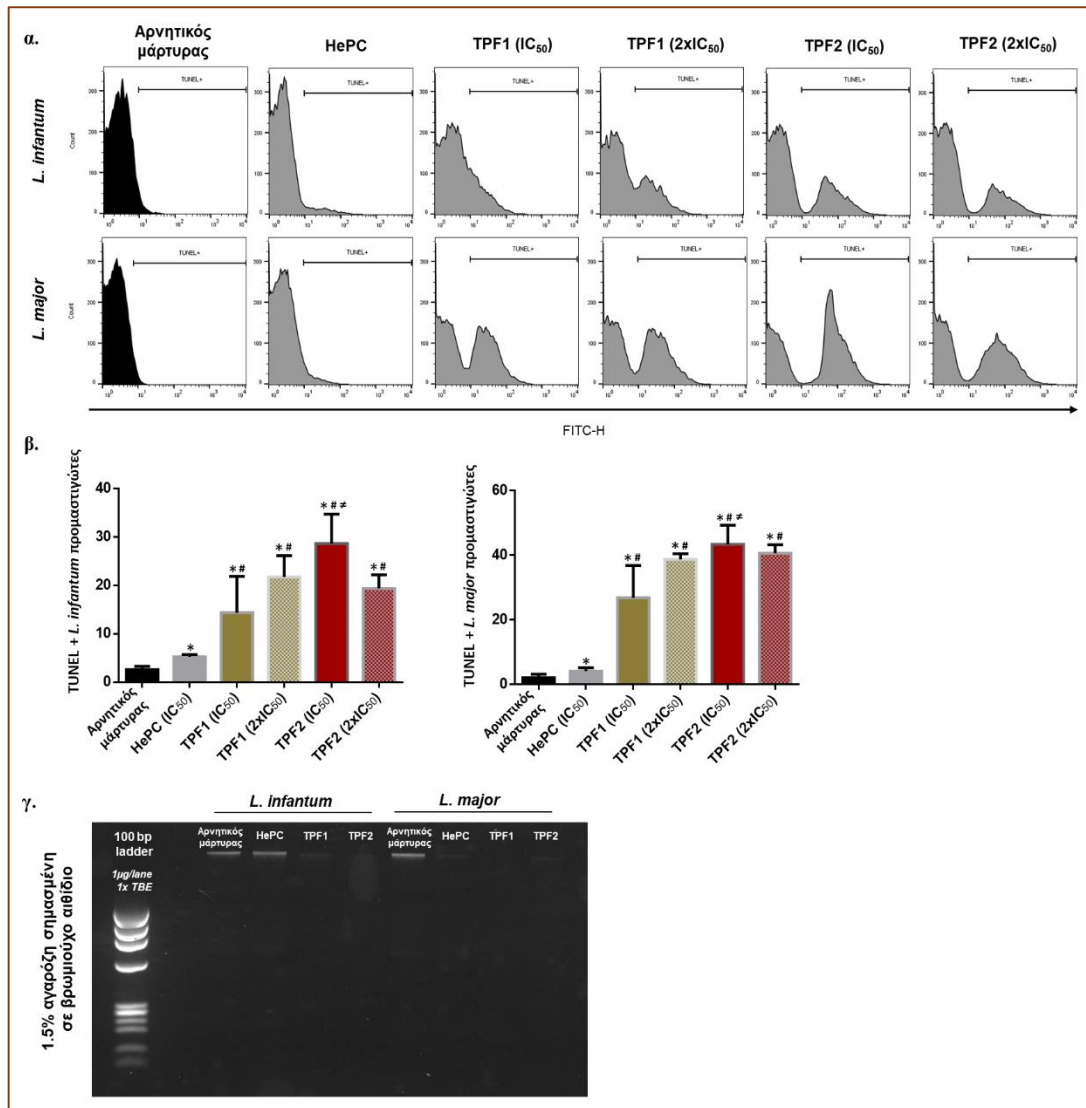
προμαστιγωτών, αντίστοιχα, σε απώλεια της ακεραιότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (ανεξίνη V⁻/PI⁺).



Εικόνα 4.8. Αλλαγές στην έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης και στην ακεραιότητα της πλασματικής μεμβράνης σε προμαστιγώτες *Leishmania* spp. που έχουν επωαστεί με TPF1 και TPF2. Προμαστιγώτες *L. infantum* (α) και *L. major* (β) εκθετικής φάσης ανάπτυξης, επώαστηκαν με TPF1, TPF2 και HePC (θετικός μάρτυρας) για 72 ώρες. Τα παράσιτα επισημάνθηκαν με ανεξίνη V-FITC και PI. Οι φαινότυποι των κυττάρων χαρακτηρίστηκαν ως: πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα (ανεξίνη V⁺/PI⁻), όψιμα αποπτωτικά (ανεξίνη V⁺/PI⁺), νεκρωτικά (ανεξίνη V⁻/PI⁺) και ζώντα κύτταρα (ανεξίνη V⁻/PI⁻). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως στικτογράμματα κυτταρομετρίας ροής, αντιπροσωπευτικά ενός πειράματος.

4.4.3 Προσδιορισμός του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου μέσω ολιγονουκλεοσωμικού κατακερματισμού του DNA σε προμαστιγώτες του γένους *Leishmania*

Το πρότυπο διάσπασης του γονιδιωματικού DNA, που χαρακτηρίζεται από κατακερματισμό του σε νουκλεοσωμικές μονάδες, αποτελεί ένα επιπλέον χαρακτηριστικό του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου (Majtnernová and Roušar 2018). Για να διερευνηθεί εάν τα ολικά φαινολικά κλάσματα, TPF1 και TPF2, οδηγούν σε κατακερματισμό του DNA των προμαστιγωτών *L. infantum* και *L. major*, πραγματοποιήθηκε η τεχνική TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP Nick End Labeling), η οποία στηρίζεται στη σύνδεση του ενζύμου TdT με τα 3'-OH άκρα των θραυσμάτων DNA. Καλλιέργειες προμαστιγωτών *L. infantum* και *L. major*, εκθετικής φάσης ανάπτυξης, επώαστηκαν με τα TPF1 και TPF2 για 72 ώρες, στις συγκεντρώσεις που αντιστοιχούν στις τιμές IC₅₀ και 2 x IC₅₀ και η εκτίμηση του φθορισμού και η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ως αρνητικοί μάρτυρες ορίστηκαν *L. infantum* και *L. major* προμαστιγώτες που δε δέχτηκαν την επίδραση κάποιας ουσίας. Όπως απεικονίζεται στην



Εικόνα 4.9. Κατακερματισμός του DNA σε προμαστιγώτες *L. infantum* και *L. major* ύστερα από 72 ώρες επώασης με TPF1 και TPF2, με τη δοκιμασία TUNEL. Προμαστιγώτες που δε δέχτηκαν την επίδραση κάποιας ουσίας ή προμαστιγώτες που επώαστηκαν με HePC, αποτέλεσαν την αρνητική και τη θετική ομάδα ελέγχου, αντίστοιχα. (α) Ιστογράμματα μονής παραμέτρου κυτταρομετρίας ροής (FL1-H) αντιπροσωπευτικά ενός πειράματος. (β) Ραβδογράμματα ποσοστού TUNEL-θετικών *L. infantum* και *L. major* προμαστιγωτών. Οι τιμές αποτελούν τις μέσες τιμές (± SD) τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Τα σύμβολα των (*) και (#) υποδεικνύουν στατιστικές σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με την αρνητική και θετική ομάδα ελέγχου, αντίστοιχα. Σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιδράσεων με TPF1 και TPF2 υποδεικνύονται με (≠). (γ) Δοκιμασία κατακερματισμού γονιδιωματικού DNA σε πήκτωμα αναρόζης 1,5%.

Εικόνα 4.9α, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της μέσης έντασης φθορισμού (FL1-H) και για τα δύο είδη του παρασίτου που επώαστηκαν με τα δύο πολυφαινολικά κλάσματα. Επίσης, τα TPF1 και TPF2 αύξησαν σημαντικά το ποσοστό των TUNEL-θετικών προμαστιγωτών σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα. Ειδικότερα, το ποσοστό των TUNEL-θετικών *L. infantum* προμαστιγωτών αυξήθηκε κατά 5,5 και 11 φορές μετά την επίδραση των TPF1 και TPF2, αντίστοιχα, σε συγκέντρωση IC₅₀ (Εικόνα 4.9β). Ομοίως, το ποσοστό των TUNEL-θετικών *L. major* προμαστιγωτών αυξήθηκε κατά 7,8 και 12,6 φορές μετά την επώαση με τα TPF1 και TPF2, αντίστοιχα, στη συγκέντρωση IC₅₀ (Εικόνα 4.9β). Επίσης, η επίδραση του TPF2 στη

συγκέντρωση IC₅₀ ήταν σημαντικά ισχυρότερη συγκριτικά με το TPF1, καθώς επέφερε σχεδόν διπλάσια αύξηση του ποσοστού των TUNEL-θετικών *L. infantum* και *L. major* παρασίτων (αύξηση κατά 2 και 1,6 φορές, αντίστοιχα). Τα παραπάνω αποτελέσματα ανέδειξαν πως το πλουσιότερο πολυφαινολικής σύνθεσης κλάσμα TPF2 παρουσιάζει ισχυρότερη αντιλεϊσμανιακή δράση.

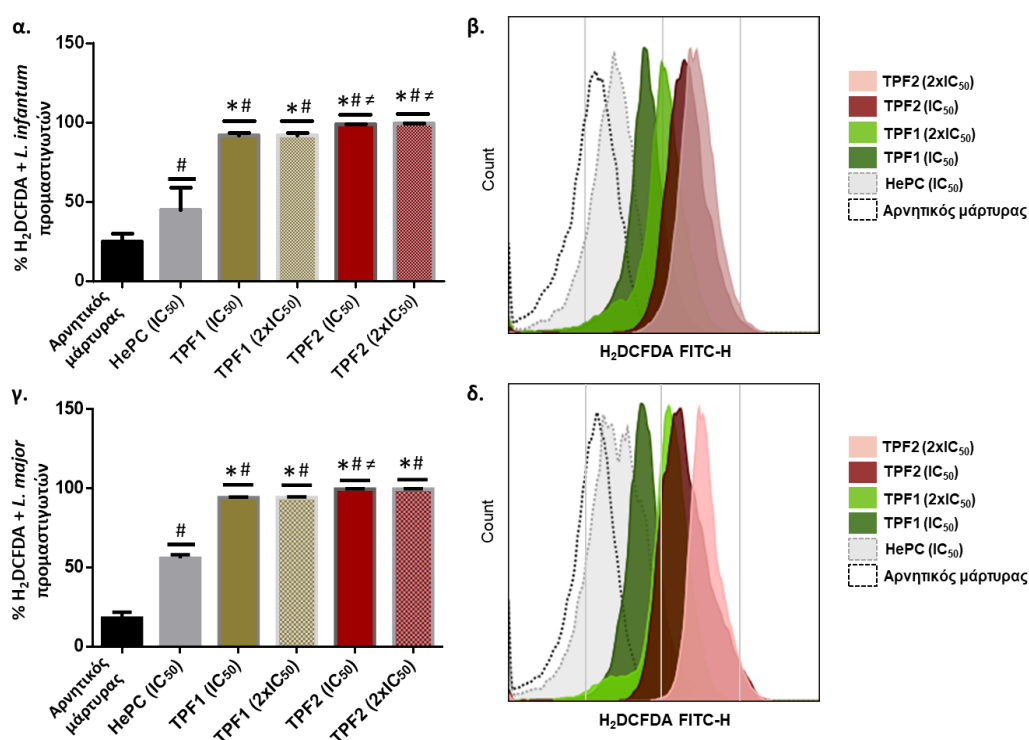
Τα προαναφερθέντα ευρήματα που προέκυψαν από την ανάλυση TUNEL, τεκμηριώθηκαν περαιτέρω πραγματοποιώντας ανάλυση του κατακερματισμού του DNA μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης. Τα αποτελέσματα φανέρωσαν ότι τόσο το TPF1 όσο και το TPF2 στις IC₅₀ συγκεντρώσεις τους, προκαλούν αξιοσημείωτο κατακερματισμό του γονιδιωματικού DNA των παρασίτων *L. infantum* και *L. major*, όπως παρατηρείται και στην Εικόνα 4.9γ.

4.4.4 Επίδραση των ολικών φαινολικών κλασμάτων στα επίπεδα των ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS - reactive oxygen species) σε προμαστιγώτες του γένους *Leishmania*

Τα ελεγχόμενα επίπεδα παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) ρυθμίζουν διάφορες πτυχές της κυτταρικής λειτουργίας και είναι απαραίτητα για τις οδούς μεταγωγής σήματος, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που διαμεσολαβούν στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση), καθώς έχουν χαρακτηριστεί ως πιθανοί ρυθμιστές του (Mallik et al. 2015). Στη συγκεκριμένη μελέτη, πραγματοποιήθηκε χρώση με H₂DCFDA για την αξιολόγηση της επαγόμενης από τα TPF1 και TPF2 παραγωγής ROS σε προμαστιγώτες *L. infantum* και *L. major*, εκθετικής φάσης ανάπτυξης, μετά από 72 ώρες επώασης. Το επίπεδο των ενεργών ριζών οξυγόνου προσδιορίστηκε με την εφαρμογή κυτταρομετρίας ροής (Εικόνα 4.10).

Τα αποτελέσματα ανέδειξαν πως η παραγωγή ROS αυξήθηκε σημαντικά στους προμαστιγώτες που επώαστηκαν με τα πολυφαινολικά κλάσματα. Αναλυτικότερα, η επίδραση των TPF1 και TPF2 σε συγκέντρωση IC₅₀, οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού των H₂DCFDA-θετικών *L. infantum* προμαστιγωτών (91,8% και 98,9%, αντίστοιχα) συγκριτικά με τα παράσιτα που δε δέχτηκαν την επίδραση κάποιας ουσίας όπου το ποσοστό διατηρήθηκε στο 24,8%. Το αντίστοιχο ποσοστό για τα παράσιτα που επώαστηκαν με HePC (θετική ομάδα ελέγχου) ήταν 45,2% ($p \leq 0,050$) (Εικόνα 4.10α). Ομοίως, η επώαση των *L. major* προμαστιγωτών με τα TPF1 και TPF2 στη συγκέντρωση IC₅₀, οδήγησε επίσης σε σημαντική παραγωγή ROS, καθώς τα αντίστοιχα ποσοστά των H₂DCFDA-θετικών προμαστιγωτών ανήλθαν στα 94,2% και 99,5%, αντίστοιχα σε σύγκριση με το αντίστοιχο ποσοστό 18,1% του αρνητικού μάρτυρα. Το ανάλογο ποσοστό στην ομάδα θετικού ελέγχου προσδιορίστηκε στο 55,8% ($p \leq 0,050$) (Εικόνα 4.10γ).

Σε απόλυτη συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της μέσης έντασης φθορισμού όπως απεικονίζεται στα αντίστοιχα ιστογράμματα μιας παραμέτρου (Εικόνες 4.10β και 4.10δ). Τα παραπάνω αποτελέσματα ανέδειξαν επίσης το TPF2 ως δραστικότερο στην παραγωγή ROS και για τα δύο στελέχη *Leishmania* ($p \leq 0,020$). Οι προμαστιγώτες υποβλήθηκαν επίσης σε επεξεργασία με υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το οποίο χρησίμευσε ως πειραματικός θετικός έλεγχος και προκάλεσε παραγωγή ROS σε ποσοστά 55,6% και 52,6% για τους προμαστιγώτες *L. infantum* και *L. major*, αντίστοιχα (τα δεδομένα δεν παρατίθενται).



Εικόνα 4.10. Ποσοτικός προσδιορισμός ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS - reactive oxygen species) σε προμαστιγώτες του γένους *Leishmania*, εκθετικής φάσης ανάπτυξης, ύστερα από 72 ώρες επώασης με τα TPF1 και TPF2. Προμαστιγώτες που δε δέχτηκαν την επίδραση κάποιας ουσίας ή προμαστιγώτες που επώαστηκαν με HePC (IC₅₀), αποτέλεσαν την αρνητική και τη θετική ομάδα ελέγχου, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές (\pm SD) του ποσοστού των H₂DCFDA-θετικών *L. infantum* (α) και *L. major* (γ) προμαστιγωτών σε ραβδογράμματα και ως ιστογράμματα μονής παραμέτρου (FITC-H) για *L. infantum* (β) και *L. major* (δ). Τα σύμβολα (*) και (#) υποδεικνύουν στατιστικές σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με την θετική και αρνητική ομάδα ελέγχου, αντίστοιχα. Στατιστικές σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιδράσεων με TPF1 και TPF2 υποδεικνύονται με (≠).

4.5 *In vitro* αξιολόγηση και ταξινόμηση του είδους της αλληλεπίδρασης των βιοφαινολών με εμπορικά διαθέσιμο φάρμακο αναφοράς, σε προμαστιγώτες και αμαστιγώτες του γένους *Leishmania*

Τα τελευταία χρόνια το επιστημονικό ενδιαφέρον επικεντρώνεται όλο και περισσότερο στην εφαρμογή συνδυαστικών θεραπευτικών προσεγγίσεων, με στόχο τη βελτιστοποίηση των υπάρχουσών χημειοθεραπειών (Intakhan et al. 2020; Rebello et al. 2019; Scariot et al. 2017; Strauss et al. 2018). Η συνδυαστική χρήση νέων δραστικών ουσιών με εμπορικά διαθέσιμα φάρμακα αποτελεί μία εναλλακτική προσέγγιση που αποσκοπεί στη μείωση της διάρκειας της θεραπείας και στη χρήση πιθανά μικρότερων δόσεων των εμπορικά διαθέσιμων τοξικών φαρμάκων.

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, τα προαναφερθέντα ενθαρρυντικά αποτελέσματα της μονήρους αντιλεισμανιακής αποτελεσματικότητας των ολικών φαινολικών κλασμάτων και των απομονωμένων βιοφαινολικών ουσιών, ώθησαν το επιστημονικό ενδιαφέρον στην περαιτέρω αξιολόγηση της συνδυαστικής τους δράσης με το φάρμακο αναφοράς της λεισμανίασης, τη HePC. Η αξιολόγηση της φύσης της αλληλεπίδρασης των υπό μελέτη φυσικών προϊόντων με τη HePC σε εξωκυττάριους προμαστιγώτες και σε ενδοκυττάριους αμαστιγώτες του γένους *Leishmania* πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά.

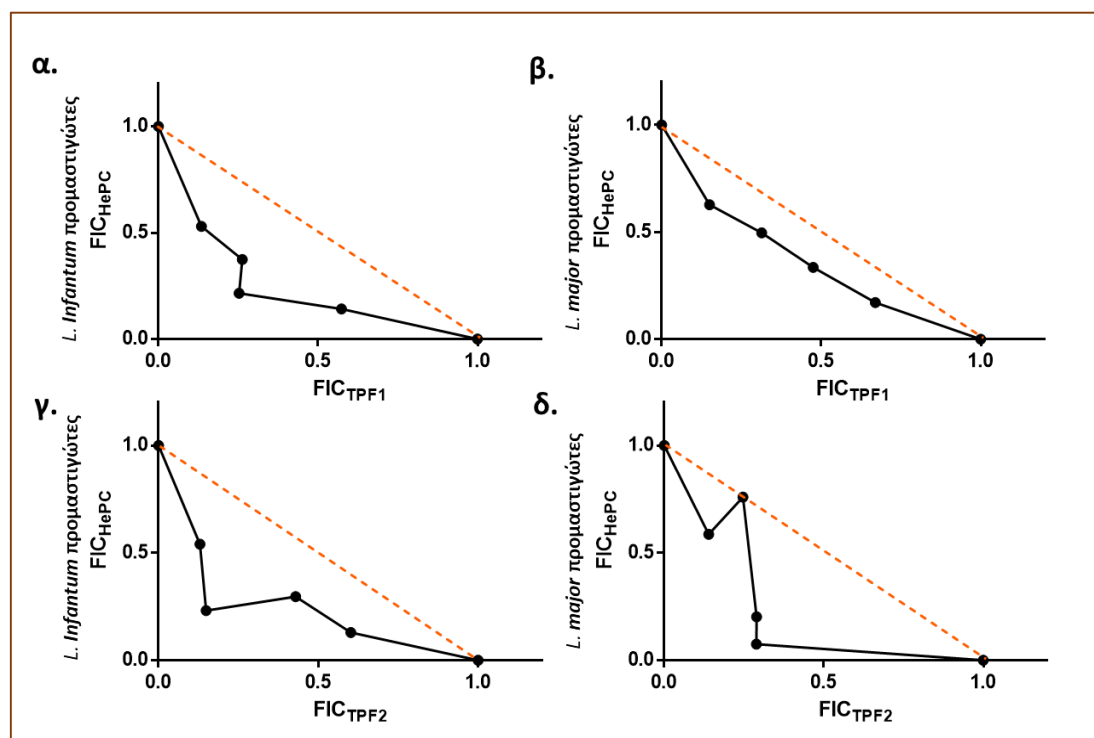
Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βιοφαινολικών ενώσεων και της HePC αξιολογήθηκαν σύμφωνα με την τροποποιημένη μέθοδο ισοβολογράμματος (Fivelman et al. 2004), όπως αναλύεται στην Ενότητα 3.11. Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των δεικτών κλασματικής ανασταλτικής συγκέντρωσης (FICIs), σύμφωνα με τους οποίους οι αλληλεπιδράσεις ταξινομήθηκαν ως συνεργιστικές ($FICI \leq 0,5$), αθροιστικές ($0,5 < FICI \leq 1$), αδιάφορες ($1 < FICI < 2$), ή ανταγωνιστικές ($FICI \geq 2$). Τέλος, πραγματοποιήθηκε γραφική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων με ισοβολογράμματα. Σε κάθε ισοβολόγραμμα τα σημεία δεδομένων (κουκίδες) που αντιστοιχούν στις τιμές FIC των συνδυασμών συνδέθηκαν με γραμμή τάσης, ενώ η διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει τη γραμμή αθροιστικότητας (additivity line) και προκύπτει από τη διασταύρωση των τιμών IC_{50} της μονήρους δράσης του κάθε φαρμάκου.

4.5.1 *In vitro* αξιολόγηση της συνδυαστικής αλληλεπίδρασης των βιοφαινολών με το φάρμακο αναφοράς, σε προμαστιγώτες του γένους *Leishmania*

Προμαστιγώτες *L. infantum* και *L. major*, εκθετικής φάσης ανάπτυξης, δέχτηκαν τη συνδυαστική δράση των βιοφαινολικών ενώσεων με τη HePC στους συνδυασμούς Β, C, D και E, επώαστηκαν με αυτούς για 72 ώρες και τα αποτελέσματα ανακτήθηκαν με τη βοήθεια της οξειδοαναγωγικής αντίδρασης της ρεσαζουρίνης. Σύμφωνα με τις τιμές FICI, οι αλληλεπιδράσεις HePC-TRF1 (FICI = 0,62 και 0,81 για *L. infantum* και *L. major*, αντίστοιχα) και HePC-TRF2 (FICI = 0,63 και 0,65 για *L. infantum* και *L. major* προμαστιγώτες, αντίστοιχα) χαρακτηρίστηκαν στο σύνολό τους ως αθροιστικές (Πίνακας 10).

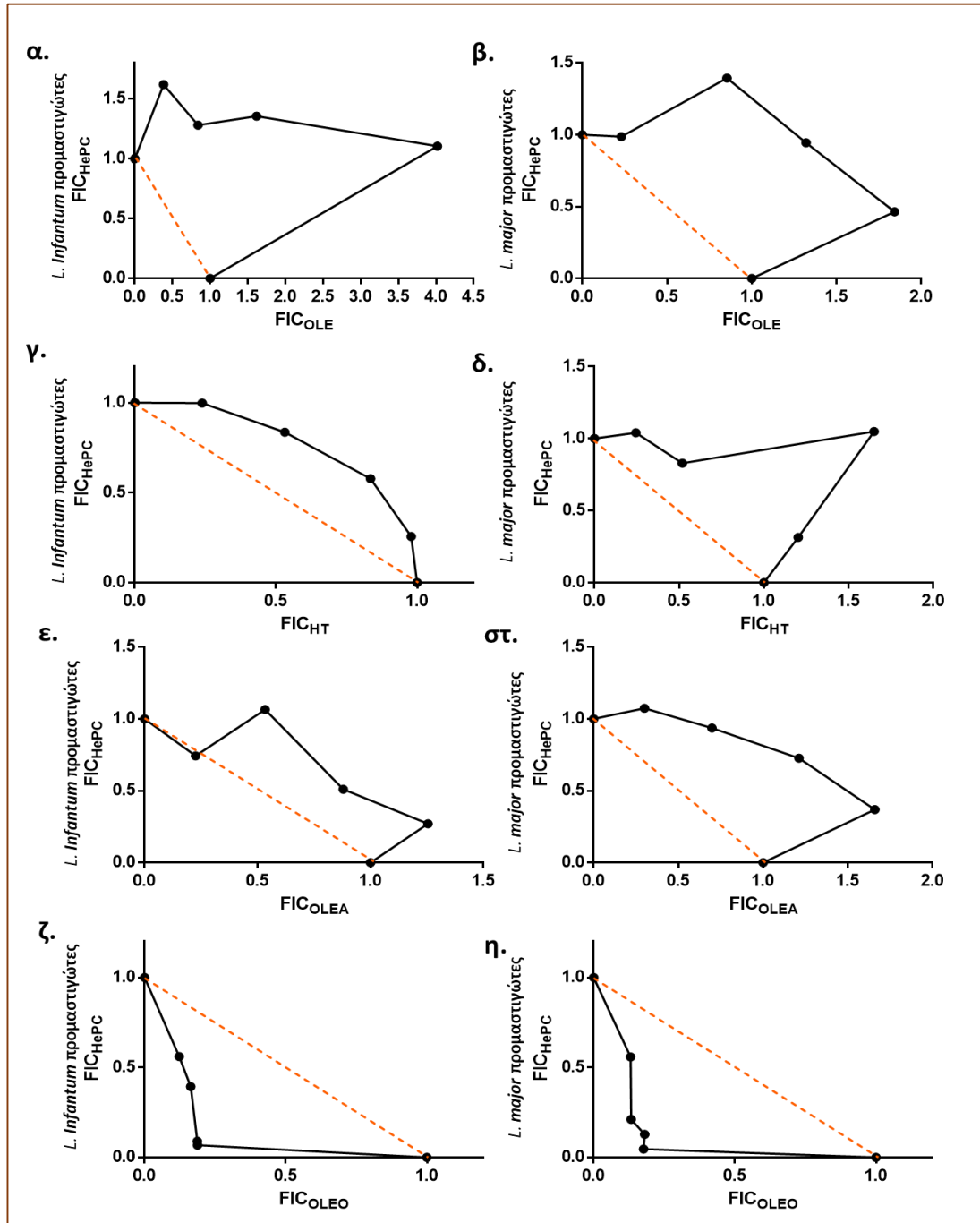
Πίνακας 10. Αξιολόγηση της συνδυαστικής αλληλεπίδρασης σε προμαστιγώτες *Leishmania* spp.

ΠΡΟΜΑΣΤΙΓΩΤΕΣ			
ΕΙΔΟΣ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ	ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	FICI	ΕΙΔΟΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ
<i>L. infantum</i>	HePC – TRF1	0,62	ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΗ
	HePC – TRF2	0,63	ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΗ
	HePC – OLE	3,12	ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ
	HePC – HT	1,31	ΑΔΙΑΦΟΡΗ
	HePC – OLEA	1,37	ΑΔΙΑΦΟΡΗ
	HePC – OLEO	0,44	ΣΥΝΕΡΓΙΣΤΙΚΗ
<i>L. major</i>	HePC – TRF1	0,81	ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΗ
	HePC – TRF2	0,65	ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΗ
	HePC – OLE	2,03	ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ
	HePC – HT	1,73	ΑΔΙΑΦΟΡΗ
	HePC – OLEA	1,74	ΑΔΙΑΦΟΡΗ
	HePC – OLEO	0,39	ΣΥΝΕΡΓΙΣΤΙΚΗ



Εικόνα 4.11. Αντιπροσωπευτικά ισοβιολογάρια της αλληλεπίδρασης της HePC με τα TRF1 και TRF2. Η αλληλεπίδραση των κλασμάτων TRF1 και TRF2 με τη HePC αναλύθηκε έναντι των προμαστιγωτών *L. infantum* (α,γ) και *L. major* (β,δ). Οι τιμές του άξονα χ αντιπροσωπεύουν τις τιμές FIC των TRF1 και TRF2 και οι τιμές του άξονα γ τις τιμές FIC της HePC. Τα σημεία δεδομένων (κουκκίδες) που βρίσκονται πάνω, κατά μήκος ή κάτω από τη διακεκομμένη γραμμή (ΣFICI = 1) υποδεικνύουν ανταγωνιστική, αθροιστική, ή συνεργιστική αλληλεπίδραση, αντίστοιχα. Τα κατασκευασμένα ισοβιολογάρια είναι το αποτέλεσμα 3 τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων που εκτελέστηκαν εις τριπλούν.

Στα αντίστοιχα ισοβολογράμματα παρατηρήθηκε μετατόπιση των σημείων δεδομένων (κουκίδες) προς τα αριστερά, κάτω από τη γραμμή αθροιστικότητας (Εικόνα 4.11), υποδεικνύοντας μία σαφή μείωση των τιμών IC₅₀ της HePC στους συνδυασμούς, όπως φαίνεται αναλυτικά και στα συμπληρωματικά δεδομένα (Πίνακες 12 και 13, Παράρτημα II).



Εικόνα 4.12. Αντιπροσωπευτικά ισοβολογράμματα της αλληλεπίδρασης της HePC με τις απομονωμένες βιοφαινολικές ενώσεις. Η αλληλεπίδραση των απομονωμένων ενώσεων με τη HePC αναλύθηκε έναντι των προμαστιγωτών *L. infantum* (α,γ,ε,ζ) και *L. major* (β,δ,στ,η). Οι τιμές του άξονα χ αντιπροσωπεύουν τις τιμές FIC της κάθε βιοφαινόλης και οι τιμές του άξονα γ τις τιμές FIC της HePC. Τα σημεία δεδομένων (κουκίδες) που βρίσκονται πάνω, κατά μήκος ή κάτω από τη διακεκομμένη γραμμή ($\Sigma FICI = 1$) υποδεικνύουν ανταγωνιστική, αθροιστική, ή συνεργιστική αλληλεπίδραση, αντίστοιχα. Τα κατασκευασμένα ισοβολογράμματα είναι το αποτέλεσμα 3 τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων που εκτελέστηκαν εις τριπλούν.

Οι αλληλεπιδράσεις HePC-OLE, και για τα δύο στελέχη του παρασίτου, χαρακτηρίστηκαν ως ανταγωνιστικές με τιμές FICI ίσες με 3,12 και 2,03 για τα *L. infantum* και *L. major*, αντίστοιχα (Πίνακας 10). Τα σημεία των συνδυασμών στα αντίστοιχα ισοβιολογράμματα εμφάνισαν σημαντική μετατόπιση προς τα δεξιά, πάνω από τη γραμμή αθροιστικότητας (Εικόνα 4.12) και οι τιμές IC₅₀ της HePC στους συνδυασμούς σημείωσαν αύξηση στο σύνολό τους (Πίνακας 14, Παράρτημα II). Αντίστοιχα, οι αλληλεπιδράσεις HePC-HT και HePC-OLEA ταξινομήθηκαν ως αδιάφορες (Πίνακας 8), παρουσιάζοντας παρόμοιες τιμές FICI (FICI = 1,31 και 1,37, αντίστοιχα για *L. infantum* και 1,73 και 1,74 ομοίως για *L. major*). Στα αντίστοιχα ισοβιολογράμματα, τα σημεία των περισσότερων συνδυασμών παρέμειναν κοντά στη γραμμή αθροιστικότητας (Εικόνα 4.12), με τις τιμές IC₅₀ της HePC στους συνδυασμούς να μη σημειώνουν σημαντικές διαφοροποιήσεις σε σχέση με τη μονήρη δράση της (Πίνακες 15 και 16, Παράρτημα II). Τέλος, η αλληλεπίδραση μεταξύ HePC και OLEO χαρακτηρίστηκε ως συνεργιστική με τις τιμές FICI να προσδιορίζονται στο 0,44 και 0,39 για το σπλαγχνικό και το δερματικό στέλεχος, αντίστοιχα (Πίνακας 10). Στα αντίστοιχα ισοβιολογράμματα σημειώθηκε σημαντική μετατόπιση όλων των σημείων προς τα αριστερά, κάτω από τη γραμμή αθροιστικότητας (Εικόνα 4.12), και οι τιμές IC₅₀ της HePC στους συνδυασμούς μειώθηκαν σημαντικά συγκριτικά με την τιμή IC₅₀ της μονήρους δράσης της HePC (Πίνακας 17, Παράρτημα II).

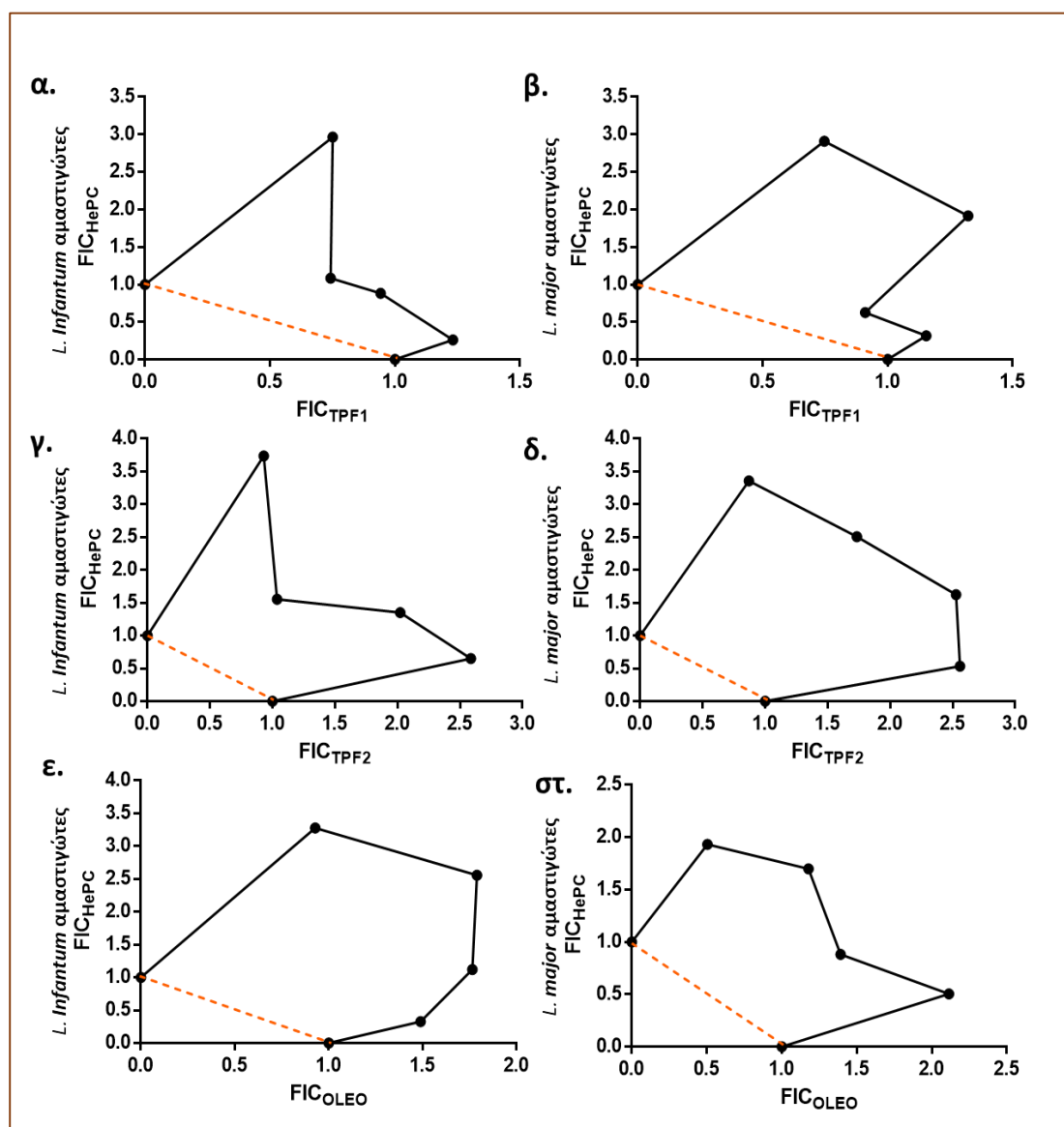
4.5.2 *In vitro* αξιολόγηση της συνδυαστικής αλληλεπίδρασης των βιοφαινολών με το φάρμακο αναφοράς, σε ενδοκυττάρια αμαστιγώτες του γένους *Leishmania*

Η παραπάνω αξιολόγηση της συνδυαστικής αλληλεπίδρασης των φυσικών προϊόντων με τη HePC στο σύστημα των εξωκυττάρια προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου, ανέδειξε τα πολυφαινολικά κλάσματα TPF1 και TPF2 και την καθαρή OLEO, ως τις πιο υποσχόμενες βιοφαινόλες καθώς φανέρωσαν αθροιστικές και συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις για τα δύο στελέχη *Leishmania*. Συνεπώς, αυτές οι βιοφαινόλες επιλέχθηκαν για την περαιτέρω μελέτη τους σε ενδοκυττάρια αμαστιγώτες του γένους *Leishmania*. Η αξιολόγηση των αλληλεπιδράσεων των τριών βιοφαινολικών ενώσεων με τη HePC στο *in vitro* σύστημα των *L. infantum* και *L. major* μολυσμένων μακροφάγων,

Πίνακας 11. Αξιολόγηση της συνδυαστικής αλληλεπίδρασης σε ενδοκυττάρια αμαστιγώτες *Leishmania* spp.

ΑΜΑΣΤΙΓΩΤΕΣ			
ΕΙΔΟΣ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ	ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	FICI	ΕΙΔΟΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ
<i>L. infantum</i>	HePC – TPF1	2,22	ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ
	HePC – TPF2	3,47	ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ
	HePC – OLEO	3,31	ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ
<i>L. major</i>	HePC – TPF1	2,48	ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ
	HePC – TPF2	3,93	ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ
	HePC – OLEO	2,55	ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ

πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της οξειδοαναγωγικής αντίδρασης της ρεσαζουρίνης, μετά από έκθεσή τους στους συνδυασμούς Β, C, D και E για 48 ώρες. Σύμφωνα με τις τιμές FICI, οι αλληλεπιδράσεις HePC-TPF1, HePC-TPF2 και HePC-OLEO ταξινομήθηκαν ως ανταγωνιστικές για τους ενδοκυττάριους αμαστιγώτες *L. infantum* (FICI = 2,22, 3,47 και 3,31, αντίστοιχα). Ομοίως, οι αντίστοιχες αλληλεπιδράσεις ταξινομήθηκαν ως ανταγωνιστικές και για τους αμαστιγώτες *L. major* (FICI = 2,48, 3,93 και 2,55, αντίστοιχα) (Πίνακας 11). Τα σημεία δεδομένων στα ισοβολογράμματα, σημείωσαν στο σύνολό τους σημαντική μετατόπιση προς τα δεξιά, πάνω από τη γραμμή αθροιστικότητας (Εικόνα 4.13), ενώ η πλειοψηφία των τιμών

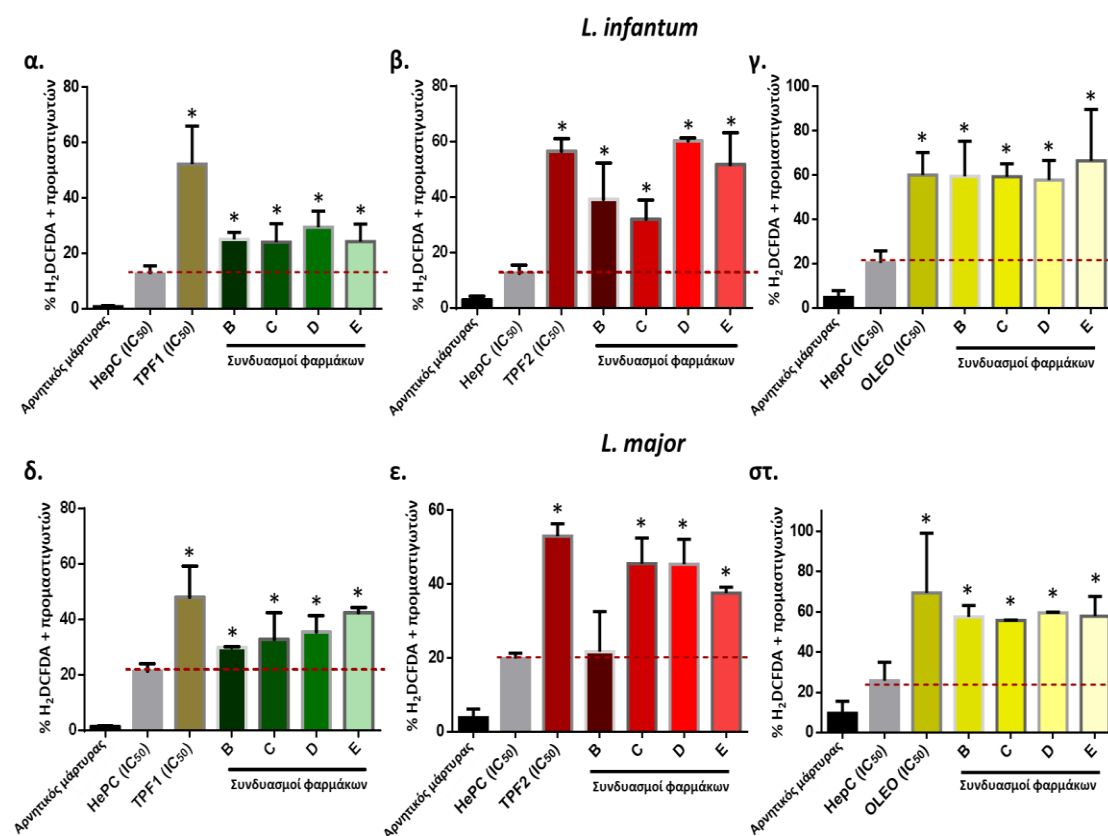


Εικόνα 4.13. Αντιπροσωπευτικά ισοβολογράμματα της αλληλεπίδρασης της HePC με τα φυσικά προϊόντα TPF1, TPF2 και OLEO σε ενδοκυττάριους αμαστιγώτες. Η αλληλεπίδραση των ουσιών αναλύθηκε έναντι των ενδοκυττάριων αμαστιγωτών *L. infantum* (α,γ,ε) και *L. major* (β,δ,στ). Οι τιμές του άξονα χ αντιπροσωπεύουν τις τιμές FIC του κάθε φυσικού προϊόντος και οι τιμές του άξονα γ τις τιμές FIC της HePC. Τα σημεία δεδομένων (κουκκίδες) που βρίσκονται πάνω, κατά μήκος ή κάτω από τη διακεκομμένη γραμμή (ΣFICI = 1) υποδεικνύουν ανταγωνιστική, αθροιστική, ή συνεργιστική αλληλεπίδραση, αντίστοιχα. Τα κατασκευασμένα ισοβολογράμματα είναι το αποτέλεσμα 3 τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων που εκτελέστηκαν εις τριπλούν.

IC₅₀ της HePC στους συνδυασμούς παρουσίασε άνοδο συγκριτικά με τις IC₅₀ τιμές της μονήρους δράσης της, όπως φαίνεται αναλυτικά και στα συμπληρωματικά δεδομένα του Παραρτήματος II (Πίνακες 18, 19 και 20).

4.5.3 Επίδραση των συνδυαστικών αλληλεπιδράσεων των βιοφαινολών με το φάρμακο αναφοράς, στα επίπεδα των ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) σε προμαστιγώτες του γένους *Leishmania*

Στη συνέχεια, οι υποσχόμενες αλληλεπιδράσεις των πολυφαινολικών κλασμάτων TPF1 και TPF2 και της καθαρής OLEO, με το φάρμακο αναφοράς HePC, αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα επαγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) στους εξωκυττάριους προμαστιγώτες *Leishmania*. Η παραγωγή ROS αξιολογήθηκε για κάθε επιμέρους συνδυασμό (B, C, D και E) (Πίνακες 12, 13 και 17, Παράρτημα II) σε προμαστιγώτες *L. infantum* και *L. major*, εκθετικής



Εικόνα 4.14. Ενδοκυττάρια παραγωγή οξειδωτικών ριζών οξυγόνου (ROS) σε προμαστιγώτες *L. infantum* και *L. major* που δέχτηκαν τη συνδυαστική δράση ουσιών. Προμαστιγώτες εκθετικής φάσης επωάστηκαν για 72 ώρες με τις αναλογίες 4:1, 3:2, 2:3 και 1:4 των συνδυασμών HePC-TPF1 (α, δ), HePC-TPF2 (β, ε) και HePC-OLEO (γ, στ), αντίστοιχα. Προμαστιγώτες που δε δέχτηκαν την επίδραση κάποιας ουσίας ή προμαστιγώτες που επωάστηκαν με HePC (IC₅₀), αποτέλεσαν την αρνητική και τη θετική ομάδα ελέγχου, αντίστοιχα. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές (± SD) των ποσοστών των H₂DCFDA-θετικών προμαστιγωτών σε ραβδογράμματα. Το σύμβολο του (*) υποδεικνύει στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με την ομάδα θετικού ελέγχου.

φάσης ανάπτυξης, που επωάστηκαν με αυτούς για 72 ώρες και αναλύθηκε με κυτταρομετρία ροής.

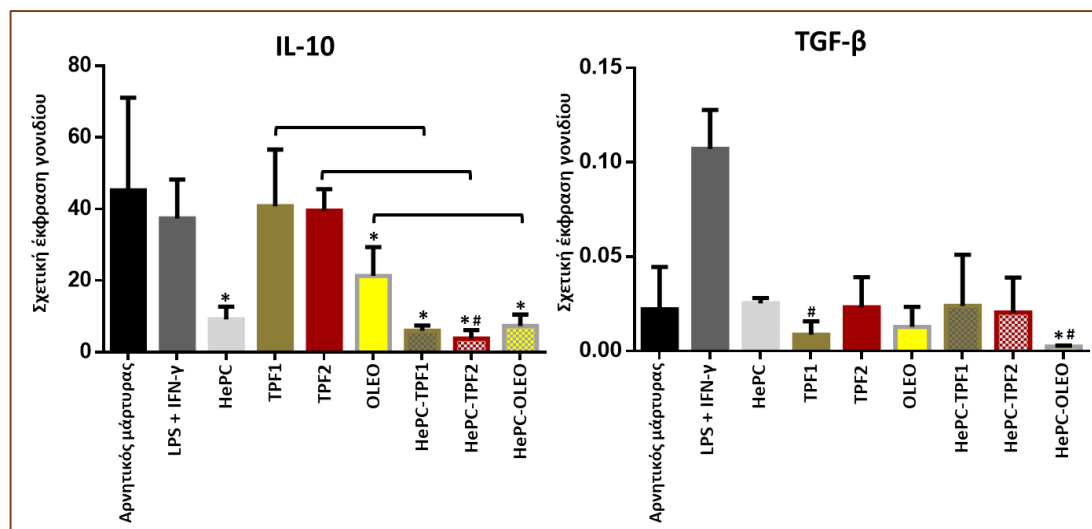
Τα αποτελέσματά απεικονίζονται στην Εικόνα 4.14 και φανερώνουν πως η συνδυαστική επίδραση όλων των βιοφαινολών με τη HePC οδήγησε σε σημαντική ενίσχυση της παραγωγή ROS, για κάθε επιμέρους συνδυασμό, και στα δύο στελέχη *Leishmania*, συγκριτικά με τη μονήρη δράση της HePC ($p \leq 0,050$). Ειδικότερα, οι επιμέρους συνδυασμοί HePC-TPF1 οδήγησαν σε αυξημένη παραγωγή ROS έως και 2,4 φορές, συγκριτικά τη μονήρη δράση της HePC, και για τα δύο στελέχη *Leishmania* (Εικόνα 4.14α και 4.14δ). Οι αντίστοιχοι συνδυασμοί HePC-TPF2 επέφεραν αύξηση έως και 4,8 φορές στα επίπεδα των παραγόμενων ROS, συγκριτικά με τη μονήρη δράση της HePC (Εικόνα 4.14β και 4.14ε). Ομοίως, οι συνδυασμοί HePC-OLEO, οδήγησαν σε αύξηση των ROS έως και 3,3 φορές (Εικόνα 4.14γ και 4.14στ). Συμπερασματικά, αυτά τα παραπάνω ευρήματα ενίσχυσαν την αθροιστική και συνεργιστική ταξινόμηση των TPF1 και TPF2 και της OLEO με τη HePC, όπως προσδιορίστηκε προηγουμένως κατά την ανάλυση ισοβλογράμματος (παράγραφος 4.4.1).

4.6 Επίδραση της μονήρους δράσης των βιοφαινολών, καθώς και της συνδυαστικής με HePC, στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων (mRNA) στο *in vitro* σύστημα *Leishmania* - μολυσμένων μακροφάγων

Τα μακροφάγα δρουν έχοντας διπλό ρόλο στην εξέλιξη της λείσμανιάσης, καθώς αποτελούν τα κύρια κύτταρα-ξενιστές για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των παρασίτων, αλλά και αποτελεσματικά κύτταρα για την εξάλειψή του (Tomiotto-Pellissier et al. 2018). Όπως αναφέρεται και στην ενότητα 1.5 της παρούσας διδακτορικής διατριβής, οι πληθυσμοί των μακροφάγων που έχουν χαρακτηριστεί και μελετηθεί εκτενέστερα είναι τα «κλασικά ενεργοποιημένα» (M1) μακροφάγα και τα «εναλλακτικά ενεργοποιημένα» (M2). Η πόλωση των M1 και M2 μακροφάγων έχει συσχετιστεί με την παραγωγή κυτταροκινών από τα λεμφοκύτταρα της Th1 προστατευτικής και της Th2 μη προστατευτικής απόκρισης για την εξέλιξη της νόσου, αντίστοιχα.

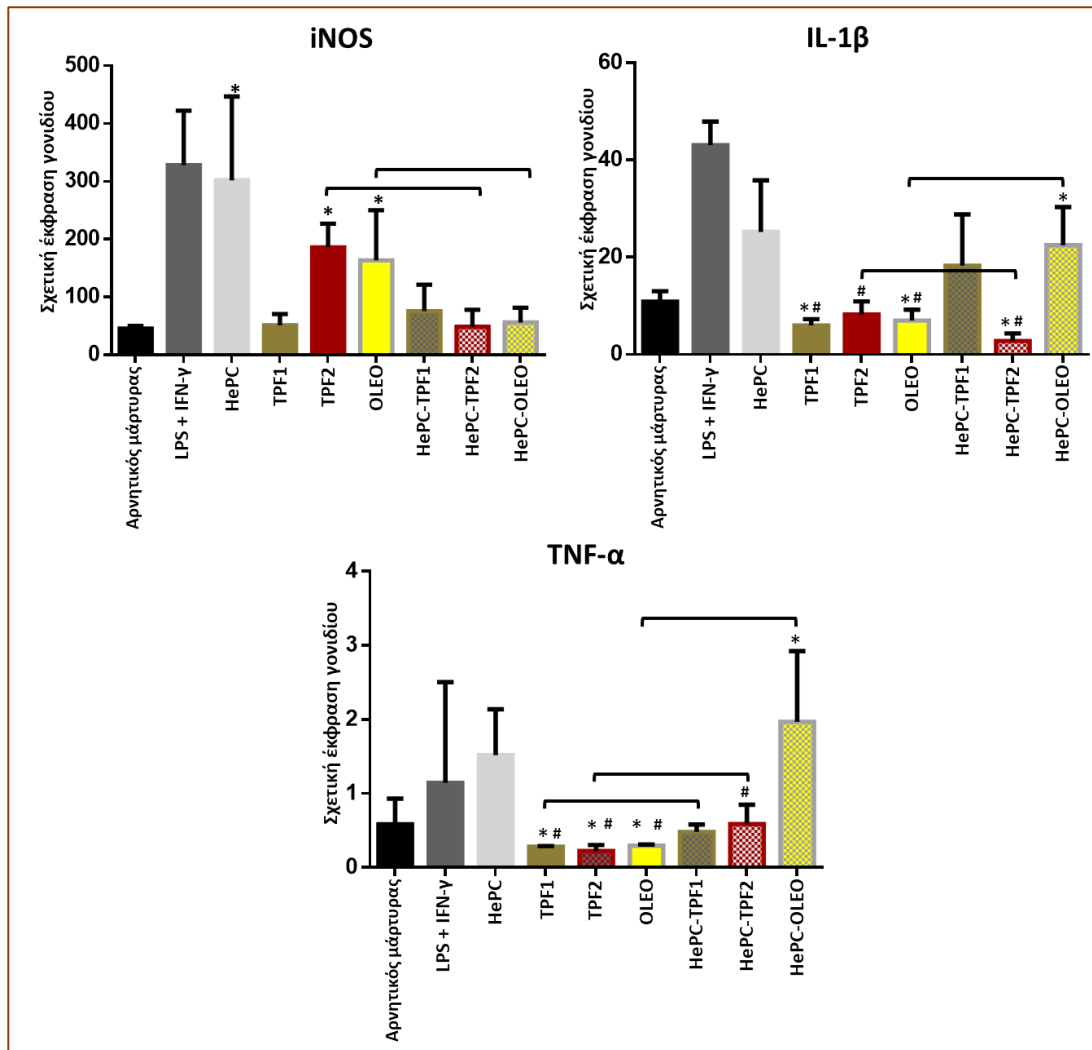
Στην παρούσα ενότητα, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των επιπέδων έκφρασης των mRNA της ιντερλευκίνης-1β (IL-1β), της ιντερλευκίνης-10 (IL-10), του παράγοντα νέκρωσης όγκων α (TNF-α), του αυξητικού παράγοντα μετασηματισμού β (TGF-β) και της επαγόμενης συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (iNOS) με RT-PCR πραγματικού χρόνου, σε *Leishmania* – μολυσμένα μακροφάγα J774A.1 που δέχτηκαν την μονήρη επίδραση των βιοφαινολικών ενώσεων (των κλασμάτων TPF1, TPF2 και της OLEO), καθώς και την συνδυαστική επίδραση αυτών με τη HePC, για 48 ώρες. Ως αρνητικός μάρτυρας των ενεργοποιημένων μακροφάγων

χρησιμοποιήθηκαν μολυσμένα μακροφάγα που δε δέχτηκαν την επίδραση κάποιου φαρμακευτικού παράγοντα, ενώ ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν μακροφάγα που εκτέθηκαν στους ισχυρούς ανοσορυθμιστικούς διεγέρτες LPS και IFN- γ . Η εξομάλυνση των αποτελεσμάτων έγινε με τον αρνητικό μάρτυρα των μη μολυσμένων μακροφάγων.



Εικόνα 4.15. Σχετική έκφραση των mRNA των Th2 κυτταροκινών (IL-10 και TGF- β), σε *L. infantum* - μολυσμένα μακροφάγα J774A.1 που δέχτηκαν τη μονήρη δράση των βιοφαινολικών ενώσεων TPF1, TPF2 και OLEO, καθώς και τη συνδυαστική αυτών με τη HePC. Τα σύμβολα (*) και (#) υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα των ενεργοποιημένων μακροφάγων και της μονήρους δράσης της HePC, αντίστοιχα.

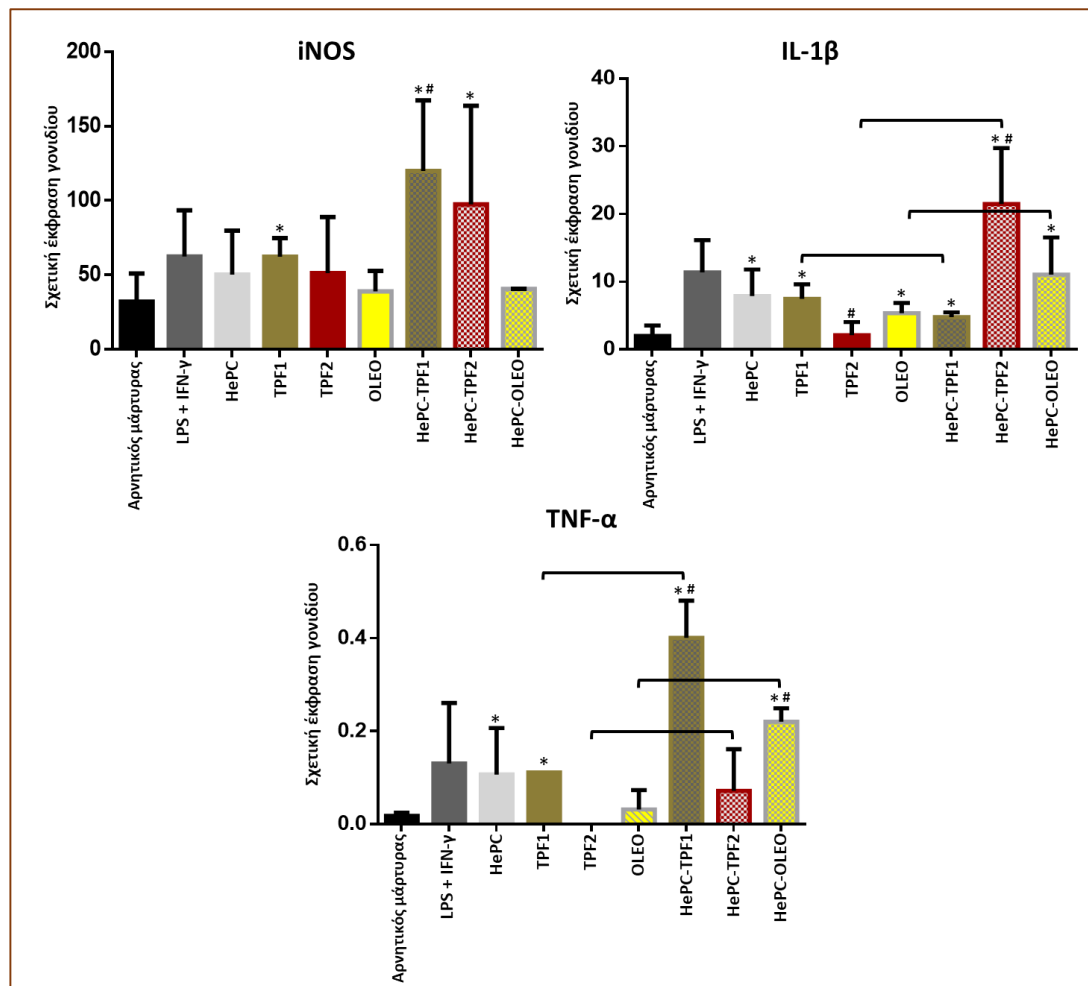
Ο προσδιορισμός της σχετικής έκφρασης των προαναφερθέντων γονιδίων ανέδειξε την ανοσορυθμιστική δράση των βιοφαινολικών ενώσεων. Αναλυτικότερα, στο *in vitro* σύστημα των μολυσμένων μακροφάγων που προσομοιάζει την εκδήλωση της σπλαγγνικής μορφής της νόσου (μόλυνση μακροφάγων με προμαστιγώτες *L. infantum*), παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της σχετικής έκφρασης του γονιδίου IL-10 στις ομάδες που δέχτηκαν τις συνδυαστικές επιδράσεις των TPF1, TPF2 και OLEO με τη HePC, σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα ($p = 0,034$ και $0,014$, αντίστοιχα) (Εικόνα 4.15). Ειδικότερα, η συνδυαστική επίδραση και των τριών βιοφαινολών με τη HePC για 48 ώρες, οδήγησε σε μείωση της έκφρασης του γονιδίου IL-10 και σε σχέση με τη μονήρη δράση του φαρμάκου αναφοράς, ενώ ο συνδυασμός HePC-TPF2 επέφερε σημαντική μείωση της αντίστοιχης έκφρασης ($p = 0,025$). Επιπλέον, η ομάδα των μολυσμένων μακροφάγων που δέχτηκε τη συνδυαστική επίδραση HePC-OLEO, παρουσίασε επίσης σημαντική μείωση της έκφρασης του TGF- β συγκριτικά τόσο με τον αρνητικό μάρτυρα, όσο και με τη μονήρη δράση της HePC ($p = 0,025$ και $0,050$, αντίστοιχα) (Εικόνα 4.15). Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα παράσιτα του γένους *Leishmania* διεγείρουν την παραγωγή των αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών TGF- β και IL-10 από τα μακροφάγα, παρεμποδίζοντας μέσω αυτών την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου και την επακόλουθη καταστροφή του παρασίτου, τα παραπάνω αποτελέσματα αξιολογούνται ως



Εικόνα 4.16. Σχετική έκφραση των mRNA Th1 κυτταροκινών (iNOS, IL-1β και TNF-α), σε *L. infantum* - μολυσμένα μακροφάγα J774A.1 που δέχτηκαν τη μονήρη δράση των βιοφαινολικών ενώσεων TPF1, TPF2 και OLEO, καθώς και τη συνδυαστική αυτών με τη HePC. Τα σύμβολα (*) και (#) υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα των ενεργοποιημένων μακροφάγων και της μονήρους δράσης της HePC, αντίστοιχα.

ενδεικτικά της ικανότητας των συνδυαστικών θεραπειών του εμπορικά διαθέσιμου φαρμάκου με τις βιοφαινόλες, να καθοδηγούν την ενεργοποίηση των T κυττάρων προς τον προστατευτικό Th1 ανοσοφαινότυπο. Η παραδοχή αυτή ενισχύεται και από την έκφραση της iNOS, όπου παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της έκφρασης του γονιδίου στις ομάδες που δέχτηκαν την επίδραση των βιοφαινολών TPF2 και OLEO ($p = 0,050$) (Εικόνα 4.16). Μεταξύ των ομάδων που μελετήθηκαν, η ομάδα των μακροφάγων που δέχτηκε τη συνδυαστική επίδραση OLEO και HePC παρουσιάζει την πιο υποσχόμενη ανοσορυθμιστική δράση προς την αυξημένη αντιπαρασιτική δράση των μακροφάγων και την περαιτέρω διαφοροποίηση της ανοσολογικής απόκρισης προς τον προστατευτικό Th1 ανοσοφαινότυπο, καθώς εκτός από τη σημαντική μείωση των αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών TGF-β και IL-10, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της σχετικής έκφρασης των γονιδίων IL-1β και TNF-α ($p = 0,025$ και $0,034$,

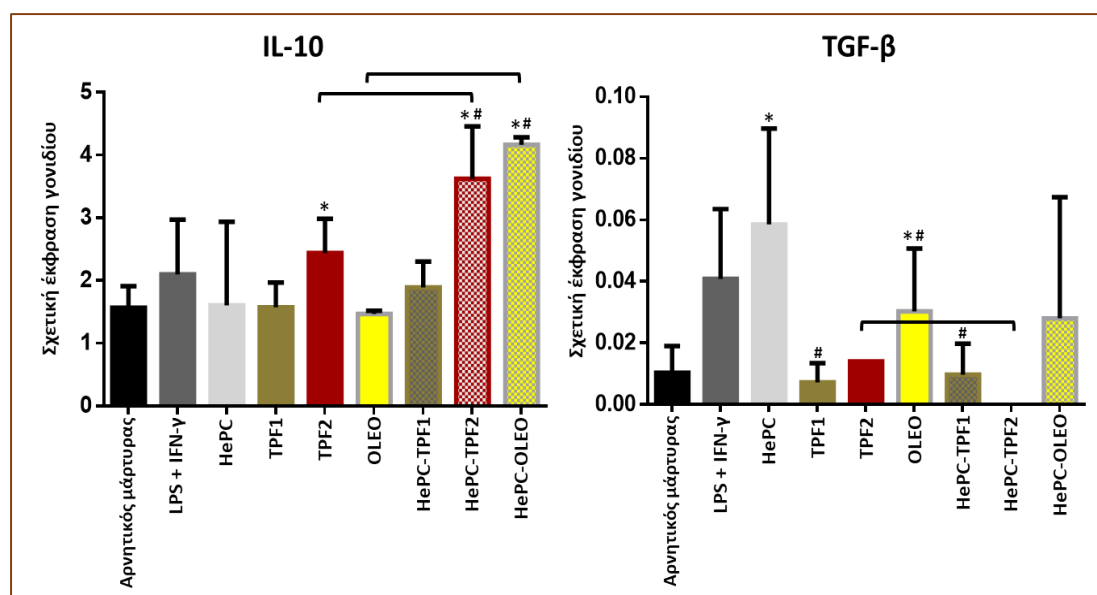
αντίστοιχα), σε σύγκριση με την αρνητική ομάδα ελέγχου (Εικόνα 4.16). Η IL-1 και ο TNF- α παράγονται από ενεργοποιημένα μακροφάγα, συνήθως μαζί, και δρουν αυτοκρινώς, παρακρινώς ή ενδοκρινώς προς την καταστολή της ανάπτυξης του παρασίτου (Dayakar et al. 2019).



Εικόνα 4.17. Σχετική έκφραση των mRNA Th1 κυτταροκινών (iNOS, IL-1 β και TNF- α), σε *L. major* - μολυσμένα μακροφάγα J774A.1 που δέχτηκαν τη μονήρη δράση των βιοφαινολικών ενώσεων TPF1, TPF2 και OLEO, καθώς και τη συνδυαστική αυτών με τη HePC. Τα σύμβολα (*) και (#) υποδεικνύουν στατιστικές σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα των ενεργοποιημένων μακροφάγων και της μονήρους δράσης της HePC, αντίστοιχα.

Η ανοσορυθμιστική ικανότητα των βιοφαινολών αναδείχθηκε και στο *in vitro* σύστημα των μολυσμένων μακροφάγων που προσομοιάζει την εκδήλωση της δερματικής μορφής της νόσου (μόλυνση μακροφάγων με προμαστιγώτες *L. major*), καθώς και οι τρεις βιοφαινολικές ενώσεις παρουσίασαν σημαντική αύξηση της σχετικής έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη της προστατευτικής Th1 ανοσοαπόκρισης. Αναλυτικότερα, η μονήρης επίδραση των βιοφαινολών επέφερε αύξηση της έκφρασης του γονιδίου IL-1 β , ενώ ως δραστικότερες αναδείχθηκαν οι συνδυαστικές επιδράσεις των TPF2 και OLEO με τη HePC, καθώς οδήγησαν σε στατιστικώς σημαντική αύξηση της έκφρασης συγκριτικά με τα

μολυσμένα μακροφάγα που δε δέχτηκαν την επίδραση κάποιου φαρμακευτικού παράγοντα ($p = 0,006$) (Εικόνα 4.17). Ειδικότερα, ο συνδυασμός HePC-TPF2 οδήγησε σε σημαντική αύξηση της έκφρασης συγκριτικά με την επαγόμενη αύξηση της μονήρους δράσης των επιμέρους ενώσεων HePC και TPF2 ($p = 0,009$ και $0,014$, αντίστοιχα). Ανάλογη ήταν και η επίδραση των συνδυαστικών επιδράσεων των βιοφαινολικών ενώσεων με τη HePC, στην έκφραση των γονιδίων iNOS και TNF- α . Αναλυτικότερα, ο συνδυασμός HePC-TPF1 αναδείχθηκε ως ο πιο υποσχόμενος καθώς οδήγησε σε σημαντική αύξηση της έκφρασης και των δύο προαναφερθέντων γονιδίων συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα ($p = 0,034$ και $0,050$, αντίστοιχα). Επιπλέον, η παρατηρούμενη αυξημένη γονιδιακή έκφραση ήταν ενισχυμένη συγκριτικά με τη μονήρη επίδραση των επιμέρους ενώσεων HePC και TPF1. Αντίστοιχα, η έκφραση της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή σε σχέση με την αρνητική ομάδα ελέγχου. Τέλος, η ομάδα των μακροφάγων που δέχτηκε την επίδραση του TPF2 παρουσίασε σημαντική αύξηση της σχετικής έκφρασης του γονιδίου IL-10, γεγονός που συνηγορεί με τη μη μεταβολή των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων iNOS, TNF- α και IL-1 β . Επίσης, η συνδυαστική επίδραση των TPF2 και OLEO με τη HePC οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου IL-10 σε σχέση με τα μολυσμένα μακροφάγα που δε δέχτηκαν την επίδραση κάποιου φαρμακευτικού παράγοντα ($p = 0,021$ και $0,034$, αντίστοιχα) (Εικόνα 4.18).

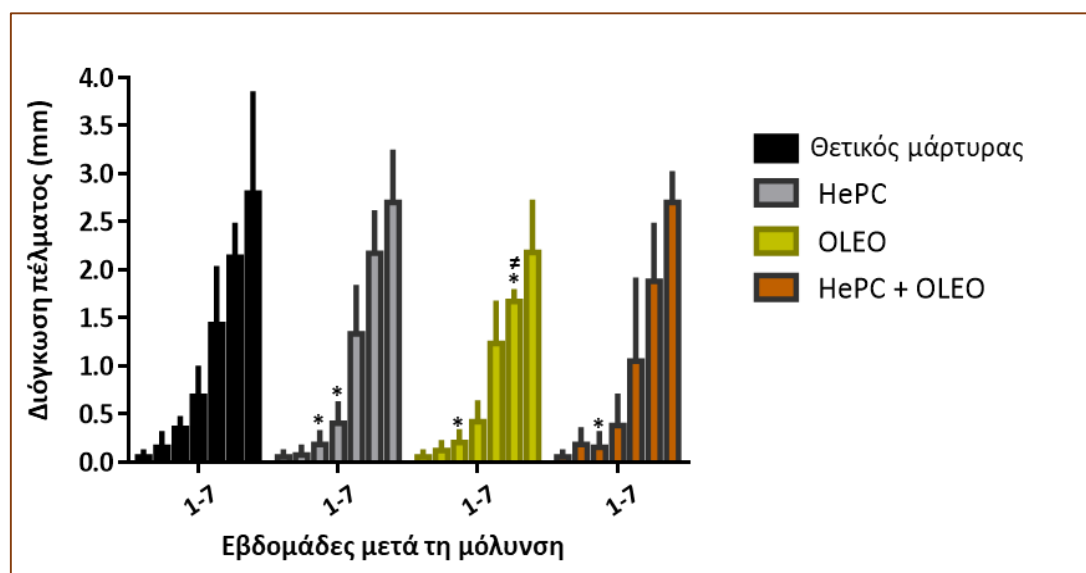


Εικόνα 4.18. Σχετική έκφραση των mRNA Th2 κυτταροκινών (IL-10 και TGF- β), σε *L. major* - μολυσμένα μακροφάγα J774A.1 που δέχτηκαν τη μονήρη δράση των βιοφαινολικών ενώσεων TPF1, TPF2 και OLEO, καθώς και τη συνδυαστική αυτών με τη HePC. Τα σύμβολα (*) και (#) υποδεικνύουν στατιστικές σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα των ενεργοποιημένων μακροφάγων και της μονήρους δράσης της HePC, αντίστοιχα.

4.7 Αξιολόγηση της μονήρους και συνδυαστικής θεραπευτικής δράσης της ολεοκανθάλης σε *in vivo* πειραματικό μοντέλο δερματικής λεισμανίασης

Το σύνολο των προαναφερθέντων ευρημάτων της παρούσας διατριβής, αναδεικνύει την OLEO ως ένα ισχυρό και πολλά υποσχόμενο εν δυνάμει αντιπαρασιτικό φάρμακο. Ειδικότερα, η ανάδειξη της συνεργιστικής αλληλεπίδρασής της με το τυπικό αντιλεισμανιακό φάρμακο, τη HePC, στο *in vitro* σύστημα των εξωκυττάρων προμαστιγωτών *Leishmania*, ανοίγει το δρόμο για τη πιθανή χρήση της σε πρωτόκολλο συνδυαστικής θεραπείας. Επιπλέον, πρόσφατη μελέτη αναδεικνύει τη μονήρη αποτελεσματικότητα της OLEO, τόσο σε *in vitro*, όσο και σε *in vivo* πειραματικά μοντέλα λεισμανίασης (Karampetsou et al. 2022). Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, στην παρούσα διατριβή αξιολογήθηκε για πρώτη φορά η συνδυαστική θεραπευτική δράση των OLEO και HePC σε *in vivo* πειραματικό μοντέλο δερματικής λεισμανίασης ποντικού.

Για τον σκοπό αυτό, 10^6 προμαστιγωτές μορφές *L. major* χορηγήθηκαν υποδόρια (s.c) στο πέλμα γενετικά ευαίσθητων BALB/c ποντικών και 14 ημέρες αργότερα, πραγματοποιήθηκε η έναρξη του θεραπευτικού σχήματος για κάθε πειραματική ομάδα, διάρκειας 5 ημερών, όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.13 της παρούσας διατριβής. Ελέγχθηκαν τρία θεραπευτικά σχήματα: η μονήρης χορήγηση OLEO, η μονήρης χορήγηση HePC και η συνδυαστική χορήγηση OLEO και HePC. Επιπλέον, *L. major* – μολυσμένα ποντίκια που δεν έλαβαν θεραπεία αποτέλεσαν τη θετική ομάδα ελέγχου. Ένα μήνα μετά τη λήξη της θεραπείας,



Εικόνα 4.19. Εξέλιξη της βλάβης του πέλματος κατά τη διάρκεια της *in vivo* θεραπείας. Ποντίκια BALB/c μολύνθηκαν με προμαστιγωτές *L. major* στο αριστερό οπίσθιο πέλμα. Η ομάδα που έλαβε HePC και η ομάδα που δεν έλαβε αγωγή αποτέλεσαν τον θετικό και αρνητικό μάρτυρα, αντίστοιχα. Το πάχος του ποδιού παρακολουθούνταν εβδομαδιαίως και τα δεδομένα παρουσιάζονται ως η μέση τιμή (\pm SD) του πάχους του πέλματος. Τα σύμβολα (#) και (*) υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με την ομάδα θετικού ελέγχου και την ομάδα που έλαβε HePC, αντίστοιχα.

αξιολογήθηκε το πιθανό θεραπευτικό αποτέλεσμα των χορηγούμενων σχημάτων με μέτρηση του πάχους του πέλματος και με προσδιορισμό του παρασιτικού φορτίου στους ιγνυακούς λεμφαδένες.

Η ανάπτυξη βλαβών στο πέλμα των ποντικών παρακολούθηθηκε σε εβδομαδιαία διαστήματα μέχρι το τέλος του πειραματισμού (7 εβδομάδες μετά τη μόλυνση). Το μέγεθος των βλαβών στα ποντίκια που έλαβαν θεραπεία, είτε ανεξάρτητα με HePC και OLEO, είτε συνδυαστικά, ήταν μειωμένο συγκριτικά με τα ποντίκια της θετικής ομάδας ελέγχου, ωστόσο οι διαφορές αυτές δεν ήταν στατιστικώς σημαντικές ($p > 0,050$) (Εικόνα 4.19).

Ο προσδιορισμός του παρασιτικού φορτίου στους σύστοιχους ιγνυακούς λεμφαδένες των πειραματόζων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Τα ποντίκια που έλαβαν θεραπεία με OLEO και τα αντίστοιχα ζώα εργαστηρίου που έλαβαν τη

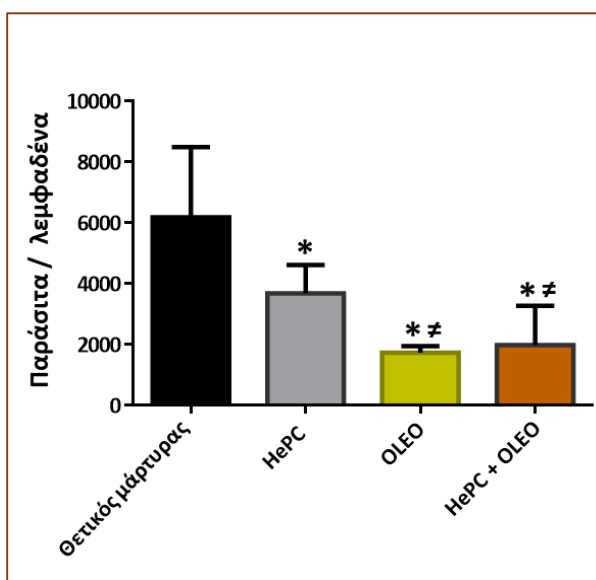
συνδυαστική θεραπεία HePC-OLEO, παρουσίασαν σημαντικά ελαττωμένο παρασιτικό φορτίο, σε σύγκριση με τη θετική ομάδα ελέγχου.

Αναλυτικότερα, στην πειραματική ομάδα που έλαβε OLEO σημειώθηκαν 1740,4 αμαστιγώτες / λεμφαδένα ($\pm 210,98$) και στην ομάδα που έλαβε HePC-OLEO σημειώθηκαν 1988,4 αμαστιγώτες / λεμφαδένα ($\pm 1290,33$).

Το αντίστοιχο φορτίο στην ομάδα θετικού ελέγχου ήταν 6191,4 αμαστιγώτες / λεμφαδένα ($\pm 2307,07$).

Η θεραπεία με HePC οδήγησε επίσης σε σημαντική μείωση του παρασιτικού φορτίου ($p = 0,045$) σε σύγκριση με τη

θετική ομάδα ελέγχου ($3685,8 \pm 935,42$ έναντι $6191,4 \pm 2307,07$ παράσιτα / λεμφαδένα, αντίστοιχα) (Εικόνα 4.20). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως το θεραπευτικό αποτέλεσμα της μονήρους και της συνδυαστικής δράσης της OLEO, στο παρασιτικό φορτίο των ιγνυακών λεμφαδένων ήταν σημαντικά ενισχυμένο συγκριτικά με το αντίστοιχο αποτέλεσμα της HePC ($p = 0,004$ και $p = 0,025$, αντίστοιχα).



Εικόνα 4.20. Προσδιορισμός παρασιτικού φορτίου μετά το πέρας της θεραπείας, σε ιγνυακούς λεμφαδένες, με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Ο προσδιορισμός έγινε 3 εβδομάδες μετά τη λήξη της θεραπείας. Κάθε ράβδος αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή (\pm SD) για κάθε πειραματική ομάδα ($n = 6$ / ομάδα). Τα σύμβολα (*) και (\neq) υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με την ομάδα θετικού ελέγχου και την ομάδα που έλαβε HePC, αντίστοιχα.

5. Συζήτηση

5.1 Προοπτικές εφαρμογής των βιοδραστικών συστατικών του ελαιόλαδου ως θεραπευτική προσέγγιση έναντι της λειψμανίας

Η λειψμανία εξακολουθεί να αποτελεί μία σοβαρή πολυσυστηματική παρασιτική ζωοανθρωπονόσο, χωρίς διαθέσιμο εμβόλιο και με περιορισμένες θεραπευτικές επιλογές (Croft and Olliaro 2011; Malvoliti et al. 2021). Μεταξύ αυτών, η μιλτεφοσίνη (HePC) αποτελεί το πρώτο αποτελεσματικό φάρμακο έναντι της νόσου που χορηγείται διά στόματος και χρησιμοποιείται ευρέως από το 2002 (Alvar, Croft, and Olliaro 2006; Karampetsou et al. 2021; Kyriazis et al. 2013; Tiwari et al. 2018). Παρόλα αυτά, όλα τα εμπορικά διαθέσιμα φάρμακα εμφανίζουν σημαντικά μειονεκτήματα, όπως η ανάγκη χορήγησής τους μέσω της παρεντερικής οδού (με εξαίρεση τη μιλτεφοσίνη), η τοξικότητα, τα μακρά θεραπευτικά σχήματα που οδηγούν σε μικρή συμμόρφωση και το υψηλό κόστος (Brindha et al. 2021; Juliana Quero Reimão 2011; Tiwari et al. 2018; Uliana et al. 2017). Λαμβάνοντας υπόψη ότι η συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών και των ανθρώπων που βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο νόσησης, κατοικούν σε υποανάπτυκτες ή αναπτυσσόμενες χώρες, το υψηλό κόστος των θεραπευτικών προσεγγίσεων αποτελεί σημαντικότατο μειονέκτημα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η λιποσωμιακή αμφοτερικίνη Β (L-AmB), η οποία αν και αποτελεί ένα ανεκτό και αποτελεσματικό φάρμακο για την απειλητική για τη ζωή του ανθρώπου σπλαγχνική λειψμανία, το υψηλό της κόστος την καθιστά μη ενδεδειγμένη για τις προαναφερθείσες περιοχές. Επιπλέον, παρότι ο επιπολασμός της λειψμανίας του ανθρώπου στις αναπτυσσόμενες χώρες του Δυτικού Κόσμου, συμπεριλαμβανομένης της Νότιας Ευρώπης όπου ανήκει η Ελλάδα, είναι χαμηλός, ο αντίστοιχος επιπολασμός στον οικόσμο και στον μη δεσποζόμενο σκύλο είναι υψηλός. Συνεπώς, αποτελεί παγκόσμια επιτακτική ανάγκη, η ανακάλυψη νέων, αποτελεσματικών, φθηνών και ασφαλών φαρμακευτικών παραγόντων, τόσο για τον άνθρωπο όσο και για κτηνιατρική χρήση.

Προς αυτή την κατεύθυνση, τα τελευταία χρόνια το επιστημονικό ενδιαφέρον έχει προσανατολιστεί στη μελέτη βιοδραστικών ενώσεων φυσικής προέλευσης, οι οποίες μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη νέων αποτελεσματικών φαρμάκων έναντι διαφόρων νοσημάτων. Η τεχνολογική ανάπτυξη και η συγκέντρωση γνώσης από πληθώρα ερευνητικών εργαστηρίων, οδήγησαν στην ταυτοποίηση εκχυλισμάτων και απομονωμένων ενώσεων από φύλλα, σπόρους και άλλα μέρη διαφόρων φυτών, τα οποία εμφανίζουν ποικίλες θεραπευτικές ιδιότητες. Μεταξύ αυτών των φυσικών προϊόντων έχουν ταυτοποιηθεί πληθώρα βιοδραστικών παραγόντων με αντιφλεγμονώδεις και αντιπρωτοζωικές ιδιότητες (Gervazoni et al. 2020; Ghodsian et al. 2020; Rodrigues et al. 2015). Επιστημονικές μελέτες αναφέρουν το ελαιόδεντρο (*Olea europaea* L., της οικογένειας

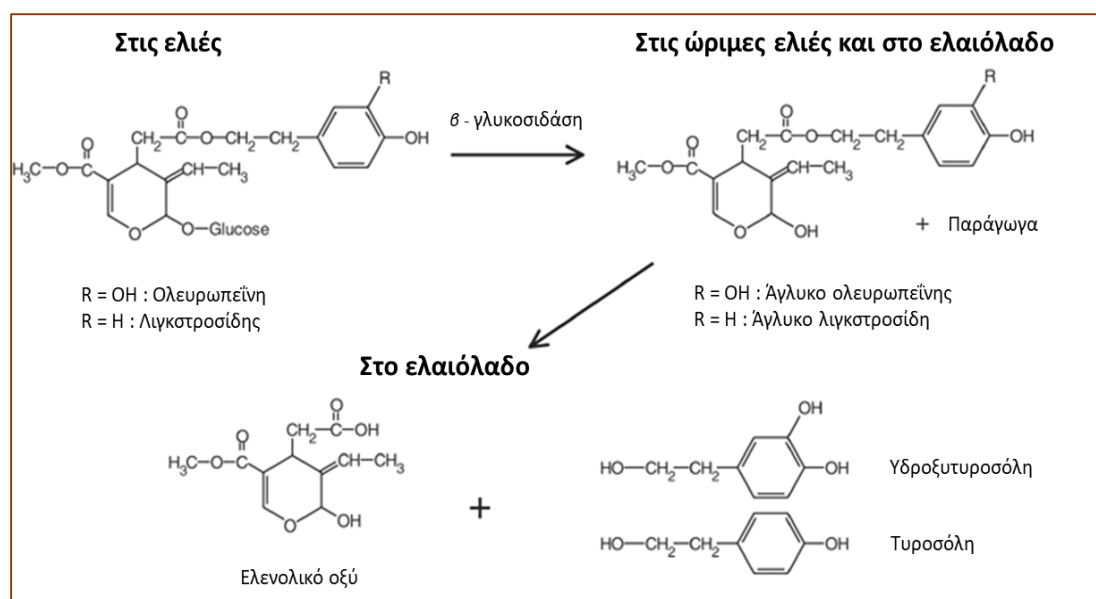
Oleaceae), τα σπαράγγια (*Asparagus gracilis*, της οικογένειας Asparagaceae), τα γαρύφαλλα (*Stellaria media*, της οικογένειας Caryophyllaceae), τα φυτά της οικογένειας Piperaceae, το τζίντζερ (*Zingiber officinale* της οικογένειας Zingiberaceae), το φυτό *Aloe Vera* της οικογένειας Liliaceae και το πράσινο τοάι (*Camellia sinensis* της οικογένειας Theaceae) για την υποσχόμενη αντιλεϊσμμανιακή τους δράση (Chouhan et al. 2015; Dutta et al. 2008; Keyhani et al. 2021; Khademvatan et al. 2019; Koko et al. 2022; Polini et al. 2018; Dos Reis et al. 2013; Ullah et al. 2016).

Το ελαιόλαδο (olive oil, OO) βρίσκεται στην κορυφή της Μεσογειακής Διατροφής, η οποία έχει χαρακτηριστεί ως ένα «υγιεινό διατροφικό πρότυπο» που συνδέεται με την μακροζωία και την ευεξία (Casas et al. 2017). Αποτελεί την κύρια πηγή λίπους στη Μεσογειακή διατροφή και βρίσκεται στο μικροσκόπιο της διεθνούς επιστημονικής κοινότητας. Η κατανάλωση ελαιολάδου έχει συσχετιστεί με προστατευτικές επιδράσεις έναντι χρόνιων παθήσεων, όπως καρδιαγγειακά νοσήματα, παχυσαρκία και καρκίνο (Castro-Barquero et al. 2018; Parkinson and Ciceralo 2016). Η Ελλάδα συγκαταλέγεται στις κορυφαίες ελαιοπαραγωγικές χώρες παγκοσμίως και κατατάσσεται στην τρίτη θέση, μετά την Ισπανία και την Ιταλία (Kalogeropoulos and Tsimidou 2014; Romani et al. 2019). Τα τελευταία χρόνια, το επιστημονικό ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί στη διερεύνηση των ευεργετικών δράσεων του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου (extra virgin olive oil, EVOO), ενός δηλαδή ανώτερης ποιότητας ελαιολάδου, που χαρακτηρίζεται για τον πλούτο του σε βιοενεργά μόρια (De Santis et al. 2019; Yubero-Serrano et al. 2019). Σήμερα, η κατανάλωση EVOO δεν περιορίζεται μόνο στην Ευρώπη ή τις μεσογειακές χώρες, αλλά αποτελεί ένα προϊόν υψηλής ζήτησης σε όλο τον κόσμο (Navajas-Porras et al. 2020).

Το ελαιόλαδο αποτελεί ένα εξαιρετικά πολύπλοκο μείγμα συστατικών. Στο EVOO εντοπίζονται υψηλά επίπεδα λιπαρών οξέων (98 - 99% του συνολικού του βάρους), κυρίως μονοακόρεστων (monounsaturated fatty acids, MUFAs) όπως το ελαϊκό οξύ (54 - 84% του συνόλου των λιπαρών οξέων) (Romani et al. 2019). Επιπλέον, εντοπίζονται και άλλα πολυάριθμα πολύτιμα συστατικά, τα οποία αν και υπάρχουν σε πολύ μικρότερες ποσότητες (περίπου 1 - 2%), περιλαμβάνουν περισσότερες από 230 χημικές ενώσεις (Casas et al. 2017; Jiménez-Sánchez et al. 2022; Nikou et al. 2019; Romani et al. 2019). Μεταξύ αυτών οι πολυφαινόλες του EVOO αποτελούν μόρια που σχετίζονται ισχυρά με την ανθρώπινη υγεία, καθώς εμφανίζουν υψηλή αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική και αντιμικροβιακή δράση (Ghanbari et al. 2012; Mehmood et al. 2020; Santangelo et al. 2017). Η πολύπλοκη φύση των βιοφαινολών του ελαιολάδου, έχει οδηγήσει σε έναν αυξανόμενο αριθμό μελετών, οι οποίες διερευνούν τις φαρμακολογικές ιδιότητες αυτών των ουσιών είτε ως απομονωμένες ουσίες,

είτε ως μείγματα. Το ολικό φαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου (total phenolic fraction, TPF), αποτελεί ένα σύνθετο μείγμα φαινολικών ενώσεων, με πιο χαρακτηριστικές τις απλές φαινόλες, τα φλαβονοειδή, τα σεκοϊριδοειδή, τα φαινολικά οξέα και τις λιγνάνες (Angelis et al. 2017; Pedan et al. 2019; Romani et al. 2019). Μεταξύ των χαρακτηριστικότερων βιοφαινολικών ενώσεων που εντοπίζονται σε αυτά τα κλάσματα είναι οι ακόλουθες: η ολευρωπεΐνη (OLE), το άγλυκο του λιγκτροσίδη (LA), η υδροξυτυροσόλη (HT), η τυροσόλη (T), η ολεασεΐνη (OLEA) και η ολεοκανθάλη (OLEO) (Εικόνα 5.1) (Romani et al. 2019).

Λαμβάνοντας υπόψη ότι το ελαιόλαδο αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο της Μεσογειακής διατροφής και ότι η Ελλάδα εμφανίζεται, με βάση τα στοιχεία του Διεθνούς Συμβουλίου Ελαιολάδου (IOC), κατά την περίοδο 2019 - 2020, να κατέχει την 2η θέση στην κατά κεφαλήν κατανάλωση ελαιολάδου στην Ευρωπαϊκή Ένωση, με ελάχιστη απόσταση από την Ισπανία (11 kg / κάτοικο Ελλάδος έναντι 11,2 kg / κάτοικο Ισπανίας) (OliveNews.gr 2022), η παρούσα διδακτορική διατριβή εστίασε στη διερεύνηση της πιθανής αντιπαρασιτικής δράσης των συστατικών του, σε *in vitro* και *in vivo* συστήματα.



Εικόνα 5.1. Χημικές δομές των φαινολών που υπάρχουν στις ελιές και στο ελαιόλαδο, αναπαράσταση της μετατροπής τους στις άγλυκες μορφές και η υδρόλυση σε τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη (τροποποίηση από Vissers et. al. 2004).

5.2 Παράγοντες βιολογικής αξίας ελαιολάδου

Παρά τον ικανοποιητικό αριθμό μελετών στο ελαιόλαδο, παραμένει δύσκολη η εξαγωγή σαφών και ασφαλών συμπερασμάτων λόγω της υψηλής μεταβλητότητας της φαινολικής σύστασης μεταξύ των ελαιολάδων (Agiomyrgianaki et al. 2012; Ghanbari et al. 2012; Nikou et al. 2020). Οι καθοριστικοί παράγοντες της σύστασης του ελαιολάδου διακρίνονται στους ενδογενείς, όπως ενζυμικές δραστηριότητες, και στους εξωγενείς όπως η γεωγραφική

προέλευση, η ποικιλία της ελιάς, ο βαθμός ωρίμανσης του καρπού, η περίοδος συγκομιδής, η διαδικασία παραγωγής, οι καιρικές συνθήκες και οι συνθήκες φύλαξης (Castillo-Luna et al. 2021; Cicerale et al. 2009; Criado-Navarro, López-Bascón, and Priego-Carote 2020; Hachicha Hbaieb et al. 2016; Markhali 2021). Στο εργαστήριο του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, της Φαρμακευτικής Σχολής του ΕΚΠΑ, αναλύεται η φαινολική σύσταση δειγμάτων EVOO από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας. Πρόσφατη μελέτη ανέδειξε την αντιλεϊσμμανιακή δράση ενός TPF που εκχυλίστηκε από δείγμα EVOO προερχόμενου από την περιοχή Ζαρός της Κρήτης. Η ανάλυση του φαινολικού περιεχομένου του συγκεκριμένου TPF ανέδειξε την ύπαρξη HT, T, OLEA και OLEO στα 30, 22, 110 και 70 mg/g εκχυλίσματος, αντίστοιχα (Koutsoni et al. 2018). Τα προαναφερθέντα ερευνητικά αποτελέσματα, ενέπνευσαν τον σχεδιασμό πειραματικών πρωτοκόλλων για την αξιολόγηση της αντιλεϊσμμανιακής δράσης δύο διαφορετικών κλασμάτων προερχόμενων από EVOO διαφορετικής φαινολικής σύστασης, ως προς τις δύο κύριες χημικές κατηγορίες που απαντώνται στα ελληνικά ελαιόλαδα, δηλαδή τις φαινολικές αλκοόλες HT και T, και τα σεκοϊριδοειδή OLEA και OLEO. Η παρουσία OLEA και OLEO σε ένα φαινολικό κλάσμα, υποδηλώνει πιθανή περαιτέρω απελευθέρωση HT και T σε ένα βιολογικό σύστημα κατά τη μεταβολική δραστηριότητα, καθώς οι OLEA και OLEO αποτελούν εστεροποιημένες πρόδρομες ενώσεις των HT και T, αντίστοιχα (Lozano-Castellón et al. 2020; Vissers, Zock, and Katan 2004). Έτσι, κατά την περίοδο συγκομιδής 2020-2021, επιλέχθηκαν δύο χαρακτηριστικά EVOOs, το EVOO-1 και το EVOO-2, βάση χρωματογραφημάτων HPLC-DAD, τα οποία προέρχονταν από την ποικιλία Κορωνέικη, από δύο διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας (Πελοπόννησος – Αρκαδία και Κρήτη – Ηράκλειο, αντίστοιχα). Από αυτά τα δείγματα, με τη διαδικασία της εκχύλισης, προέκυψαν αντίστοιχα τα κλάσματα TPF1 και TPF2, των οποίων η ποσοτική ανάλυση αποκάλυψε ότι το TPF1 περιείχε HT και T στα 7 και 42 mg/g εκχυλίσματος, αντίστοιχα, ενώ το TPF2 ήταν πλουσιότερο σε πολυφαινολικές ενώσεις, καθώς περιείχε HT και T στα ίδια επίπεδα περίπου με το TPF1 (5 και 12 mg/g εκχυλίσματος, αντίστοιχα) και επιπλέον τα σεκοϊριδοειδή OLEA και OLEO στα 144 και 301 mg/g εκχυλίσματος, αντίστοιχα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη των κλασμάτων αυτών σε *in vitro* συστήματα παρασίτων του γένους *Leishmania*.

5.3 *In vitro* αντιπολλαπλασιαστική, αντιλεϊσμανιακή και κυτταροτοξική δράση των βιοφαινολικών συστατικών του ελαιολάδου

Στην παρούσα διατριβή αξιολογήθηκε η αντιλεϊσμανιακή δράση δύο ολικών φαινολικών κλασμάτων διαφορετικής σύστασης, των TPF1 και TPF2, και τεσσάρων απομονωμένων βιοφαινολών, της OLE, HT, OLEA και OLEO. Η αξιολόγηση της αντιλεϊσμανιακής δράσης όλων των υπό μελέτη φυσικών προϊόντων πραγματοποιήθηκε αρχικά στο σύστημα των προμαστιγωτών μορφών δύο στελεχών *Leishmania*, των *L. infantum* και *L. major*, που αποτελούν αιτιολογικούς παράγοντες για τις κύριες κλινικές μορφές της νόσου, τη σπλαγχνική και τη δερματική λεισμανίαση, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, εξετάστηκε η παρασιτοκτόνος δράση τους έναντι της ενδοκυττάριας αμαστιγωτής μορφής και των δύο ειδών του παρασίτου, δεδομένου ότι η μορφή αυτή επιβιώνει και πολλαπλασιάζεται ενδοκυτταρικά εντός των μακροφάγων του τελικού ξενιστή.

Τα αποτελέσματα της μελέτης ανέδειξαν τα ολικά φαινολικά κλάσματα ως ικανά να αναστείλουν αποτελεσματικά τη βιωσιμότητα των προμαστιγωτών μορφών και των δύο ειδών του παρασίτου. Ωστόσο, το TPF2 εμφάνισε ισχυρότερες αντιλεϊσμανιακές ιδιότητες σε σύγκριση με το TPF1, καθώς οι μέσες ανασταλτικές συγκεντρώσεις IC_{50} έναντι των προμαστιγωτών *L. infantum* και *L. major* ήταν μειωμένες κατά 3,7 και 3,9 φορές, αντίστοιχα. Επίσης, συγκρίνοντας την αποτελεσματικότητά τους έναντι των διαφορετικών στελεχών του παρασίτου *Leishmania*, αξίζει να σημειωθεί πως η δράση των φαινολικών κλασμάτων TPF1 και TPF2, ήταν ισχυρότερη έναντι των προμαστιγωτών *L. major*, σε σύγκριση με το *L. infantum*, όπως προκύπτει από τις μειωμένες κατά 1,3 φορές τιμές IC_{50} . Ομοίως, και οι ενδοκυττάριας αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου, παρουσίασαν μεγαλύτερη ευαισθησία στο TPF2. Ειδικότερα, για το TPF2 προσδιορίστηκαν μέσες ανασταλτικές συγκεντρώσεις IC_{50} έναντι των *L. infantum* και *L. major*, κατά 2 φορές χαμηλότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές του TPF1. Επιπλέον, όμοια με το σύστημα των εξωκυττάριας προμαστιγωτών, η αντιλεϊσμανιακή δράση και των δύο πολυφαινολικών κλασμάτων ήταν ισχυρότερη έναντι του στελέχους *L. major*, συγκριτικά με το *L. infantum*, καθώς προσδιορίστηκαν μειωμένες τιμές IC_{50} κατά 1,5 φορά.

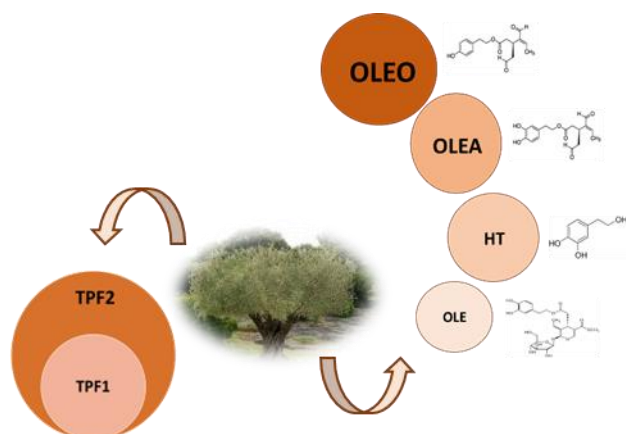
Κατά την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών παραγόντων, ο τοξικολογικός έλεγχος είναι απαραίτητος τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* συστήματα. Ως εκ τούτου, στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, πραγματοποιήθηκε *in vitro* έλεγχος της κυτταροτοξικότητας των πολυφαινολικών κλασμάτων TPF1 και TPF2 σε μακροφάγα της κυτταρικής σειράς J774A.1. Η επιλογή των μακροφάγων για τον κυτταροτοξικό έλεγχο βασίστηκε στο γεγονός ότι αποτελούν τον κύριο κυτταρικό ξενιστή του παρασίτου. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική

τοξικότητα για κανένα από τα δύο κλάσματα, ενώ αντιθέτως, εμφάνισαν εκλεκτική δράση έναντι των ενδοκυττάρων αμαστιγωτών μορφών και των δύο στελεχών *Leishmania*, όπως αυτό καταδεικνύεται από τους αντίστοιχους δείκτες SI που προσδιορίστηκαν μεγαλύτεροι της μονάδας. Επιπλέον, οι δείκτες SI ανέδειξαν το κλάσμα TPF2 ως εκλεκτότερο έναντι και των δύο στελεχών *Leishmania*, συγκριτικά με το TPF1.

Συμπερασματικά, από τη συγκριτική αξιολόγηση της δράσης των δύο πολυφαινολικών κλασμάτων διαφορετικής φαινολικής σύστασης στα *in vitro* συστήματα μεταβολικής δραστηριότητας των εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων παρασίτων *Leishmania*, προέκυψε ότι το κλάσμα TPF2 που είχε την υψηλότερη φαινολική περιεκτικότητα σε OLEA και OLEO, παρουσίασε ισχυρότερη αντιλεϊσμανιακή δράση. Επιπρόσθετα, οι υποσχόμενες αντιλεϊσμανιακές ιδιότητες των πολυφαινολικών κλασμάτων TPF1 και TPF2, επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω με μελέτη της κινητικής ανάπτυξης των προμαστιγωτών *Leishmania*, μετά την έκθεσή τους σε αυτά τα φυσικά προϊόντα. Οι αντίστοιχες καμπύλες ανάπτυξης των προμαστιγωτών *L. infantum* και *L. major* ανέδειξαν την ισχυρή αντιπολλαπλασιαστική ικανότητα και των δύο κλασμάτων. Ανάλογη μελέτη, εφαρμόζει την κινητική ανάπτυξης για την *in vitro* αξιολόγηση της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης της αλλοπουρινόλης, ενός ανάλογου πουρίνης που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της λείσμανιάσης του σκύλου (Kamau, Nunez, and Grimm 2001). Ομοίως, οι φαινολικές ενώσεις, απιγενίνη και ροσμαρινικό οξύ ανέστειλαν τον πολλαπλασιασμό των *L. donovani* προμαστιγωτών (Antwi et al. 2019).

Επιπρόσθετα, σε απομονωμένες φαινολικές ενώσεις, που αποτελούν δευτερογενείς φυτικούς μεταβολίτες που λαμβάνονται με τη διατροφή, έχει αναγνωριστεί η ανασταλτική τους δράση έναντι των παρασίτων *Leishmania* (Antwi et al. 2019; Tasmemir et al. 2006). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν το ροσμαρινικό οξύ και η απιγενίνη, ενώσεις με ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι και των δύο αναπτυξιακών μορφών του παρασίτου *L. donovani*. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες που έχουν επικεντρωθεί στη μελέτη του ελαιολάδου, έχουν φανερώσει τις αντιλεϊσμανιακές ιδιότητες των απομονωμένων κυρίαρχων φαινολικών ενώσεών του. Χαρακτηριστικές είναι η OLE, η T, η HT και η OLEO (Belmonte-Reche et al. 2016; Elamin and Al-Maliki 2014; Karampetsou et al. 2022; Kyriazis et al. 2013, 2017). Στην παρούσα μελέτη, έχοντας αρχικά αξιολογήσει την αποτελεσματικότητα των δύο πολυφαινολικών κλασμάτων TPF1 και TPF2, τέθηκε ως επόμενος στόχος η αξιολόγηση της αντιλεϊσμανιακής δράσης τεσσάρων απομονωμένων φαινολικών ενώσεων: α) της OLE, ενός σεκοϊριδοειδούς που εντοπίζεται κυρίως στα φύλλα της ελιάς και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις στο ελαιόλαδο, β) της HT που αποτελεί την καλύτερα μελετημένη μέχρι σήμερα φαινολική αλκοόλη του ελαιολάδου, και γ) των σεκοϊριδοειδών OLEA και OLEO,

δύο χημικά συγγενικών μορίων που αποτελούν συζευγμένες πρόδρομες ενώσεις των HT και T, αντίστοιχα. Παρότι, όπως προαναφέρθηκε, υπάρχουν αναφορές για την αντιλεϊσμμανιακή τους δράση έναντι ορισμένων στελεχών του παρασίτου *Leishmania*, στην παρούσα μελέτη, αξιολογήθηκαν περαιτέρω σε άλλα στελέχη του παρασίτου *Leishmania* ή σε παράσιτα διαφορετικής αναπτυξιακής φάσης. Τα αποτελέσματα της μελέτης ανέδειξαν και τις τέσσερις ουσίες ως ικανές να προκαλέσουν αναστολή της βιωσιμότητας των προμαστιγωτών μορφών *L. infantum* και *L. major*. Ωστόσο, η OLE και η OLEO εμφάνισαν ισχυρότερες



Εικόνα 5.2. Σχηματική αναπαράσταση του δυναμικού της λεϊσμμανιοκτόνου δράσης των ολικών φαινολικών κλασμάτων και των απομονωμένων βιοφαινολικών ενώσεων.

αντιπρομαστιγωτικές ιδιότητες έναντι και των δύο στελεχών, όπως αποδεικνύεται από τις μικρότερες τιμές των μέσων ανασταλτικών συγκεντρώσεων IC_{50} . Επίσης, συγκρίνοντας την αποτελεσματικότητα των απομονωμένων ενώσεων έναντι των δύο διαφορετικών στελεχών του παρασίτου *Leishmania*, αξίζει να σημειωθεί πως η δράση και των

τεσσάρων ενώσεων ήταν ισχυρότερη έναντι του στελέχους *L. infantum*, συγκριτικά με το *L. major*, καθώς προσδιορίστηκαν μειωμένες τιμές IC_{50} κατά 1,5 έως 2 φορές. Αντίστοιχα, στο *in vitro* σύστημα των ενδοκυττάρων αμαστιγωτών, παρότι και οι τέσσερις παρουσίασαν αντιαμαστιγωτική δράση, οι απομονωμένες OLEA και OLEO παρουσιάστηκαν ως ισχυρότερες. Επιπλέον, μεταξύ των τεσσάρων ενώσεων, η OLEA αναδείχθηκε ως το πιο εκλεκτικό δραστικό φυσικό προϊόν με δείκτες εκλεκτικότητας ίσους με 4,3 για το *L. infantum* και 11 για το *L. major*, γεγονός που την αναδεικνύει ως ένα πολλά υποσχόμενο φαρμακευτικό προϊόν. Ακολούθησε η OLEO η οποία εμφάνισε δείκτες εκλεκτικότητας 1,7 για το στέλεχος *L. major* και 1,2 για το *L. infantum*. Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ξανά πως η εκλεκτική OLEO παρουσίασε επίσης χαμηλές τιμές IC_{50} και για τις δύο αναπτυξιακές μορφές και των δύο στελεχών *Leishmania*. Για τα υπόλοιπα φυσικά προϊόντα, OLE και HT, προσδιορίστηκε δείκτης εκλεκτικότητας κοντά στη μονάδα.

5.4 *In vitro* επαγωγή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου σε προμαστιγώτες *Leishmania* spp.

Τα ενδοκυττάρια παράσιτα εξασφαλίζουν την εγκατάσταση της λοίμωξης και της μετάδοσής τους, αποφεύγοντας τον υπερ-παρασιτισμό που θα οδηγούσε στο θάνατο τόσο του ξενιστή, όσο και του ίδιου του παρασίτου (Lüder et al. 2010). Ο ενδοκυττάριος πληθυσμός των παρασίτων μπορεί να ρυθμιστεί από παράγοντες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και το είδος του κυτταρικού θανάτου που λαμβάνει χώρα κατά τη χορήγηση θεραπευτικών ουσιών. Συνεπώς, η μελέτη του είδους του κυτταρικού θανάτου που επάγεται από τα νέα υποψήφια αντιλεϊσμανιακά φάρμακα είναι εξέχουσας σημασίας. Επιπλέον, το είδος του κυτταρικού θανάτου των παρασίτων, και εν προκειμένω ο αποπτωτικός θάνατος των πρωτόζωων του γένους *Leishmania*, έχει ιδιαίτερη σημασία για την επιτυχή μόλυνση ρυθμίζοντας ταυτόχρονα και την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή (Basmaciyan, Azas, and Casanova 2018; Basmaciyan and Casanova 2019).

Όπως προαναφέρθηκε, οι δευτερογενείς μεταβολίτες της ελιάς OLE, HT και OLEO, έχουν δείξει ισχυρή αντιλεϊσμανιακή δράση σε *in vitro* ή/και σε *in vivo* συστήματα και έχει αναφερθεί ότι οι λεϊσμανιοκτόνες δραστηριότητές τους οφείλονται σε αποπτωτικές διεργασίες (Elamin and Al-Maliki 2014; Kyriazis et al. 2017). Συνεπώς, τα δύο ολικά φαινορικά κλάσματα TPF1 και TPF2, διερευνήθηκαν συγκριτικά προς αυτή την κατεύθυνση. Αρχικά, για τον προσδιορισμό του εμπλεκόμενου μηχανισμού κυτταρικού θανάτου, αξιολογήθηκαν μορφολογικές αλλοιώσεις, όπως αλλαγές στο σχήμα και το μέγεθος των προμαστιγωτών μορφών των παρασίτων *Leishmania*, μετά από 72 ώρες επίδρασης με τα TPF1 και TPF2. Οι προμαστιγώτες που δε δέχτηκαν την επίδραση κάποιας ουσίας, εμφάνισαν το χαρακτηριστικό επίμηκες ατρακτοειδές σχήμα, ενώ τα παράσιτα που επωάστηκαν με τα TPF1 και TPF2, παρουσίασαν χαρακτηριστικές μορφολογικές μεταβολές που σχετίζονται με την απόπτωση, όπως στρογγυλοποίηση και συρρίκνωση του σώματός τους (στρογγυλά ή ωοειδή παράσιτα), και μείωση του μήκους τους. Οι παρατηρούμενες μορφολογικές αλλαγές ήταν ανάλογες με αντίστοιχες αλλοιώσεις που προκλήθηκαν σε προμαστιγώτες *L. donovani* μετά από έκθεσή τους στη ρακεμοσίδη A, μια φυσική στεροειδή σαπωνίνη, και στη HePC, η οποία στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως το φάρμακο αναφοράς (Dutta, Ghoshal, et al. 2007; Paris et al. 2004). Επιπρόσθετα, η λιγνάνη *yangambin*, που λαμβάνεται από το φυτό *Ocotea duckei*, επιφέρει παρόμοιες μορφολογικές αλλοιώσεις σε προμαστιγώτες *L. chagasi* και *L. amazonensis*, ενώ υπάρχουν και αναφορές για αντίστοιχες μορφολογικές αλλαγές σε

προμαστιγώτες *L. infantum* προκαλούμενες από αιθέρια έλαια φυτών του γένους *Artemisia* (Islamuddin, Chouhan, et al. 2014; Neto et al. 2011).

Οι προαναφερθείσες μορφολογικές αλλαγές αποτέλεσαν μια πρώτη ένδειξη για το είδος του επαγόμενου κυτταρικού θανάτου, ενώ ακολούθησε η περαιτέρω μελέτη βιοχημικών χαρακτηριστικών (Galluzzi et al. 2012). Έτσι, αρχικά αξιολογήθηκε η βασική αλλοίωση που έχει περιγραφεί ότι υφίσταται η πλασματική κυτταρική μεμβράνη κατά τη διάρκεια διεργασιών αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου. Αναλυτικότερα, κατά την απόπτωση παρατηρείται εξωτερίκευση του φωσφολιπιδίου της φωσφατιδυλοσερίνης (PS) (Lüder et al. 2010), καθώς διαταράσσεται η συμμετρία της πλασματικής μεμβράνης και η PS μετατοπίζεται στο εξωτερικό πέταλό της (Chen et al. 2008). Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, προμαστιγώτες *L. infantum* και *L. major* εκθετικής φάσης ανάπτυξης, επώαστηκαν με τα TPF1 και TPF2 για 72 ώρες και ακολούθως χρωματίστηκαν διπλά με ανεξίνη V-FITC και PI. Η ανεξίνη V αποτελεί μια κυτταρική πρωτεΐνη που συνδέεται με φωσφολιπίδια, επιδεικνύοντας μεγαλύτερη χημική συγγένεια για την PS, ενώ το PI αποτελεί μια μη διαπερατή χρωστική για την άθικτη πλασματική μεμβράνη που συνδέεται με το DNA (Chen et al. 2008). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής (Darzynkiewicz and Bedner 2000; Pietkiewicz, Schmidt, and Lavrik 2015), προκειμένου να ποσοτικοποιηθεί το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων. Η επίδραση των TPF1 και TPF2 οδήγησε σε σημαντική αύξηση του ποσοστού των σημασμένων με ανεξίνη V παρασίτων, ενώ το TPF2 αναδείχθηκε ως ισχυρότερος αντιλεϊσμνιακός παράγοντας καθώς επέφερε μέχρι και 66% μεγαλύτερη αύξηση στο ποσοστό των σημασμένων παρασίτων, συγκριτικά με το TPF1. Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με ανάλογες προγενέστερες μελέτες οι οποίες αναφέρουν την έκθεση της PS μετά από διάφορες φαρμακευτικές επιδράσεις σε προμαστιγώτες *Leishmania*. Πρόσφατα, η μελέτη της *in vitro* επίδρασης ενός ακατέργαστου πολυφαινολικού κλάσματος (TPF) εμπλουτισμένου με OLEO, σε προμαστιγώτες *L. infantum* και *L. major* σε τρία χρονικά σημεία, προσδιόρισε σημαντική αύξηση των ποσοστών των σημασμένων με ανεξίνη V παρασίτων (Karampetsou et al. 2021). Ομοίως, αιθέριο έλαιο προερχόμενο από το φυτό *Artemisia annua* ενισχύει τη δέσμευση της ανεξίνης V σε προμαστιγώτες *L. donovani*, μετά από 72 ώρες επώασης (Islamuddin, Chouhan, et al. 2014). Επίσης, η επίδραση του αιθέριου ελαίου EROSA, πλούσιου σε ευγενόλη, που προέρχεται από το δέντρο *Syzygium aromaticum*, σε προμαστιγώτες *L. donovani*, προκαλεί τη δέσμευση τόσο της ανεξίνης V όσο και του PI, υποδεικνύοντας την επαγωγή όψιμης αποπτωτικής φάσης (Islamuddin, Sahal, and Afrin 2014). Αντίστοιχα, επώαση παρασίτων *L. donovani* με εκχύλισμα φύλλων του φυτού *Aloe vera* προκαλεί μέγιστη έκθεση της PS στις 24 ώρες επίδρασης (Dutta,

Bandyopadhyay, et al. 2007), ενώ φυτικό εκχύλισμα από το φυτό *Cassia Fistula* προκαλεί δοσοεξαρτώμενη μετατόπιση από την πρώιμη στην όψιμη αποπτωτική φάση σε προμαστιγώτες *L. donovani*, μετά από 48 ώρες επώασης (Tabrez et al. 2021).

Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα σχετικά με την εξωτερίκευση της PS αποτελούν μεμονωμένη βιοχημική ένδειξη του επαγόμενου κυτταρικού θανάτου και απαιτείται η συνεκτίμησή τους με επιπλέον βιοχημικούς δείκτες (Galluzzi et al. 2012). Η επιλογή του ελέγχου της εξωτερίκευσης της PS ως κριτήριο αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου σε προμαστιγώτες του γένους *Leishmania* αποτελεί αμφιλεγόμενο ζήτημα, καθώς η ανεξίτηλη V συνδέεται και με άλλα φωσφολιπίδια εκτός από την PS, τα οποία εκτίθενται επίσης στην κυτταρική μεμβράνη των παρασίτων. Μεταξύ αυτών των φωσφολιπιδίων, συναντώνται η φωσφατιδυλογλυκερόλη, η 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη, το φωσφατιδικό οξύ, η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη και η φωσφατιδυλινοσιτόλη (Weingärtner et al. 2012).

Ο κατακερματισμός του DNA είναι ένα από τα κοινά βιοχημικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης στα θηλαστικά και θεωρείται σημαντικός δείκτης για τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο στα πρωτόζωα (Jiménez-Ruiz et al. 2010; Ni Nyoman and Lüder 2013). Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική TUNEL για να εκτιμηθεί ο κατακερματισμός του γονιδιωματικού DNA των προμαστιγωτών *L. infantum* και *L. major* ύστερα από 72 ώρες επώασης με τα TPF1 και TPF2 (Mirzayans and Murray 2020). Η επίδραση των πολυφαινολικών κλασμάτων οδήγησε σε σημαντική αύξηση του ποσοστού των TUNEL-θετικών κυττάρων, ενώ το TPF2 αναδείχθηκε ως ισχυρότερος αντιλεϊσμνιακός παράγοντας καθώς επέφερε μέχρι και 62% μεγαλύτερη αύξηση στο ποσοστό αυτό, συγκριτικά με το TPF1. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω με απομόνωση του DNA των παρασίτων, διαχωρισμό των κλασμάτων υψηλού και χαμηλού μοριακού βάρους και ανάλυση μετά από ηλεκτροφόρηση. Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν παρόμοια ευρήματα σε προμαστιγώτες *L. donovani* που επωάστηκαν για 48 ώρες με αρτεμισίνη, ένα καθιερωμένο φάρμακο κατά της ελονοσίας, που απομονώθηκε από το φυτό *Artemisia annua* ή με αιθανολικό εκχύλισμα προερχόμενο από το *Piper betle* (Sarkar et al. 2008; Sen et al. 2007). Επίσης, μια νέα λιποσωματική τροποποίηση της αμφοτερικίνης B (Kalsome TM10), οδηγεί σε κατακερματισμό του DNA και σε σημαντική αύξηση των TUNEL-θετικών κυττάρων σε προμαστιγώτες *L. donovani* μετά από 12 ώρες επώασης (Shadab et al. 2017). Ομοίως, κατακερματισμός του DNA παρατηρείται σε προμαστιγώτες *L. donovani* μετά από 72 ώρες επώασης με αιθέρια έλαια προερχόμενα από τα φυτά *Syzygium aromaticum* και *Artemisia annua* (Islamuddin, Chouhan, et al. 2014; Islamuddin, Sahal, et al. 2014).. Αντιθέτως, η επίδραση της αλλισίνης σε προμαστιγώτες *L. infantum* δεν προκαλεί κατακερματισμό του παρασιτικού DNA (Corral et al. 2016).

Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση και στη ρύθμιση των κύριων οδών απόπτωσης που μεσολαβούνται από τα μιτοχόνδρια και το ενδοπλασματικό δίκτυο. Η υπέρμετρη παραγωγή ROS προκαλεί βλάβες σε πρωτεΐνες και οργανίδια, όπως τα μιτοχόνδρια, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε ενεργοποίηση διεργασιών αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου (Redza-Dutordoir and Averill-Bates 2016; Roy et al. 2008; Silva-Silva et al. 2022; Smirlis et al. 2010). Στην παρούσα διατριβή προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των κυτταροπλασματικών ROS σε προμαστιγώτες *L. infantum* και *L. major* που δέχτηκαν την επίδραση των πολυφαινολικών κλασμάτων TPF1 και TPF2 για 72 ώρες και παρατηρήθηκε σημαντική αύξησή τους και στα δύο στελέχη *Leishmania*. Ανάλογα ευρήματα αναφέρονται και σε πρόσφατη μελέτη διερεύνησης του επαγόμενου κυτταρικού θανάτου από πολυφαινολικό κλάσμα TPF διαφορετικής φαινολικής σύνθεσης σε προμαστιγώτες *L. infantum* και *L. major*, όπου συσχετίστηκε η αυξημένη παραγωγή ROS με διαταραχές του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Karampetsou et al. 2021). Αρκετά βιβλιογραφικά δεδομένα συνδέουν την αυξημένη παραγωγή ROS με προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο σε παράσιτα του γένους *Leishmania*, ύστερα από τη δράση φυσικών προϊόντων. Ενδεικτικά, η σησαμόλη, μια φαινολική ένωση του σησαμέλαιου, επάγει δοσοεξαρτώμενη παραγωγή ROS σε προμαστιγώτες *L. donovani* μετά από 48 ώρες επώασης, προκαλώντας αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο (Ali et al. 2021). Ομοίως, η ένωση «carajurin» που προέρχονται από το φυτό *Arrabidaea chica* και η απιγενίνη, ένα βιοενεργό φλαβονοειδές που συναντάται σε αφθονία σε φυτά όπως ο μαϊντανός και το χαμομήλι, προκαλούν αυξημένη παραγωγή ROS σε προμαστιγώτες *L. amazonensis* ύστερα από 24 ώρες επώασης (Fonseca-Silva et al. 2015; Silva-Silva et al. 2022). Ομοίως, η κερσετίνη, ένα από τα πιο κοινά πολυφαινολικά φλαβονοειδή που εντοπίζεται σε φυτά όπως τα κρεμμύδια, το γκίνγκο μπιλόμπα και το τσάι, επιφέρει αυξημένη παραγωγή σε προμαστιγώτες *L. amazonensis*, ύστερα από 48 ώρες επώασης (Fonseca-Silva et al. 2011). Αντιθέτως, η επίδραση με εκχύλισμα φύλλων του φυτού *Aloe vera* σε προμαστιγώτες *L. donovani* δεν πυροδοτεί τη δημιουργία ROS (Dutta, Ghoshal, et al. 2007).

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη συνεκτιμήθηκαν διαφορετικοί δείκτες αποπτωτικού θανάτου, συμπεριλαμβανομένων των μορφολογικών αλλοιώσεων και των βιοχημικών χαρακτηριστικών (η εξωτερίκευση της PS, ο κατακερματισμός του DNA, η παραγωγή ROS). Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, τα ολικά φαινολικά κλάσματα επάγουν προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο τόσο σε σπλαγχνοτροπικά, όσο και σε δερμοτροπικά στελέχη του γένους. Τα αποτελέσματα αυτά ανοίγουν το δρόμο για

περαιτέρω έρευνα ως προς τη χημειοθεραπευτική χρήση πολυφαινολικών κλασμάτων έναντι της λείσμανιάσης.

5.5 Συνδυαστική χημειοθεραπεία έναντι των ενδοκυττάρων παρασίτων *Leishmania*

Παρά την πρόοδο στις γνώσεις γύρω από την κυτταρική βιολογία και την ανοσολογία της λείσμανιάσης, η χημειοθεραπεία της νόσου εξακολουθεί να στερείται εναλλακτικών επιλογών. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, εγκεκριμένα εμβόλια κατά της λείσμανιάσης δεν υπάρχουν και το χημειοθεραπευτικό οπλοστάσιο για την ίαση της νόσου είναι αρκετά περιορισμένο, καθώς τα συμβατικά αντιλειτουργικά φάρμακα παρουσιάζουν σημαντικά μειονεκτήματα (Abou-El-Naga, Mady, and Mogahed 2020; Uliana et al. 2017). Συνεπώς, οι διαθέσιμες χημειοθεραπευτικές επιλογές απαιτούν βελτίωση για την επίτευξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Προς αυτή την κατεύθυνση, τα τελευταία χρόνια, οι έρευνες επικεντρώνονται στην ανάπτυξη εναλλακτικών στρατηγικών θεραπείας (Roatt et al. 2020; Sundar and Chakravarty 2013), όπως η συνδυαστική χρήση φαρμάκων που αποτελεί μια υποσχόμενη εναλλακτική προσέγγιση που ήδη εφαρμόζεται για τη θεραπεία ασθενειών, όπως ο καρκίνος (Saputra et al. 2018), αλλά και αρκετών μολυσματικών νοσημάτων όπως η ελονοσία, το AIDS, η φυματίωση και η λέπρα (Juliana Quero Reimão 2011; Uliana et al. 2017). Η στρατηγική της συνδυαστικής χημειοθεραπείας θεωρείται πλεονεκτική επιλογή συγκριτικά με τη συμβατική χημειοθεραπεία, καθώς η κατάλληλη συγχορήγηση φαρμάκων μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό εργαλείο ικανό να επιτύχει τη μείωση των παρενεργειών, μέσω της μείωσης της διάρκειας και της δοσολογίας των τρεχουσών θεραπειών, αλλά και την καθυστέρηση ή/και πρόληψη της αντοχής στα ήδη επί δεκαετιών χρησιμοποιούμενα αντιλειτουργικά φάρμακα (Abou-El-Naga et al. 2020; Bastos et al. 2016; Griensven van et al. 2010; Roatt et al. 2020).

Σχετικά με την θεραπεία της λείσμανιάσης, πρόσφατες μελέτες αναφέρουν τη συνδυαστική χρήση φαρμάκων στην αντιμετώπιση της συλλοίμωξης HIV/*Leishmania* (Rebello et al. 2019). Επιπλέον, αρκετές μελέτες επικεντρώνονται στην αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της συνδυαστικής χημειοθεραπείας, είτε μεταξύ συμβατικών φαρμάκων, είτε σε συνδυασμό με νέες ενώσεις που έχουν επιδείξει ισχυρή λείσμανιοκτόνο δράση (Mesquita, Tempone, and Reimão 2014; Morais-Teixeira et al. 2014; Nunes et al. 2017; Sousa et al. 2014; Trinconi et al. 2021). Ενδεικτικά, η αλληλεπίδραση μεταξύ HePC και AmB ταξινομήθηκε ως αδιάφορη τόσο στο σύστημα των προμαστιγωτών, όσο και στο αντίστοιχο σύστημα των αμαστιγωτών *L. donovani* (Karin Seifert and Simon L. Croft 2006; Ménez et al. 2006). Ομοίως, η αλληλεπίδραση μεταξύ HePC και παρομομυκίνης επίσης ταξινομήθηκε ως

αδιάφορη έναντι των αμαστιγωτών *L. infantum* και *L. donovani* (Hendrickx et al. 2017; Ménez et al. 2006). Στο πεδίο των φυσικών προϊόντων, παρότι πολλές ενώσεις, όπως αιθέρια έλαια, και φυτικά εκχυλίσματα έχουν ταυτοποιηθεί ως προς την αντιλεϊσμμανιακή τους δράση (Koko et al. 2022), ο αριθμός των μελετών της αλληλεπίδρασής τους, είτε μεταξύ τους, είτε με εγκεκριμένα και εμπορικά διαθέσιμα φάρμακα παραμένει περιορισμένος. Ενδεικτική μελέτη αναφέρει αθροιστικές και συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενώσεων αιθέριου ελαίου προερχόμενου από το *Chenopodium ambrosioides* έναντι προμαστιγωτών *L. amazonensis* (Pastor et al. 2015). Επίσης, ανάλογη μελέτη αναφέρει ότι το προαναφερθέν αιθέριο έλαιο παρουσιάζει συνεργιστική δράση με την πενταμιδίνη έναντι των προμαστιγωτών *L. amazonensis*, ενώ η αντίστοιχη αλληλεπίδρασή του με την αντιμονιακή μεγλουμίνη ή την AmB χαρακτηρίζεται ως αδιάφορη (Monzote et al. 2007). Αντιθέτως, η αλληλεπίδραση ενός αιθέριου ελαίου προερχόμενου από τα φύλλα *V. Brasiliana* με τη HePC έναντι προμαστιγωτών *L. infantum* χαρακτηρίζεται ως ανταγωνιστική (Mondêgo-Oliveira et al. 2021). Επίσης, ανάλογη μελέτη αναφέρει ότι ο συνδυασμός αντιμονιακής μεγλουμίνης με χημικές ενώσεις που εντοπίζονται σε μπαχαρικά, όπως η καψαϊκίνη και η πιπερίνη, επιφέρει ενισχυμένη αντιλεϊσμμανιακή *in vitro* δράση των φυσικών ενώσεων έναντι τόσο των προμαστιγωτών όσο και των αμαστιγωτών μορφών *L. infantum* (Koko et al. 2022; Vieira-Araújo et al. 2018). Επίσης, η αξιολόγηση της συνδυαστικής δράσης ενός δυναμικού αιθανολικού εκχυλίσματος προερχόμενου από φύλλα του αφρικανικού φαρμακευτικού φυτού *Moringa oleifera* με την AmB έναντι των προμαστιγωτών και των αμαστιγωτών *L. major*, αποκάλυψε συνέργεια (Hammi et al. 2020). Ομοίως, ως συνεργιστική χαρακτηρίζεται και η αλληλεπίδραση επιλεγμένων συνδυασμών της AmB με την αλλισίνη, μιας οργανοθειϊκής ένωσης που απαντάται στο σκόρδο, έναντι των ενδοκυττάρων αμαστιγωτών *L. martiquensis* και *L. donovani*, οδηγώντας σε τετραπλάσια και διπλάσια, αντίστοιχα, μείωση της δόσης της AmB (Corral et al. 2014; Intakhan et al. 2020). Τέλος, ως αθροιστική χαρακτηρίζεται η αλληλεπίδραση της ελαϊκής ευγενόλης, ενός χημικά συνθετικού παράγωγου της ευγενόλης, και της HePC σε προμαστιγώτες και αμαστιγώτες στο *L. donovani* (Kar et al. 2021).

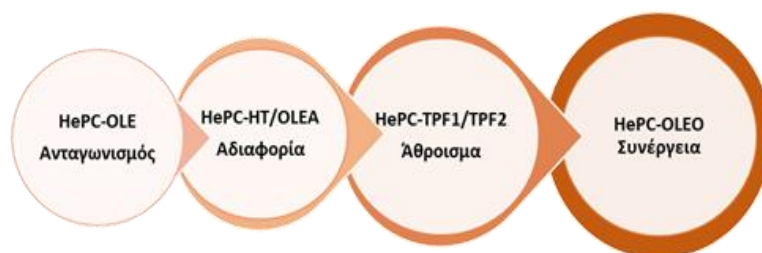
Στην παρούσα μελέτη αναζητήθηκε ο καταλληλότερος συνδυασμός βιοφαινολικών ενώσεων του ΕVOO με τη HePC, με απώτερο στόχο τη βελτιστοποίηση της απόδοσης της HePC, του μοναδικού εγκεκριμένου από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) σκευάσματος που χορηγείται δια στόματος για τη θεραπεία της λεϊσμμανίασης. Έχοντας ήδη αποδείξει *in vitro* τις αντιλεϊσμμανιακές ιδιότητες, τόσο των ολικών φαινολικών κλασμάτων TPF1 και TPF2, όσο και των απομονωμένων φαινολικών ενώσεων OLE, HT, OLEA και OLEO,

ακολούθησε η αξιολόγηση της φύσης της αλληλεπίδρασης αυτών των πολυφαινολών με τη HePC, σε *in vitro* συστήματα εξωκυττάρων προμαστιγωτών και ενδοκυττάρων αμαστιγωτών *Leishmania*. Στόχος αυτής της προσέγγισης ήταν ο προσδιορισμός πιθανών αποτελεσματικών συνδυαστικών δοσολογικών σχημάτων βιοφαινολών και HePC χαμηλότερης δόσης. Μέχρι σήμερα, πολλές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση των φαρμακευτικών αλληλεπιδράσεων, ενώ η κλασματική ανασταλτική συγκέντρωση (FIC) αποτελεί έναν διαδεδομένο δείκτη που χρησιμοποιείται από τις αρχές του 1980. (Chou 2006; ESCMID 2000; Hall, Middleton, and Westmacott 1983; Odds 2003; Zhao, L-S Au, and Guillaume Wientjes 2010). Επιπλέον, η ανάλυση ισοβολογράμματος χρησιμοποιείται ευρέως γι' αυτό το σκοπό (Huang et al. 2019; Tallarida 2006). Συνεπώς, στην παρούσα μελέτη, τα αποτελέσματα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας την τροποποιημένη μέθοδο ισοβολογράμματος (Fivelman et al. 2004) και η φύση των αλληλεπιδράσεων κατηγοριοποιήθηκε ως συνεργιστική, αθροιστική, αδιάφορη ή ανταγωνιστική (ESCMID 2000; Fratini et al. 2017).

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η μελέτη των αλληλεπιδράσεων κάθε μιας φαινολικής ένωσης με τη HePC, στο *in vitro* σύστημα των εξωκυττάρων προμαστιγωτών *L. infantum* και *L. major*. Με γνώμονα τις τιμές IC_{50} που είχαν ήδη προσδιοριστεί, υπολογίστηκε η κορυφαία συγκέντρωση (top concentration) κάθε ουσίας και τέσσερις επιμέρους συνδυασμοί HePC και φαινολικής ένωσης (4:1, 3:2, 2:3, 1:4) διερευνήθηκαν ως προς την αποτελεσματικότητά τους. Οι αλληλεπιδράσεις των πολυφαινολικών κλασμάτων TPF1 και TPF2 με τη HePC, ταξινομήθηκαν ως αθροιστικές και για τα δύο στελέχη *Leishmania*. Αναλυτικότερα, οι τιμές ΣFIC των επιμέρους συνδυασμών κυμαίνονταν από 0,469 έως 0,842 για το σπλαγχνοτροπικό στέλεχος *L. infantum* και από 0,365 έως 1,007 για το δερμοτροπικό *L. major*. Ωστόσο, η ανάλυση του αντίστοιχου ισοβολογράμματος της αλληλεπίδρασης HePC-TPF1 έναντι του *L. infantum*, ανέδειξε τον επιμέρους συνδυασμό D (2:3, HePC:TPF1) ως τον πλησιέστερο σε συνεργιστική δράση ($\Sigma FIC = 0,469$), μειώνοντας την απαιτούμενη δόση της HePC κατά 4,6 φορές, σε σύγκριση με τη μονήρη δράση της. Ομοίως, κατά την αλληλεπίδραση HePC-TPF2 έναντι των *L. infantum* και *L. major*, αντίστοιχα, οι επιμέρους συνδυασμοί C (3:2, HePC:TPF2) και E (1:4, HePC:TPF2) χαρακτηρίστηκαν ως οι πλησιέστεροι σε συνεργιστική δράση, επιφέροντας μείωση της απαιτούμενης δόσης HePC κατά 4,3 και 13 φορές, αντίστοιχα. Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των ολικών φαινολικών κλασμάτων, η αλληλεπίδραση HePC-OLE ταξινομήθηκε ως ανταγωνιστική και για τα δύο είδη του παρασίτου. Αναλυτικότερα, για το στέλεχος *L. infantum*, ο μέσος όρος των ΣFIC (FICI) προσδιορίστηκε στο 3,12, ενώ οι τιμές ΣFIC των επιμέρους συνδυασμών κυμαίνονταν από 2,016 έως 5,272. Αντίστοιχα, για το στέλεχος *L. major*, ο μέσος όρος των ΣFIC (FICI) προσδιορίστηκε στο 2,03 και οι τιμές ΣFIC των

επιμέρους συνδυασμών κυμαίνονταν από 1,222 έως 2,350. Οι αλληλεπιδράσεις HePC-HT και HePC-OLEA, ταξινομήθηκαν ως αδιάφορες και για τα δύο στελέχη *Leishmania*, με τις τιμές ΣFIC των επιμέρους συνδυασμών να κυμαίνονται από 1,235 έως 2,728 και 0,969 έως 2,028, αντίστοιχα. Η ανάλυση των αντίστοιχων ισοβολογραμμάτων έδειξε πως μόνο ο επιμέρους συνδυασμός Β (4:1) κατά την αλληλεπίδραση HePC-OLEA, στο στέλεχος *L. infantum*, πλησίασε σε αθροιστικό αποτέλεσμα, οδηγώντας σε μείωση της δόσης της HePC κατά 1,4 φορές. Τέλος, η φύση της αλληλεπίδρασης HePC-OLEO κατηγοριοποιήθηκε ως συνεργιστική και για τα δύο στελέχη *Leishmania*, με τις τιμές ΣFIC των επιμέρους συνδυασμών να κυμαίνονται από 0,225 έως 0,690. Σε αυτή την περίπτωση, όλοι οι επιμέρους συνδυασμοί οδήγησαν σε σημαντική μείωση της απαιτούμενης δόσης HePC. Αξιοσημείωτη είναι η αλληλεπίδραση Ε (1:4, HePC:OLEO), η οποία επέφερε δραματική μείωση της δοσολογίας του τυπικού αντιλεϊσμάνιακού φαρμάκου κατά 12,4 και 16,9 φορές για τα στελέχη *L. infantum* και *L. major*, αντίστοιχα.

Συμπερασματικά, όπως συνοψίζεται από τα παραπάνω αποτελέσματα, στην περίπτωση της συνέργειας, όλοι οι επιμέρους συνδυασμοί των υπό μελέτη ουσιών με τη HePC, οδηγούν σε σημαντική μείωση της δόσης του τυπικού φαρμάκου. Παρόλα αυτά, ορισμένοι από τους επιμέρους συνδυασμούς επιφέρουν σημαντική μείωση της δόσης της HePC ακόμη και όταν η φύση της αλληλεπίδρασης χαρακτηρίζεται ως αθροιστική, αδιάφορη ή ακόμη και ανταγωνιστική. Ομοίως, κατά την αξιολόγηση της φύσης της αλληλεπίδρασης μεταξύ διαφόρων συνδυασμών φαρμάκων κατά της ελονοσίας, τα αποτελέσματα εμφάνισαν ποικιλομορφία οδηγώντας σε διαφορετικό είδος αλληλεπίδρασης ανάλογα με τις αναλογίες των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση (Gurta et al. 2002; Karin Seifert 2006). Ωστόσο, συγκρίνοντας τους επιμέρους συνδυασμούς μεταξύ των αθροιστικών, αδιάφορων και ανταγωνιστικών αλληλεπιδράσεων, παρατηρήθηκε ότι επιλεγμένοι συνδυασμοί των αθροιστικών αλληλεπιδράσεων προκαλούν μεγαλύτερη μείωση στη δοσολογία της HePC, συγκριτικά με τις περιπτώσεις αδιαφορίας ή ανταγωνισμού. Γενικότερα, η συνεργιστική ή η αθροιστική αλληλεπίδραση των φαρμάκων αποτελεί



Εικόνα 5.3. Απεικόνιση της φύσης των αλληλεπιδράσεων στους προμαστιγώτες *Leishmania spp.*

επιδιωκόμενο στόχο στην ανάπτυξη συνδυαστικών χημειοθεραπειών, καθώς η προσέγγιση αυτή υποστηρίζεται όλο και περισσότερο ως ένας τρόπος για την αύξηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας και για τη μείωση της διάρκειας και του κόστους της (Costa et al. 2016; Fitzgerald et al. 2006; Karin Seifert 2006; Uliana et al. 2017). Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, οι αλληλεπιδράσεις HePC-OLEO και HePC-πολυφαινολικών κλασμάτων (TPF1 και TPF2) θεωρήθηκαν ως οι πιο υποσχόμενες, καθώς φανέρωσαν συνέργεια και αθροιστικότητα, αντίστοιχα. Η υποσχόμενη δράση αυτών των συνδυασμών επιβεβαιώθηκε περαιτέρω από την ενισχυμένη ενδοκυτταρική παραγωγή ROS που παρατηρήθηκε στους προμαστιγώτες που δέχτηκαν την επίδραση όλων των επιμέρους συνδυασμών αυτών των αλληλεπιδράσεων.

Παρά τα υποσχόμενα αποτελέσματα στο σύστημα των εξωκυττάρων προμαστιγωτών, τίθεται υπό αμφισβήτηση η κλινική συνάφεια των προαναφερθέντων ευρημάτων, καθώς δεν εκτίθεται αυτό το αναπτυξιακό στάδιο του παρασίτου στα φάρμακα κατά την εφαρμογή της αγωγής. Συνεπώς, στη συνέχεια της παρούσας μελέτης, η OLEO και τα πολυφαινολικά κλάσματα TPF1 και TPF2 που παρουσίασαν τις πιο υποσχόμενες αλληλεπιδράσεις στο σύστημα των προμαστιγωτών, αξιολογήθηκαν περαιτέρω και στο σύστημα των ενδοκυττάρων αμαστιγωτών (Callahan et al. 1997; Nunes et al. 2017). Οι αλληλεπιδράσεις



Εικόνα 5.4. Απεικόνιση της φύσης των αλληλεπιδράσεων στους ενδοκυττάρους αμαστιγώτες *Leishmania spp.*

της HePC και με τις τρεις βιοφαινόλες χαρακτηρίστηκαν ως ανταγωνιστικές και για τα δύο στελέχη *Leishmania*, με τις τιμές ΣFICs των επιμέρους συνδυασμών να κυμαίνονται από 1,472 έως 4,668. Παρόλα αυτά, η ανάλυση των ισοβολογραμμάτων έδειξε ότι ο επιμέρους συνδυασμός E (1:4) της αλληλεπίδρασης HePC-TPF1, ήταν πλησιέστερος σε αθροιστικό αποτέλεσμα, προκαλώντας μείωση της δόσης της HePC κατά 3,8 και 3,1 φορές για το *L. infantum* και το *L. major* στέλεχος, αντίστοιχα, σε σχέση με τη μονήρη δράση της. Αντίστοιχα, ο συνδυασμός E (1:4) της αλληλεπίδρασης HePC-OLEO στους αμαστιγώτες *L. infantum*, παρότι υπέδειξε αδιάφορο αποτέλεσμα, μείωσε τη δόση της HePC κατά 3,1 φορές. Αν και αυτές οι αποκλίσεις που παρατηρούνται μεταξύ των διαφορετικών μορφών του παρασίτου χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης, τα αποτελέσματα συνολικά υποδηλώνουν ότι το ενδοκυτταρικό περιβάλλον μεταβάλλει τη φύση της

της HePC και με τις τρεις βιοφαινόλες χαρακτηρίστηκαν ως ανταγωνιστικές και για τα δύο στελέχη *Leishmania*, με τις τιμές ΣFICs των επιμέρους συνδυασμών να κυμαίνονται από 1,472 έως 4,668. Παρόλα αυτά, η ανάλυση των ισοβολογραμμάτων έδειξε ότι ο επιμέρους συνδυασμός E (1:4) της αλληλεπίδρασης HePC-TPF1,

αλληλεπίδρασης μεταξύ των φυσικών προϊόντων και της HePC έναντι των *Leishmania* spp. και η επιλογή κατάλληλων επιμέρους συνδυασμών μπορεί να ενισχύσει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας.

5.6 Μελέτη ανοσοτροποποιητικών ιδιοτήτων επιλεγμένων βιοφαινολών

Η ανοσολογική απόκριση έναντι του παρασίτου *Leishmania* διαμεσολαβείται τόσο από την έμφυτη, όσο και από την προσαρμοστική ανοσία (Alves et al. 2021) και οι εμπλεκόμενοι ανοσολογικοί μηχανισμοί χαρακτηρίζονται από πολυπλοκότητα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην ενότητα 1.5 της παρούσας μελέτης, τα μακροφάγα αποτελούν τα κύρια φαγοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη της λείσμανιάσης έχοντας διπλό ρόλο, τόσο ως ξενιστές για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του παρασίτου, όσο και ως αποτελεσματικά κύτταρα για την εξάλειψή του (Costa-Da-silva et al. 2022; Liu and Uzonna 2012; Tomiotto-Pellissier et al. 2018). Δεδομένου ότι τα υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα *Leishmania* είναι ικανά να παρεμποδίσουν τους αμυντικούς μηχανισμούς των μακροφάγων προς όφελος τους, μια ιδανική προσέγγιση για τη θεραπεία της λείσμανιάσης περιλαμβάνει τη χορήγηση ανοσοτροποποιητικών ενώσεων, οι οποίες εκτός από άμεση αντιλειτουργική δράση, θα μπορούσαν ταυτόχρονα να ρυθμίσουν την ανοσοαπόκριση του ξενιστή.

Οι ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες φαρμακευτικών φυτικών προϊόντων έχουν αποδειχθεί ως αποτελεσματική θεραπευτική στρατηγική. Διάφορα φυτικά σκευάσματα και δευτερογενείς μεταβολίτες φυτών, όπως τα φλαβονοειδή και οι σαπωνίνες, είναι γνωστό ότι αποτελούν αποτελεσματικά ανοσοτροποποιητικά μόρια (Kolodziej et al. 2005; Rodrigues et al. 2015; Shukla, Bajrai, and Kim 2014). Στα πλαίσια του πρώτου άξονα μελέτης της παρούσας διατριβής, αναδείχθηκε ότι οι βιοφαινόλες του ελαιολάδου παρουσιάζουν ισχυρή αντιλειτουργική δράση σε *in vitro* συστήματα εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων παρασίτων *Leishmania*, ενώ επιπλέον μελετήθηκε η δυναμική αλληλεπίδρασή τους με το χρησιμοποιούμενο φάρμακο HePC. Τα αποτελέσματα αυτά, έδειξαν το δρόμο για την περαιτέρω αξιολόγηση των θεραπευτικών δράσεων αυτών των βιοδραστικών φυσικών προϊόντων σε *in vitro* σύστημα μακροφάγων μολυσμένων με τα παράσιτα *Leishmania*, με στόχο την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών δράσης και των ανοσοτροποποιητικών τους ιδιοτήτων. Συνεπώς, αξιολογήθηκε η ικανότητα των βιοφαινολών να ρυθμίζουν ανοσολογικές αποκρίσεις προς την ενεργοποίηση της ειδικής ανοσίας. Οι βιοφαινόλες που επιλέχθηκαν για αυτή τη μελέτη ήταν τα πολυφαινολικά κλάσματα TPF1 και TPF2 και η απομονωμένη OLEO, καθώς αυτά τα μόρια επέδειξαν ταυτόχρονα ισχυρή *in vitro*

αντιλειψμανιακή δράση και υποσχόμενη αλληλεπίδραση με τη HePC. Αναλυτικότερα, αξιολογήθηκε η ικανότητά της μονήρους και της συνδυαστικής με τη HePC δράσης τους, να επάγουν τη λειτουργική διαφοροποίηση των μολυσμένων μακροφάγων, μέσω της διερεύνησης του προφίλ των παραγόμενων κυτταροκινών, μετά από 48 ώρες επώασης. Για τις μονήρεις επιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές IC₅₀ όπως αυτές προσδιορίστηκαν στην ενότητα 4.3, ενώ για τη συνδυαστική δράση επιλέχθηκαν οι τιμές IC₅₀ του επιμέρους συνδυασμού E, ο οποίος κατά την *in vitro* αξιολόγηση των αλληλεπιδράσεων στο σύστημα των ενδοκυττάρων αμαστιγωτών, οδήγησε στη μεγαλύτερη μείωση της δόσης της HePC. Η θετική ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από μολυσμένα μακροφάγα τα οποία διεγέρθηκαν ταυτόχρονα με LPS και IFN-γ, ενώ η αρνητική ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από μολυσμένα μακροφάγα που δεν δέχτηκαν την επίδραση κάποιου παράγοντα. Η αξιολόγηση των παραγόμενων κυτταροκινών πραγματοποιήθηκε μέσω της εφαρμογής PCR πραγματικού χρόνου για τον έλεγχο των επιπέδων των mRNA γονιδίων κυτταροκινών που σχετίζονται με τη λειτουργική M1/M2 πόλωση των μακροφάγων και επηρεάζουν την ενεργοποίηση των προσαρμοστικών Th1/Th2 αποκρίσεων. Ενδεικτικές προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες των M1 μακροφάγων που επηρεάζουν την ενεργοποίηση των Th1 λεμφοκυττάρων που σχετίζεται με την κάθαρση των παρασίτων είναι ο TNF-α και η IL-1, ενώ αντίστοιχες αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες των M2 μακροφάγων που επηρεάζουν την ενεργοποίηση των Th2 κυττάρων που σχετίζεται με την επιδείνωση της νόσου, είναι η IL-10 και ο TGF-β (Alves et al. 2021; Duque and Descoteaux 2014; Maspi, Abdoli, and Ghaffarifar 2016; Tomiotto-Pellissier et al. 2018).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων ανέδειξε την ανοσορυθμιστική δράση και των τριών βιοφαινολικών ενώσεων. Αναλυτικότερα, στα *L. infantum* – μολυσμένα μακροφάγα οι επιδράσεις των συνδυασμών των TPF1, TPF2 και OLEO με τη HePC μείωσαν σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10 κατά 7,6, 12,1 και 6,2 φορές, αντίστοιχα, συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Παρομοίως, ο συνδυασμός HePC-OLEO οδήγησε σε μειωμένη έκφραση του γονιδίου TGF-β κατά 9,1 και 10,4 φορές, τόσο σε σχέση με την αρνητική ομάδα ελέγχου, όσο και με τη μονήρη δράση της HePC, αντίστοιχα. Επιπλέον, ο συνδυασμός HePC-OLEO οδήγησε σε σημαντική αύξηση της σχετικής έκφρασης των γονιδίων IL-1β και TNF-α σε σύγκριση με την αρνητική ομάδα ελέγχου. Συνεπώς, τα παραπάνω αποτελέσματα αναδεικνύουν ότι η συνδυαστική επίδραση HePC-OLEO παρουσιάζει την πιο υποσχόμενη ανοσορυθμιστική δράση προς την αυξημένη αντιπαρασιτική δράση των μακροφάγων και την περαιτέρω διαφοροποίηση της ανοσολογικής απόκρισης προς τον προστατευτικό Th1 ανοσοφαινότυπο. Επιπλέον, η

ανοσορυθμιστική δράση των βιοφαινολικών ενώσεων αναδείχθηκε και στο σύστημα των *L. major* - μολυσμένων μακροφάγων. Οι συνδυαστικές αλληλεπιδράσεις, HePC-TPF2 και HePC-OLEO, οδήγησαν σε σημαντική αύξηση της γονιδιακής έκφρασης της IL-1 β κατά 10,7 και 5,5 φορές, αντίστοιχα, σε σύγκριση με αρνητικό μάρτυρα. Επιπλέον, κατά τον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης του TNF- α , αναδείχθηκε η υποσχόμενη ανοσοτροποποιητική δράση του συνδυασμού HePC-TPF1, καθώς επέφερε αύξηση των επιπέδων έκφρασης 23,4 φορές. Στην περίπτωση αυτή, είναι αξιοσημείωτο πως ο συνδυασμός HePC-TPF1 επέφερε σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου και συγκριτικά με τις μονήρεις δράσεις των παραγόντων.

Η πιο συχνά αξιολογούμενη ανοσοτροποποιητική παράμετρος για την κάθαρση των παρασίτων είναι η παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) που αποτελεί το κύριο λείψμανιοκτόνο μόριο για τους ενδοκυττάριους αμαστιγώτες. Το NO και οι μεσολαβητές της οξειδωτικής καταπόνησης εξαλείφουν αποτελεσματικά το παράσιτο ως αποτέλεσμα της συνεργιστικής δράσης κυτταροκινών της ανοσοαπόκρισης τύπου Th1 (IFN- γ , TNF- α). Προς αυτή την κατεύθυνση, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της έκφρασης των μεταγράφων mRNA της επαγόμενης συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (iNOS). Στο σύστημα του σπλαγχοτροπικού στελέχους *L. infantum*, παρατηρήθηκε ότι οι μονήρεις επιδράσεις του TPF2 και της OLEO, οδήγησαν σε αύξηση της έκφρασης κατά 4,1 και 3,6 φορές αντίστοιχα, συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Οι συνδυαστικές επιδράσεις διατήρησαν την έκφραση των μεταγράφων mRNA της iNOS σε όμοια επίπεδα με τον αρνητικό μάρτυρα, γεγονός που αποτελεί εξίσου σημαντικό εύρημα δεδομένου ότι η δόση της HePC στους συνδυασμούς είναι μειωμένη έως και 3,8 φορές. Αντιστοίχως, στο σύστημα του δερμοτροπικού στελέχους *L. major*, οι συνδυαστικές επιδράσεις HePC-TPF1 και HePC-TPF2 επέφεραν αύξηση της έκφρασης κατά 3,7 και 3,0 φορές αντίστοιχα, συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα.

Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με μελέτες της διεθνούς επιστημονικής κοινότητας, οι οποίες επίσης αναδεικνύουν τις ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες φυσικών προϊόντων. Ενδεικτικά, κλάσμα οξικού μεθυλεστέρα (EAF) προερχόμενο από εκχύλιση των φύλλων του φυτού *Azadirachta indica* (Neem), οδήγησε σε ανοδική ρύθμιση της έκφρασης των Th1 κυτταροκινών TNF- α , IL-1 β και IL-8, σε *L. amazonensis* – μολυσμένα THP-1 μακροφάγα, διατηρώντας τα επίπεδα έκφρασης iNOS και IL-10 σταθερά (Dayakar et al. 2015). Επίσης, το γαλλικό φαινολικό οξύ ενισχύει τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης της iNOS, καθώς και σημαντικών προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1, TNF- α και IFN- γ) σε *L. major* – μολυσμένα RAW 264.7 μακροφάγα (Radtke et al. 2004). Επίσης, υδρολυόμενες ταννίνες, ομάδα φαινολικών μεταβολιτών που εντοπίζονται κυρίως σε

ξυλώδη και ποώδη φυτά, πέραν της λεισμανιοκτόνου δράσης τους, επάγουν την απελευθέρωση NO και την ανοδική πορεία του TNF-α, σε *L. donovani* – μολυσμένα RAW 264.7 μακροφάγα (Kiderlen et al. 2001; Kolodziej et al. 2001). Ωστόσο, υπάρχουν και περιπτώσεις στις οποίες πολυφαινολικές ενώσεις έχει βρεθεί ότι μπορεί να αναστέλλουν την παραγωγή NO και την έκκριση κυτταροκινών όπως TNF-α ή IL-1 (Kim et al. 1999; Kolodziej et al. 2005).

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη αναδείχθηκε η ανοσορυθμιστική δράση και των τριών βιοφαινολικών ενώσεων, η οποία στην πλειονότητα των δοκιμασιών ενισχύθηκε όταν οι ενώσεις αυτές συνδυάστηκαν με τη HePC. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης αποτελούν τη βάση για την περαιτέρω εφαρμογή πειράματα κατανόησης του ανοσοτροποποιητικού ρόλου των πολυφαινολών, με απώτερο στόχο την εφαρμογή τους σε μελλοντικές ανοσοθεραπευτικές στρατηγικές, τόσο κατά της λεισμανίασης, όσο κατά άλλων παραμελημένων ασθενειών.

5.7 Αξιολόγηση της θεραπευτικής συνδυαστικής δράσης HePC-OLEO σε *in vivo* πειραματικό μοντέλο ποντικού

Ο προσδιορισμός της *in vitro* αντιλεισμανιακής δράσης των υποσχόμενων φυτικών ενώσεων έναντι των προμαστιγωτών και αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *Leishmania*, αποτελεί τη βασική προϋπόθεση για την περαιτέρω αξιολόγηση της βιολογικής τους δράσης σε *in vivo* πρωτόκολλα της νόσου. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, αρχικά αναδείχθηκε *in vitro* η υποσχόμενη αντιλεισμανιακή δράση των δύο ολικών φαινολικών κλασμάτων TPF1 και TPF2, και τεσσάρων απομονωμένων βιοφαινολών (OLE, HT, OLEA και OLEO), προερχόμενα από το ελαιόλαδο. Μεταξύ αυτών, η OLEO συγκέντρωσε το μεγαλύτερο ερευνητικό ενδιαφέρον για την περαιτέρω διερεύνησή της σε *in vivo* πειραματικό μοντέλο λεισμανίασης, διότι η φύση της αλληλεπίδρασης HePC-OLEO κατηγοριοποιήθηκε ως συνεργιστική και για τα δύο στελέχη προμαστιγωτών *Leishmania*. Επιπλέον, πρόσφατα αναδείχθηκε η μονήρης θεραπευτική της δράση σε αντίστοιχο πειραματικό μοντέλο δερματικής λεισμανίασης ποντικού (Karampetsou et al. 2022). Αναλυτικότερα, πραγματοποιήθηκε η διερεύνηση της θεραπευτικής συνδυαστικής δράσης HePC-OLEO σε *in vivo* πειραματικό μοντέλο γενετικά ευαίσθητων για τη λεισμανίαση BALB/c ποντικών. Η χρήση των αιμομικτικών φυλών ποντικών αποτελεί ένα ευρέως αποδεκτό μοντέλο προκλινικών μελετών για τη διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης υποψήφιων θεραπευτικών ουσιών, τόσο έναντι λοιμωδών και αυτοάνοσων νοσημάτων, όσο και έναντι του καρκίνου. Ειδικότερα, η επιλογή των γενετικά ευαίσθητων για τη λεισμανίαση BALB/c ποντικών βασίζεται στο γεγονός ότι αποτελούν ένα

καλά μελετημένο μοντέλο της νόσου, που ευνόησε την αξιολόγηση των μηχανισμών που σχετίζονται με την παθογένεση και τη θεραπεία της νόσου (Aguiar et al. 2009; Mears et al. 2015; Ozbak et al. 2019). Το δοσολογικό σχήμα που εφαρμόστηκε βασίζεται σε πρόσφατη δημοσιευμένη μελέτη (Kar et al. 2021). Πλήθος επαναλαμβανόμενων δόσεων και διαφορετικών οδών χορήγησης έχουν χρησιμοποιηθεί σε διαφορετικές μελέτες για την αξιολόγηση της *in vivo* βιοδραστικότητας της OLEO και σε όλες έχει αναφερθεί αμελητέα τοξικότητα (Ayoub et al. 2017; Siddique, Ayoub, et al. 2019; Siddique, Ebrahim, et al. 2019).

Οι αξιολογήσεις των θεραπευτικών μονήρων δράσεων υποσχόμενων φυτικών ουσιών σε *in vivo* πειραματικά μοντέλα λειψμανίασης, έχουν προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον. Πρόσφατες επιστημονικές μελέτες παρουσίασαν σημαντικά ελαττωμένο μέγεθος βλάβης του πέλματος σε ποντίκια μολυσμένα με *L. major* ή *L. amazonensis* παράσιτα, που έλαβαν θεραπεία είτε με κουμαρίνη, που απομονώθηκε από φύλλα *Calophyllum Brasiliense*, είτε με το υδάτινο εκχύλισμα από το φυτό *Sambucus ebulus* (Heidari-Kharaji et al. 2019; Tiuman et al. 2012), είτε με εκχύλισμα προερχόμενο από *Gossypium hirsutum* (Sharifi et al. 2006). Εστιάζοντας στις πολυφαινόλες του ελαιόδεντρου, έχει αναδειχθεί η *in vivo* αντιλειψμανιακή δράση της OLE και ενός ακατέργαστου πολυφαινολικού κλάσματος (TPF) εμπλουτισμένου με OLEO (Karampetsou et al. 2021; Koutsoni et al. 2018; Kyriazis et al. 2013). Σχετικά με την αξιολόγηση συνδυαστικών θεραπειών σε *in vivo* πειραματικά μοντέλα της νόσου, υπάρχει περιορισμένος αριθμός δημοσιευμένων μελετών (Karin Seifert 2006; Tiwari et al. 2017). Ενδεικτική μελέτη αναφέρει ότι η συνδυαστική χορήγηση ταμοξιφαίνης, μιας αντικαρκινικής ένωσης που έχει προταθεί και ως πιθανό υποψήφιο φάρμακο κατά της λειψμανίασης, με την AmB οδήγησε σε σημαντική μείωση της ιστικής βλάβης και του παρασιτικού φορτίου σε BALB/c ποντίκια που είχαν προηγουμένως μολυνθεί με *L. amazonensis*, σε σύγκριση με τις μονήρεις χορηγήσεις (Miguel et al. 2009; Miguel, Yokoyama-Yasunaka, and Uliana 2008; Trinconi et al. 2021). Επίσης, η συνδυαστική χορήγηση της 6-τζιντζερόλης, κύριο συστατικό της πιπερόριζας, με την AmB, οδήγησε σε αισθητή μείωση του παρασιτικού φορτίου, συγκριτικά με τη μονήρη δράση της κάθε ουσίας, σε *L. major* – μολυσμένα BALB/c ποντίκια (Keyhani et al. 2021).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν πως τόσο οι μονήρεις δόσεις, όσο και η συγχορήγηση των OLEO και HePC, σε *L. major* - μολυσμένα BALB/c ποντίκια, παρότι δεν επέφεραν σημαντική μείωση στη βλάβη του πέλματος των μολυσμένων ποντικών, το εκτιμώμενο παρασιτικό φορτίο στους ιγνυακούς λεμφαδένες, μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες των ζώων που έλαβαν είτε μονήρη, είτε συνδυαστική θεραπεία, χωρίς ωστόσο να παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των θεραπευτικών σχημάτων. Σε αντίθεση με

τα παραπάνω αποτελέσματα, πρόσφατη μελέτη αξιολόγησης της μονήρους θεραπευτικής δράσης της OLEO σε ανάλογο *in vivo* πειραματικό μοντέλο δερματικής λεισμανίασης, αναφέρει σημαντικές διαφορές της εξέλιξης της βλάβης του πέλματος μεταξύ της ομάδας που έλαβε θεραπεία με OLEO, σε σύγκριση με την ομάδα που δεν έλαβε θεραπεία (Karampetsou et al. 2022). Η αντίφαση αυτή πιθανόν να αποδίδεται στη διαφορετική διάρκεια των θεραπευτικών σχημάτων που εφαρμόστηκαν μεταξύ των δύο μελετών, με σαφείς ενδείξεις ότι μεγαλύτερης διάρκειας θεραπευτικά πρωτόκολλα με επαναλαμβανόμενες δόσεις, εγκαθιστούν ισχυρότερα και παρατεταμένα αποτελέσματα φαρμακευτικής δράσης των ουσιών υπό έρευνα. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται σε μελέτη κατά την οποία οι μονήρεις χορηγήσεις εξετιμίμπης (φάρμακο για τη θεραπεία της υπερχοληστερολαιμίας) και κετοκοναζόλης (αντιμυκητιασικό φάρμακο) σε πειραματικό μοντέλο δερματικής λεισμανίασης ποντικού, επέφεραν μείωση του μεγέθους των αλλοιώσεων και του παρασιτικού φορτίου, ενώ η συνδυαστική χορήγησή τους επέφερε σημαντικότερη μείωση στο μέγεθος των αλλοιώσεων, χωρίς ωστόσο να παρατηρείται ανάλογη επίπτωση και στο παρασιτικό φορτίο (Andrade-Neto et al. 2016). Επίσης, επιπλέον δεδομένα αναφέρουν ότι ο συνδυασμός υψηλής δόσης παρομομυκίνης και χλωροκίνης παρουσιάζει ήπια δράση στην εξέλιξη του μεγέθους των βλαβών σε μολυσμένα με *L. major* ποντίκια, χωρίς να παρατηρείται πρόσθετη μείωση παρασιτικού φορτίου σε σύγκριση με τη μονοθεραπεία με παρομομυκίνη, κάτι το οποίο ερχόταν σε αντίθεση με την ισχυρή λεισμανιοκτόνο δράση του συνδυασμού στις *in vitro* δοκιμές (Wijnant et al. 2017).

Η ταξινόμηση των *in vivo* αλληλεπιδράσεων εξακολουθεί να μην είναι πλήρως κατανοητή, καθώς στις προσεγγίσεις αυτές δε λαμβάνονται υπόψη παράγοντες όπως ο πιθανός ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος στον έλεγχο της λοίμωξης, αλλά και φαρμακοκινητικές αλληλεπιδράσεις κατά τις οποίες η απορρόφηση, ο μεταβολισμός, η κατανομή ή/και η αποβολή ενός φαρμάκου μεταβάλλονται τροποποιώντας την αποτελεσματικότητα των συστατικών του (Karin Seifert and Simon L. Croft 2006; Sharifi et al. 2006). Συνεπώς, απαιτείται περαιτέρω έρευνα προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο φαρμάκων και να διερευνηθεί η συσχέτιση μεταξύ των φυσικοχημικών αλληλεπιδράσεων και των βιολογικών τους δράσεων.

6. Συμπεράσματα και πρωτοτυπία μελέτης

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή εξετάστηκε η αντιλεισμανιακή δράση ολικών φαινολικών κλασμάτων και απομονωμένων δευτερογενών μεταβολιτών προερχόμενα από το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο (EVOO). Οι ουσίες αυτές κατάφεραν να περιορίσουν *in vitro* τον πολλαπλασιασμό στελεχών του παρασίτου του γένους *Leishmania* που ευθύνονται για τη σπλαγχνική και τη δερματική μορφή της νόσου. Επιπλέον, τα TPFs που αξιολογήθηκαν στην παρούσα μελέτη αναδείχθηκαν ως ικανά να επάγουν προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο σε προμαστιγώτες *Leishmania*, ενώ η μεταξύ τους σύγκριση ανέδειξε το TPF2 ως πιο υποσχόμενο αντιλεισμανιακό παράγοντα συγκριτικά με το «φτωχότερο» ως προς την πολυφαινολική του σύνθεση TPF1. Τα παραπάνω αποτελέσματα σηματοδοτούν τη θετική επίδραση της παρουσίας των OLEA και OLEO, σεκοϊριδοειδών ουσιών που αποτελούν εστέρες των HT και T, αντίστοιχα, που θα μπορούσαν να διαμεσολαβήσουν στην απελευθέρωση των HT και T σε ένα βιολογικό σύστημα μέσω μεταβολικών διαδικασιών. Πράγματι, κατά την αξιολόγηση της μονήρους λεισμανιοκτόνου δράσης των απομονωμένων πολυφαινολικών ουσιών, η OLEO αποδείχθηκε ως ισχυρότερη μεταξύ των OLEA, HT και OLE, στο σύνολο των πειραματικών διαδικασιών.

Η πρωτοτυπία της παρούσας διατριβής, πέραν την συγκριτικής μελέτης των δύο πολυφαινολικών κλασμάτων ως οικονομικότερων και ευκολότερα προσβάσιμων εν δυνάμει φαρμάκων έναντι της λεισμανίασης, βρίσκεται και στη διερεύνηση μίας νέας προσέγγισης για την αντιμετώπιση της νόσου, με τη χρήση συνδυαστικής χημειοθεραπείας εμπορικά διαθέσιμων φαρμάκων με φυσικά προϊόντα του ελαιόδεντρου (φαινολικά κλάσματα και απομονωμένες ουσίες). Τα δύο υπό μελέτη κλάσματα και η απομονωμένη OLEO, έδωσαν τα πιο υποσχόμενα αποτελέσματα όταν συνδυάστηκαν με το τυπικό αντιλεισμανιακό φάρμακο HePC, οδηγώντας σε αθροιστική και συνεργιστική αλληλεπίδραση, αντίστοιχα. Η προοπτική της ταυτόχρονης χορήγησης δύο λεισμανιοκτόνων παραγόντων δημιουργεί προϋποθέσεις μίας ασφαλέστερης, λιγότερο τοξικής και οικονομικότερης θεραπείας. Η προοπτική αυτή ενισχύεται περαιτέρω αν αξιολογηθεί υπό το πρίσμα της ταυτόχρονης ανοσοτροποποιητικής δράσης των υποσχόμενων φυσικών προϊόντων. Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας συμβάλλουν στη δημιουργία επιστημονικής γνώσης, για την ανάπτυξη μιας καινοτόμου θεραπείας για τη λεισμανίαση, η οποία δεν στοχεύει μόνο στην εξάλειψη του παρασίτου, αλλά ταυτόχρονα είναι ικανή να ενεργοποιεί μία κατάλληλη προστατευτική ανοσολογική απόκριση. Η αποδεδειγμένη αντιφλεγμονώδης δράση του ελαιολάδου, αποτελεί την πλέον ενδεδειγμένη επιλογή φυσικού προϊόντος, διότι στοχεύει στο πιο σημαντικό σημείο του ανοσολογικού ελέγχου, αυτό της ισχυρής προφλεγμονώδους απόκρισης, με στόχο τη βελτίωση της κλινικής εικόνας της νόσου παρεμβαίνοντας στην σπλαγχνική ή δερματική

εξάπλωση του παρασίτου. Συνοψίζοντας, η διερεύνηση της συνδυαστικής θεραπευτικής δράσης των βιοφαινολών του ελαιολάδου, στη ρύθμιση γονιδίων που εμπλέκονται σε ανοσολογικούς μηχανισμούς που ενορχηστρώνουν την πορεία της ανάπτυξης ενδοκυττάρων παρασιτικών νοσημάτων, φαίνεται να ανοίγει έναν νέο δρόμο στην εφαρμογή θεραπευτικών σχημάτων με συστατικά του εξαιρετικά παρθένου ελαιόλαδου, είτε ως συμπληρωμάτων, είτε ως φαρμάκων έναντι φλεγμονωδών, παρασιτικών και άλλων νοσημάτων.

7. Βιβλιογραφία

- Abadías-Granado, I., A. Diago, P. A. Cerro, A. M. Palma-Ruiz, and Y. Gilaberte. 2021. "Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis." *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)* 112:601–18.
- Abou-El-Naga, Iman Fathy, Rasha Fadly Mady, and Nermine Mogahed Fawzy Hussien Mogahed. 2020. "In Vitro Effectivity of Three Approved Drugs and Their Synergistic Interaction against Leishmania Infantum." *Biomedica* 40:89–101.
- Agiomyrgianaki, Alexia, Panos V. Petrakis, and Photis Dais. 2012. "Influence of Harvest Year, Cultivar and Geographical Origin on Greek Extra Virgin Olive Oils Composition: A Study by NMR Spectroscopy and Biometric Analysis." *Food Chemistry* 135:2561–68.
- Aguiar, Marta Gontijo, Diana Lara Silva, Fernando Antônio Nunan, Elzília Aguiar Nunan, Ana Paula Fernandes, and Lucas Antônio Miranda Ferreira. 2009. "Combined Topical Paromomycin and Oral Miltefosine Treatment of Mice Experimentally Infected with Leishmania (Leishmania) Major Leads to Reduction in Both Lesion Size and Systemic Parasite Burdens." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64:1234–40.
- Ajal, El Amine, Salah Chaji, Sanae Moussafir, Rachid Nejjari, Abdelmajid Soulaymani, and Aadil Bajoub. 2021. "Virgin Olive Oil Phenolic Compounds: Insights on Their Occurrence, Health-Promoting Properties and Bioavailability." Pp. 1–26 in *Olive Oil*.
- Akhoundi, Mohammad, Katrin Kuhls, Arnaud Cannet, Jan Votýpka, Pierre Marty, Pascal Delaunay, and Denis Sereno. 2016. "A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10:e0004349.
- Alexander, James, and Frank Brombacher. 2012. "T Helper1/T Helper2 Cells and Resistance/Susceptibility to Leishmania Infection: Is This Paradigm Still Relevant?" *Frontiers in Immunology* 3:80.
- Ali, Rahat, Shams Tabrez, Sajjadul Kadir Akand, Fazlur Rahman, Atahar Husein, Mohd Arish, Ali S. Alqahtani, Mohammad Z. Ahmed, Mohammad Husain, and Abdur Rub. 2021. "Sesamol Induces Apoptosis-Like Cell Death in Leishmania Donovanii." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11:749420.
- Alvar, Jorge, Pilar Aparicio, Abraham Aseffa, Margriet Den Boer, Carmen Cañavate, Jean Pierre Dedet, Luigi Gradoni, Rachel Ter Horst, Rogelio López-Vélez, and Javier Moreno. 2008. "The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: The Second 10 Years." *Clinical Microbiology Reviews* 21:334–59.
- Alvar, Jorge, Simon Croft, and Piero Olliaro. 2006. "Chemotherapy in the Treatment and Control of Leishmaniasis." *Advances in Parasitology* 61:223–74.
- Alvar, Jorge, Sergio Yactayo, and Caryn Bern. 2006. "Leishmaniasis and Poverty." *Trends in Parasitology* 22:552–57.
- Alves, Michel Muálem de Moraes, Daniel Dias Rufino Arcanjo, Rita Cássia Viana de Carvalho, Layane Valéria Amorim, Ingedy Lopes Dos Santos, Rodolfo Ritchelle Lopes Santos, Kayo Alves Figueiredo, Jessica Freire Silva Figueiredo, Enoque Pereira Costa Sobrinho-Júnior, Lucas Pereira Lima da Cruz, Valeria Carlos Sousa, Laiz Pinheiro Dos Santos, Juan Carlos Ramos Gonçalves, Sabrina Maria Portela Carneiro, Ivete Lopes de Mendonça, and Fernando Aécio de Amorim Carvalho. 2021. "METHODS OF MACROPHAGES ACTIVATION

AND THEIR MODULATION FOR THE PROSPECTION OF NEW ANTILEISHMANIA DRUGS: A REVIEW." *Bioscience Journal* 37:e37077.

- Alviano, Daniela Sales, Anna Léa Silva Barreto, Felipe de Almeida Dias, Igor de Almeida Rodrigues, Maria do Socorro dos Santos Rosa, Celuta Sales Alviano, and Rosângela Maria de Araújo Soares. 2012. "Conventional Therapy and Promising Plant-Derived Compounds against Trypanosomatid Parasites." *Frontiers in Microbiology* 3:283.
- Andrade-Neto, Valter Viana, Edézio Ferreira Cunha-Júnior, Marilene Marcuzzo Do Canto-Cavaleiro, Geórgia Correa Atella, Talita De Almeida Fernandes, Paulo Roberto Ribeiro Costa, and Eduardo Caio Torres-Santos. 2016. "Antileishmanial Activity of Ezetimibe: Inhibition of Sterol Biosynthesis, in Vitro Synergy with Azoles, and Efficacy in Experimental Cutaneous Leishmaniasis." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60:6844–52.
- Angelis, Apostolis, Mahmoud Hamzaoui, Nektarios Aligiannis, Theodora Nikou, Dimitris Michailidis, Panagiotis Gerolimatos, Aikaterini Termentzi, Jane Hubert, Maria Halabalaki, Jean Hugues Renault, and Alexios Léandros Skaltsounis. 2017. "An Integrated Process for the Recovery of High Added-Value Compounds from Olive Oil Using Solid Support Free Liquid-Liquid Extraction and Chromatography Techniques." *Journal of Chromatography A* 1491:126–36.
- Angeloni, Cristina, Marco Malaguti, Maria Cristina Barbalace, and Silvana Hrelia. 2017. "Bioactivity of Olive Oil Phenols in Neuroprotection." *International Journal of Molecular Sciences* 18:2230.
- Antinori, S., E. Longhi, G. Bestetti, R. Piolini, V. Acquaviva, A. Foschi, S. Trovati, C. Parravicini, M. Corbellino, and L. Meroni. 2007. "Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis as an Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome in a Patient with Acquired Immune Deficiency Syndrome." *British Journal of Dermatology* 157:1032–36.
- Antwi, Christine Achiaa, Cynthia Mmalebna Amisigo, Jonathan Partt Adjimani, and Theresa Manful Gwira. 2019. "In Vitro Activity and Mode of Action of Phenolic Compounds on Leishmania Donovanii." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13:e0007206.
- Aparicio-Soto, Marina, Marina Sánchez-Hidalgo, M. Ángeles Rosillo, M. Luisa Castejón, and Catalina Alarcón-De-La-Lastra. 2016. "Extra Virgin Olive Oil: A Key Functional Food for Prevention of Immune-Inflammatory Diseases." *Food and Function* 7:4492–4505.
- Arenas, Roberto, Edoardo Torres-Guerrero, Marco Romano Quintanilla-Cedillo, and Julieta Ruiz-Esmenjaud. 2017. "Leishmaniasis: A Review." *F1000Research* 6:750.
- Ayoub, Nehad M., Abu Bakar Siddique, Hassan Y. Ebrahim, Mohamed M. Mohyeldin, and Khalid A. El Sayed. 2017. "The Olive Oil Phenolic (-)-Oleocanthal Modulates Estrogen Receptor Expression in Luminal Breast Cancer in Vitro and in Vivo and Synergizes with Tamoxifen Treatment." *European Journal of Pharmacology* 810:100–111.
- Bañuls, Anne Laure, Mallorie Hide, and Franck Prugnolle. 2007. "Leishmania and the Leishmaniasis: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans." *Advances in Parasitology* 64:64001–3.
- Barker, Douglas C., and Janice Butcher. 1983. "The Use of DNA Probes in the Identification of Leishmaniasis: Discrimination between Isolates of the Leishmania Mexicana and L.

Braziliensis Complexes*." *TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE* 77:285-297.

Basher A., Rashid MM., Habibullah AM., Nath R., Akter D., Chowdhury IH., Azim A., Nath P., Faiz MA. 2019. "Miltefosine Induced Reduced Male Fertility Capacity after Treatment of Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis, Bangladesh." *Mymensingh Med* 28:328–32.

Basmaciyan, Louise, Nadine Azas, and Magali Casanova. 2018. "Different Apoptosis Pathways in Leishmania Parasites." *Cell Death Discovery* 4:90.

Basmaciyan, Louise, and Magali Casanova. 2019. "La Mort Cellulaire Chez Leishmania." *Parasite (Paris, France)* 26:71.

Bastos, Mônica Mac Edo, Lucas Villas Bôas Hoelz, Núbia Boechat, and Andressa Paula De Oliveira. 2016. "Antileishmanial Chemotherapy: A Literature Review." *Revista Virtual de Quimica* 8:2072–2104.

Batarseh, Yazan S., and Amal Kaddoumi. 2017. "Oleocanthal-Rich Extra-Virgin Olive Oil Enhances Donepezil Effect by Reducing Amyloid- β Load and Related Toxicity in a Mouse Model of Alzheimer's Disease." *Journal of Nutritional Biochemistry* 55:113–23.

Bates, Paul A. 2007. "Transmission of Leishmania Metacyclic Promastigotes by Phlebotomine Sand Flies." *International Journal for Parasitology* 37:1097–1106.

Bates, Paul A. 2009. "Leishmania Sand Fly Interaction: Progress and Challenges." *Current Opinion in Microbiology* 11:340–44.

Batista, Marina Ferreira, Carlos Alcides Nájera, Isabela Meneghelli, and Diana Bahia. 2020. "The Parasitic Intracellular Lifestyle of Trypanosomatids: Parasitophorous Vacuole Development and Survival." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8:396.

Beauchamp, Gary K., Russell S. J. Keast, Diane Morel, Jianming Lin, Jana Pika, Qiang Han, Chi Ho Lee, Amos B. Smith, and Paul A. S. Breslin. 2005. "Ibuprofen-like Activity in Extra-Virgin Olive Oil." *Nature* 437:45–46.

Belmonte-Reche, Efres, Marta Martínez-García, Pablo Peñalver, Verónica Gómez-Pérez, Ricardo Lucas, Francisco Gamarro, José María Pérez-Victoria, and Juan Carlos Morales. 2016. "Tyrosol and Hydroxytyrosol Derivatives as Antitrypanosomal and Antileishmanial Agents." *European Journal of Medicinal Chemistry* 119:132–40.

Bertelli, Matteo, Aysha Karim Kiani, Stefano Paolacci, Elena Manara, Danjela Kurti, Kristjana Dhuli, Vilma Bushati, Jan Miertus, Domenico Pangallo, Mirko Baglivo, Tommaso Beccari, and Sandro Michelini. 2020. "Hydroxytyrosol: A Natural Compound with Promising Pharmacological Activities." *Journal of Biotechnology* 309:29–33.

Besteiro, Sébastien, Roderick A. M. Williams, Graham H. Coombs, and Jeremy C. Mottram. 2007. "Protein Turnover and Differentiation in Leishmania." *International Journal for Parasitology* 37:1063–75.

Bi, Kaiming, Yuyang Chen, Songnian Zhao, Yan Kuang, and Chih Hang John Wu. 2018. "Current Visceral Leishmaniasis Research: A Research Review to Inspire Future Study." *BioMed Research International* 2018:13.

- Bilal, Rana M., Chunjie Liu, Haohan Zhao, Yanzhou Wang, Mayada R. Farag, Mahmoud Alagawany, Faiz Ul Hassan, Shaaban S. Elnesr, Hamada A. M. Elwan, Huajiao Qiu, and Qian Lin. 2021. "Olive Oil: Nutritional Applications, Beneficial Health Aspects and Its Prospective Application in Poultry Production." *Frontiers in Pharmacology* 12:723040.
- BioNinja. 2022. "Cell Death." Retrieved January 14, 2023 (<https://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-1-cell-biology/16-cell-division/cell-death.html>).
- Bongiorno, David, Vita Di Stefano, Serena Indelicato, Giuseppe Avellone, and Leopoldo Ceraulo. 2021. "Bio-Phenols Determination in Olive Oils: Recent Mass Spectrometry Approaches." *Mass Spectrometry Reviews* 2022:e21744.
- Borzi, Antonio Maria, Antonio Biondi, Francesco Basile, Salvatore Luca, Enzo Saretto Dante Vicari, and Marco Vacante. 2019. "Olive Oil Effects on Colorectal Cancer." *Nutrients* 11:32.
- Boskou, Dimitrios. 2006. *Olive Oil : Chemistry and Technology*. AOCs Press.
- Bouguerra Neji, Soumaya, and Mohamed Bouaziz. 2022. "Production of Biologically Active Hydroxytyrosol Rich Extract: Via Catalytic Conversion of Tyrosol." *RSC Advances* 12:2595–2602.
- Boutsini, Sofia, Labrini V. Athanasiou, Gregory Spanakos, Dimitra Ntousi, Eleni Dotsika, Marina Bisia, and Elias Papadopoulos. 2017. "Phlebotomine Sandflies and Factors Associated with Their Abundance in the Leishmaniasis Endemic Area of Attiki, Greece." *Parasitology Research* 117:107–13.
- Brauchle, Eva, Sibylle Thude, Sara Y. Brucker, and Katja Schenke-Layland. 2014. "Cell Death Stages in Single Apoptotic and Necrotic Cells Monitored by Raman Microspectroscopy." *Scientific Reports* 4:4698.
- Brindha, J., M. M. Balamurali, and Kaushik Chanda. 2021. "An Overview on the Therapeutics of Neglected Infectious Diseases—Leishmaniasis and Chagas Diseases." *Frontiers in Chemistry* 9:622286.
- Buckland, G., N. Travier, V. Cottet, C. A. González, L. Luján-Barroso, A. Agudo, A. Trichopoulou, P. Lagiou, D. Trichopoulos, P. H. Peeters, A. May, H. B. Bueno-De-Mesquita, F. J. Bvan Duijnhoven, T. J. Key, N. Allen, K. T. Khaw, N. Wareham, I. Romieu, V. McCormack, M. Boutron-Ruault, F. Clavel-Chapelon, S. Panico, C. Agnoli, D. Palli, R. Tumino, P. Vineis, P. Amiano, A. Barricarte, L. Rodríguez, M. J. Sanchez, M. D. Chirlaque, R. Kaaks, B. Teucher, H. Boeing, M. M. Bergmann, K. Overvad, C. C. Dahm, A. Tjønneland, A. Olsen, J. Manjer, E. Wirfält, G. Hallmans, I. Johansson, E. Lund, A. Hjärker, G. Skeie, A. C. Vergnaud, T. Norat, D. Romaguera, and E. Riboli. 2013. "Adherence to the Mediterranean Diet and Risk of Breast Cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Cohort Study." *International Journal of Cancer* 132:2918–27.
- Burza, Sakib, Simon L. Croft, and Marleen Boelaert. 2018. "Leishmaniasis." *The Lancet* 392:951–70.
- Callahan, Heather L., André Ia, C. Portal, Robert Devereaux, and Max Grogil. 1997. "An Axenic Amastigote System for Drug Screening." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41:818–22.

- Carter, Nicola S., Brendan D. Stamper, Fawzy Elbarbry, Vince Nguyen, Samuel Lopez, Yumena Kawasaki, Reyhaneh Poormohamadian, and Sigrid C. Roberts. 2021. "Natural Products That Target the Arginase in Leishmania Parasites Hold Therapeutic Promise." *Microorganisms* 9:267.
- Carvalho, Edgar M., Olivia Bacellar, Aldina Barral, Roberto Badaro, and Warren D. Johnson. 1989. *Antigen-Specific Immunosuppression in Visceral Leishmaniasis Is Cell Mediated*.
- Casas, Rosa, Ramon Estruch, and Emilio Sacanella. 2017. "The Protective Effects of Extra Virgin Olive Oil on Immune-Mediated Inflammatory Responses." *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 18:23–35.
- Castañer, Olga, Montserrat Fitó, M. Carmen López-Sabater, Henrik E. Poulsen, Kristiina Nyyssönen, Helmut Schröder, Jukka T. Salonen, Karina De la Torre-Carbot, Hans Franz Zunft, Rafael De la Torre, Hans Bäumler, Antonio V. Gaddi, Guillermo T. Saez, Marta Tomás, and Maria Isabel Covas. 2011. "The Effect of Olive Oil Polyphenols on Antibodies against Oxidized LDL. A Randomized Clinical Trial." *Clinical Nutrition* 30:490–93.
- Castillo-Luna, A., I. Criado-Navarro, C. A. Ledesma-Escobar, M. A. López-Bascón, and F. Priego-Capote. 2021. "The Decrease in the Health Benefits of Extra Virgin Olive Oil during Storage Is Conditioned by the Initial Phenolic Profile." *Food Chemistry* 336:127730.
- Castro-Barquero, Sara, Rosa M. Lamuela-Raventós, Mónica Doménech, and Ramon Estruch. 2018. "Relationship between Mediterranean Dietary Polyphenol Intake and Obesity." *Nutrients* 10:1523.
- Castro, Emanuella, Thamile Luciane Reus, Alessandra Melo de Aguiar, Andrea Rodrigues Ávila, and Tatiana de Arruda Campos Brasil de Souza. 2017. "Procaspase-Activating Compound-1 Induces Apoptosis in Trypanosoma Cruzi." *Apoptosis* 22:1564–77.
- CDC. 2020. "Center of Disease Control and Prevention." Retrieved December 18, 2022 (<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>).
- Cerretani, Lorenzo, Tullia Gallina Toschi, and Alessandra Bendini. 2009. "Phenolic Fraction of Virgin Olive Oil: An Overview on Identified Compounds and Analytical Methods for Their Determination." *Functional Plant Science and Biotechnology* 3:69–80.
- Cerretani, Lorenzo, Tullia Gallina Toschi, and Alessandra Bendini. 2009. "Phenolic Fraction of Virgin Olive Oil: An Overview on Identified Compounds and Analytical Methods for Their Determination." *Functional Plant Science and Biotechnology* 3:69–80.
- Chakravarty, Jaya, and Shyam Sundar. 2019. "Current and Emerging Medications for the Treatment of Leishmaniasis." *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 20:1251–65.
- Chappuis, François, Shyam Sundar, Asrat Hailu, Hashim Ghalib, Suman Rijal, Rosanna W. Peeling, Jorge Alvar, and Marleen Boelaert. 2007. "Visceral Leishmaniasis: What Are the Needs for Diagnosis, Treatment and Control?" *Nature Reviews Microbiology* 5:873–82.
- Chen, Shun, An Chun Cheng, Ming Shu Wang, and Xi Peng. 2008. "Detection of Apoptosis Induced by New Type Gosling Viral Enteritis Virus in Vitro through Fluorescein Annexin V-FITC/PI Double Labeling." *World Journal of Gastroenterology* 14:2174–78.
- Chou, Ting Chao. 2006. "Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation

- of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies." *Pharmacological Reviews* 58(3):621–81.
- Chouhan, Garima, Mohammad Islamuddin, Muzamil Y. Want, Hani A. Ozbak, Hassan A. Hemeg, Dinkar Sahal, and Farhat Afrin. 2015. "Leishmanicidal Activity of Piper Nigrum Bioactive Fractions Is Interceded via Apoptosis in Vitro and Substantiated by Th1 Immunostimulatory Potential in Vivo." *Frontiers in Microbiology* 6:1368.
- Christodoulou, Vasiliki, Maria Antoniou, Pantelis Ntais, Ippokratis Messaritakis, Vladimir Ivovic, Jean Pierre Dedet, Francine Pratlong, Vít Dvorak, and Yiannis Tselentis. 2012. "Re-Emergence of Visceral and Cutaneous Leishmaniasis in the Greek Island of Crete." *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 12:214–22.
- De Cicco, Paola, Maria Valeria Catani, Valeria Gasperi, Matteo Sibilano, Maria Quaglietta, and Isabella Savini. 2019. "Nutrition and Breast Cancer: A Literature Review on Prevention, Treatment and Recurrence." *Nutrients* 11:1514.
- Cicerale, Sara, Xavier A. Conlan, Andrew J. Sinclair, and Russell S. J. Keast. 2009. "Chemistry and Health of Olive Oil Phenolics." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 49:218–36.
- Collin, Matthew, and Venetia Bigley. 2018. "Human Dendritic Cell Subsets: An Update." *Immunology* 154:3–20.
- COMMISSION REGULATION (EU). 2012. *Establishing a List of Permitted Health Claims Made on Foods, Other than Those Referring to the Reduction of Disease Risk and to Children's Development and Health*.
- Corona, Giulia, Xenofon Tzounis, M. Assunta Dessì, Monica Deiana, Edward S. Debnam, Francesco Visioli, and Jeremy P. E. Spencer. 2006. "The Fate of Olive Oil Polyphenols in the Gastrointestinal Tract: Implications of Gastric and Colonic Microflora-Dependent Biotransformation." *Free Radical Research* 40:647–58.
- Corral, M. J., E. González-Sánchez, M. Cuquerella, and J. M. Alunda. 2014. "In Vitro Synergistic Effect of Amphotericin B and Allicin on Leishmania Donovanii and L. Infantum." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58:1596–1602.
- Corral, María J., Elena Benito-Peña, M. Dolores Jiménez-Antón, Laureano Cuevas, María C. Moreno-Bondi, and José M. Alunda. 2016. "Allicin Induces Calcium and Mitochondrial Dysregulation Causing Necrotic Death in Leishmania." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10:e0004525.
- Costa-Da-silva, Ana Caroline, Danielle de Oliveira Nascimento, Jesuino R. M. Ferreira, Kamila Guimarães-Pinto, Leonardo Freire-De-lima, Alexandre Morrot, Debora Decote-Ricardo, Alessandra Almeida Filardy, and Celio Geraldo Freire-De-lima. 2022. "Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview." *Tropical Medicine and Infectious Disease* 7:54.
- Costa, Sonya, Marisa Machado, Cláudia Cavadas, and Maria do Céu Sousa. 2016. "Antileishmanial Activity of Antiretroviral Drugs Combined with Miltefosine." *Parasitology Research* 115:3881–87.
- Courret, Nathalie, Claude Fréhel, Nelly Gouhier, Marcel Pouchelet, Eric Prina, Pascal Roux, and Jean-Claude Antoine. 2002. "Biogenesis of Leishmania-Harboring Parasitophorous

Vacuoles Following Phagocytosis of the Metacyclic Promastigote or Amastigote Stages of the Parasites." *Journal of Cell Science* 115:2303–16.

Couto, E., P. Boffetta, P. Lagiou, P. Ferrari, G. Buckland, K. Overvad, C. C. Dahm, A. Tjønneland, A. Olsen, F. Clavel-Chapelon, M. C. Boutron-Ruault, V. Cottet, D. Trichopoulos, A. Naska, V. Benetou, R. Kaaks, S. Rohrmann, H. Boeing, A. Von Ruesten, S. Panico, V. Pala, P. Vineis, D. Palli, R. Tumino, A. May, P. H. Peeters, H. B. Bueno-De-Mesquita, F. L. Büchner, E. Lund, G. Skeie, D. Engeset, C. A. Gonzalez, C. Navarro, L. Rodríguez, M. J. Sánchez, P. Amiano, A. Barricarte, G. Hallmans, I. Johansson, J. Manjer, E. Wirfält, N. E. Allen, F. Crowe, K. T. Khaw, N. Wareham, A. Moskal, N. Slimani, M. Jenab, D. Romaguera, T. Mouw, T. Norat, E. Riboli, and A. Trichopoulou. 2011. "Mediterranean Dietary Pattern and Cancer Risk in the EPIC Cohort." *British Journal of Cancer* 104:1493–99.

Criado-Navarro, Inmaculada, María Asunción López-Bascón, and Feliciano Priego-Capote. 2020. "Evaluating the Variability in the Phenolic Concentration of Extra Virgin Olive Oil According to the Commission Regulation (EU) 432/2012 Health Claim." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68:9070–80.

Croft, S. L., and P. Olliaro. 2011. "Leishmaniasis Chemotherapy-Challenges and Opportunities." *Clinical Microbiology and Infection* 17:1478–83.

D'Arcy, Mark S. 2019. "Cell Death: A Review of the Major Forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy." *Cell Biology International* 43:582–92.

Darzynkiewicz, Zbigniew, and Elzbieta Bedner. 2000. "Analysis of Apoptotic Cells by Flow and Laser Scanning Cytometry." *Methods in Enzymology* 322:18–39.

David, Consuelo V., and Noah Craft. 2009. "Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis." *Dermatologic Therapy* 22:491–502.

Dayakar, Alti, Sambamurthy Chandrasekaran, Suresh V. Kuchipudi, and Suresh K. Kalangi. 2019. "Cytokines: Key Determinants of Resistance or Disease Progression in Visceral Leishmaniasis: Opportunities for Novel Diagnostics and Immunotherapy." *Frontiers in Immunology* 10:670.

Dayakar, Alti, Sambamurthy Chandrasekaran, Jalaja Veronica, Shyam Sundar, and Radheshyam Maurya. 2015. "In Vitro and in Vivo Evaluation of Anti-Leishmanial and Immunomodulatory Activity of Neem Leaf Extract in Leishmania Donovanii Infection." *Experimental Parasitology* 153:45–54.

Diamantakos, Panagiotis, Kostas Ioannidis, Christos Papanikolaou, Annia Tsolakou, Aimilia Rigakou, Eleni Melliou, and Prokopios Magiatis. 2021. "A New Definition of the Term 'High-Phenolic Olive Oil' Based on Large Scale Statistical Data of Greek Olive Oils Analyzed by Qnmr." *Molecules* 26:1115.

Domínguez, Mercedes, Inmaculada Moreno, Margarita López-Trascasa, and Alfredo Toraño. 2002. "Complement Interaction with Trypanosomatid Promastigotes in Normal Human Serum." *Journal of Experimental Medicine* 195:451–59.

Dores Moreira, Nádia Das, Juliana Vitoriano-Souza, Bruno Mendes Roatt, Paula Melo De Abreu Vieira, Wendel Coura-Vital, Jamille Mirelle De Oliveira Cardoso, Mariana Trevisan Rezende, Henrique Gama Ker, Rodolfo Cordeiro Giunchetti, Claudia Martins Carneiro, and Alexandre Barbosa Reis. 2016. "Clinical, Hematological and Biochemical Alterations

- in Hamster (*Mesocricetus Auratus*) Experimentally Infected with *Leishmania Infantum* through Different Routes of Inoculation." *Parasites and Vectors* 9:181.
- Dowlati, Yahya. 1996. "Cutaneous Leishmaniasis: Clinical Aspect." *Clinics in Dermatology* 14:425–31.
- Duque, Guillermo Arango, and Albert Descoteaux. 2014. "Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases." *Frontiers in Immunology* 5:491.
- Dutta, Avijit, Suman Bandyopadhyay, Chitra Mandal, and Mitali Chatterjee. 2007. "Aloe Vera Leaf Exudate Induces a Caspase-Independent Cell Death in *Leishmania Donovanii* Promastigotes." *Journal of Medical Microbiology* 56:629–36.
- Dutta, Avijit, Angana Ghoshal, Debayan Mandal, Nirup B. Mondal, Sukdeb Banerjee, Niranjan P. Sahu, and Chitra Mandal. 2007. "Racemoside A, an Anti-Leishmanial, Water-Soluble, Natural Steroidal Saponin, Induces Programmed Cell Death in *Leishmania Donovanii*." *Journal of Medical Microbiology* 56:1196–1204.
- Dutta, Avijit, Debjani Sarkar, Ameenah Gurib-Fakim, Chitra Mandal, and Mitali Chatterjee. 2008. "In Vitro and in Vivo Activity of Aloe Vera Leaf Exudate in Experimental Visceral Leishmaniasis." *Parasitology Research* 102:1235–42.
- EFSA. 2011. "Scientific Opinion on the Substantiation of Health Claims Related to Polyphenols in Olive and Protection of LDL Particles from Oxidative Damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), Maintenance of Normal Blood HDL Cholesterol Concentrations (ID 1639), Mainte." *EFSA Journal* 9:2033.
- El, Sedef N., and Sibel Karakaya. 2009. "Olive Tree (*Olea Europaea*) Leaves: Potential Beneficial Effects on Human Health." *Nutrition Reviews* 67:632–38.
- Elamin, Maha H., and Salyha S. Al-Maliki. 2014. "Leishmanicidal and Apoptotic Activities of Oleuropein on *Leishmania Major*." *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 52:880–88.
- Elmore, Susan. 2007. "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death." *Toxicol Pathol.* 35:495–516.
- Emma, Maria Rita, Giuseppa Augello, Vita Di Stefano, Antonina Azzolina, Lydia Giannitrapani, Giuseppe Montalto, Melchiorre Cervello, and Antonella Cusimano. 2021. "Potential Uses of Olive Oil Secoiridoids for the Prevention and Treatment of Cancer: A Narrative Review of Preclinical Studies." *International Journal of Molecular Sciences* 22:1–22.
- Eruslanov, Evgeniy, and Sergei Kusmartsev. 2010. "Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry." *Methods in Molecular Biology* 594:57–72.
- ESCMID, European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing EUCAST of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2000. "Terminology Relating to Methods for the Determination of Susceptibility of Bacteria to Antimicrobial Agents." *Clinical Microbiology and Infection* 6:503–8.
- Fitzgerald, Jonathan B., Birgit Schoeberl, Ulrik B. Nielsen, and Peter K. Sorger. 2006. "Systems Biology and Combination Therapy in the Quest for Clinical Efficacy." *Nature Chemical Biology* 2:458–66.

- Fivelman, Quinton L., Ipemida S. Adagu, and David C. Warhurst. 2004. "Modified Fixed-Ratio Isobologram Method for Studying in Vitro Interactions between Atovaquone and Proguanil or Dihydroartemisinin against Drug-Resistant Strains of Plasmodium Falciparum." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48:4097–4102.
- Fonseca-Silva, Fernanda, Marilene M. Canto-Cavalheiro, Rubem F. S. Menna-Barreto, and Elmo E. Almeida-Amaral. 2015. "Effect of Apigenin on Leishmania Amazonensis Is Associated with Reactive Oxygen Species Production Followed by Mitochondrial Dysfunction." *Journal of Natural Products* 78:880–84.
- Fonseca-Silva, Fernanda, Job D. F. Inacio, Marilene M. Canto-Cavalheiro, and Elmo Eduardo Almeida-Amaral. 2011. "Reactive Oxygen Species Production and Mitochondrial Dysfunction Contribute to Quercetin Induced Death in Leishmania Amazonensis." *PLoS ONE* 6:e14666.
- Formaglio, Pauline, Mohamad Alabdullah, Anastasios Siokis, Juliane Handschuh, Ina Sauerland, Yan Fu, Anna Krone, Patricia Gintschel, Juliane Stettin, Sandrina Heyde, Juliane Mohr, Lars Philipsen, Anja Schröder, Philippe A. Robert, Gang Zhao, Sahamoddin Khailaie, Anne Dudeck, Jessica Bertrand, Gerald F. Späth, Sascha Kahlfuß, Philippe Bouso, Burkhardt Schraven, Jochen Huehn, Sebastian Binder, Michael Meyer-Hermann, and Andreas J. Müller. 2021. "Nitric Oxide Controls Proliferation of Leishmania Major by Inhibiting the Recruitment of Permissive Host Cells." *Immunity* 54:2724-2739.e10.
- Foroutan-Rad, Masoud, Shahram Khademvatan, Jasem Saki, and Mahmoud Hashemitabar. 2016. "Holothuria Leucospilota Extract Induces Apoptosis in Leishmania Major Promastigotes." *Iran J Parasitol* 11:339–49.
- Fratini, Filippo, Simone Mancini, Barbara Turchi, Elisabetta Friscia, Luisa Pistelli, Giulia Giusti, and Domenico Cerri. 2017. "A Novel Interpretation of the Fractional Inhibitory Concentration Index: The Case Origanum Vulgare L. and Leptospermum Scoparium J. R. et G. Forst Essential Oils against Staphylococcus Aureus Strains." *Microbiological Research* 195:11–17.
- Galluzzi, L., J. M. Bravo-San Pedro, I. Vitale, S. A. Aaronson, J. M. Abrams, D. Adam, E. S. Alnemri, L. Altucci, D. Andrews, M. Annicchiarico-Petruzzelli, E. H. Baehrecke, N. G. Bazan, M. J. Bertrand, K. Bianchi, M. V. Blagosklonny, K. Blomgren, C. Borner, D. E. Bredesen, C. Brenner, M. Campanella, E. Candi, F. Cecconi, F. K. Chan, N. S. Chandel, E. H. Cheng, J. E. Chipuk, J. A. Cidlowski, A. Ciechanover, T. M. Dawson, V. L. Dawson, V. De Laurenzi, R. De Maria, K. M. Debatin, N. Di Daniele, V. M. Dixit, B. D. Dynlacht, W. S. El-Deiry, G. M. Fimia, R. A. Flavell, S. Fulda, C. Garrido, M. L. Gougeon, D. R. Green, H. Gronemeyer, G. Hajnoczky, J. M. Hardwick, M. O. Hengartner, H. Ichijo, B. Joseph, P. J. Jost, T. Kaufmann, O. Kepp, D. J. Klionsky, R. A. Knight, S. Kumar, J. J. Lemasters, B. Levine, A. Linkermann, S. A. Lipton, R. A. Lockshin, C. López-Otín, E. Lugli, F. Madeo, W. Malorni, J. C. Marine, S. J. Martin, J. C. Martinou, J. P. Medema, P. Meier, S. Melino, N. Mizushima, U. Moll, C. Muñoz-Pinedo, G. Nuñez, A. Oberst, T. Panaretakis, J. M. Penninger, M. E. Peter, M. Piacentini, P. Pinton, J. H. Prehn, H. Puthalakath, G. A. Rabinovich, K. S. Ravichandran, R. Rizzuto, C. M. Rodrigues, D. C. Rubinsztein, T. Rudel, Y. Shi, H. U. Simon, B. R. Stockwell, G. Szabadkai, S. W. Tait, H. L. Tang, N. Tavernarakis, Y. Tsujimoto, T. Vanden Berghe, P. Vandenabeele, A. Villunger, E. F. Wagner, H. Walczak, E. White, W. G. Wood, J. Yuan, Z. Zakeri, B. Zhivotovsky, G. Melino, and G. Kroemer. 2015. "Essential versus Accessory Aspects of Cell Death: Recommendations of the NCCD 2015." *Cell Death and Differentiation* 22:58–73.

- Galluzzi, L., I. Vitale, J. M. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, T. M. Dawson, V. L. Dawson, W. S. El-Deiry, S. Fulda, E. Gottlieb, D. R. Green, M. O. Hengartner, O. Kepp, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, X. Lu, F. Madeo, W. Malorni, P. Mehlen, G. Nñez, M. E. Peter, M. Piacentini, D. C. Rubinsztein, Y. Shi, H. U. Simon, P. Vandenabeele, E. White, J. Yuan, B. Zhivotovsky, G. Melino, and G. Kroemer. 2012. "Molecular Definitions of Cell Death Subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012." *Cell Death and Differentiation* 19:107–20.
- García-Almagro, Domingo. 2005. "Cutaneous Leishmaniasis." *Actas Dermo-Sifiliograficas* 96:1–24.
- Gautam, Shalini, Rajiv Kumar, Neetu Singh, Abhishek Kumar Singh, Madhukar Rai, David Sacks, Shyam Sundar, and Susanne Nylén. 2014. "CD8 T Cell Exhaustion in Human Visceral Leishmaniasis." *Journal of Infectious Diseases* 209:290–99.
- Gervazoni, Luiza F. O., Gabrielle B. Barcellos, Taiana Ferreira-Paes, and Elmo E. Almeida-Amaral. 2020. "Use of Natural Products in Leishmaniasis Chemotherapy: An Overview." *Frontiers in Chemistry* 8:579891.
- Ghanbari, Rahele, Farooq Anwar, Khalid M. Alkharfy, Anwarul Hassan Gilani, and Nazamid Saari. 2012. "Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea Europaea* L.)-A Review." *International Journal of Molecular Sciences* 13:1291–1340.
- Ghodsian, Sahar, Niloofar Taghipour, Niloofar Deravi, Hamed Behniafar, and Zohreh Lasjerdi. 2020. "Recent Researches in Effective Antileishmanial Herbal Compounds: Narrative Review." *Parasitology Research* 119:3929–46.
- Gibson, Mary E. 1983. "THE IDENTIFICATION OF KALA AZAR AND THE DISCOVERY OF LEISHMANIA DONOVANI." *Medical History* 27:203–13.
- Gong, Xianghui, Zhuqing Liang, Yongxing Yang, Haifeng Liu, Jing Ji, and Yubo Fan. 2020. "A Resazurin-Based, Nondestructive Assay for Monitoring Cell Proliferation during a Scaffold-Based 3D Culture Process." *Regenerative Biomaterials* 7:271–81.
- Gorzynik-Debicka, Monika, Paulina Przychodzen, Francesco Cappello, Alicja Kuban-Jankowska, Antonella Marino Gammazza, Narcyz Knap, Michal Wozniak, and Magdalena Gorska-Ponikowska. 2018. "Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols." *International Journal of Molecular Sciences* 19:547.
- Gossage, Sharon M., Matthew E. Rogers, and Paul A. Bates. 2003. "Two Separate Growth Phases during the Development of Leishmania in Sand Flies: Implications for Understanding the Life Cycle." *Journal of Parasitology* 33:1027–34.
- Grevelink, Suzanne A., Ethan A. Lemer, and Phd Boston. 1996. "CLINICAL REVIEWS Leishmaniasis." *Journal of the American Academy of Dermatology* 34:257–72.
- Van Griensven, J., E. Carrillo, R. López-Vélez, L. Lynen, and J. Moreno. 2014. "Leishmaniasis in Immunosuppressed Individuals." *Clinical Microbiology and Infection* 20:286–99.
- van Griensven, Johan, and Ermias Diro. 2012. "Visceral Leishmaniasis." *Infectious Disease Clinics of North America* 26:309–22.

- van Griensven, Johan, and Ermias Diro. 2019. "Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens." *Infectious Disease Clinics of North America* 33:79–99.
- Griensven van, Johan, Manica Balasegaram, Filip Meheus, Jorge Alvar, Lutgarde Lynen, and Marleen Boelaert. 2010. "Combination Therapy for Visceral Leishmaniasis." *The Lancet Infectious Diseases* 10:184–94.
- Gueirard, Pascale, Annie Laplante, Christiane Rondeau, Geneviève Milon, and Michel Desjardins. 2008. "Trafficking of Leishmania Donovanii Promastigotes in Non-Lytic Compartments in Neutrophils Enables the Subsequent Transfer of Parasites to Macrophages." *Cellular Microbiology* 10:100–111.
- Guerin, Philippe J., Piero Olliaro, Shyam Sundar, Marleen Boelaert, Simon L. Croft, Philippe Desjeux, Monique K. Wasunna, and Anthony D. M. Bryceson. 2002. "Visceral Leishmaniasis: Current Status of Control, Diagnosis, and Treatment, and a Proposed Research and Development Agenda." *Lancet Infectious Diseases* 2:494–501.
- Gupta, S., M. M. Thapar, W. H. Wernsdorfer, and A. Björkman. 2002. "In Vitro Interactions of Artemisinin with Atovaquone, Quinine, and Mefloquine against Plasmodium Falciparum." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46:1510–15.
- Gurel, Mehmet Salih, Burak Tekin, and Soner Uzun. 2019. "Cutaneous Leishmaniasis: A Great Imitator." *Clinics in Dermatology* 38:140–51.
- Hachicha Hbaieb, Rim, Faten Kotti, Stefania Vichi, and Mohamed Gargouri. 2016. "Evolution of Endogenous Enzyme Activities and Virgin Olive Oil Characteristics during Chétoui and Chemlali Olive Ripening." *European Journal of Lipid Science and Technology* 119:1600150.
- Hailu, Asrat, Debbie Van Baarle, Gerlinde J. Knol, Nega Berhe, Frank Miedema, and Piet A. Kager. 2005. "T Cell Subset and Cytokine Profiles in Human Visceral Leishmaniasis during Active and Asymptomatic or Sub-Clinical Infection with Leishmania Donovanii." *Clinical Immunology* 117:182–91.
- Hall, M. J., R. F. Middleton, and D. Westmacott. 1983. "The Fractional Inhibitory Concentration (FIC) Index as a Measure of Synergy." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 11:427–33.
- Hammi, K. M., R. Essid, O. Tabbene, S. Elkahoui, H. Majdoub, and R. Ksouri. 2020. "Antileishmanial Activity of Moringa Oleifera Leaf Extracts and Potential Synergy with Amphotericin B." *South African Journal of Botany* 129:67–73.
- Hartley, Mary Anne, Stefan Drexler, Catherine Ronet, Stephen M. Beverley, and Nicolas Fasel. 2014. "The Immunological, Environmental, and Phylogenetic Perpetrators of Metastatic Leishmaniasis." *Trends in Parasitology* 30:412–22.
- HAYFLICK, L. 1965. "THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS." *Experimental Cell Research* 37:614–36.
- Heidari-Kharaji, Maryam, Vahid Fallah-Omrani, Alireza Badirzadeh, Behnam Mohammadi-Ghalehbin, Mohammad Ali Nilforoushzadeh, Leila Masoori, Hossein Montakhab-Yeganeh, and Mehrak Zare. 2019. "Sambucus Ebulus Extract Stimulates Cellular Responses in Cutaneous Leishmaniasis." *Parasite Immunology* 41:e12605.

- Hendrickx, Sarah, Magali Van den Kerkhof, Dorien Mabile, Paul Cos, Peter Delputte, Louis Maes, and Guy Caljon. 2017. "Combined Treatment of Miltefosine and Paromomycin Delays the Onset of Experimental Drug Resistance in *Leishmania Infantum*." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11:e0005620.
- Henry, Conor M., Emilie Hollville, and Seamus J. Martin. 2013. "Measuring Apoptosis by Microscopy and Flow Cytometry." *Methods* 61(2):90–97.
- Heras-Mosteiro, Julio, Begoña Monge-Maillo, Mariona Pinart, Patricia Lopez Pereira, Emely Garcia-Carrasco, Pedro Campuzano Cuadrado, Ana Royuela, Irene Mendez Roman, and Rogelio López-Vélez. 2017. "Interventions for Old World Cutaneous Leishmaniasis." *Cochrane Database of Systematic Reviews* 11:CD005067.
- Herwaldt, Barbara L. 1999. "Leishmaniasis." *The Lancet* 354:1191–99.
- Hommel, Marcel. 1999. "Visceral Leishmaniasis: Biology of the Parasite." *Journal of Infection* 39:101–11.
- Huang, Ruo Yue, Linlin Pei, Quanjin Liu, Shiqi Chen, Haibo Dou, Gang Shu, Zhi Xiang Yuan, Juchun Lin, Guangneng Peng, Wei Zhang, and Hualin Fu. 2019. "Isobologram Analysis: A Comprehensive Review of Methodology and Current Research." *Frontiers in Pharmacology* 10:1222.
- Ikeogu, Nnamdi M., Gloria N. Akaluka, Chidalu A. Edechi, Enitan S. Salako, Chukwunonso Onyilagha, Aida F. Barazandeh, and Jude E. Uzonna. 2020. "Leishmania Immunity: Advancing Immunotherapy and Vaccine Development." *Microorganisms* 8:1–21.
- Iliopoulou, Polixeni, Andreas Tsatsaris, Ioannis Katsios, Amalia Panagiotopoulou, Stelios Romaliades, Byron Papadopoulos, and Yannis Tselentis. 2018. "Risk Mapping of Visceral Leishmaniasis: A Spatial Regression Model for Attica Region, Greece." *Tropical Medicine and Infectious Disease* 3:83.
- Intakhan, Nuchpicha, Wetpisit Chanmol, Pradya Somboon, Michelle D. Bates, Vanessa Yardley, Paul A. Bates, and Narissara Jariyapan. 2020. "Antileishmanial Activity and Synergistic Effects of Amphotericin b Deoxycholate with Allicin and Andrographolide against *Leishmania Martiniquensis* in Vitro." *Pathogens* 9:49.
- IOC. 2009. "Determination of Biophenols in Olive Oil by HPLC." 29 1–8. Retrieved August 4, 2022 (<https://www.internationaloliveoil.org/what-we-do/chemistry-standardisation-unit/standards-and-methods/>).
- Islamuddin, Mohammad, Garima Chouhan, Muzamil Y. Want, Maujiram Tyagi, Malik Z. Abdin, Dinkar Sahal, and Farhat Afrin. 2014. "Leishmanicidal Activities of *Artemisia Annu*a Leaf Essential Oil against Visceral Leishmaniasis." *Frontiers in Microbiology* 5:626.
- Islamuddin, Mohammad, Dinkar Sahal, and Farhat Afrin. 2014. "Apoptosis-like Death in *Leishmania Donovan*i Promastigotes Induced by Eugenol-Rich Oil of *Syzygium Aromaticum*." *Journal of Medical Microbiology* 63:74–85.
- Jafarzadeh, Abdollah, Maryam Nemati, Prashant Chauhan, Ashok Patidar, Arup Sarkar, Iraj Sharifi, and Bhaskar Saha. 2020. "Interleukin-27 Functional Duality Balances *Leishmania* Infectivity and Pathogenesis." *Frontiers in Immunology* 11:1573.

- Jimenez-Lopez, Cecilia, Maria Carpena, Catarina Lourenço-Lopes, Maria Gallardo-Gomez, Jose M. Lorenzo, Francisco J. Barba, Miguel A. Prieto, and Jesus Simal-Gandara. 2020. "Bioactive Compounds and Quality of Extra Virgin Olive Oil." *Foods* 9:1014.
- Jiménez-Ruiz, Antonio, Juan Fernando Alzate, Ewan Thomas MacLeod, Carsten Günter Kurt Lüder, Nicolas Fasel, and Hilary Hurd. 2010. "Apoptotic Markers in Protozoan Parasites." *Parasites and Vectors* 3:104.
- Jiménez-Sánchez, Andrés, Antonio Jesús Martínez-Ortega, Pablo Jesús Remón-Ruiz, Ana Piñar-Gutiérrez, José Luis Pereira-Cunill, and Pedro Pablo García-Luna. 2022. "Therapeutic Properties and Use of Extra Virgin Olive Oil in Clinical Nutrition: A Narrative Review and Literature Update." *Nutrients* 14:1440.
- Juliana Quero Reimão, André Gustavo Tempone. 2011. "Investigation into in Vitro Anti-Leishmanial Combinations of Calcium Channel Blockers and Current Anti-Leishmanial Drugs." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106:1032–38.
- Kaczanowski, Szymon, Mohammed Sajid, and Sarah E. Reece. 2011. "Evolution of Apoptosis-like Programmed Cell Death in Unicellular Protozoan Parasites." *Parasites and Vectors* 4:44.
- Kalogeropoulos, Nick, and Maria Z. Tsimidou. 2014. "Antioxidants in Greek Virgin Olive Oils." *Antioxidants* 3:387–413.
- Kamau, Sarah W., Rafael Nunez, and Felix Grimm. 2001. "Flow Cytometry Analysis of the Effect of Allopurinol and the Dinitroaniline Compound (Chloralin) on the Viability and Proliferation of Leishmania Infantum Promastigotes." *BMC Pharmacology* 1:1.
- Kamhawi, Shaden. 2006. "Phlebotomine Sand Flies and Leishmania Parasites: Friends or Foes?" *Trends in Parasitology* 22:439–45.
- Kapellakis, Iosif Emmanouil, Konstantinos P. Tsagarakis, and John C. Crowther. 2008. "Olive Oil History, Production and by-Product Management." *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 7:1–26.
- Kar, Amrita, Mamilla R. Charan Raja, Adithyan Jayaraman, Sujatha Srinivasan, Joy Debnath, and Santanu Kar Mahapatra. 2021. "Oral Combination of Eugenol Oleate and Miltefosine Induce Immune Response during Experimental Visceral Leishmaniasis through Nitric Oxide Generation with Advanced Cytokine Demand." *Cytokine* 146:155623.
- Karampetsou, Kalliopi, Olga S. Koutsoni, Fotis Badounas, Apostolis Angelis, Georgia Gogou, Leandros-Alexios Skaltsounis, Maria Halabalaki, and Eleni Dotsika. 2022. "Exploring the Immunotherapeutic Potential of Oleocanthal against Murine Cutaneous Leishmaniasis." *Planta Medica* 88:783–93.
- Karampetsou, Kalliopi, Olga S. Koutsoni, Georgia Gogou, Apostolis Angelis, Leandros Alexios Skaltsounis, and Eleni Dotsika. 2021. "Total Phenolic Fraction (TPF) from Extra Virgin Olive Oil: Induction of Apoptotic-like Cell Death in Leishmania Spp. Promastigotes and in Vivo Potential of Therapeutic Immunomodulation." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 15:1–30.
- Karin Seifert and Simon L. Croft. 2006. "In Vitro and In Vivo Interactions between Miltefosine and Other Antileishmanial Drugs." *Public Understanding of Science* 50:73–88.

- Karin Seifert, Simon L. Croft. 2006. "In Vitro and In Vivo Interactions between Miltefosine and Other Antileishmanial Drugs." *Public Understanding of Science* 15:73–88.
- Kaushal, Himanshu, Rachel Bras-Gonçalves, Narender Singh Negi, Jean Loup Lemesre, Gérard Papierok, and Poonam Salotra. 2014. "Role of CD8+ T Cells in Protection against Leishmania Donovanii Infection in Healed Visceral Leishmaniasis Individuals." *BMC Infectious Diseases* 14:653.
- Kaye, Paul M., Mattias Svensson, Manabu Ato, Asher Maroof, Rosalind Polley, Simona Stager, Soombul Zubairi, and Christian R. Engwerda. 2004. "The Immunopathology of Experimental Visceral Leishmaniasis." *Parasites and Vectors* 201:239–53.
- Kerr, J. F. R., A. H. Wyllie, and A. R. Curriet. 1972. "APOPTOSIS: A BASIC BIOLOGICAL PHENOMENON WITH WIDE-RANGING IMPLICATIONS IN TISSUE KINETICS." *Br. J. Cancer* 26:239.
- Keyhani, Alireza, Iraj Sharifi, Ehsan Salarkia, Ahmad Khosravi, Razieh Tavakoli Oliaee, Zahra Babaei, Pooya Ghasemi Nejad Almani, Saeid Hassanzadeh, Reza Kheirandish, Mashid Mostafavi, Maryam Hakimi Parizi, Sodabeh Alahdin, Fatemeh Sharifi, Shahriar Dabiri, Simin Shamsi Meymandi, Ali Khamesipour, Abdollah Jafarzadeh, and Mehdi Bamorovat. 2021. "In Vitro and in Vivo Therapeutic Potentials of 6-Gingerol in Combination with Amphotericin B for Treatment of Leishmania Major Infection: Powerful Synergistic and Multifunctional Effects." *International Immunopharmacology* 101:108274.
- Khademvatan, Shahram, K. Eskandari, Khosrow Hazrati-Tappeh, Fakher Rahim, Masoud Foroutan, E. Yousefi, and N. Asadi. 2019. "In Silico and in Vitro Comparative Activity of Green Tea Components against Leishmania Infantum." *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 18:187–94.
- Kiderlen, Albrecht F., Oliver Kayserb, Daneel Ferreirac, and H. Erbert Kolodziej. 2001. "Tannins and Related Compounds: Killing of Amastigotes of Leishmania Donovanii and Release of Nitric Oxide and Tumour Necrosis Factor α in Macrophages in Vitro." *Z. Naturforsch* 56:444–54.
- Kim, Hee Kee, Bong Sun Cheon, Young Ha Kim, Sung Yong Kim, and Hyun Pyo Kim. 1999. "Effects of Naturally Occurring Flavonoids on Nitric Oxide Production in the Macrophage Cell Line RAW 264.7 and Their Structure-Activity Relationships." *Biochemical Pharmacology* 58:759–65.
- Klatt, Stephan, Larry Simpson, Dmitri A. Maslov, and Zoltán Konthur. 2019. "Leishmania Tarentolae: Taxonomic Classification and Its Application as a Promising Biotechnological Expression Host." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13:e0007424.
- Koko, Waleed S., Ibrahim S. Al Nasr, Tariq A. Khan, Rainer Schobert, and Bernhard Biersack. 2022. "An Update on Natural Antileishmanial Treatment Options from Plants, Fungi and Algae." *Chemistry and Biodiversity* 19:e202100542.
- Kolodziej, H., O. Kayser, A. F. Kiderlen, H. Ito, T. Hatano, T. Yoshida, and L. Y. Foo. 2001. "Antileishmanial Activity of Hydrolyzable Tannins and Their Modulatory Effects on Nitric Oxide and Tumour Necrosis Factor- α Release in Macrophages in Vitro." *Planta Medica* 67:825–32.
- Kolodziej, Herbert, Anne Burmeister, Weronika Trun, Oliver A. Radtke, Albrecht F. Kiderlen,

- Hideyuki Ito, Tsutomu Hatano, Takashi Yoshida, and Yeap Foo Lai. 2005. "Tannins and Related Compounds Induce Nitric Oxide Synthase and Cytokines Gene Expressions in Leishmania Major-Infected Macrophage-like RAW 264.7 Cells." *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 13:6470–76.
- Koutsoni, Olga S., Kalliopi Karampetsou, Ioannis D. Kyriazis, Panagiotis Stathopoulos, Nektarios Aligiannis, Maria Halabalaki, Leandros A. Skaltsounis, and Eleni Dotsika. 2018. "Evaluation of Total Phenolic Fraction Derived from Extra Virgin Olive Oil for Its Antileishmanial Activity." *Phytomedicine* 47:143–50.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nuñez, M. E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, and G. Melino. 2009. "Classification of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." *Cell Death and Differentiation* 16:3–11.
- Kumari, Diksha, Summaya Perveen, Rashmi Sharma, and Kuljit Singh. 2021. "Advancement in Leishmaniasis Diagnosis and Therapeutics: An Update." *European Journal of Pharmacology* 910:174436.
- Kyriazis, ID, D. Smirlis, A. Papadaki, O. Koutsoni, N. Aligiannis, AL Skaltsounis, and E. Dotsika. 2017. "Leishmanicidal Activity of Oleuropein: Leishmania Donovanii Promastigote Cell Death through a Possibly ROS-Independent Mechanism." *Journal of Pharmacognosy & Natural Products* 03:1000141.
- Kyriazis, Ioannis D., Olga S. Koutsoni, Nektarios Aligiannis, Kalliopi Karampetsou, Alexios Leandros Skaltsounis, and Eleni Dotsika. 2016. "The Leishmanicidal Activity of Oleuropein Is Selectively Regulated through Inflammation and Oxidative Stress-Related Genes." *Parasites and Vectors* 9:441.
- Kyriazis, Joannis D., Nektarios Aligiannis, Panagiotis Polychronopoulos, Alexios Leandros Skaltsounis, and Eleni Dotsika. 2013. "Leishmanicidal Activity Assessment of Olive Tree Extracts." *Phytomedicine* 20:275–81.
- Kyrylkova, Kateryna, Sergiy Kyryachenko, Mark Leid, and Chrissa Kioussi. 2012. "Detection of Apoptosis by TUNEL Assay." *Methods in Molecular Biology* 887:41–47.
- Lawry, John. 2004. "Detection of Apoptosis by the TUNEL Assay." *Methods in Molecular Biology* 9:183.
- Lee, N., S. Bertholet, A. Debrabant, J. Muller, R. Duncan, and H. L. Nakhasi. 2002. "Programmed Cell Death in the Unicellular Protozoan Parasite Leishmania." *Cell Death and Differentiation* 9:53–64. doi: 10.1038/sj/cdd/4400952.
- Leontides, Leonidas S., Manolis N. Saridomichelakis, Charalambos Billinis, Vasilios Kontos, Alexander F. Koutinas, Apostolos D. Galatos, and Mathios E. Mylonakis. 2002. "A Cross-Sectional Study of Leishmania Spp. Infection in Clinically Healthy Dogs with Polymerase Chain Reaction and Serology in Greece." *Veterinary Parasitology* 109:19–27.
- Lindoso, Joselyne Angelo Lauletta, Mirella Alves Cunha, Igor Thiago Queiroz, and Carlos Henrique Valente Moreira. 2016. "Leishmaniasis–HIV Coinfection: Current Challenges." *HIV/AIDS - Research and Palliative Care* 8:147–56.

- Liu, Dong, and Jude E. Uzonna. 2012. "The Early Interaction of Leishmania with Macrophages and Dendritic Cells and Its Influence on the Host Immune Response." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2:83.
- López-yerena, Anallely, Anna Vallverdú-queralt, Raf Mols, Patrick Augustijns, Rosa M. Lamuela-raventós, and Elvira Escribano-ferrer. 2020. "Absorption and Intestinal Metabolic Profile of Oleocanthal in Rats." *Pharmaceutics* 12:134.
- Loría-Cervera, Elsy Nalleli, and Fernando José Andrade-Narváez. 2014. "Review: Animal Models for the Study of Leishmaniasis Immunology." *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 56:1–11.
- Lozano-Castellón, Julián, Anallely López-Yerena, José Fernando Rinaldi de Alvarenga, Jaume Romero del Castillo-Alba, Anna Vallverdú-Queralt, Elvira Escribano-Ferrer, and Rosa M. Lamuela-Raventós. 2020. "Health-Promoting Properties of Oleocanthal and Oleacein: Two Secoiridoids from Extra-Virgin Olive Oil." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 60:2532–48.
- Lüder, Carsten Gk, Jenny Campos-Salinas, Elena Gonzalez-Rey, and Ger Van Zandbergen. 2010. "Impact of Protozoan Cell Death on Parasite-Host Interactions and Pathogenesis." *Parasites and Vectors* 3:116.
- Lukeš, Julius, Isabel L. Mauricio, Gabriele Schö nian, Jean-Claude Dujardin, Ketty Soteriadou, Jean-Pierre Dedet, Katrin Kuhls, K. Wilber Quispe Tintaya, Milan Jirků, Eva Chocholová, Christos Haralambous, Francine Pratlong, Miroslav Oborník, Aleš Horá, Francisco J. Ayala, and Michael A. Miles. 2007. "Evolutionary and Geographical History of the Leishmania Donovanii Complex with a Revision of Current Taxonomy." *PNAS* 104:9375–80.
- Majtnerová, Pavlína, and Tomáš Roušar. 2018. "An Overview of Apoptosis Assays Detecting DNA Fragmentation." *Molecular Biology Reports* 45:1469–78.
- Mallick, Suvadip, Somaditya Dey, Supratim Mandal, Aritri Dutta, Debarati Mukherjee, Gunjan Biswas, Soumya Chatterjee, Sanjaya Mallick, Tapan Kumar Lai, Krishnendu Acharya, and Chiranjib Pal. 2015. "A Novel Triterpene from *Astraeus Hygrometricus* Induces Reactive Oxygen Species Leading to Death in *Leishmania Donovanii*." *Future Microbiology* 10:763–89.
- Malvolti, Stefano, Melissa Malhame, Carsten F. Mantel, Epke A. Le Rutte, and Paul M. Kaye. 2021. "Human Leishmaniasis Vaccines: Use Cases, Target Population and Potential Global Demand." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 15:e0009742.
- Manach, Claudine, Augustin Scalbert, Christine Morand, Christian Rémésy, and Liliana Jiménez. 2004. "Polyphenols: Food Sources and Bioavailability 1,2." *Am J Clin Nutr* 79:727–74.
- Mansueto, Pasquale, Aurelio Seidita, Giustina Vitale, and Antonio Cascio. 2014. "Transfusion Transmitted Leishmaniasis. What to Do with Blood Donors from Endemic Areas?" *Travel Medicine and Infectious Disease* 12:617–27.
- Markhali, Fereshteh Safarzadeh. 2021. "Effect of Processing on Phenolic Composition of Olive Oil Products and Olive Mill By-Products and Possibilities for Enhancement of Sustainable Processes." *Processes* 9:953.

- Marković, Ana Karković, Jelena Torić, Monika Barbarić, and Cvijeta Jakobušić Brala. 2019. "Hydroxytyrosol, Tyrosol and Derivatives and Their Potential Effects on Human Health." *Molecules* 24:2001.
- Maspi, Nahid, Amir Abdoli, and Fathemeh Ghaffarifar. 2016. "Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in Cutaneous Leishmaniasis: A Review." *Pathogens and Global Health* 110:247–60.
- Matos, A. P. S., A. L. Viçosa, M. I. Ré, E. Ricci-Júnior, and C. Holandino. 2020. "A Review of Current Treatments Strategies Based on Paromomycin for Leishmaniasis." *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 57:101664 Contents.
- McGwire, B. S., and A. R. Satoskar. 2014. "Leishmaniasis: Clinical Syndromes and Treatment." *QJM* 107:7–14.
- Mears, Emily Rose, Farrokh Modabber, Robert Don, and George E. Johnson. 2015. "A Review: The Current In Vivo Models for the Discovery and Utility of New Anti-Leishmanial Drugs Targeting Cutaneous Leishmaniasis." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9:e0003889.
- Mehmood, Arshad, Muhammad Usman, Prasanna Patil, Lei Zhao, and Chengtao Wang. 2020. "A Review on Management of Cardiovascular Diseases by Olive Polyphenols." *Food Science and Nutrition* 8:4639–55.
- Mendes Roatt, Bruno, Rodrigo DO Aguiar-Soares, Wendel Coura-Vital, Henrique G. Ker, Nádia das Dores Moreira, Juliana Vitoriano-Souza, Rodolfo Cordeiro Giunchetti, Cláudia Martins Carneiro, and Alexandre Barbosa Reis. 2014. "Immunotherapy and Immunochemotherapy in Visceral Leishmaniasis: Promising Treatments for This Neglected Disease." *Frontiers in Chemistry* 5:272.
- Mendes Roatt, Bruno, Jamille Mirelle De Oliveira Cardoso, Rory Cristiane, Fortes De Brito, Wendel Coura-Vital, Rodrigo Dian, Oliveira Aguiar-Soares, and Alexandre Barbosa Reis. 2020. "Recent Advances and New Strategies on Leishmaniasis Treatment." *Springer* 104:8965–8977.
- Ménez, Cécile, Marion Buyse, Madeleine Besnard, Robert Farinotti, Philippe M. Loiseau, and Gillian Barratt. 2006. "Interaction between Miltefosine and Amphotericin B: Consequences for Their Activities towards Intestinal Epithelial Cells and Leishmania Donovanii Promastigotes in Vitro." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50:3793–3800.
- Menna-Barreto, Rubem Figueiredo Sadok. 2019. "Cell Death Pathways in Pathogenic Trypanosomatids: Lessons of (over)Kill." *Cell Death and Disease* 10:93.
- Mentella, Maria Chiara, Franco Scaldaferrri, Caterina Ricci, Antonio Gasbarrini, and Giacinto Abele Donato Miggiano. 2019. "Cancer and Mediterranean Diet: A Review." *Nutrients* 11:2059.
- Mescouto-Borges, Myrlena Regina Machado, Érika Maués, Dorcas Lamounier Costa, Maria Cristina da Silva Pranchevicius, and Gustavo Adolfo Sierra Romero. 2013. "Congenitally Transmitted Visceral Leishmaniasis: Report of Two Brazilian Human Cases." *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 17:263–66.
- Mesquita, Juliana T., Andre G. Tempone, and Juliana Q. Reimão. 2014. "Combination Therapy

- with Nitazoxanide and Amphotericin B, Glucantime®, Miltefosine and Sitamaquine against *Leishmania (Leishmania) Infantum* Intracellular Amastigotes.” *Acta Tropica* 130:112–16.
- Miguel, Daniel C., Jenicer K. U. Yokoyama-Yasunaka, and Silvia R. B. Uliana. 2008. “Tamoxifen Is Effective in the Treatment of *Leishmania Amazonensis* Infections in Mice.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2:e249.
- Miguel, Danilo C., Rogéria C. Zauli-Nascimento, Jenicer K. U. Yokoyama-Yasunaka, Simone Katz, Clara L. Barbiéri, and Silvia R. B. Uliana. 2009. “Tamoxifen as a Potential Antileishmanial Agent: Efficacy in the Treatment of *Leishmania Braziliensis* and *Leishmania Chagasi* Infections.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63:365–68.
- Millán, Javier, Ezio Ferroglia, and Laia Solano-Gallego. 2014. “Role of Wildlife in the Epidemiology of *Leishmania Infantum* Infection in Europe.” *Parasitology Research* 113:2005–14.
- Mirzayans, Razmik, and David Murray. 2020. “Do TUNEL and Other Apoptosis Assays Detect Cell Death in Preclinical Studies?” *International Journal of Molecular Sciences* 21:1–12.
- Mishra, Jyotsna, Anubha Saxena, and Sarman Singh. 2007. “Chemotherapy of Leishmaniasis: Past, Present and Future.” *Current Medicinal Chemistry* 14:1153–69.
- Mondêgo-Oliveira, Renata, Joicy Cortez de Sá Sousa, Carla Junqueira Moragas-Tellis, Paulo Victor Ramos de Souza, Maria do Socorro dos Santos Chagas, Maria Dutra Behrens, Daiana de Jesús Haridoim, Noemi Nosomi Taniwaki, Thaize Quiroga Chometon, Alvaro Luiz Bertho, Kátia da Silva Calabrese, Fernando Almeida-Souza, and Ana Lucia Abreu-Silva. 2021. “*Vernonia Brasiliana* (L.) Druce Induces Ultrastructural Changes and Apoptosis-like Death of *Leishmania Infantum* Promastigotes.” *Biomedicine and Pharmacotherapy* 133:111025.
- Monge-Maillo, Begoña, Francesca F. Norman, Israel Cruz, Jorge Alvar, and Rogelio López-Vélez. 2014. “Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection in the Mediterranean Region.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8:e3021.
- Monzote, Lianet, Ana Margarita Montalvo, Ramón Scull, Juan Miranda, and Juan Abreu. 2007. “Technical Effect of the Essential Oil from *Chenopodium Ambrosioides* and Antileishmanial Drugs on Promastigotes of *Leishmania Amazonensis*.” *Medical Sciences* 49:257–60.
- Morais-Teixeira, de Eliane, Mariana Kolos Gallupo, Lucas Fonseca Rodrigues, á Ivaro José Romanha, and Ana Rabello. 2014. “In Vitro Interaction between Paromomycin Sulphate and Four Drugs with Leishmanicidal Activity against Three New World *Leishmania* Species.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69:150–54.
- Morales-Yuste, Manuel, Joaquina Martín-Sánchez, and Victoriano Corpas-Lopez. 2022. “Canine Leishmaniasis: Update on Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention.” *Veterinary Sciences* 9:387.
- Mosmann T., Cherwinski H., Bond M., Giedlin M., Coffman R. 1986. “Two Types of Murine Helper T Cell Clone. I. Definition According to Profiles of Lymphokine Activities and Secreted Proteins.” *Journal of Immunology* 136:2348–57.

- Muxel, Sandra M., Juliana I. Aoki, Juliane C. R. Fernandes, Maria F. Laranjeira-Silva, Ricardo A. Zampieri, Stephanie M. Acuña, Karl E. Müller, Rubia H. Vanderlinde, and Lucile M. Floeter-Winter. 2018. "Arginine and Polyamines Fate in Leishmania Infection." *Frontiers in Microbiology* 8:2682.
- My Olive Plant. 2016. "Οι Ποικιλίες Της Ελιάς." Retrieved January 17, 2023 (<https://myoliveplant.gr/Elaivnas/Poikilies-Elias/>).
- Nascimento, Leopoldo F. M., Dayane Francisca Higino Miranda, Luana D. Moura, Flaviane A. Pinho, Guilherme Loureiro Werneck, Ricardo Khouri, Steven G. Reed, Malcolm S. Duthie, Aldina Barral, Manoel Barral-Netto, and Maria S. P. Cruz. 2020. "Allopurinol Therapy Provides Long Term Clinical Improvement, but Additional Immunotherapy Is Required for Sustained Parasite Clearance, in L. Infantum-Infected Dogs." *Vaccine: X* 4:100048.
- Navajas-Porras, B., S. Pérez-Burillo, J. Morales-Pérez, J. A. Rufián-Henares, and S. Pastoriza. 2020. "Relationship of Quality Parameters, Antioxidant Capacity and Total Phenolic Content of EVOO with Ripening State and Olive Variety." *Food Chemistry* 325:126926.
- Neto, Rubens L. Mont., Louisa M. A. Sousa, Celidarque S. Dias, José M. Barbos. Filho, Márcia R. Oliveira, and Regina C. B. Q. Figueiredo. 2011. "Morphological and Physiological Changes in Leishmania Promastigotes Induced by Yangambin, a Lignan Obtained from Ocotea Duckei." *Experimental Parasitology* 127:215–21.
- Ni Nyoman, Ayu Dewi, and Carsten G. K. Lüder. 2013. "Apoptosis-like Cell Death Pathways in the Unicellular Parasite Toxoplasma Gondii Following Treatment with Apoptosis Inducers and Chemotherapeutic Agents: A Proof-of-Concept Study." *Apoptosis* 18:664–80.
- Nikou, Theodora, Vasiliki Liaki, Panagiotis Stathopoulos, Aimilia D. Sklirou, Eleni N. Tsakiri, Thomas Jakschitz, Günther Bonn, Ioannis P. Trougakos, Maria Halabalaki, and Leandros A. Skaltsounis. 2019. "Comparison Survey of EVOO Polyphenols and Exploration of Healthy Aging-Promoting Properties of Oleocanthal and Oleacein." *Food and Chemical Toxicology* 125:403–12.
- Nikou, Theodora, Maria Eleni Sakavitsi, Evangelos Kalampokis, and Maria Halabalaki. 2022. "Metabolism and Bioavailability of Olive Bioactive Constituents Based on In Vitro, In Vivo and Human Studies." *Nutrients* 14:3773.
- Nikou, Theodora, Matthias Witt, Panagiotis Stathopoulos, Aiko Barsch, and Maria Halabalaki. 2020. "Olive Oil Quality and Authenticity Assessment Aspects Employing FIA-MRMS and LC-Orbitrap MS Metabolomic Approaches." *Frontiers in Public Health* 8:558226.
- Nocella, Cristina, Vittoria Cammisotto, Luca Fianchini, Alessandra D'Amico, Marta Novo, Valentina Castellani, Lucia Stefanini, Francesco Violi, and Roberto Carnevale. 2017. "Extra Virgin Olive Oil and Cardiovascular Diseases: Benefits for Human Health." *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 18:4–13.
- Novais, Fernanda O., Ba T. Nguyen, Lucas P. Carvalho, Nelson D. Glennie, Sara Passos, Edgar M. Carvalho, and Phillip Scott. 2014. "Human Classical Monocytes Control the Intracellular Stage of Leishmania Braziliensis by Reactive Oxygen Species." *Journal of Infectious Diseases* 209:1288–96.
- Ntais, Pantelis, Dimitra Sifaki-Pistola, Vasiliki Christodoulou, Ippokratis Messaritakis, Francine

- Pratlong, George Poupalos, and Maria Antoniou. 2013. "Leishmaniasis in Greece." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 89:906–15.
- Nunes, Débora Cristina De Oliveira, Luiz Borges Bispo-Da-Silva, Danielle Reis Napolitano, Mônica Soares Costa, Márcia Moura Nunes Rocha Figueira, Renata Santos Rodrigues, Veridiana De Melo Rodrigues, and Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama. 2017. "In Vitro Additive Interaction between Ketoconazole and Antimony against Intramacrophage *Leishmania* (*Leishmania*) *Amazonensis* Amastigotes." *PLoS ONE* 12:e0180530.
- Nylén, Susanne, and Shalini Gautam. 2010. "Immunological Perspectives of Leishmaniasis." *Journal of Global Infectious Diseases* 2:135.
- Obied, Hassan K., and Hassan Obied. 2013. "Biography of Biophenols: Past, Present and Future." *Functional Foods in Health and Disease* 3:230–41.
- Odds, F. C. 2003. "Synergy, Antagonism, and What the Checkerboard Tells between Them." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52:1.
- Okwor, Ifeoma, and Jude Uzonna. 2016. "Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 94:489–93.
- Okwor, Ifeoma, and Jude Eze Uzonna. 2013. "The Immunology of *Leishmania*/HIV Co-Infection." *Immunologic Research* 56:163–71.
- Oliveira, Renata Mondêgo de, Solange de Araújo Melo, Tatiane Aranha da Penha-Silva, Fernando Almeida-Souza, and Ana Lucia Abreu-Silva. 2018. "Alternative Treatment for Leishmaniasis." Pp. 145–61 in *Leishmaniasis as Re-emerging Diseases*. InTech.
- Olivenews.gr. 2022. "Olivenews.Gr." Retrieved January 15, 2023 (<https://www.olivenews.gr/el/agora-times/deyteri-thesi-stin-kefalin-katanalosi-elaioladoy-pagkosmios-ellada/>).
- Oliverio, Manuela, Monica Nardi, Maria Luisa Di Gioia, Paola Costanzo, Sonia Bonacci, Stefano Mancuso, and Antonio Procopio. 2021. "Semi-Synthesis as a Tool for Broadening the Health Applications of Bioactive Olive Secoiridoids: A Critical Review." *Natural Product Reports* 38:444–69.
- Orgen, G. B., and P. C. Melby. 2009. "Leishmania." *Encyclopedia of Microbiology* 663–73.
- Oryan, A., and M. Akbari. 2016. "Worldwide Risk Factors in Leishmaniasis." *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 9:925–32.
- Ozbak, Hani A., Hassan A. Hemeg, Farhat Afrin, Garima Chouhan, Mohammad Islamuddin, and Muzamil Y. Want. 2019. "Cinnamomum Cassia Exhibits Antileishmanial Activity against *Leishmania* *Donovani* Infection in Vitro and in Vivo." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13:e0007227.
- Panche, A. N., A. D. Diwan, and S. R. Chandra. 2016. "Flavonoids: An Overview." *Journal of Nutritional Science* 5:e47.
- Papadopoulou, C., A. Kostoula, D. Dimitriou, A. Panagiou, C. Bobojianni, and G. Antoniadis. 2005. "Human and Canine Leishmaniasis in Asymptomatic and Symptomatic Population in Northwestern Greece." *Journal of Infection* 50:53–60.

- Paris, Caroline, Philippe M. Loiseau, Christian Bories, and Jaqueline Bréard. 2004. "Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in Leishmania Donovanii Promastigotes." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48:852–59.
- Parkinson, Lisa, and Sara Cicerale. 2016. "The Health Benefiting Mechanisms of Virgin Olive Oil Phenolic Compounds." *Molecules* 21:1734.
- Passero, Luiz Felipe D., Erika dos Santos Brunelli, Thamara Sauini, Thais Fernanda Amorim Pavani, Jéssica Adriana Jesus, and Eliana Rodrigues. 2021. "The Potential of Traditional Knowledge to Develop Effective Medicines for the Treatment of Leishmaniasis." *Frontiers in Pharmacology* 12:690432.
- Pastor, Jacinta, Marley García, Silvia Steinbauer, William N. Setzer, Ramón Scull, Lars Gille, and Lianet Monzote. 2015. "Combinations of Ascaridole, Carvacrol, and Caryophyllene Oxide against Leishmania." *Acta Tropica* 145:31–38.
- Pazolli, Ermira, and Sheila A. Stewart. 2008. "Senescence: The Good the Bad and the Dysfunctional." *Current Opinion in Genetics and Development* 18:42–47.
- Pedan, Vasilisa, Martin Popp, Sascha Rohn, Matthias Nyfeler, and Annette Bongartz. 2019. "Characterization of Phenolic Compounds and Their Contribution to Sensory Properties of Olive Oil." *Molecules* 24:2041.
- Pereira, Pedro S., Carlos Vinicius B. Oliveira, Ana J. Maia, Saulo R. Tintino, Cícera Datiane De M. Oliveira-Tintino, Maria C. Vega-Gomez, Miriam Rolón, Cathia Coronel, Antônia Eliene Duarte, Luiz M. Barros, Jean Paul Kamdem, Abolghasem Siyadatpanah, Polrat Wilairatana, and Henrique D. M. Coutinho. 2021. "Cytotoxicity of Essential Oil Cordia Verbenaceae against Leishmania Brasiliensis and Trypanosoma Cruzi." *Molecules* 26:4485.
- Pietkiewicz, Sabine, Jörn H. Schmidt, and Inna N. Lavrik. 2015. "Quantification of Apoptosis and Necroptosis at the Single Cell Level by a Combination of Imaging Flow Cytometry with Classical Annexin V/Propidium Iodide Staining." *Journal of Immunological Methods* 423:99–103.
- Polini, Beatrice, Maria Digiaco, Sara Carpi, Simone Bertini, Francesca Gado, Giuseppe Saccomanni, Marco Macchia, Paola Nieri, Clementina Manera, and Stefano Fogli. 2018. "Oleocanthal and Oleacein Contribute to the in Vitro Therapeutic Potential of Extra Virgin Oil-Derived Extracts in Non-Melanoma Skin Cancer." *Toxicology in Vitro* 52:243–50.
- Pradhan, S., R. A. Schwartz, A. Patil, S. Grabbe, and M. Goldust. 2022. "Treatment Options for Leishmaniasis." *Clinical and Experimental Dermatology* 47:516–21.
- Proto, William R., Graham H. Coombs, and Jeremy C. Mottram. 2013. "Cell Death in Parasitic Protozoa: Regulated or Incidental?" *Nature Reviews Microbiology* 11:58–66.
- Quintero-Flórez, Angélica, Gema Pereira-Caro, Cristina Sánchez-Quezada, José Manuel Moreno-Rojas, José J. Gaforio, Antonio Jimenez, and Gabriel Beltrán. 2018. "Effect of Olive Cultivar on Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Phenolic Fraction of Virgin Olive Oil." *European Journal of Nutrition* 57:1925–46.
- Radtke, Oliver A., Albrecht F. Kiderlen, Oliver Kayser, and Herbert Kolodziej. 2004. "Gene

- Expression Profiles of Inducible Nitric Oxide Synthase and Cytokines in Leishmania Major-Infected Macrophage-like RAW 264.7 Cells Treated with Gallic Acid." *Planta Medica* 70:924–28.
- Ready, Paul D. 2014. "Epidemiology of Visceral Leishmaniasis." *Clinical Epidemiology* 6:147–54.
- Rebello, Karina M., Valter V. Andrade-Neto, Claudia Regina B. Gomes, Marcos Vinícius N. De Souza, Marta H. Branquinha, André L. S. Santos, Eduardo Caio Torres-Santos, and Claudia M. D'Avila-Levy. 2019. "Miltefosine-Lopinavir Combination Therapy against Leishmania Infantum Infection: In Vitro and in Vivo Approaches." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9:00229.
- Reboredo-Rodríguez, Patricia, Alfonso Varela-López, Tamara Y. Forbes-Hernández, Massimiliano Gasparrini, Sadia Afrin, Danila Cianciosi, Jiaojiao Zhang, Piera Pia Manna, Stefano Bompadre, José L. Quiles, Maurizio Battino, and Francesca Giampieri. 2018. "Phenolic Compounds Isolated from Olive Oil as Nutraceutical Tools for the Prevention and Management of Cancer and Cardiovascular Diseases." *International Journal of Molecular Sciences* 19:2305.
- Redza-Dutordoir, Maureen, and Diana A. Averill-Bates. 2016. "Activation of Apoptosis Signalling Pathways by Reactive Oxygen Species." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1863:2977–92.
- Dos Reis, Matheus Balduino Goncalves, Letícia Correa Manjolin, Claudia Do Carmo Maquiaveli, Osvaldo Andrade Santos-Filho, and Edson Roberto Da Silva. 2013. "Inhibition of Leishmania (Leishmania) Amazonensis and Rat Arginases by Green Tea EGCG, (+)-Catechin and (-)-Epicatechin: A Comparative Structural Analysis of Enzyme-Inhibitor Interactions." *PLoS ONE* 8:e78387.
- Reithinger, Richard, Jean Claude Dujardin, Hechmi Louzir, Claude Pirmez, Bruce Alexander, and Simon Brooker. 2007. "Cutaneous Leishmaniasis." *Lancet Infectious Diseases* 7:581–96.
- Rigacci, Stefania, Caterina Miceli, Chiara Nediani, Andrea Berti, Roberta Cascella, Daniela Pantano, Pamela Nardiello, Ilaria Luccarini, Fiorella Casamenti, and Massimo Stefani. 2017. "Oleuropein Aglycone Induces Autophagy via the AMPK/MTOR Signalling Pathway: A Mechanistic Insight." *Oncotarget* 6:35344–57.
- Riley, F. R. 2002. "OLIVE OIL PRODUCTION ON BRONZE AGE CRETE: NUTRITIONAL PROPERTIES, PROCESSING METHODS AND STORAGE LIFE OF MINOAN OLIVE OIL." *OXFORD JOURNAL OF ARCHAEOLOGY* 21:63–75.
- Rioux, J. A., G. Lanotte, E. Serres, F. Pratlong, P. Bastien, and J. Perieres. 1990. "Taxonomy of Leishmania. Use of Isoenzymes. Suggestions for a New Classification." *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* 65:111–25.
- Roatt, Bruno Mendes, Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso, Rory Cristiane Fortes De Brito, Wendel Coura-Vital, Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar-Soares, and Alexandre Barbosa Reis. 2020. "Recent Advances and New Strategies on Leishmaniasis Treatment." *Applied Microbiology and Biotechnology* 104:8965–77.
- Rodrigues, Igor A., Ana Maria Mazotto, Verônica Cardoso, Renan L. Alves, Ana Claudia F.

- Amaral, Jefferson Rocha De Andrade Silva, Anderson S. Pinheiro, and Alane B. Vermelho. 2015. "Natural Products: Insights into Leishmaniasis Inflammatory Response." *Mediators of Inflammation* 2015:12.
- Rodrigues, Juliany Cola Fernandes, Joseane Lima Prado Godinho, and Wanderley de Souza. 2014. "Biology of Human Pathogenic Trypanosomatids: Epidemiology, Lifecycle and Ultrastructure." *Sub-Cellular Biochemistry* 74:1–42.
- Rodrigues, Lorranny Santana, Aline Silva Barreto, Lays Gisele Santos Bomfim, Marcos Couto Gomes, Nathalia Luisa Carlos Ferreira, Geydson Silveira da Cruz, Lucas Sousa Magalhães, Amélia Ribeiro de Jesus, Clarisa B. Palatnik-de-Sousa, Cristiane Bani Corrêa, and Roque Pacheco de Almeida. 2021. "Multifunctional, TNF- α and IFN- γ -Secreting CD4 and CD8 T Cells and CD8^{High} T Cells Are Associated With the Cure of Human Visceral Leishmaniasis." *Frontiers in Immunology* 12:773983.
- Rodrigues, Vasco, Anabela Cordeiro-Da-Silva, Mireille Laforge, Ricardo Silvestre, and Jérôme Estaquier. 2016. "Regulation of Immunity during Visceral Leishmania Infection." *Parasites and Vectors* 9:118.
- Rodríguez-Morató, Jose, Laura Xicota, Montse Fitó, Magí Farré, Mara Dierssen, and Rafael De La Torre. 2015. "Potential Role of Olive Oil Phenolic Compounds in the Prevention of Neurodegenerative Diseases." *Molecules* 20:4655–80.
- Rohloff, Jens, Ariaya Hymete, and Yinebeb Tariku. 2013. "Plant-Derived Natural Products for the Treatment of Leishmaniasis." Pp. 381–429 in *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol. 39. Elsevier B.V.
- Román, G. C., R. E. Jackson, J. Reis, A. N. Román, J. B. Toledo, and E. Toledo. 2019. "Extra-Virgin Olive Oil for Potential Prevention of Alzheimer Disease." *Revue Neurologique* 175:705–23.
- Romani, Annalisa, Francesca Ieri, Silvia Urciuoli, Annalisa Noce, Giulia Marrone, Chiara Nediani, and Roberta Bernini. 2019. "Health Effects of Phenolic Compounds Found in Extra-Virgin Olive Oil, by-Products, and Leaf of *Olea Europaea* L." *Nutrients* 11:1776.
- Rossi, Matteo, and Nicolas Fasel. 2018. "How to Master the Host Immune System? Leishmania Parasites Have the Solutions! Running Title Host Immune Response to Leishmania Parasites." *International Immunology* 30:103–11.
- Roy, Amit, Agneyo Ganguly, Somdeb BoseDasgupta, Benu Brata Das, Churala Pal, Parasuraman Jaisankar, and Hemanta K. Majumder. 2008. "Mitochondria-Dependent Reactive Oxygen Species-Mediated Programmed Cell Death Induced by 3,3'-Diindolylmethane through Inhibition of FOF1-ATP Synthase in Unicellular Protozoan Parasite *Leishmania Donovanii*." *Molecular Pharmacology* 74:1292–1307.
- Safavi, Moeinadin, Hamid Eshaghi, and Zeinab Hajihassani. 2020. "Visceral Leishmaniasis: Kala-Azar." *Diagnostic Cytopathology* 49:446–48.
- Sakyi, Patrick O., Richard K. Amewu, Robert N. O. A. Devine, Emahi Ismaila, Whelton A. Miller, and Samuel K. Kwofie. 2021. "The Search for Putative Hits in Combating Leishmaniasis: The Contributions of Natural Products Over the Last Decade." *Natural Products and Bioprospecting* 11:489–544.

- Samaranayake, Nilakshi. 2020. "Leishmaniasis." Pp. 21–46 in *Molecular Advancements in Tropical Diseases Drug Discovery*. Elsevier.
- Santangelo, Carmela, Rosaria Vari, Beatrice Scazzocchio, Patrizia De Sancti, Claudio Giovannini, Massimo D'Archivio, and Roberta Masella. 2017. "Anti-Inflammatory Activity of Extra Virgin Olive Oil Polyphenols: Which Role in the Prevention and Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases?" *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 18:36–50.
- De Santis, Stefania, Marica Cariello, Elena Piccinin, Carlo Sabbà, and Antonio Moschetta. 2019. "Extra Virgin Olive Oil: Lesson from Nutrigenomics." *Nutrients* 11:2085.
- Saputra, Elysia C., Lu Huang, Yihui Chen, and Lisa Tucker-Kellogg. 2018. "Combination Therapy and the Evolution of Resistance: The Theoretical Merits of Synergism and Antagonism in Cancer." *Cancer Research* 78:2419–31.
- Sarkar, Avijit, Rupashree Sen, Piu Saha, Sudipto Ganguly, Goutam Mandal, and Mitali Chatterjee. 2008. "An Ethanolic Extract of Leaves of Piper Betle (Paan) Linn Mediates Its Antileishmanial Activity via Apoptosis." *Parasitology Research* 102:1249–55.
- Sasidharan, Santanu, and &. Prakash Saudagar. 2021. "Leishmaniasis: Where Are We and Where Are We Heading?" *PROTOZOOLOGY* 120:1541–54.
- Scariot, Débora B., Elizandra A. Britta, Amanda L. Moreira, Hugo Falzirolli, Cleuza C. Silva, Tânia Ueda-Nakamura, Benedito P. Dias-Filho, and Celso V. Nakamura. 2017. "Induction of Early Autophagic Process on Leishmania Amazonensis by Synergistic Effect of Miltefosine and Innovative Semi-Synthetic Thiosemicarbazone." *Frontiers in Microbiology* 8:00255.
- Schönian, Gabriele, Isabel Mauricio, Marina Gramiccia, Carmen Cañavate, Marleen Boelaert, and Jean Claude Dujardin. 2008. "Leishmaniasis in the Mediterranean in the Era of Molecular Epidemiology." *Trends in Parasitology* 24:135–42.
- Schwingshackl, L., A. M. Lampousi, M. P. Portillo, D. Romaguera, G. Hoffmann, and H. Boeing. 2017. "Olive Oil in the Prevention and Management of Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies and Intervention Trials." *Nutrition and Diabetes* 7:e262.
- Scott, Phillip, and Fernanda O. Novais. 2016. "Cutaneous Leishmaniasis: Immune Responses in Protection and Pathogenesis." *Nature Reviews Immunology* 16:581–92.
- Seifert, Karin. 2011. "Structures, Targets and Recent Approaches in Anti-Leishmanial Drug Discovery and Development." *The Open Medicinal Chemistry Journal* 5:31–39.
- Sen, Rupashree, Samiran Bandyopadhyay, Avijit Dutta, Goutam Mandal, Sudipto Ganguly, Piu Saha, and Mitali Chatterjee. 2007. "Artemisinin Triggers Induction of Cell-Cycle Arrest and Apoptosis in Leishmania Donovanii Promastigotes." *Journal of Medical Microbiology* 56:1213–18.
- Sen, Rupashree, and Mitali Chatterjee. 2011. "Plant Derived Therapeutics for the Treatment of Leishmaniasis." *Phytomedicine* 18:1056–69.
- Sereno, D., P. Holzmüller, I. Mangot, G. Cuny, A. Ouaisi, and J. L. Lemesre. 2001. "Antimonial-Mediated DNA Fragmentation in Leishmania Infantum Amastigotes." *Antimicrobial*

Agents and Chemotherapy 45:2064–69.

- Serra, Francesco, Francesco Spatafora, Silvia Toni, Alberto Farinetti, Roberta Gelmini, and Anna Vittoria Mattioli. 2021. "Polyphenols, Olive Oil and Colorectal Cancer: The Effect of Mediterranean Diet in the Prevention." *Acta Biomedica* 92:e2021307.
- Serrelli, Gabriele, and Monica Deiana. 2018. "Biological Relevance of Extra Virgin Olive Oil Polyphenols Metabolites." *Antioxidants* 7:170.
- Servili, Maurizio, Beatrice Sordini, Sonia Esposto, Stefania Urbani, Gianluca Veneziani, Ilona Di Maio, Roberto Selvaggini, and Agnese Taticchi. 2014. "Biological Activities of Phenolic Compounds of Extra Virgin Olive Oil." *Antioxidants* 3:1–23.
- Shadab, Md, Baijayanti Jha, Mohammad Asad, Makaraju Deepthi, Mohd Kamran, and Nahid Ali. 2017. "Apoptosis-like Cell Death in Leishmania Donovanii Treated with Kalsome™10, a New Liposomal Amphotericin B." *PLoS ONE* 12:e0171306.
- Sharifi, Fatemeh, Fariba Sharififar, Mostafa Pournamdari, Mehdi Ansari, Razieh Tavakoli Oliaee, Mehdi Bamorovat, Ahmad Khosravi, Ali Reza Keyhani, Ehsan Salarkia, Abbas Mortazaeizadeh, Shahriar Dabiri, Ali Khamesipour, and Iraj Sharifi. 2006. "Leishmanicidal Potentials of Gossypium Hirsutum Extract and Its Fractions on Leishmania Major in a Murine Model: Parasite Burden, Gene Expression, and Histopathological Profile." *Journal of Medical Microbiology* 70:01333.
- Sharma, Umakant, and Sarman Singh. 2008. "Insect Vectors of Leishmania: Distribution, Physiology and Their Control." *J Vector Borne Dis* 45:255–72.
- Shukla, Shruti, Vivek K. Bajpai, and Myunghee Kim. 2014. "Plants as Potential Sources of Natural Immunomodulators." *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 13:17–33.
- Siddique, Abu Bakar, Nehad M. Ayoub, Afsana Tajmim, Sharon A. Meyer, Ronald A. Hill, and Khalid A. El Sayed. 2019. "(-)-Oleocanthal Prevents Breast Cancer Locoregional Recurrence after Primary Tumor Surgical Excision and Neoadjuvant Targeted Therapy in Orthotopic Nude Mouse Models." *Cancers* 11:637.
- Siddique, Abu Bakar, Hassan Y. Ebrahim, Mohamed R. Akl, Nehad M. Ayoub, Amira A. Goda, Mohamed M. Mohyeldin, Suresh K. Nagumalli, Wael M. Hananeh, Yong Yu Liu, Sharon A. Meyer, and Khalid A. El Sayed. 2019. "(-)-Oleocanthal Combined with Lapatinib Treatment Synergized against HER-2 Positive Breast Cancer in Vitro and in Vivo." *Nutrients* 11:412.
- Sideris, V., E. Karagouni, G. Papadopoulou, A. Garifallou, and E. Dotsika. 1996. "Canine Visceral Leishmaniasis In The Great Athens Area, Greece." *Parasite* 3:125–30.
- Sideris, V., G. Papadopoulou, E. Dotsika, and E. Karagouni. 1999. "Asymptomatic Canine Leishmaniasis in Greater Athens Area, Greece." *European Journal of Epidemiology* 15:271–76.
- Silva-Silva, João Victor, Carla J. Moragas-Tellis, Maria S. S. Chagas, Paulo Victor R. Souza, Davyson L. Moreira, Daiana J. Hardoim, Noemi N. Taniwaki, Vanessa F. A. Costa, Alvaro L. Bertho, Daniela Brondani, Eduardo Zapp, Aldo Sena De Oliveira, Kátia S. Calabrese, Maria D. Behrens, and Fernando Almeida-Souza. 2022. "Carajurin Induces Apoptosis in

- Leishmania Amazonensis Promastigotes through Reactive Oxygen Species Production and Mitochondrial Dysfunction." *Pharmaceuticals* 15:331.
- Smirlis, Despina, Michael Duszenko, Antonio Jiménez Ruiz, Effie Scoulica, Patrick Bastien, Nicolas Fasel, and Ketty Soteriadou. 2010. "Targeting Essential Pathways in Trypanosomatids Gives Insights into Protozoan Mechanisms of Cell Death." *Parasites and Vectors* 3:107.
- Solano-Gálvez, Sandra, Jack Abadi-Chiriti, Luis Gutiérrez-Velez, Eduardo Rodríguez-Puente, Enrique Konstat-Korzenny, Diego-Abelardo Álvarez-Hernández, Giorgio Franyuti-Kelly, Laila Gutiérrez-Kobeh, and Rosalino Vázquez-López. 2018. "Apoptosis: Activation and Inhibition in Health and Disease." *Medical Sciences* 6:54.
- Solano-Gálvez, Sandra Georgina, Diego Abelardo Álvarez-Hernández, Laila Gutiérrez-Kobeh, and Rosalino Vázquez-López. 2021. "Leishmania: Manipulation of Signaling Pathways to Inhibit Host Cell Apoptosis." *Therapeutic Advances in Infectious Disease* 8:1–11.
- Sousa, Maria C., Raquel Varandas, Rita C. Santos, Manuel Santos-Rosa, Vera Alves, and Jorge A. R. Salvador. 2014. "Antileishmanial Activity of Semisynthetic Lupane Triterpenoids Betulin and Betulinic Acid Derivatives: Synergistic Effects with Miltefosine." *PLoS ONE* 9:e89939.
- Srivastava, Saumya, Prem Shankar, Jyotsna Mishra, and Sarman Singh. 2016. "Possibilities and Challenges for Developing a Successful Vaccine for Leishmaniasis." *Parasites and Vectors* 9:277.
- Steverding, Dietmar. 2017. "The History of Leishmaniasis." *Parasites and Vectors* 10:1–10.
- Strauss, Mariana, Jean Henrique S. Rodrigues, María Silvina Lo Presti, Paola Carolina Bazán, Alejandra Lidia Báez, Patricia Paglini-Oliva, Celso Vataru Nakamura, Juan Manuel Bustamante, and Héctor Walter Rivarola. 2018. "In Vitro and in Vivo Drug Combination for the Treatment of Trypanosoma Cruzi Infection: A Multivariate Approach." *Experimental Parasitology* 189:19–27.
- Sundar, Shyam, and Jaya Chakravarty. 2013. "Leishmaniasis: An Update of Current Pharmacotherapy." *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 14:53–63.
- Sunter, Jack, and Keith Gull. 2017. "Shape, Form, Function and Leishmania Pathogenicity: From Textbook Descriptions to Biological Understanding." *Open Biology* 7:170165.
- Sunyoto, Temmy, Julien Potet, and Marleen Boelaert. 2018. "Why Miltefosine - A Life-Saving Drug for Leishmaniasis-Is Unavailable to People Who Need It the Most." *BMJ Global Health* 3:e000709.
- Tabrez, Shams, Fazlur Rahman, Rahat Ali, Abdulaziz S. Alouffi, Bader Mohammed Alshehri, Fahdah Ayed Alshammari, Mohammed A. Alaidarous, Saeed Banawas, Abdul Aziz Bin Dukhyil, and Abdur Rub. 2021. "Assessment of the Antileishmanial Potential of Cassia Fistula Leaf Extract." *ACS Omega* 6:2318–27.
- Tallarida, Ronald J. 2006. "An Overview of Drug Combination Analysis with Isobolograms." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 319:1–7.
- Tasdemir, Deniz, Marcel Kaiser, Reto Brun, Vanessa Yardley, Thomas J. Schmidt, Fatma Tosun,

- and Peter Rüedi. 2006. "Antitrypanosomal and Antileishmanial Activities of Flavonoids and Their Analogues: In Vitro, in Vivo, Structure-Activity Relationship, and Quantitative Structure-Activity Relationship Studies." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50:1352–64.
- Taslimi, Y., F. Zahedifard, and S. Rafati. 2016. "Leishmaniasis and Various Immunotherapeutic Approaches." *Parasitology* 145:497–507.
- Thakur, Shivani, Jyoti Joshi, and Sukhbir Kaur. 2020. "Leishmaniasis Diagnosis: An Update on the Use of Parasitological, Immunological and Molecular Methods." *Journal of Parasitic Diseases* 44:253–72.
- Theocharidou, Dionysia, Efstratios Maltezos, Theodoros Constantinidis, and Anna Papa. 2019. "Human Visceral Leishmaniasis in Northern Greece: Seroepidemiology and Risk Factors in Endemic Region." *Journal of Vector Borne Diseases* 56:244–51.
- Tiuman, Tatiana Shioji, Mislaine Adriana Brenzan, Tânia Ueda-Nakamura, Benedito Prado Dias Filho, Diógenes Aparicio Garcia Cortez, and Celso Vataru Nakamura. 2012. "Intramuscular and Topical Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Lesions in Mice Infected with *Leishmania Amazonensis* Using Coumarin (-) Mamea A/BB." *Phytomedicine* 19:1196–99.
- Tiwari, Brajendra, Richa Pahuja, Pradeep Kumar, Srikanta Kumar Rath, Kailash Chand Gupta, and Neena Goyal. 2017. "Nanotized Curcumin and Miltefosine, a Potential Combination for Treatment of Experimental Visceral Leishmaniasis." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61:e01169-16.
- Tiwari, Neeraj, Mallikarjuna Rao Gedda, Vinod K. Tiwari, Surya P. Singh, and Rakesh K. Singh. 2018. "Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis." *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 18:26–41.
- Tomiotto-Pellissier, Fernanda, Bruna Taciane da Silva Bortoleti, João Paulo Assolini, Manoela Daiele Gonçalves, Amanda Cristina Machado Carloto, Milena Menegazzo Miranda-Sapla, Ivete Conchon-Costa, Juliano Bordignon, and Wander Rogério Pavanelli. 2018. "Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons." *Frontiers in Immunology* 9:2529.
- Trincon, Cristiana T., Juliana Q. Reimão, Jenicer K. U. Yokoyama-Yasunaka, Danilo C. Miguel, and Silvia R. B. Uliana. 2021. "Combination Therapy with Tamoxifen and Amphotericin B in Experimental Cutaneous Leishmaniasis." *ACS Publications* 6:2318–27.
- Tsagosis, Panagiotis, Evdokia Karagouni, and Eleni Dotsika. 2003. "CD8 + T Cells with Parasite-Specific Cytotoxic Activity and a Tc1 Profile of Cytokine and Chemokine Secretion Develop in Experimental Visceral Leishmaniasis." *Parasite Immunology* 25:569–79.
- Tuttolomondo, Antonino, Irene Simonetta, Mario Daidone, Alba Mogavero, Antonella Ortello, and Antonio Pinto. 2019. "Metabolic and Vascular Effect of the Mediterranean Diet." *International Journal of Molecular Sciences* 20:4716.
- Tzani, Myrsini, Alicia Barrasa³, Annita Vakali², Theano Georgakopoulou², Kassiani Mellou, Danai Pervanidou, Tzani Myrsini, Barrasa Alicia, Vakali Annita, Georgakopoulou Theano, Mellou Kassiani, and Pervanidou Danai. 2021. "Surveillance Data for Human

- Leishmaniasis Indicate the Need for a Sustainable Action Plan for Its Management and Control, Greece, 2004 to 2018." *Euro Surveillance* 26:2000159.
- Uliana, Silvia R. B., Cristiana T. Trinconi, and Adriano C. Coelho. 2017. "Chemotherapy of Leishmaniasis: Present Challenges." *Parasitology* 145:464–80.
- Ullah, Nazif, Akhtar Nadhman, Sumaira Siddiq, Shaila Mehwish, Arshad Islam, Laila Jafri, and Muhammad Hamayun. 2016. "Plants as Antileishmanial Agents: Current Scenario." *Phytotherapy Research* 30:1905–25.
- Verma, Navin K., and Chinmoy S. Dey. 2004. "Possible Mechanism of Miltefosine-Mediated Death of *Leishmania Donovanii*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48:3010–15.
- Vermerris, Wilfred., and Ralph L. Nicholson. 2006. *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer.
- Vermes, Is&m, Clemens Haanen, Helga Steffens-Nakken, and Chris Reutelingsperger. 1995. "A Novel Assay for Apoptosis Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Early Apoptotic Cells Using Fluorescein Labelled Expression on Annexin V." *JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL ELSEVTER Journal of Immunological Methods* 184:39–51.
- Vieira-Araújo, Francisco Marcelo, Fernanda Cristina Macedo Rondon, Ícaro Gusmão Pinto Vieira, Francisca Noelia Pereira Mendes, José Claudio Carneiro de Freitas, and Selene Maia de Morais. 2018. "Sinergism between Alkaloids Piperine and Capsaicin with Meglumine Antimoniate against *Leishmania Infantum*." *Experimental Parasitology* 188:79–82.
- Vissers, M. N., P. L. Zock, and M. B. Katan. 2004. "Bioavailability and Antioxidant Effects of Olive Oil Phenols in Humans: A Review." *European Journal of Clinical Nutrition* 58:955–65.
- Vossen, Paul. 2007. "Olive Oil: History, Production, and Characteristics of the World's Classic Oils." *HORT SCIENCE* 42:1093–1100.
- Weingärtner, Adrien, Gerdi Kemmer, Frederic D. Müller, Ricardo Andrade Zampieri, Marcos Gonzaga dos Santos, Jürgen Schiller, and Thomas Günther Pomorski. 2012. "Leishmania Promastigotes Lack Phosphatidylserine but Bind Annexin V upon Permeabilization or Miltefosine Treatment." *PLoS ONE* 7:e42070.
- WHO. 2022. "Leishmaniasis - World Health Organization (WHO)." Retrieved January 19, 2023 (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis?fbclid=IwAR3zAta2R1cim9n0dHI4xif2egBMorvRJqLZKc5UFMI7D61ObRmO37ufxRg>).
- WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniases. 2010. *Control of the Leishmaniases*. World Health Organization.
- Wijnant, Gert-Jan, Katrien Van Bocxlaer, Vanessa Yardley, Sudaxshina Murdan, and Simon L. Croft. 2017. "Efficacy of Paromomycin-Chloroquine Combination Therapy in Experimental Cutaneous Leishmaniasis." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61:e00358-17.
- Yubero-Serrano, Elena M., Javier Lopez-Moreno, Francisco Gomez-Delgado, and Jose Lopez-Miranda. 2019. "Extra Virgin Olive Oil: More than a Healthy Fat." *European Journal of*

Clinical Nutrition 72:8–17.

Zanluqui, Nagela Ghabdan. 2015. "Macrophage Polarization in Chagas Disease." *Journal of Clinical and Cellular Immunology* 6:317.

Zhao, Liang, Jessie L-S Au, and M. Guillaume Wientjes. 2010. "Comparison of Methods for Evaluating Drug-Drug Interaction." *Frontiers in Bioscience* 2:241.

Zijlstra E E, Musa A M, Khalil E A G, Hassan I M El, and El-Hassan A. M. 2003. "Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis." *Lancet Infectious Diseases* 3:87–98.

Ευρωπαϊκή Επιτροπή. 2020. "Το Ελαιόλαδο Στην ΕΕ." Retrieved January 18, 2023 (https://agriculture.ec.europa.eu/farming/crop-productions-and-plant-based-products/olive-oil_el).

Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης, Άρθρο 71, παράγραφος 1. 1987. "Κώδικας Τροφίμων, Ποτών Και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης, Άρθρο 71, Παράγραφος 1."

Παράρτημα Ι

Παρασκευές διαλυμάτων

- ❖ **Πλήρες θρεπτικό διάλυμα RPMI-1640:** εμπλουτισμένο με 10 mM διαλύματος HEPES, 2 mM L-γλουταμίνης (Biosera, UK), στρεπτομυκίνη σε συγκέντρωση 100 µg/mL, πενικιλίνη σε συγκέντρωση 100 U/mL (Biowest, USA) και 10% v/v ορό εμβρύου μόσχου (FBS).
- ❖ **Fetus Bovine Serum (FBS):** Ορός εμβρύου μόσχου, αδρανοποιημένος στους 56 °C για 30 λεπτά, προκειμένου να αδρανοποιηθούν οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος. Ο ορός αποθηκεύεται στους -20 °C.
- ❖ **Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate-buffered-saline) 10x, pH 7,4:** 1 L διαλύματος παρασκευάζεται με την προσθήκη 80 g NaCl, 2g KCl, 11,5 g Na₂HPO₄ και 2 g KH₂PO₄, σε δις-απεσταγμένο νερό. Το pH ρυθμίζεται στο 7,2 - 7,4 και το διάλυμα αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- ❖ **Διάλυμα χρωστικής TrypanBlue (μπλε του τρυπανίου), 0,4% w/v:** παρασκευάζεται με την διάλυση 0,4 g χρωστικής TrypanBlue σε 100 mL PBS (1x) ή φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα διηθείται με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,45 µm.
- ❖ **Θρεπτικό διάλυμα Schneider's:** Στο θρεπτικό υλικό προστίθενται τα αντιβιοτικά πενικιλίνη (100 U/mL) και στρεπτομυκίνη (100 µg/mL).
- ❖ **Διάλυμα SDS (Δωδέκυλο θειϊκό νάτριο):** παρασκευάζεται με την προσθήκη 0,01 g SDS σε 100 mL PBS (1x) ή αποστειρωμένου νερού.
- ❖ **Διάλυμα Triton X-100/BSA:** παρασκευάζεται με την προσθήκη 0,1 mL TritonX-100 και 5 mg/mL BSA σε 100 mL PBS 1x. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.
- ❖ **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE (Tris-boric-EDTA) 10x:** 1 L TBE 10x παρασκευάζεται με την προσθήκη 108 g Tris Base, 55 g Βορικού οξέος, 40 mL 0,5 M EDTA pH 8, σε ddH₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Παράρτημα II

Αναλυτικά δεδομένα από τις *in vitro* αλληλεπιδράσεις των βιοφαινολικών ενώσεων με τη μιλτεφοσίνη

Πίνακας 12. IC₅₀s, FICs και ΣFIC από τον συνδυασμό της HePC με το TPF1 έναντι των προμαστιγωτών μορφών *Leishmania* spp.

ΠΑΡΑΣΙΤΑ	ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ	ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ ΦΑΡΜΑΚΩΝ								ΕΙΔΟΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ
		ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ (μg/mL)		IC ₅₀ ± SD (μg/mL)		FIC		ΣFIC	FICI	
		HePC	TPF1	HePC	TPF1	HePC	TPF1			
<i>L. infantum</i>	A	20	0	2,48 ± 0,23	-	-	-	-	0,62	ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΗ
	B	16	1760	1,31 ± 0,31	160,74 ± 1,46	0,530	0,135	0,665		
	C	12	3520	0,93 ± 0,29	312,12 ± 24,21	0,374	0,263	0,637		
	D	8	5280	0,54 ± 0,17	299,95 ± 15,83	0,216	0,253	0,469		
	E	4	7040	0,35 ± 0,07	681,03 ± 39,12	0,142	0,574	0,716		
	F	0	8800	-	1186,48 ± 45,82	-	-	-		
<i>L. major</i>	A	28	0	3,38 ± 0,3	-	-	-	-	0,81	ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΗ
	B	22,4	1540	2,12 ± 0,04	145,95 ± 2,43	0,628	0,150	0,777		
	C	16,8	3080	1,68 ± 0,03	306,58 ± 5,14	0,497	0,314	0,811		
	D	11,2	4620	1,13 ± 0,02	463,93 ± 12,34	0,336	0,475	0,811		
	E	5,6	6160	0,58 ± 0,02	653,53 ± 34,05	0,172	0,671	0,842		
	F	0	7700	-	976,03 ± 21,56	-	-	-		

Πίνακας 13. IC₅₀s, FICs και ΣFIC από τον συνδυασμό της HePC με το TPF2 έναντι των προμαστιγωτών μορφών *Leishmania* spp.

ΠΑΡΑΣΙΤΑ	ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ	ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ ΦΑΡΜΑΚΩΝ								ΕΙΔΟΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ
		ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ (μg/mL)		IC ₅₀ ± SD (μg/mL)		FIC		ΣFIC	FICI	
		HePC	TPF2	HePC	TPF2	HePC	TPF2			
<i>L. infantum</i>	A	20	0	2,48 ± 0,23	-	-	-	-	0,63	ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΗ
	B	16	500	1,34 ± 0,37	41,9 ± 11,61	0,540	0,130	0,669		
	C	12	1000	0,57 ± 0,02	48,16 ± 2,7	0,232	0,149	0,380		
	D	8	1500	0,74 ± 0,06	135,8 ± 13,78	0,297	0,429	0,726		
	E	4	2000	0,32 ± 0,13	194,2 ± 6,12	0,130	0,602	0,732		
	F	0	2500	-	322,58 ± 18,87	-	-	-		
<i>L. major</i>	A	28	0	3,38 ± 0,3	-	-	-	-	0,65	ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΗ
	B	22,4	400	1,98 ± 0,70	35,41 ± 12,51	0,586	0,140	0,726		
	C	16,8	800	2,57 ± 0,71	62,42 ± 19,50	0,760	0,247	1,007		
	D	11,2	1200	0,69 ± 0,25	73,27 ± 27,02	0,203	0,290	0,493		
	E	5,6	1600	0,26 ± 0,18	73,02 ± 49,90	0,076	0,289	0,365		
	F	0	2000	-	252,58 ± 30,16	-	-	-		

Πίνακας 14. IC₅₀s, FICs και ΣFIC από τον συνδυασμό της HePC με την OLE έναντι των προμαστιγωτών μορφών *Leishmania* spp.

ΠΑΡΑΣΙΤΑ	ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ ΦΑΡΜΑΚΩΝ									
	ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ (μg/mL)		IC ₅₀ ± SD (μg/mL)		FIC		ΣFIC	FICI	ΕΙΔΟΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ
		HePC	OLE	HePC	OLE	HePC	OLE			
<i>L. infantum</i>	A	20	0	2,48 ± 0,23	-	-	-	-	3,12	ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ
	B	16	280	4,02 ± 0,29	70,37 ± 4,80	1,619	0,397	2,016		
	C	12	560	3,17 ± 0,29	154,93 ± 6,23	1,280	0,873	2,153		
	D	8	840	3,36 ± 0,92	297,62 ± 13,97	1,355	1,678	3,033		
	E	4	1120	2,74 ± 0,11	739,25 ± 36,89	1,105	4,167	5,272		
	F	0	1400	-	177,4 ± 30	-	-	-		
<i>L. major</i>	A	28	0	3,38 ± 0,3	-	-	-	-	2,03	ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ
	B	22,4	420	3,34 ± 0,12	62,83 ± 2,27	0,987	0,235	1,222		
	C	16,8	840	2,89 ± 0,02	143,64 ± 1,32	1,394	0,875	2,269		
	D	11,2	1260	2,85 ± 0,76	374,69 ± 6,96	0,945	1,352	2,297		
	E	5,6	1680	1,41 ± 0,45	504,11 ± 16,97	0,464	1,887	2,350		
	F	0	2100	-	267,2 ± 37,8	-	-	-		

Πίνακας 15. IC₅₀s, FICs και ΣFIC από τον συνδυασμό της HePC με την HT έναντι των προμαστιγωτών μορφών *Leishmania* spp.

ΠΑΡΑΣΙΤΑ	ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ ΦΑΡΜΑΚΩΝ									
	ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ (μg/mL)		IC ₅₀ ± SD (μg/mL)		FIC		ΣFIC	FICI	ΕΙΔΟΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ
		HePC	HT	HePC	HT	HePC	HT			
<i>L. infantum</i>	A	20	0	2,48 ± 0,23	-	-	-	-	1,31	ΑΔΙΑΦΟΡΗ
	B	16	420	2,5 ± 0,18	64,4 ± 4,9	0,998	0,239	1,237		
	C	12	840	2,1 ± 0,18	143,4 ± 12,5	0,836	0,532	1,368		
	D	8	1260	1,4 ± 1,12	225,1 ± 17,7	0,578	0,835	1,413		
	E	4	1680	0,6 ± 0,09	263,9 ± 41,2	0,257	0,979	1,235		
	F	0	2100	-	269,63 ± 26,2	-	-	-		
<i>L. major</i>	A	28	0	3,38 ± 0,3	-	-	-	-	1,73	ΑΔΙΑΦΟΡΗ
	B	22,4	640	3,5 ± 0,74	101,1 ± 21,4	1,041	0,249	1,290		
	C	16,8	1280	2,8 ± 0,64	213,9 ± 50,6	0,829	0,527	1,356		
	D	11,2	1920	3,5 ± 1,12	681,2 ± 75,4	1,049	1,679	2,728		
	E	5,6	2560	1,1 ± 0,13	496,1 ± 54,7	0,314	1,223	1,537		
	F	0	3200	-	405,67 ± 39,8	-	-	-		

Πίνακας 16. IC₅₀s, FICs και ΣFIC από τον συνδυασμό της HePC με την OLEA έναντι των προμαστιγωτών μορφών *Leishmania spp.*

ΠΑΡΑΣΙΤΑ	ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ	ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ ΦΑΡΜΑΚΩΝ								ΕΙΔΟΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ
		ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ (μg/mL)		IC ₅₀ ± SD (μg/mL)		FIC		ΣFIC	FICI	
		HePC	OLEA	HePC	OLEA	HePC	OLEA			
<i>L. infantum</i>	A	20	0	2,48 ± 0,23	-	-	-	-	1,37	ΑΔΙΑΦΟΡΗ
	B	16	500	1,8 ± 0,89	73,1 ± 9,9	0,743	0,226	0,969		
	C	12	1000	2,6 ± 0,97	172,9 ± 16,8	1,066	0,534	1,600		
	D	8	1500	1,3 ± 0,47	284,8 ± 37	0,511	0,880	1,390		
	E	4	2000	0,7 ± 0,24	406,4 ± 54,1	0,271	1,255	1,526		
	F	0	2500	-	323,7 ± 18,49	-	-	-		
<i>L. major</i>	A	28	0	3,38 ± 0,3	-	-	-	-	1,74	ΑΔΙΑΦΟΡΗ
	B	22,4	900	3,6 ± 1,09	171,2 ± 5,5	1,074	0,300	1,374		
	C	16,8	1800	3,2 ± 1,02	398,7 ± 12,8	0,937	0,698	1,635		
	D	11,2	2700	2,5 ± 0,71	692,0 ± 31,2	0,727	1,212	1,939		
	E	5,6	3600	1,2 ± 0,39	947,6 ± 6,8	0,369	1,660	2,028		
	F	0	4500	-	571 ± 19,36	-	-	-		

Πίνακας 17. IC₅₀s, FICs και ΣFIC από τον συνδυασμό της HePC με την OLEO έναντι των προμαστιγωτών μορφών *Leishmania spp.*

ΠΑΡΑΣΙΤΑ	ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ	ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ ΦΑΡΜΑΚΩΝ								ΕΙΔΟΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ
		ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ (μg/mL)		IC ₅₀ ± SD (μg/mL)		FIC		ΣFIC	FICI	
		HePC	OLEO	HePC	OLEO	HePC	OLEO			
<i>L. infantum</i>	A	20	0	2,48 ± 0,23	-	-	-	-	0,44	ΣΥΝΕΡΓΙΣΤΙΚΗ
	B	16	320	1,4 ± 0,05	25,3 ± 4,1	0,561	0,123	0,683		
	C	12	640	1,0 ± 0,64	33,8 ± 7,0	0,394	0,164	0,558		
	D	8	960	0,4 ± 0,22	38,6 ± 7,1	0,090	0,187	0,278		
	E	4	1280	0,2 ± 0,10	38,9 ± 1,7	0,068	0,188	0,257		
	F	0	1600	-	206,26 ± 4,6	-	-	-		
<i>L. major</i>	A	28	0	3,38 ± 0,3	-	-	-	-	0,39	ΣΥΝΕΡΓΙΣΤΙΚΗ
	B	22,4	480	1,9 ± 0,11	40,4 ± 2,4	0,558	0,132	0,690		
	C	16,8	960	0,7 ± 0,09	41,0 ± 5,1	0,212	0,134	0,346		
	D	11,2	1440	0,4 ± 0,01	55,7 ± 1,4	0,128	0,182	0,310		
	E	5,6	1920	0,2 ± 0,03	54,6 ± 9,2	0,047	0,178	0,225		
	F	0	2400	-	306,43 ± 55,6	-	-	-		

Πίνακας 18. IC₅₀S, FICs και ΣFIC από τον συνδυασμό της HePC με το TPF1 έναντι των ενδοκυτταρικά αμαστιγωτών μορφών *Leishmania* spp.

ΠΑΡΑΣΙΤΑ	ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ ΦΑΡΜΑΚΩΝ									
	ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ (μg/mL)		IC ₅₀ ± SD (μg/mL)		FIC		ΣFIC	FICI	ΕΙΔΟΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ
		HePC	TPF1	HePC	TPF1	HePC	TPF1			
<i>L. infantum</i>	A	12	0	1,57 ± 0,84	-	-	-	-	2,22	ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ
	B	9,6	320	4,66 ± 0,39	155,51 ± 13,48	2,966	0,751	3,718		
	C	7,2	640	1,70 ± 0,20	153,77 ± 20,02	1,084	0,743	1,827		
	D	4,8	960	1,39 ± 0,36	195,27 ± 5,85	0,833	0,943	1,826		
	E	2,4	1280	0,41 ± 0,11	254,96 ± 14,44	0,261	1,232	1,493		
	F	0	1600	-	207,02 ± 6,57	-	-	-		
<i>L. major</i>	A	18	0	2,36 ± 0,17	-	-	-	-	2,48	ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ
	B	14,4	224	6,87 ± 1,33	106,36 ± 21,03	2,909	0,747	3,657		
	C	10,8	448	4,52 ± 0,97	188,11 ± 37,90	1,916	1,322	3,238		
	D	7,2	672	1,48 ± 0,27	129,54 ± 13,43	0,627	0,910	1,538		
	E	3,6	896	0,75 ± 0,17	164,39 ± 16,03	0,317	1,155	1,472		
	F	0	1120	-	142,3 ± 28,24	-	-	-		

Πίνακας 19. IC₅₀S, FICs και ΣFIC από τον συνδυασμό της HePC με το TPF2 έναντι των ενδοκυτταρικά αμαστιγωτών μορφών *Leishmania* spp.


ΠΑΡΑΣΙΤΑ	ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ ΦΑΡΜΑΚΩΝ									
	ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ (μg/mL)		IC ₅₀ ± SD (μg/mL)		FIC		ΣFIC	FICI	ΕΙΔΟΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ
		HePC	TPF2	HePC	TPF2	HePC	TPF2			
<i>L. infantum</i>	A	12	0	1,57 ± 0,84	-	-	-	-	3,47	ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ
	B	9,6	160	5,87 ± 0,87	97,66 ± 14,60	3,738	0,930	4,668		
	C	7,2	320	2,44 ± 0,29	108,85 ± 13,04	1,554	1,037	2,590		
	D	4,8	480	2,12 ± 0,28	212,31 ± 32,95	1,350	2,022	3,372		
	E	2,4	640	1,03 ± 0,19	271,56 ± 43,90	0,653	2,587	3,240		
	F	0	800	-	104,98 ± 10,02	-	-	-		
<i>L. major</i>	A	18	0	2,36 ± 0,17	-	-	-	-	3,93	ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ
	B	14,4	120	7,93 ± 1,50	66,21 ± 12,65	3,360	0,870	4,231		
	C	10,8	240	5,92 ± 1,15	131,94 ± 4,07	2,509	1,734	4,244		
	D	7,2	360	3,84 ± 0,54	192,23 ± 26,83	1,626	2,527	4,153		
	E	3,6	480	1,26 ± 0,53	194,64 ± 52,07	0,536	2,559	3,095		
	F	0	600	-	76,07 ± 14,5	-	-	-		

Πίνακας 20. IC₅₀S, FICs και ΣFIC από τον συνδυασμό της HePC με την OLEO έναντι των ενδοκυτταρικά αμαστιγωτών μορφών *Leishmania* spp.

ΠΑΡΑΣΙΤΑ	ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ ΦΑΡΜΑΚΩΝ									
	ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ (μg/mL)		IC ₅₀ ± SD (μg/mL)		FIC		ΣFIC	FICI	ΕΙΔΟΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ
		HePC	OLEO	HePC	OLEO	HePC	OLEO			
<i>L. infantum</i>	A	12	0	1,57 ± 0,84	-	-	-	-	3,31	ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ
	B	9,6	62	5,1 ± 0,88	35,8 ± 9,1	3,278	0,928	4,206		
	C	7,2	124	4,0 ± 0,34	69,0 ± 5,8	2,558	1,789	4,347		
	D	4,8	186	1,8 ± 0,08	68,1 ± 3,1	1,121	1,765	2,886		
	E	2,4	248	0,5 ± 0,08	57,4 ± 12,6	0,329	1,489	1,818		
	F	0	310	-	38,56 ± 5,4	-	-	-		
<i>L. major</i>	A	18	0	2,36 ± 0,17	-	-	-	-	2,55	ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ
	B	14,4	43	4,6 ± 1,28	13,6 ± 3,8	1,933	0,505	2,437		
	C	10,8	86	4,0 ± 0,27	31,8 ± 2,3	1,698	1,179	2,877		
	D	7,2	129	2,1 ± 0,62	37,6 ± 11	0,883	1,393	2,276		
	E	3,6	172	1,2 ± 0,05	57,1 ± 2,5	0,505	2,114	2,619		
	F	0	215	-	27,01 ± 7,27	-	-	-		

Article

Direct In Vitro Comparison of the Anti-Leishmanial Activity of Different Olive Oil Total Polyphenolic Fractions and Assessment of Their Combined Effects with Miltefosine

Georgia Gogou ^{1,2,†}, Olga S. Koutsoni ^{1,†}, Panagiotis Stathopoulos ², Leandros A. Skaltsounis ², Maria Halabalaki ²  and Eleni Dotsika ^{1,*}

¹ Laboratory of Cellular Immunology, Department of Microbiology, Hellenic Pasteur Institute, 11521 Athens, Greece

² Division of Pharmacognosy and Natural Product Chemistry, Department of Pharmacy, National and Kapodistrian University of Athens, 15784 Athens, Greece

* Correspondence: e.dotsika@pasteur.gr; Tel./Fax: +30-2106478828

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: The bioactive compounds present in the edible products of the olive tree have been extensively studied and their favorable effects on various disease risk factors have been demonstrated. The aim of this study was to perform a comparative analysis of the anti-leishmanial effects of total phenolic fractions (TPFs) derived from extra virgin olive oil with different phenolic contents and diverse quantitative patterns. Moreover, the present study investigated their association with miltefosine, a standard anti-leishmanial drug, against both extracellular promastigotes and intracellular amastigotes of a viscerotropic and a dermatropic *Leishmania* strain. The chemical compositions of TPFs were determined by high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). Analysis of parasite growth kinetics, reactive oxygen species production and apoptotic events were determined by microscopy and flow cytometry. Our results revealed that the presence of oleacein (OLEA) and oleocanthal (OLEO) secoiridoids enhances the anti-leishmanial effect of TPE. The association between TPFs and miltefosine was suggested as being additive in *Leishmania infantum* and *Leishmania major* promastigotes, and as antagonistic in intracellular amastigotes, as was evaluated with the modified isobologram method. The obtained data verified that TPFs are bioactive dietary extracts with a strong anti-leishmanial activity and highlighted that fractions that are richer in OLEA and OLEO phenolic compounds possess stronger inhibitory effects against parasites. This study may contribute to improving the therapeutic approaches against leishmaniasis.

Keywords: leishmaniasis; natural products; total phenolic fraction; promastigotes; intracellular amastigotes; isobologram; combination therapy



Citation: Gogou, G.; Koutsoni, O.S.; Stathopoulos, P.; Skaltsounis, L.A.; Halabalaki, M.; Dotsika, E. Direct In Vitro Comparison of the Anti-Leishmanial Activity of Different Olive Oil Total Polyphenolic Fractions and Assessment of Their Combined Effects with Miltefosine. *Molecules* **2022**, *27*, 6176. <https://doi.org/10.3390/molecules27196176>

Academic Editor: Arjun H. Banskota

Received: 11 August 2022

Accepted: 17 September 2022

Published: 21 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Leishmaniasis is a vector-borne infectious disease, caused by several protozoan parasites of the genus *Leishmania* [1]. It has a broad spectrum of clinical manifestations, and it is mainly classified into three forms: visceral, cutaneous, and mucocutaneous. Visceral leishmaniasis (VL) is the most severe and systemic form, which can be lethal if left untreated, while cutaneous leishmaniasis (CL) is the most prevalent form and is usually limited to an ulcer that self-heals, but can also lead to disfiguring scars and disabilities [2]. It is estimated that 50,000 to 90,000 new cases of VL and 600,000 to 1,000,000 new cases of CL occur worldwide annually [3].

Since a vaccine is currently unavailable, chemotherapy is the only treatment option for leishmaniasis [4,5]. Among the various anti-leishmanial treatments, pentavalent antimonials were the first-line drugs applied against leishmaniasis over several decades P [6,7]. Nowadays, the available monotherapies and combination treatments include various chemotherapeutic resources, such as amphotericin B, pentamidine, paromomycin,

various azoles, and miltefosine [8–10]. Nevertheless, all the existing drugs present several drawbacks, such as a high cost, toxicity, and the emergence of resistance. Thus, the treatment of leishmaniasis remains a challenge and the search for new active compounds is an urgent need.

Natural products, as either herbal extracts or plant-derived compounds, comprise valuable sources of drugs and many of them have been tested as anti-parasitic and anti-leishmanial drugs [5,8,11]. In addition, combination therapies might be an alternative approach by reducing the overall dose of drugs and the treatment duration [12–14]. The olive tree *Olea europaea* L. (Oleaceae), which extensively grows in the Mediterranean region, has long been known to contain a wealth of biologically active compounds with health-promoting potential [15,16]. Extra virgin olive oil (EVOO) is mainly composed of lipophilic components that are rich in monounsaturated fatty acids (MUFA). It also consists of the polar fraction (total phenolic fraction—TPF), which contains diverse chemical classes of polyphenols, such as phenyl alcohols, phenolic acids, secoiridoids, flavonoids, and lignans, which are associated with health-beneficial properties, such as antioxidant, anti-inflammatory and anti-cancer properties [17–20]. According to the EU Health Claim Labeling Regulation, olive oil polyphenols are therefore listed among food substances with attributed health claims (432/2012) [21,22]. Our group has showcased the anti-leishmanial properties of olive oil phenolic compounds by demonstrating that pure oleuropein and oleocanthal (OLEO) exert anti-leishmanial properties in vitro and promote in vivo efficacy in murine experimental models of VL and CL [23–26]. In addition, we have reported that TPF exhibits chemotherapeutic anti-leishmanial activity in vitro and in vivo [27,28].

This study aimed (i) to perform an in vitro comparative analysis of the anti-leishmanial properties of two distinct TPFs with completely different phenolic contents with respect to the two main chemical classes of polyphenols, secoiridoids (oleacein—OLEA, and oleocanthal—OLEO) and phenyl alcohols (hydroxytyrosol—HT, and tyrosol—T), against a viscerotropic and a dermatropic *Leishmania* strain, and (ii) to determine their combinatorial association with the miltefosine standard anti-leishmanial drug (hexadecylphosphocholine/HePC), on both parasite developmental forms, the extracellular promastigotes and the intracellular amastigotes. As treatment of the disease is challenging, the present study may contribute to the development of an effective treatment scheme against leishmaniasis based on bioactive components that are naturally presented in the diet.

2. Results

2.1. Chemical Composition of Total Phenolic Fraction 1 (TPF1) and Total Phenolic Fraction 2 (TPF2)

The chemical analysis performed on the EVOO-1 and EVOO-2 samples revealed that TPF1 was rich in HT and T while TPF2 was enriched in OLEA and OLEO (Figure 1). Specifically, the content of HT and T in the EVOO-1 extract was 7.02 and 42.07 mg/g of TPF, while the concentration levels of OLEA and OLEO were below the detection limit of the HPLC-DAD method. In the EVOO-2 extract, the content of HT and T was detected approximately at the same levels as TPF1 (5.01 and 12.03 mg per g of extract), while the concentrations of OLEA and OLEO were at higher levels, 144.12 and 301.24 mg/g, respectively (Table 1).

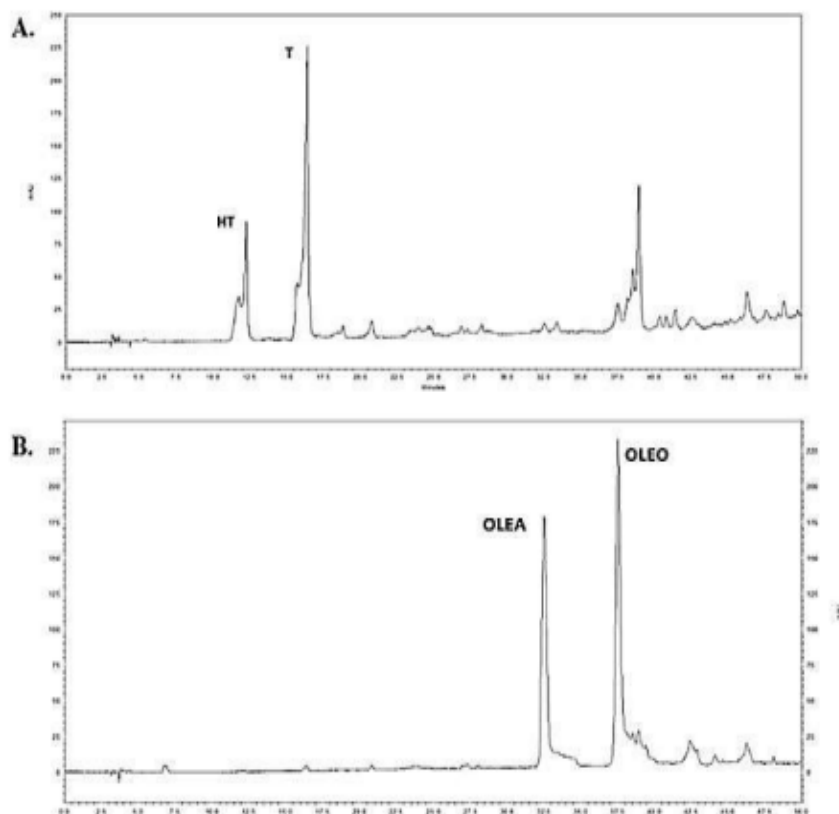


Figure 1. HPLC-DAD chromatograms obtained from the analysis of TPF1 (A) and TPF2 (B) extracts, applying the IOC proposed method. Hydroxytyrosol (HT), tyrosol (T), oleacein (OLEA), and oleocanthal (OLEO) peaks are indicated.

Table 1. Phenolic composition of the analyzed TPF1 and TPF2 extracts. Data of the regression model (linear regression, r^2 -squared and concentration ranges) are given.

Phenolic Compounds	TPF1	TPF2	Linearity of Phenolic Compounds Standards		
	mg/g of Extract (Mean \pm SD, n = 3)	mg/g of Extract (Mean \pm SD, n = 3)	Linear Regression	r^2	Concentration Range (μ g/mL)
HT	7.02 (\pm 0.4)	5.01 (\pm 0.2)	$y = 84028x + 39609$	0.9997	0.5–100
T	42.07 (\pm 0.2)	12.03 (\pm 0.1)	$y = 53933x - 11712$	0.9987	0.5–100
OLEA	Non determined	144.12 (\pm 5.4)	$y = 32720x + 12723$	0.9997	5–500
OLEO	Non determined	301.24 (\pm 6.5)	$y = 18836x + 54185$	0.9982	5–600

2.2. Anti-Promastigote Activity Evaluation (IC_{50}) of TPF1 and TPF2 against *Leishmania* spp.

The biological effects of TPF1 and TPF2 against promastigote forms of two different *Leishmania* species, were evaluated at various increasing concentrations, ranging from 800 to 1500 μ g/mL and 100 to 850 μ g/mL, respectively. After 72 h of incubation, both TPF1 and TPF2 demonstrated inhibitory effects on the viability of *L. infantum* and *L. major* promastigotes in a dose-dependent manner in comparison with untreated parasites (Figure 2). Substantial inhibition was observed at higher concentrations and the IC_{50} values of TPF1 and TPF2 against *L. infantum* promastigotes were determined at 1186.48 ± 45.82 and 322.58 ± 18.87 μ g/mL, respectively, while the relevant IC_{50} values against *L. major* promastigotes were determined at 976.03 ± 21.56 μ g/mL for TPF1 and 252.58 ± 30.16 μ g/mL.

for TPF2 (Table 2). Thus, both *L. infantum* and *L. major* promastigotes were more susceptible to TPF2.

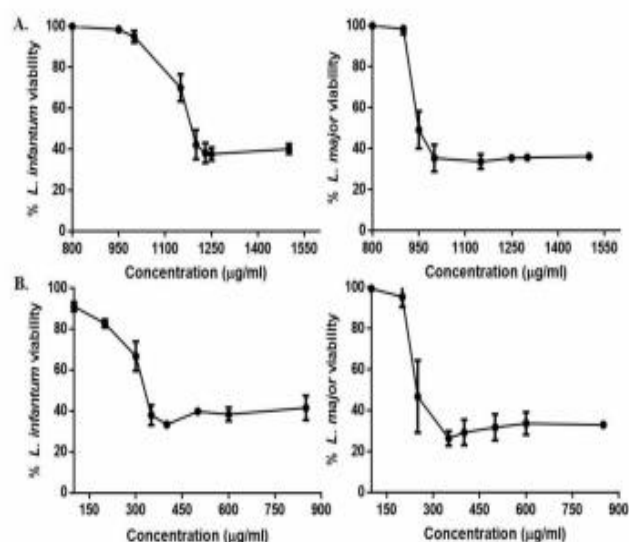


Figure 2. Anti-promastigote effect of TPF1 and TPF2 against *L. infantum* and *L. major* promastigotes. Log-phase promastigotes were treated with TPF1 (A) and TPF2 (B) at various increasing concentrations for 72 h and their viability was determined using the resazurin cell viability assay. OD was determined with a microplate spectrophotometer at 570 nm (reference filter 630 nm). Data are presented as mean values \pm SD of three independent experiments.

Table 2. Cytotoxicity evaluation and anti-leishmanial activity of individual drugs against *Leishmania infantum* and *Leishmania major* promastigotes and intracellular amastigotes.

Compound	Cytotoxicity (J774A.1 Cells) CC ₅₀ (µg/mL)	<i>L. infantum</i>			<i>L. major</i>		
		Promastigotes	Amastigotes		Promastigotes	Amastigotes	
			IC ₅₀ \pm SD (µg/mL)	SI		IC ₅₀ \pm SD (µg/mL)	SI
TPF1	270.22 \pm 8.14	1186.48 \pm 45.82	207.02 \pm 6.57	1.3	976.03 \pm 21.56	142.3 \pm 28.24	1.9
TPF2	157.6 \pm 2.18	322.58 \pm 18.87	104.98 \pm 10.02	1.5	252.58 \pm 30.16	76.07 \pm 14.5	2.07
HePC	28.48 \pm 3.66	2.48 \pm 0.23	1.57 \pm 0.84	18.14	3.38 \pm 0.3	2.36 \pm 0.17	12.06

Data represent mean \pm SD of three independent experiments performed in triplicate. CC₅₀: cytotoxic concentration for 50% of cells; IC₅₀: inhibitory concentration for 50% of parasites; SI (selectivity index) = CC₅₀ for J774A.1 cells/IC₅₀ for amastigotes.

2.3. Anti-Amastigote Activity Evaluation (IC₅₀), Cytotoxicity (CC₅₀) and Selectivity Index Calculation (SI)

Since *Leishmania* spp. have two clearly defined developmental forms: promastigote forms that colonize insect vectors and amastigote forms that multiply primarily within mammalian macrophages [29,30], we therefore tested the activity of TPF1 and TPF2 on intracellular *L. infantum* and *L. major* amastigotes. After the treatment of *Leishmania*-infected macrophages with different concentrations of TPF1 and TPF2, we found a significant inhibition of intracellular amastigotes. The anti-amastigote activity of TPF1 and TPF2 is summarized in Table 2 and the IC₅₀ values were determined at 207.02 \pm 6.57 and 104.98 \pm 10.02 for *L. infantum* and 142.3 \pm 28.24 and 76.07 \pm 14.5 for *L. major*, respectively, indicating that both *L. infantum* and *L. major* amastigotes were also more susceptible to TPF2, as was observed with the promastigote forms. We also determined through the resazurin reduction assay the toxicity of TPF1 and TPF2 on J774A.1 macrophages and we further compared this toxicity with their anti-amastigote activity by calculating the

selectivity index (SI = CC₅₀ for J774A.1 cells/IC₅₀ for amastigotes) (Table 2). Our results demonstrated that both TPF1 and TPF2 were selective against *Leishmania* spp.

2.4. Effect of TPF1 and TPF2 on Growth Kinetics of *Leishmania* spp. Promastigotes

The growth kinetics of log-phase *L. infantum* and *L. major* promastigotes were performed in vitro after their treatment with IC₅₀ and 2 × IC₅₀ concentrations of TPF1 and TPF2, independently. The results were obtained by counting daily the promastigote number of each *Leishmania* strain over a 72 h treatment period. The growth curves are shown in Figure 3. With initial population densities of 20 × 10⁶ parasites/mL, both *L. infantum* and *L. major* untreated parasites exhibited an exponential growth, while treated parasites with TPF1 and TPF2 or the standard drug (HePC), had analogous growth patterns, indicating a significant reduction evident from the first 24 h of treatment. The effect of TPF1 and TPF2 in the culture growth of both *Leishmania* strains was more potent compared to HePC (*p* ≤ 0.05). Specifically, *L. infantum* and *L. major* promastigotes demonstrated an 88.1% and an 88.6% decrease when treated with TPF1 at an IC₅₀ concentration and an 89.8% and a 90.8% decrease when they were treated with TPF1 at 2 × IC₅₀ concentration, respectively, after 24 h of treatment. The relative decrease in HePC-treated parasites was 51.7% and 25.4%, respectively. Additionally, *L. infantum* and *L. major* promastigotes demonstrated a 75% and a 62.7% decrease when they were treated with TPF2 at an IC₅₀ concentration and a 78.3% and a 74.6% decrease when they were treated with 2 × IC₅₀ concentration, respectively. In order to illustrate the anti-promastigote effects of TPF1 and TPF2, phase-contrast micrographs of *L. infantum* and *L. major* treated promastigotes were taken at 72 h of treatment (Figure 3C).

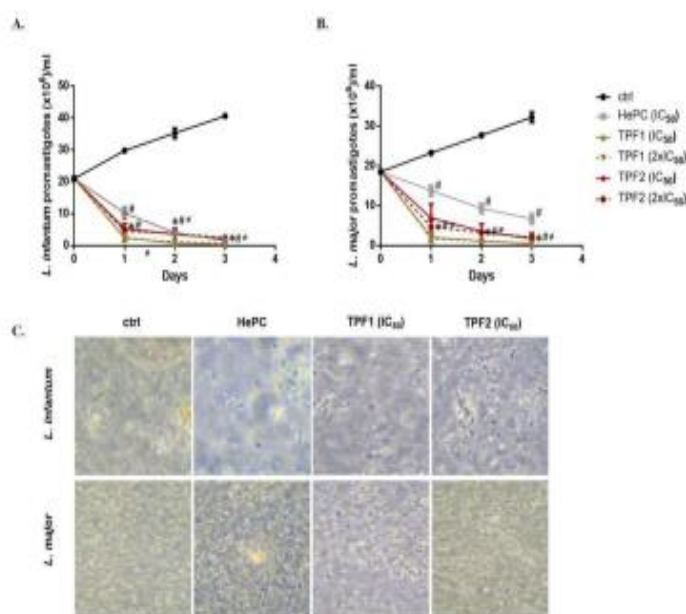


Figure 3. Effect of TPF1 and TPF2 on *Leishmania* spp. promastigotes growth kinetics. Log-phase *L. infantum* (A) and *L. major* (B) promastigotes were treated with TPF1 and TPF2 at IC₅₀ and 2 × IC₅₀ doses. The parasite growth and multiplication were determined by differential counting of dead and live promastigotes at 24 h intervals over a period of 72 h. HePC (IC₅₀)-treated and untreated parasites were used as positive and negative control groups, respectively. Data are expressed as mean value ± SD of three independent experiments. Symbols of * and # indicate significant differences compared to positive and negative control groups, respectively. Differences between TPF1- and TPF2-treated parasites are indicated with ≠. (C) Determination of the promastigote morphology by phase-contrast microscopy (40× magnification).

2.5. TPF1 and TPF2 Induce ROS Generation in *Leishmania* spp. Promastigote

Staining with H₂DCFDA was performed to evaluate TPF1- and TPF2-induced ROS generation in *L. infantum* and *L. major* promastigotes. ROS generation was remarkably enhanced to 91.8% and 98.9% in *L. infantum* promastigotes treated with TPF1 and TPF2 for 72 h, at concentrations corresponding to their IC₅₀ values ($p = 0.021$ and 0.020), compared to the untreated parasites (Figure 4A). Similarly, treatment with TPF1 and TPF2 also generated ROS production in *L. major* promastigotes. We observed 94.2% and 99.5% H₂DCFDA-fluorescent parasites upon treatment with IC₅₀ concentrations, respectively, while the relevant percentage in the control parasites was 18.1% ($p = 0.014$ and 0.009) (Figure 4B). In addition, we also observed a significant shift of fluorescence in the right direction at IC₅₀ and $2 \times$ IC₅₀ concentrations for both TPF1 and TPF2 (Figure 4C,D). Our results indicated that TPF2 was more effective compared to TPF1 in both *Leishmania* strains ($p \leq 0.02$). *Leishmania* spp. promastigotes were also treated with hydrogen peroxide (H₂O₂), serving as the experimental positive control and it induced ROS formation to 55.6% and 52.6% in *L. infantum* and *L. major* promastigotes, respectively (data not shown).

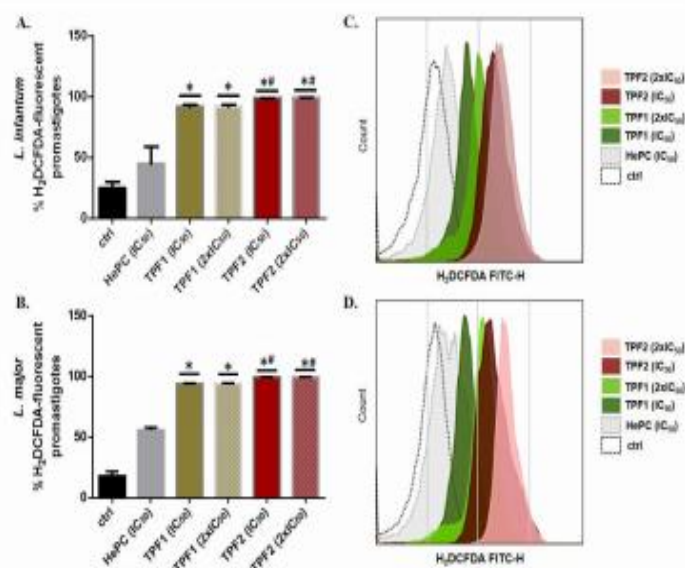


Figure 4. Intracellular ROS levels in TPF1- and TPF2-treated *Leishmania* spp. promastigotes. Log-phase *L. infantum* and *L. major* promastigotes were treated with TPF1 and TPF2 at IC₅₀ and $2 \times$ IC₅₀ doses for 72 h. HePC (IC₅₀)-treated and untreated parasites were used as positive and negative control groups, respectively. ROS levels were quantified using H₂DCFDA and flow cytometry. Data are presented as mean values of H₂DCFDA-fluorescent *L. infantum* (A) and *L. major* (B) promastigotes (\pm SD) in bar diagrams, and as single parameter histograms (FITC-H) for *L. infantum* (C) and *L. major* (D). The symbol of * indicates significant differences compared to the positive control group. Differences between TPF1- and TPF2-treated parasites are indicated with #.

2.6. TPF1 and TPF2 Induce Phosphatidylserine Externalization and Cause Loss of Cell Membrane Integrity in *Leishmania* spp. Promastigotes

Staining with annexin V-FITC and propidium iodide (PI) was performed to evaluate TPF1- and TPF2-induced phosphatidylserine externalization and cell membrane integrity in *L. infantum* and *L. major* promastigotes. After the treatment of *L. infantum* promastigotes with TPF1 and TPF2 at their IC₅₀ concentrations for 72 h, the number of viable parasites notably decreased from 97.8% to 53.5% and 39.4%, respectively (Figure 5A). Likewise, the treatment of *L. major* parasites with TPF1 and TPF2 at IC₅₀ concentrations for 72 h, led to a decrease in viable parasites from 96.8% to 49.4% and 24.8% ($p < 0.05$) (Figure 5B). Moreover,

there are statistically significant differences in the percentage of annexin V+ parasites between the groups treated with TPF1 and TPF2 and the reference drug HePC compared to the untreated control group. After treatment with TPF1 and TPF2, the percentage of the annexin V+ population increased from 1.4% to 18.9% and 22.7%, compared to the untreated *L. infantum* parasites ($p = 0.021$). The relative percentages in *L. major*-treated parasites increased from 2.7% to 23.6% and 34.5% ($p = 0.034$). Furthermore, our results showed that the treatment of *L. infantum* and *L. major* promastigotes with TPF1 and TPF2 provoked an equal increase in annexin V+ parasites as the HePC reference drug ($p \geq 0.05$), while only TPF2-treated *L. major* promastigotes demonstrated an increased proportion of the annexin V+ population compared to HePC ($p = 0.021$). Representative dot plots with respective quadrants that illustrate early apoptotic, late apoptotic and necrotic parasites are presented in Figure 6. Triton X-100 was used as the experimental positive control of necrosis (annexin V-/PI+). Treatment with triton X-100 drove 45.9% and 49.3% of *L. infantum* and *L. major* promastigotes to suffer a loss of membrane integrity (data not shown).

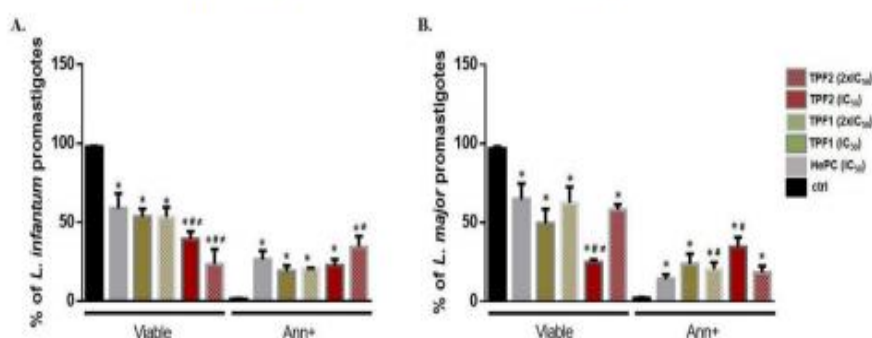


Figure 5. Changes in phosphatidylserine exposure in TPF1- and TPF2-treated *Leishmania* spp. promastigotes. Log-phase *L. infantum* (A) and *L. major* (B) promastigotes were either left untreated (negative control) or were treated with IC₅₀ and 2 × IC₅₀ doses of TPF1, TPF2 and HePC (positive control) for 72 h. Parasites were labelled with annexin V-FITC and PI. Data are presented as mean values (± SD) of viable (annexin V-/PI- parasites) and annexin V+ parasites in bar diagrams that are representative of three independent experiments. The symbols of * and # indicate significant differences compared to the negative and positive control groups, respectively. Significant differences between TPF1- and TPF2-treated parasites are indicated with #.

2.7. TPF1 and TPF2 Induce DNA Fragmentation

DNA fragmentation of log-phase *L. infantum* and *L. major* promastigotes treated with TPF1 and TPF2 for 72 h was determined by a TUNEL assay. TUNEL staining revealed a significant shift of fluorescence in the right direction in TPF1- and TPF2-treated parasites (Figure 7A). TUNEL+ *L. infantum* promastigotes were 5.5- and 11-fold increased after treatment with TPF1 and TPF2 at their IC₅₀ concentration for 72 h ($p = 0.034$ and 0.021, respectively) (Figure 7B). Similarly, TUNEL+ *L. major* promastigotes were 7.8- and 12.6-fold increased after treatment with TPF1 and TPF2 at their IC₅₀ concentrations for 72 h, compared to the untreated parasites ($p = 0.021$ and 0.034, respectively) (Figure 7B). We further validated the findings of TUNEL assay by performing a DNA fragmentation assay using agarose gel electrophoresis. Both TPF1 and TPF2 at their IC₅₀ concentrations were able to induce marked genomic DNA fragmentation of *L. infantum* and *L. major* parasites as observed on an agarose gel (Figure 7C).

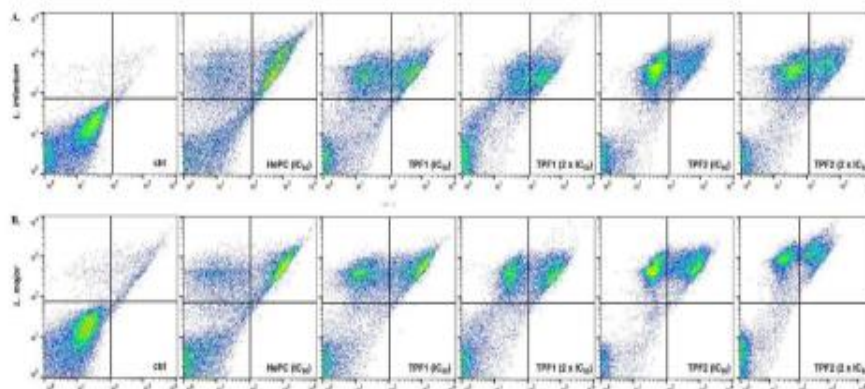


Figure 6. Changes in phosphatidylserine exposure and plasma membrane integrity in TPF1- and TPF2-treated *L. infantum* and *L. major* promastigotes. Log-phase *L. infantum* (A) and *L. major* (B) promastigotes were either left untreated (negative control) or were treated with IC_{50} and $2 \times IC_{50}$ doses of TPF1, TPF2 and HePC (positive control) for 72 h. Parasites were labelled with annexin V-FITC and PI that discriminate between early (annexin V+/PI-) and late (annexin V+/PI+) apoptotic, necrotic (annexin V-/PI+) and live (annexin V-/PI-) parasites. Phosphatidylserine exposure and cell membrane permeability were quantified by flow cytometry and data are presented as flow cytometric dot plots with respective quadrants, representative of one experiment.

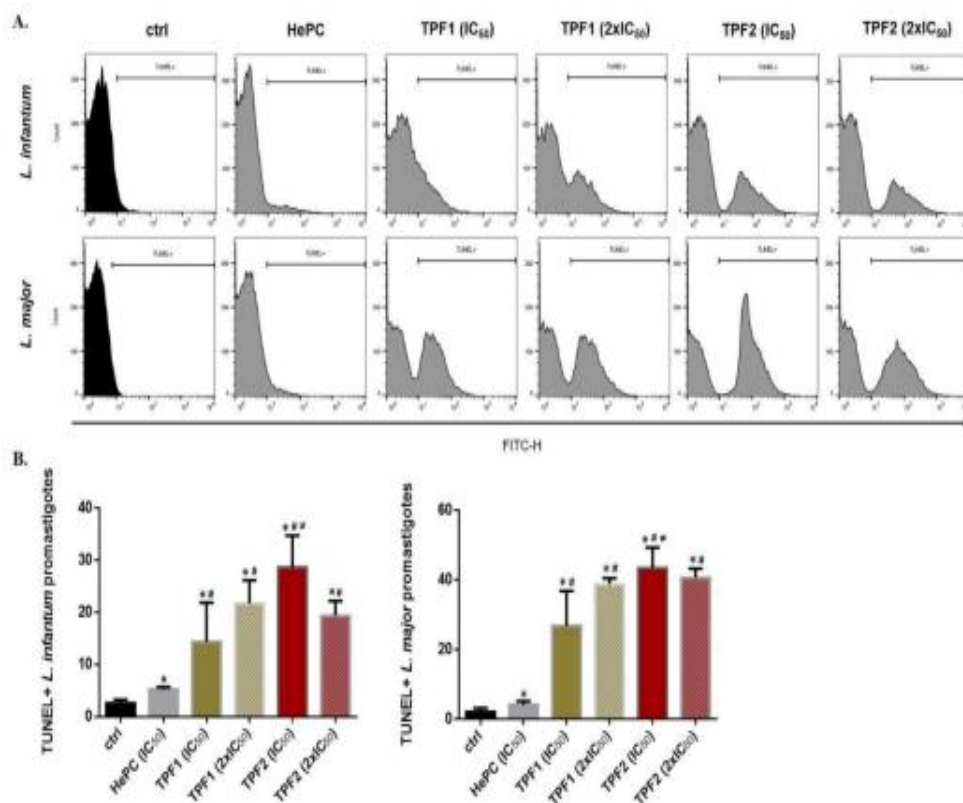


Figure 7. Cont.



Figure 7. TPF1 and TPF2 induced DNA fragmentation in *L. infantum* and *L. major* promastigotes. Log-phase *L. infantum* and *L. major* promastigotes were either left untreated (negative control) or were treated with IC_{50} and $2 \times IC_{50}$ doses of TPF1, TPF2 and HePC (positive control) for 72 h. (A) Flow cytometric single parameter histograms (FL1-H) representative of one experiment. (B) Bar diagrams illustrating the mean TUNEL+ *L. infantum* and *L. major* parasites (\pm SD) and are representative of three independent experiments. The symbols of * and # indicate significant differences compared to the negative and positive control groups, respectively. Significant differences between TPF1- and TPF2-treated parasites are indicated with \neq . (C) Genomic DNA fragmentation assay on a 1.5% agarose gel.

2.8. Anti-Leishmanial Interaction of TPF1 and TPF2 with Miltefosine

The anti-leishmanial effects of TPF1 and TPF2 in combination with HePC were investigated on promastigote and amastigote forms of *L. infantum* and *L. major*. This experimental approach allowed the determination of fractional inhibitory concentrations (FICs) for each combination. Tables 3 and 4 show the IC_{50} values for each drug alone and in combination with HePC, as well as the FIC values and the fractional inhibitory concentration index (FICI) [31,32]. Thus, the drug combinations on promastigote forms reduced the IC_{50} values of HePC approximately up to seven times. Interactions of TPF1 and TPF2 with HePC were classified as additive with a FIC index of 0.62 and 0.81 for TPF1-HePC-treated *L. infantum* and *L. major* promastigotes, respectively (Table 3). Similarly, FIC indexes in TPF2-HePC interactions were 0.63 and 0.65 for *L. infantum* and *L. major* promastigotes, respectively (Table 4).

Table 3. IC_{50} , FICs and Σ FICs of TPF1 and HePC combinations against *Leishmania infantum* and *Leishmania major* promastigotes and intracellular amastigotes.

Parasite Form	Combination	Combined Drugs						Σ FIC	FICI	Nature of Interaction
		Concentrations (μ g/mL)		$IC_{50} \pm SD$ (μ g/mL)		FIC				
		HePC	TPF1	HePC	TPF1	HePC	TPF1			
Promastigotes <i>L. infantum</i>	A	20	0	2.48 ± 0.23	-	-	-	-	-	Additive
	B	16	1760	1.31 ± 0.31	160.74 ± 1.46	0.530	0.135	0.665	-	
	C	12	3520	0.93 ± 0.29	312.12 ± 24.21	0.374	0.263	0.637	0.62	
	D	8	5280	0.54 ± 0.17	299.95 ± 15.83	0.216	0.253	0.469	-	
	E	4	7040	0.35 ± 0.07	681.05 ± 39.12	0.142	0.574	0.716	-	
	F	0	8800	-	1186.48 ± 45.82	-	-	-	-	
Promastigotes <i>L. major</i>	A	28	0	3.38 ± 0.3	-	-	-	-	-	Additive
	B	22.4	1540	2.12 ± 0.04	145.95 ± 2.43	0.628	0.150	0.777	-	
	C	16.8	3080	1.68 ± 0.03	306.58 ± 5.14	0.497	0.314	0.811	0.81	
	D	11.2	4620	1.13 ± 0.02	463.93 ± 12.34	0.336	0.475	0.811	-	
	E	5.6	6160	0.58 ± 0.02	653.53 ± 34.05	0.172	0.670	0.842	-	
	F	0	7700	-	976.03 ± 21.56	-	-	-	-	

Table 3. Cont.

Parasite Form	Combination	Combined Drugs						ΣFIC	FICI	Nature of Interaction	
		Concentrations (µg/mL)		IC ₅₀ ± SD (µg/mL)		FIC					
		HePC	TPF1	HePC	TPF1	HePC	TPF1				
Amastigotes <i>L. infantum</i>	A	12	0	1.57 ± 0.84	-	-	-	-	-	2.22	Antagonistic
	B	9.6	320	4.66 ± 0.39	155.51 ± 13.48	2.966	0.751	3.718			
	C	7.2	640	1.70 ± 0.20	153.77 ± 20.02	1.084	0.743	1.827			
	D	4.8	960	1.39 ± 0.36	195.27 ± 5.85	0.883	0.943	1.826			
	E	2.4	1280	0.41 ± 0.11	254.96 ± 14.44	0.261	1.232	1.493			
	F	0	1600	-	207.02 ± 6.57	-	-	-			
Amastigotes <i>L. major</i>	A	18	0	2.36 ± 0.17	-	-	-	-	-	2.48	Antagonistic
	B	14.4	224	6.87 ± 1.33	106.36 ± 21.03	2.909	0.747	3.657			
	C	10.8	448	4.52 ± 0.97	188.11 ± 37.90	1.916	1.322	3.238			
	D	7.2	672	1.48 ± 0.27	129.54 ± 13.43	0.627	0.910	1.538			
	E	3.6	896	0.75 ± 0.17	164.39 ± 16.03	0.317	1.155	1.472			
	F	0	1120	-	142.3 ± 28.24	-	-	-			

FIC, fractional inhibitory concentration at the indicated IC₅₀; ΣFIC, sum of the FICs. FICI, fractional inhibitory concentration index.

Table 4. IC₅₀s, FICs and ΣFICs of TPF2 and HePC combinations against *Leishmania infantum* and *Leishmania major* promastigotes and intracellular amastigotes.

Parasite Form	Combination	Combined Drugs						ΣFIC	FICI	Nature of Interaction	
		Concentrations (µg/mL)		IC ₅₀ ± SD (µg/mL)		FIC					
		HePC	TPF2	HePC	TPF2	HePC	TPF2				
Promastigotes <i>L. infantum</i>	A	20	0	2.48 ± 0.23	-	-	-	-	-	0.63	Additive
	B	16	500	1.34 ± 0.37	41.9 ± 11.61	0.540	0.130	0.669			
	C	12	1000	0.57 ± 0.02	48.16 ± 2.7	0.232	0.149	0.380			
	D	8	1500	0.74 ± 0.06	135.8 ± 13.78	0.297	0.429	0.726			
	E	4	2000	0.32 ± 0.13	194.2 ± 6.12	0.130	0.602	0.732			
	F	0	2500	-	322.58 ± 18.87	-	-	-			
Promastigotes <i>L. major</i>	A	28	0	3.38 ± 0.3	-	-	-	-	-	0.65	Additive
	B	22.4	400	1.98 ± 0.70	35.41 ± 12.51	0.586	0.140	0.726			
	C	16.8	800	2.57 ± 0.71	62.42 ± 19.50	0.760	0.247	1.007			
	D	11.2	1200	0.69 ± 0.25	73.27 ± 27.02	0.203	0.290	0.493			
	E	5.6	1600	0.26 ± 0.18	73.02 ± 49.90	0.076	0.289	0.365			
	F	0	2000	-	252.58 ± 30.16	-	-	-			
Amastigotes <i>L. infantum</i>	A	12	0	1.57 ± 0.84	-	-	-	-	-	3.47	Antagonistic
	B	9.6	160	5.87 ± 0.87	97.66 ± 14.60	3.738	0.930	4.668			
	C	7.2	320	2.44 ± 0.29	108.85 ± 13.04	1.554	1.037	2.590			
	D	4.8	480	2.12 ± 0.28	212.31 ± 32.95	1.350	2.022	3.372			
	E	2.4	640	1.03 ± 0.19	271.56 ± 43.90	0.653	2.587	3.240			
	F	0	800	-	104.98 ± 10.02	-	-	-			
Amastigotes <i>L. major</i>	A	18	0	2.36 ± 0.17	-	-	-	-	-	3.93	Antagonistic
	B	14.4	120	7.93 ± 1.50	66.21 ± 12.65	3.360	0.870	4.231			
	C	10.8	240	5.92 ± 1.15	131.94 ± 4.07	2.509	1.734	4.244			
	D	7.2	360	3.84 ± 0.54	192.23 ± 26.83	1.626	2.527	4.153			
	E	3.6	480	1.26 ± 0.53	194.64 ± 52.07	0.536	2.559	3.095			
	F	0	600	-	76.07 ± 14.5	-	-	-			

FIC, fractional inhibitory concentration at the indicated IC₅₀; ΣFIC, sum of the FICs. FICI, fractional inhibitory concentration index.

In addition, the FICI values for the TPF1-HePC combination against intracellular *L. infantum* and *L. major* amastigotes were 2.22 and 2.48, respectively (Table 3), while TPF2-HePC combinations exhibited FICI values at 3.47 and 3.93, respectively. These FICI values indicated an antagonistic interaction between each TPF and HePC against intracellular amastigotes [31,32] (Tables 3 and 4). Lastly, the resulting effects of drug association were graphically evaluated by plotting the FIC values of the compounds in combination as isobolograms (Figures 8 and 9). The points corresponding to the FIC values were connected by tendency lines, while the dashed lines representing the additivity line range of confidence were constructed by the intersection of single medication IC₅₀ values.

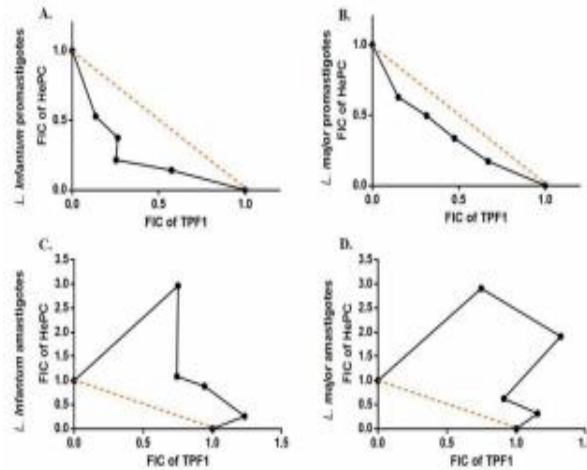


Figure 8. Representative normalized isobolograms of the interaction of TPF1 and HePC. Drug interaction was analyzed against *L. infantum* (A,C) and *L. major* (B,D) promastigotes and intracellular amastigotes. The numbers on the axes represent normalized FICs of TPF1 (x-axis) and HePC (y-axis). Data points (dots) located above, on, or below the line indicate antagonism, additivity, or synergy, respectively. The constructed isobolograms are the result of three independent experiments run in triplicate.

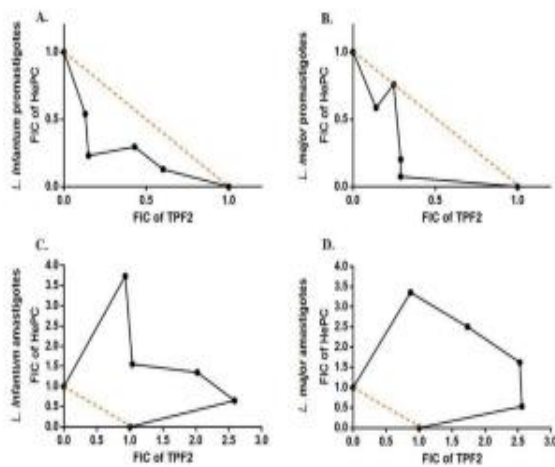


Figure 9. Representative normalized isobolograms of the interaction of TPF2 and HePC. Drug interaction was analyzed against *L. infantum* (A,C) and *L. major* (B,D) promastigotes and intracellular amastigotes. Numbers on the axes represent normalized FICs of TPF2 (x-axis) and HePC (y-axis). Data points (dots) located above, on, or below the line indicate antagonism, additivity, or synergy, respectively. The constructed isobolograms are the result of three independent experiments run in triplicate.

2.9. Effect of Drug Interaction with Miltefosine on the Induction of Oxidative Stress in *Leishmania* spp. Promastigotes

Furthermore, we tried to evaluate ROS production in drug combination-treated promastigotes compared to HePC (Figure 10). Treatment with the combination doses showed a prompt increase in ROS production, for both *L. infantum* and *L. major* promastigotes, compared to HePC. These findings confirmed the additive association between each TPF and HePC, previously determined by the isobologram analysis.

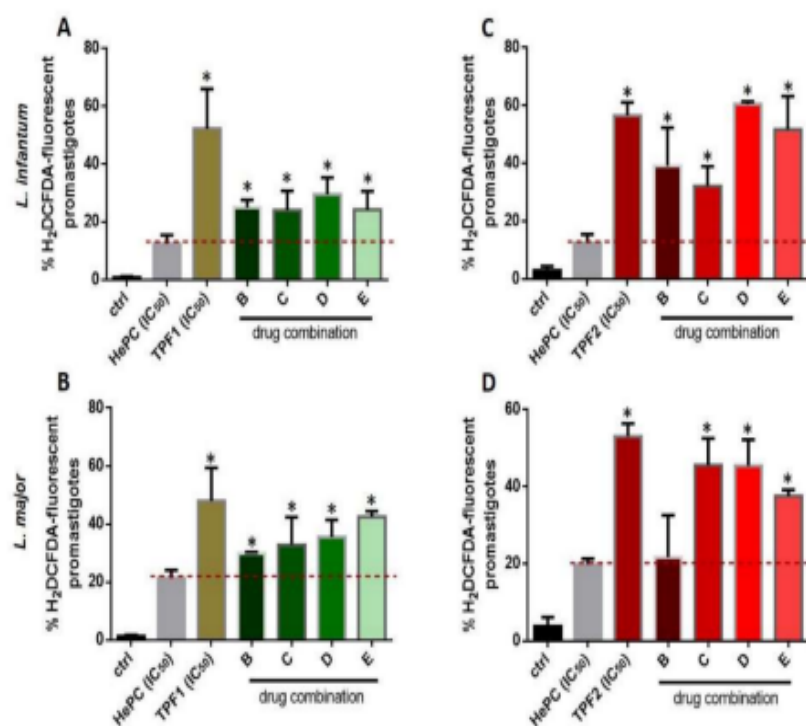


Figure 10. Intracellular ROS levels in *L. infantum* and *L. major* promastigotes treated with combinations of TPF1 and TPF2 with HePC. Log-phase promastigotes were treated with proportions of 4:1, 3:2, 2:3, and 1:4 of HePC and TPF1 (A,B) or TPF2 (C,D), respectively, for 72 h. Untreated parasites were used as a negative control group. ROS levels were quantified using H₂DCFDA and flow cytometry. Data are presented as mean values of H₂DCFDA-fluorescent promastigotes (\pm SD) in bar diagrams. The symbol of * indicates significant differences compared to HePC-treated parasites.

3. Discussion

The orientation of scientific interest in bioactive compounds of natural origin has intensified and played an important role in the development of new drugs [33,34]. During recent years, many research groups have sought to utilize natural products as effective treatments against leishmaniasis [11]. We have recently reported that a TPF containing HT, T, OLEA, and OLEO at 30, 22, 110, and 70 mg/g of extract, respectively, exhibited inhibitory effects against cell-free promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania* spp. by inducing an apoptotic-like cell death [28]. Taking into consideration that the chemical characteristics of olive oils are influenced by several factors, such as olive variety, cultivation practice, the period of harvesting, weather conditions, and milling procedures, the phenolic composition and quantities among the extracted TPFs can be highly diverse [20,35]. Herein, we performed a comparative analysis of the anti-leishmanial properties of two TPFs originating from olive tree varieties grown in two different geographical areas of Greece (Peloponnese—Arcadia and Crete—Herakleion), with completely different compositions with respect to the two main chemical classes of polyphenols, i.e., phenyl alcohols (HT, and T) and secoiridoids (OLEA, and OLEO). We verified that both TPFs, despite their different phenolic composition, exerted a strong anti-leishmanial activity. The quantitative analysis revealed that TPF1 contained HT and T at 7 and 42 mg/g of extract, respectively, while TPF2 was richer in phenolic compounds as it contained HT (5 mg/g), T (12 mg/g), OLEA (144 mg/g), and OLEO (301 mg/g). The present study reported that both TPF1 and TPF2 exhibited inhibitory effects against both the promastigote and intracellular amastigote forms of *L. infantum* and *L. major*, the causative agents of VL and CL around the Mediter-

ranean basin, while having a low toxicity against macrophages, the hostile environment of *Leishmania* spp. The SI values were higher than one, indicating a safety index for the use of these fractions in the treatment of *Leishmania*-infected host cells. In addition, our results indicated that TPF2 exhibited more potent anti-leishmanial properties compared to TPF1, as its IC₅₀ values against *L. infantum* and *L. major* promastigotes were 3.7- and 3.9-fold decreased. The respective IC₅₀ value activity against *L. infantum* and *L. major* amastigotes were two-fold decreased compared to TPF1 and the observed differences could be ascribed to their different phenolic composition. In addition, promastigote morphological changes and a decrease in growth kinetics confirmed their effect on direct parasite killing. Untreated promastigotes had the typical elongated parasitic shape, while parasites treated for 72 h with TPF1 or TPF2 presented morphological alterations, such as body deformation.

We further elucidated their comparative effectiveness as chemotherapeutic agents against leishmaniasis, by determining the type of cell death initiated in TPF1- and TPF2-treated *Leishmania* spp. promastigotes. To assess the induced type of cell death, we evaluated recently unified criteria that have been proposed for the definition of apoptosis in *Leishmania* spp. [36]. According to these criteria, after the demonstration of promastigote viability loss, we evaluated the loss of plasma membrane integrity by PI staining. Moreover, we defined apoptosis by showing the presence of at least two apoptotic markers among DNA fragmentation, cell rounding, cell shrinkage, plasma membrane modifications, and mitochondrial depolarization. Plasma membrane modifications and DNA fragmentation were evaluated by Annexin V staining and TUNEL assay, respectively, and these data also demonstrate TPF2 as the most promising against both *Leishmania* spp. Moreover, our data suggested that the promastigote death induced by TPF phenolic extracts was attributable to ROS generation. Since the loss of mitochondrial integrity for this parasite form is associated with ROS production, we suggest that our fractions could act through this process. This is also validated by our previous findings, which demonstrated that another TPF with a different phenolic composition disrupted the mitochondrial membrane potential of *Leishmania* spp. promastigotes and provoked the generation of intracellular ROS [28]. These findings are consistent with other studies which also demonstrated the contribution of ROS production and mitochondrial dysfunction to *Leishmania* death induced by natural products, such as sesamol, carajurin, apigenin, and quercetin [37–40].

Severe drawbacks of existing anti-leishmanial drugs, such as toxicity and parasite resistance, may be overcome with the alternative strategy of combination therapy [41,42]. In this direction, we further appraised the in vitro combination effects of TPF1 and TPF2 with miltefosine, in order to determine whether TPF1 or TPF2 was able to improve miltefosine monotherapy against *Leishmania* parasites. Four combinations of miltefosine with each one of the phenolic extracts (4:1, 3:2, 2:3 and 1:4) were investigated for their efficacy against *L. infantum* and *L. major* extracellular promastigote and intracellular amastigote forms. The analysis of the overall mean of Σ FIC, which varied from 0.469 to 0.842 for miltefosine:TPF1 combinations and 0.365 to 1.007 for miltefosine:TPF2, revealed additive effects in both promastigote *Leishmania* strains. Particularly, the analysis of the isobologram showed that the combination 2:3 (miltefosine:TPF1) was the closest to a synergistic effect against *L. infantum*, compared to the other tested combinations, reducing the required miltefosine dose by approximately five times. The respective analysis of miltefosine:TPF2 interactions showed that the 3:2 and 1:4 combinations were the closest to a synergistic effect against *L. infantum* and *L. major*, respectively. These combinations resulted in a 4.4- and 13-fold reduction of the required miltefosine dose against *L. infantum* and *L. major* promastigotes, respectively. The above advocates the more potent anti-leishmanial properties of TPF2 in comparison to TPF1. To date, few studies have reported the association between synthetic drugs and natural compounds in the battle against leishmaniasis [43–45]. The additive effects of each TPF combination with miltefosine according to the FIC index, were further highlighted by the enhanced intracellular ROS production in *Leishmania* promastigotes treated with drug combinations compared to miltefosine-treated parasites. Taking into account these encouraging results on extracellular promastigotes, drug interactions were

also tested in intracellular amastigotes. According to the adopted classification, the results obtained in intracellular amastigotes showed that the combinations of TPF1 and TPF2 with miltefosine were considered antagonistic because the overall Σ FIC averages varied from 2.22 to 3.93. Nevertheless, the analysis of the isobologram showed that the 1:4 miltefosine:TPF1 combination was considered to be indifferent against both *L. infantum* and *L. major*, compared to the other combinations (Σ FIC values 1.493 and 1.472, respectively).

Overall, this is the first study that demonstrates a comparative evaluation of the anti-leishmanial properties of two different TPFs derived from EVOOs, highlighting the positive impact of the presence of OLEA and OLEO. At this point, it must be highlighted that OLEA and OLEO comprise derivatives (precursors) of HT and T, respectively, and could facilitate as prodrugs releasing HT and T in a biological system after metabolization (hydrolysis). These findings are consistent with one of our previous studies, which demonstrated the remarkable *in vitro* and *in vivo* anti-leishmanial properties of pure OLEO [26]. Moreover, this is the first study that describes the nature of interactions between the phenolic extracts of EVOO and miltefosine against both a viscerotropic and a dermatropic *Leishmania* strain. Although *in vitro* interaction studies are promising approaches for screening drug combinations, future *in vivo* experiments should be conducted to assess possible drug interactions. Overall, our data suggest a need for further exploitation of bioactive compounds derived from EVOO, in order to produce strong scientific evidence of their potential additive and synergistic effects at improved therapeutic applications against leishmaniasis.

4. Materials and Methods

4.1. Starting Material

In the context of our continuation study on EVOO [20,46], two samples were selected based on their different chemical compositions regarding HT, T, OLEA, and OLEO. More specifically, EVOO-1 and EVOO-2 of the Koroneiki variety were collected during the harvesting period from 2020–2021, from two different geographical areas of Greece (Arcadia, Peloponnese, Greece and Heraklion, Crete, Greece, respectively), and were produced from two-phase olive mills. Immediately upon arrival, they were subjected to centrifugation to avoid sediment accumulation that results in rapid polyphenols decomposition. Then, samples were stored in dark, glassy vials at room temperature, and in nitrogen conditions to keep the matrixes stable.

4.2. Extraction of TPFs from EVOO

TPFs were extracted from EVOO-1 and EVOO-2 raw materials according to the method proposed by the international olive council (IOC, Madrid, Spain), with some modifications. Specifically, in a 100 mL test tube, 20 g of EVOO and 50 mL of methanol/H₂O (80:20, *v/v*) were mixed and vortexed for 120 s. After this, the mixture was placed in an ultrasonic bath for 15 min at room temperature, and then centrifuged for 25 min. The hydroalcoholic phase was evaporated and an aliquot of the dried extract (TPF) was dissolved in methanol/H₂O (80:20, *v/v*), filtered and forwarded to HPLC-DAD analysis.

4.3. HPLC-DAD Analysis and Quantification

Olive oil biophenols were determined in TPF1 and TPF2 by applying the IOC proposed analytical method, performed according to analytical conditions referred to as the IOC/T.20/Doc No 29 method (IOC, 2009) [47]. Specifically, the separation was achieved on a reversed-phase Spherisorb Discovery HS C18 column (250 × 4.6 mm, 5 μ m; Supelco) using a mobile phase consisting of 0.2% aqueous orthophosphoric acid (A) and methanol/acetonitrile (50:50 *v/v*) (B), at a flow rate of 1.0 mL/min and at an ambient temperature. The injection volume was held constant at 20 μ L. The applied gradient elution was as follows: 0 min, 96% A and 4% B; 40 min, 50% A and 50% B; 45 min, 40% A and 60% B; 60 min, 0% A and 100% B; 70 min, 0% A and 100% B; 72 min, 96% A and 4% B; and 82 min, 96% A and 4% B. Chromatograms were monitored at 280 nm. All analyses were performed in triplicate.

Concentration levels of major biophenols were determined using a regression analysis method. Specifically, standard calibration curves of hydroxytyrosol (HT), tyrosol (T), oleacein (OLEA), and oleocanthal (OLEO) were prepared. For the HT and T quantification, 9-point calibration curves were constructed (HT: $y = 84028x + 39609$, $r^2 = 0.9997$; T: $y = 53933x - 11712$, $r^2 = 0.9987$), while OLEA and OLEO were quantified according to their 8- and 10-point calibration curves, respectively (OLEA: $y = 32720x + 12723$, $r^2 = 0.9997$ and OLEO: $y = 18836x + 54185$, $r^2 = 0.9982$). The results were expressed in mg analyte per g of TPF. HT and T reference standards were purchased from ExtraSynthase (Lyon Nord, France) while OLEO and OLEA were purchased from Pharmagnose SA (Oinofyta, Greece). The selected TPFs were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Applichem, Germany) and further diluted in cell culture medium in assays. The final concentration of DMSO was less than 0.1% in all in vitro assays.

4.4. Parasite and Eukaryotic Cell Culture

L. infantum (zymodeme GH8, strain MHOM/GR/2001/GH8) and *L. major* (zymodeme LV39, strain MRHO/SU/59/P) parasites, causative agents of visceral and cutaneous leishmaniasis, respectively, were used in this study. Promastigotes were grown at 26 °C in complete RPMI-1640 medium (PAN-Biotech, Aidenbach, Passau, Germany) in cell culture flasks (SPL Life Sciences, Naechon-Myeon, Pocheon-si, Korea), as previously reported [48].

The immortalized macrophage cell line J774A.1 (ATCC No: TIB-67) was cultured in 25 cm² cell culture flasks (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), at 37 °C with a 5% CO₂ environment [48].

4.5. In Vitro Activities against *L. infantum* and *L. major* Promastigotes

The anti-leishmanial activities of TPFs, were evaluated against log-phase *L. infantum* and *L. major* promastigotes using the resazurin cell viability assay. Briefly, promastigotes were prepared in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and the promastigote suspensions were plated in 96-well flat-bottom cell culture plates (2×10^6 *L. infantum* and 2.5×10^6 *L. major* per well) at a final volume of 200 µL. Promastigotes were exposed to different increasing concentrations of TPFs (800–1500 µg/mL and 100–850 µg/mL for TPF1 and TPF2, respectively), in triplicate. Promastigotes exposed only in culture medium were considered to be the negative control group, while parasites exposed to the reference drug of miltefosine (HePC, Virbac) were considered to be the positive control group (2.48 µg/mL for *L. infantum* and 3.38 µg/mL for *L. major*). Plates were incubated at 26 °C for 65 h. After exposure to the drug, resazurin solution (20 µg/mL) was added to each well and the plates were further incubated for 24 h at 26 °C. The promastigote proliferation was determined using a microplate spectrophotometer at 570 nm (reference filter at 630 nm). The percentage (%) of viable parasites was calculated by using the mean of the negative control as 100% survival of the parasite. Data were normalized using the formula: % of survival = (sample OD – blank OD)/(control OD – blank OD) × 100. The half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values were determined from a dose-response curve generated using Excel 2016 software, as previously described [27,49]. Three independent experiments with triplicates within each experiment, were performed. The results are expressed as mean ± SD.

4.6. In Vitro Cytotoxicity Assay

J774A.1 macrophages were plated at 4×10^4 cells/well in 96-well flat bottom plates [27,49] and treated with different concentrations of each TPF (150–350 µg/mL and 60–220 µg/mL for TPF1 and TPF2, respectively). After 72 h, cell viability was measured by a resazurin assay by adding resazurin at 20 µg/mL. HePC was used as a positive control. The CC₅₀ value is expressed as the cytotoxic concentration for 50% of cells. Data were normalized using the aforementioned formula. Three independent experiments with triplicates within each experiment, were performed. The results are expressed as mean ± SD.

4.7. In Vitro Activities against *L. infantum* and *L. major* Amastigotes

Anti-amastigote killing activity within J774A.1 macrophages was assessed with a resazurin cell viability assay. Macrophages at 5×10^4 cells/well were plated in 96-well flat bottom plates in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS. The cells were incubated at 37 °C under 5% CO₂ humidified air for 18 h in order to achieve cell adhesion [49]. After this, the cells were infected with log-phase promastigotes at a 1:15 ratio for 48 h. Non-internalized promastigotes were washed with RPMI-1640 medium and the tested compounds were added in increasing concentrations (80–300 µg/mL for TPF1 and 20–200 µg/mL for TPF2). HePC was used as a reference drug. After 48 h of incubation, the supernatant was removed and the cell membranes were disrupted. The culture medium was replaced by 200 µL/well of complete Schneider's insect medium and the plates were further incubated at 26 °C for 72 h in order to achieve the transformation of viable amastigotes into promastigotes. Finally, 5 µL of resazurin solution (60 µg/mL) was added to each well and the plates were further incubated for 24 h at 26 °C. The amastigote proliferation was determined using a microplate spectrophotometer. The obtained values of each concentration were used to obtain the IC₅₀ value for the intracellular amastigotes [49]. Three independent experiments with triplicates within each experiment, were performed. The results are expressed as mean ± SD.

4.8. Effects of TPF1 and TPF2 on Growth Kinetics of *L. infantum* and *L. major* Promastigote Cultures

L. infantum and *L. major* log-phase promastigotes were treated with TPF1 and TPF2 at IC₅₀ and $2 \times$ IC₅₀ concentrations. Promastigotes cultured only under the presence of culture medium represented the negative control group, while HePC (IC₅₀)-treated parasites were the positive control group. Parasite growth and multiplication were monitored by differential counting of dead and live promastigotes at 24 h intervals for 3 consecutive days with the use of Trypan blue exclusion dye (Sigma–Aldrich, St. Louis, Mo, USA) in a Malassez counting chamber (hemocytometer) under a binocular optical microscope (Olympus, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan), as previously described [28]. The morphology of the promastigotes was observed under a phase-contrast microscope with a 40x objective (Leica DMil inverted microscope).

4.9. Detection of Reactive Oxygen Species (ROS) Production in *L. infantum* and *L. major* Promastigotes

ROS production was detected using cell permeable H₂DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, Life Technologies, NY, USA), as previously described [28,50]. *L. infantum* and *L. major* log-phase promastigotes were treated with TPF1 and TPF2, respectively, for 72 h at 26 °C, at IC₅₀ and $2 \times$ IC₅₀ concentrations. In the experiments of drug combination, the parasites were treated with various proportions of HePC:TPF1 and TPF2 independently (4:1, 3:2, 2:3, 1:4), as described below in Section 4.13. Then, 5×10^6 parasites/group were centrifuged, washed twice with phosphate buffered saline (PBS), and incubated with 20 µM H₂DCFDA for 20 min in the dark, at room temperature. Hydrogen peroxide (1 mM) was used as a positive control. Fluorescence intensity was measured by flow cytometry. Samples (20,000 promastigotes/group) were assessed on FACSCalibur (BD, San Jose, CA, USA) and the acquired data were analyzed with FlowJo V.10.0.8 software (BD, Franklin Lakes, NJ, USA).

4.10. Annexin V Binding and Propidium Iodide Staining

L. infantum and *L. major* log-phase promastigotes were treated with TPF1 and TPF2, respectively, for 72 h at 26 °C, at IC₅₀ and $2 \times$ IC₅₀ concentrations. Promastigotes treated with HePC (IC₅₀) were considered as the positive control group, while untreated parasites were the negative control group. Triton X-100 (1% v/v) was used as a control for 100% membrane permeabilization. Parasites were labeled with annexin V and propidium iodide (PI) using the annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) apoptosis detection kit

(BioLegend, San Diego, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Briefly, 10^6 parasites/group were centrifuged at 1600 rpm for 10 min at room temperature, washed twice in PBS and resuspended in 100 μ L of annexin V binding buffer, 5 μ L of annexin V-FITC, and 10 μ L of PI solution. Parasites were incubated for 15 min at room temperature, protected from the light. At the end of the incubation period, 400 μ L of annexin V binding buffer was added in each sample and the samples were analyzed by flow cytometry. The samples (20,000 promastigotes/group) were assessed on FACSCalibur and the acquired data were analyzed with FlowJo V.10.0.8 software. Promastigotes were classified according to their staining as early apoptotic (annexin V+/PI-), late apoptotic (annexin V+/PI+), necrotic (annexin V-/PI+), and viable parasites (annexin V-/PI-).

4.11. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)-Mediated dUTP Nick-End Labelling (TUNEL) Assay

A TUNEL assay was performed according to the manufacturer's instructions (CFTM 488A TUNEL Assay, Biotium, Fremont, CA, USA). Briefly, *L. infantum* and *L. major* log-phase promastigotes were treated with TPF1 and TPF2, respectively, for 72 h at 26 °C, at IC_{50} and $2 \times IC_{50}$ concentrations. Promastigotes treated with HePC (IC_{50}) were considered as the positive control group. A total of 2×10^6 parasites per experimental group, were harvested by centrifugation (1600 rpm, 10 min) and washed twice with 1 mL of PBS. The parasites were then fixed by adding 4% formaldehyde/PBS and incubated at 4 °C for 30 min. The parasites were resuspended in permeabilization buffer containing 0.2% Triton X-100 and incubated for 30 min at room temperature. The cells were washed twice in PBS and then were resuspended in 100 μ L of equilibration buffer and incubated at room temperature for 5 min. Equilibration buffer was removed and the cells were resuspended in 50 μ L of TdT reaction mix and incubated at 37 °C for 60 min, protected from direct light. Then, the cells were washed thrice in PBS containing 0.1% Triton X-100 and 5 mg/mL BSA and analyzed on FACSCalibur.

4.12. DNA Extraction Protocol

The parasites (5×10^6 parasites/mL) were obtained from all experimental groups after 72 h of treatment and were lysed in 200 μ L of lysis buffer supplemented with proteinase K and allowed to digest at 56 °C for 10 min. Total genomic DNA was obtained using a DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to manufacturer's instructions. The DNA concentration and purity were determined by measuring optical density (OD) on a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Total genomic DNA was separated on a 1.5% agarose gel containing ethidium bromide. The gel was run for 50 min at 120 V and visualized by an Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

4.13. Assessment of Drug Interactions

The modified isobologram method was used in order to determine the interaction between each TPF with HePC [43,51]. The drug interactions were assessed in both *L. infantum* and *L. major* log-phase promastigotes, as well as in intracellular amastigotes. The IC_{50} value of each compound (TPF1, TPF2, HePC), previously determined, was used to calculate the top concentration of each drug to ensure that each IC_{50} value was close to the middle of a six-point twofold dilution series. The top concentrations were prepared in four proportions of HePC with each TPF. The tested associations were as follows: 4:1 (combination B = 80% HePC + 20% TPF), 3:2 (combination C = 60% HePC + 40% TPF), 2:3 (combination D = 40% HePC + 60% TPF), and 1:4 (combination E = 20% HePC + 80% TPF). Experiments were carried out using the same approach for the evaluation of anti-leishmanial activity, using the resazurin viability assay as described in Sections 4.5 and 4.7. Thus, after 72 h of incubation, an IC_{50} value for each drug in combination was obtained for each ratio.

4.14. Determination of Fractional Inhibitory Concentrations (FICs) Index

The fractional inhibitory concentrations (FICs) at the IC_{50} level for each drug ratio (4:1, 3:2, 2:3 and 1:4) were calculated based on the following equation: $FIC = IC_{50}$ of each drug in combination/ IC_{50} of each drug alone. The isobologram construction association curves were determined by using the FICs of each drug ratio. Afterwards, the sum of FICs for each ratio was calculated by the formula $\Sigma FIC = FIC_{TPP} + FIC_{HePC}$ and finally, as an overall mean of $\Sigma FICs$, the fractional inhibitory concentration index (FICI) was determined. The obtained FICI values were used to classify the nature of the interaction as: synergistic ($FICI \leq 0.5$), additive ($0.5 < FICI \leq 1$), indifferent ($1 < FICI < 2$), and antagonistic ($FICI \geq 2$) [31,32].

4.15. Statistical Analysis

Data are representative of at least three independent experiments and are presented as mean values \pm SD. The differences between the means were analyzed for significance using the two-sided Mann–Whitney test (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY, USA: IBM Corp.) and were considered significant at a 0.05 level of confidence.

Author Contributions: Conceptualization, G.G.; O.S.K.; L.A.S.; and E.D. Methodology, G.G.; O.S.K.; P.S.; M.H.; and E.D. Software, G.G.; O.S.K.; and P.S. Validation, E.D. Formal Analysis, G.G.; and O.S.K. Investigation, G.G.; and O.S.K. Resources, L.A.S.; and E.D. Data Curation, G.G.; O.S.K.; P.S.; M.H.; L.A.S.; and E.D. Writing—Original Draft Preparation, G.G.; O.S.K.; and E.D. Writing—Review and Editing, O.S.K.; M.H.; L.A.S.; and E.D. Visualization, G.G.; O.S.K.; L.A.S.; M.H.; and E.D. Supervision, E.D. Project Administration, E.D. Funding Acquisition, L.A.S.; M.H.; G.G.; and E.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This project was co-financed by the European Regional Development Fund of EE and the Greek National Funds through the Operational Program Competitiveness, Entrepreneurship and Innovation grant number MIS 5134622. It was also co-financed by EATRIS-GR grant number MIS5028091, funded by the Operational Program “Competitiveness, Entrepreneurship and Innovation” grant number NSRF 2014–2020 of the GRST that was co-financed by the Greek State and the European Regional Development Fund. GG was awarded a PhD fellowship by the Nostos Foundation Trust Fund grant number $\Psi T10746\text{YX6T-Z61}$.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We would like to thank Ioannis D. Kyriazis for his critical reading of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.

References

1. Burza, S.; Croft, S.L.; Boelaert, M. Leishmaniasis. *Lancet* **2018**, *392*, 951–970. [[CrossRef](#)]
2. Arenas, R.; Torres-Guerrero, E.; Quintanilla-Cedillo, M.R.; Ruiz-Esmenjaud, J. Leishmaniasis: A Review. *F1000Research* **2017**, *6*, 750.
3. Gebremichael Tedla, D.; Bariagabr, F.H.; Abreha, H.H. Incidence and Trends of Leishmaniasis and Its Risk Factors in Humera, Western Tigray. *J. Parasitol. Res.* **2018**, *2018*, 9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Croft, S.L.; Olliaro, P. Leishmaniasis Chemotherapy—Challenges and Opportunities. *Clin. Microbiol. Infect.* **2011**, *17*, 1478–1483. [[CrossRef](#)]
5. Rodrigues, L.A.; Mazotto, A.M.; Cardoso, V.; Alves, R.L.; Amaral, A.C.F.; Silva, J.R.D.A.; Pinheiro, A.S.; Vermelho, A.B. Natural Products: Insights into Leishmaniasis Inflammatory Response. *Mediat. Inflamm.* **2015**, *2015*, 12. [[CrossRef](#)]
6. Akbari, M.; Oryan, A.; Hatam, G. Application of Nanotechnology in Treatment of Leishmaniasis: A Review. *Acta Trop.* **2017**, *172*, 86–90. [[CrossRef](#)]
7. Uliana, S.R.B.; Trincon, C.T.; Coelho, A.C. Chemotherapy of Leishmaniasis: Present Challenges. *Parasitology* **2018**, *145*, 464–480. [[CrossRef](#)]
8. Ghodsian, S.; Taghipour, N.; Deravi, N.; Behniafar, H.; Lasjerdi, Z. Recent Researches in Effective Antileishmanial Herbal Compounds: Narrative Review. *Parasitol. Res.* **2020**, *119*, 3929–3946. [[CrossRef](#)]

9. Pradhan, S.; Schwartz, R.A.; Patil, A.; Grabbe, S.; Goldust, M. Treatment Options for Leishmaniasis. *Clin. Exp. Dermatol.* **2022**, *47*, 516–521. [\[CrossRef\]](#)
10. Madusanka, R.K.; Silva, H.; Karunaweera, N.D. Treatment of Cutaneous Leishmaniasis and Insights into Species-Specific Responses: A Narrative Review. *Infect. Dis. Ther.* **2022**, *11*, 695–711. [\[CrossRef\]](#)
11. Gervazoni, L.F.O.; Barcellos, G.B.; Ferreira-Paes, T.; Almeida-Amaral, E.E. Use of Natural Products in Leishmaniasis Chemotherapy: An Overview. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 579891. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Nunes, D.C.D.O.; Bispo-Da-Silva, L.B.; Napolitano, D.R.; Costa, M.S.; Figueira, M.M.N.R.; Rodrigues, R.S.; Rodrigues, V.D.M.; Yoneyama, K.A.G. In Vitro Additive Interaction between Ketoconazole and Antimony against Intramacrophage Leishmania (Leishmania) Amazonensis Amastigotes. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0180530. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Rebello, K.M.; Andrade-Neto, V.V.; Gomes, C.R.B.; De Souza, M.V.N.; Branquinha, M.H.; Santos, A.L.S.; Torres-Santos, E.C.; D'Avila-Levy, C.M. Miltefosine-Lopinavir Combination Therapy against Leishmania Infantum Infection: In Vitro and in Vivo Approaches. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2019**, *9*, 229. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Twarog, N.R.; Connelly, M.; Shelat, A.A. A Critical Evaluation of Methods to Interpret Drug Combinations. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 5144. [\[CrossRef\]](#)
15. Owen, R.W.; Giacosa, A.; Hull, W.E.; Haubner, R.; Würtele, G.; Spiegelhalter, B.; Bartsch, H. Review Olive-Oil Consumption and Health Olive-Oil Consumption and Health: The Possible Role of Antioxidants. *Lancet Oncol.* **2000**, *1*, 107–112. [\[CrossRef\]](#)
16. Ghanbari, R.; Anwar, F.; Alkharfy, K.M.; Gilani, A.H.; Saari, N. Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea Europaea* L.)—A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 1291–1340. [\[CrossRef\]](#)
17. Gorzynik-Debicka, M.; Przychodzen, P.; Cappello, F.; Kuban-Jankowska, A.; Gammazza, A.M.; Knap, N.; Wozniak, M.; Gorska-Ponikowska, M. Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 547. [\[CrossRef\]](#)
18. Kouka, P.; Tsakiri, G.; Tzortzi, D.; Dimopoulou, S.; Sarikaki, G.; Stathopoulos, P.; Veskoukis, A.S.; Halabalaki, M.; Skaltsounis, A.L.; Kouretas, D. The Polyphenolic Composition of Extracts Derived from Different Greek Extra Virgin Olive Oils Is Correlated with Their Antioxidant Potency. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, *2019*, 19. [\[CrossRef\]](#)
19. Romani, A.; Ieri, F.; Urciuoli, S.; Noce, A.; Marrone, G.; Nediani, C.; Bernini, R. Health Effects of Phenolic Compounds Found in Extra-Virgin Olive Oil, by-Products, and Leaf of *Olea Europaea* L. *Nutrients* **2019**, *11*, 1776. [\[CrossRef\]](#)
20. Nikou, T.; Liaki, V.; Stathopoulos, P.; Sklirou, A.D.; Tsakiri, E.N.; Jakschitz, T.; Bonn, G.; Trougakos, I.P.; Halabalaki, M.; Skaltsounis, L.A. Comparison Survey of EVOO Polyphenols and Exploration of Healthy Aging-Promoting Properties of Oleocanthal and Oleacein. *Food Chem. Toxicol.* **2019**, *125*, 403–412. [\[CrossRef\]](#)
21. European Union. Establishing a List of Permitted Health Claims Made on Foods, Other than Those Referring to the Reduction of Disease Risk and to Children's Development and Health. *Off. J. Eur. Union* **2012**, *2*, 136/1.
22. Weaver, C.M. Bioactive Foods and Ingredients for Health. *Adv. Nutr.* **2014**, *5*, 306S–311S. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Kyriazis, J.D.; Aliannis, N.; Polychronopoulos, P.; Skaltsounis, A.L.; Dotsika, E. Leishmanicidal Activity Assessment of Olive Tree Extracts. *Phytomedicine* **2013**, *20*, 275–281. [\[CrossRef\]](#)
24. Kyriazis, I.D.; Koutsoni, O.S.; Aliannis, N.; Karampetsou, K.; Skaltsounis, A.L.; Dotsika, E. The Leishmanicidal Activity of Oleuropein Is Selectively Regulated through Inflammation and Oxidative Stress-Related Genes. *Parasites Vectors* **2016**, *9*, 441. [\[CrossRef\]](#)
25. Kyriazis, I.; Smirlis, D.; Papadaki, A.; Koutsoni, O.; Aliannis, N.; Skaltsounis, A.; Dotsika, E. Leishmanicidal Activity of Oleuropein: Leishmania Donovanii Promastigote Cell Death through a Possibly ROS-Independent Mechanism. *J. Pharm. Biomed. Sci.* **2017**, *3*, 141. [\[CrossRef\]](#)
26. Karampetsou, K.; Koutsoni, O.S.; Badounas, F.; Angelis, A.; Gogou, G.; Skaltsounis, L.-A.; Halabalaki, M.; Dotsika, E. Exploring the Immunotherapeutic Potential of Oleocanthal against Murine Cutaneous Leishmaniasis. *Planta Med.* **2022**, *88*, 783–793. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Koutsoni, O.S.; Karampetsou, K.; Kyriazis, I.D.; Stathopoulos, P.; Aliannis, N.; Halabalaki, M.; Skaltsounis, L.A.; Dotsika, E. Evaluation of Total Phenolic Fraction Derived from Extra Virgin Olive Oil for Its Antileishmanial Activity. *Phytomedicine* **2018**, *47*, 143–150. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Karampetsou, K.; Koutsoni, O.S.; Gogou, G.; Angelis, A.; Skaltsounis, L.A.; Dotsika, E. Total Phenolic Fraction (TPF) from Extra Virgin Olive Oil: Induction of Apoptotic-like Cell Death in Leishmania Spp. Promastigotes and in Vivo Potential of Therapeutic Immunomodulation. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2021**, *15*, 1–30. [\[CrossRef\]](#)
29. Sunter, J.; Gull, K. Shape, Form, Function and Leishmania Pathogenicity: From Textbook Descriptions to Biological Understanding. *Open Biol.* **2017**, *7*, 170165. [\[CrossRef\]](#)
30. Batista, M.F.; Nájera, C.A.; Meneghelli, I.; Bahia, D. The Parasitic Intracellular Lifestyle of Trypanosomatids: Parasitophorous Vacuole Development and Survival. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 396. [\[CrossRef\]](#)
31. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Terminology Relating to Methods for the Determination of Susceptibility of Bacteria to Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Infect.* **2000**, *6*, 503–508.
32. Fratini, F.; Mancini, S.; Turchi, B.; Friscia, E.; Pistelli, L.; Giusti, G.; Cerri, D. A Novel Interpretation of the Fractional Inhibitory Concentration Index: The Case *Origanum vulgare* L. and *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst Essential Oils against *Staphylococcus aureus* Strains. *Microbiol. Res.* **2017**, *195*, 11–17. [\[CrossRef\]](#)

33. Lahlou, M. Screening of Natural Products for Drug Discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2007**, *2*, 697–705. [CrossRef] [PubMed]
34. Atanasov, A.G.; Zotchev, S.B.; Dirsch, V.M.; Orhan, I.E.; Banach, M.; Rollinger, J.M.; Barreca, D.; Weckwerth, W.; Bauer, R.; Bayer, E.A.; et al. Natural Products in Drug Discovery: Advances and Opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20*, 200–216. [CrossRef] [PubMed]
35. Agiomirgiani, A.; Petrakis, P.V.; Dais, P. Influence of Harvest Year, Cultivar and Geographical Origin on Greek Extra Virgin Olive Oils Composition: A Study by NMR Spectroscopy and Biometric Analysis. *Food Chem.* **2012**, *135*, 2561–2568. [CrossRef]
36. Basmaciyan, L.; Casanova, M. Cell Death in Leishmania. *Parasite* **2019**, *26*, 71. [CrossRef]
37. Ali, R.; Tabrez, S.; Akand, S.K.; Rahman, F.; Husein, A.; Arish, M.; Alqahtani, A.S.; Ahmed, M.Z.; Husain, M.; Rub, A. Sesamol Induces Apoptosis-Like Cell Death in Leishmania Donovanii. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 749420. [CrossRef] [PubMed]
38. Silva-Silva, J.V.; Moragas-Tellis, C.J.; Chagas, M.S.S.; Souza, P.V.R.; Moreira, D.L.; Hardoim, D.J.; Taniwaki, N.N.; Costa, V.F.A.; Bertho, A.L.; Brondani, D.; et al. Carajurin Induces Apoptosis in Leishmania Amazonensis Promastigotes through Reactive Oxygen Species Production and Mitochondrial Dysfunction. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 331. [CrossRef]
39. Fonseca-Silva, F.; Canto-Cavalheiro, M.M.; Menna-Barreto, R.F.S.; Almeida-Amaral, E.E. Effect of Apigenin on Leishmania Amazonensis Is Associated with Reactive Oxygen Species Production Followed by Mitochondrial Dysfunction. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 880–884. [CrossRef]
40. Fonseca-Silva, F.; Inacio, J.D.F.; Canto-Cavalheiro, M.M.; Almeida-Amaral, E.E. Reactive Oxygen Species Production and Mitochondrial Dysfunction Contribute to Quercetin Induced Death in Leishmania Amazonensis. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e14666. [CrossRef]
41. Van Griensven, J.; Balasegaram, M.; Meheus, F.; Alvar, J.; Lynen, L.; Boelaert, M. Combination Therapy for Visceral Leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* **2010**, *10*, 184–194. [CrossRef]
42. Diro, E.; Blesson, S.; Edwards, T.; Ritmeijer, K.; Fikre, H.; Admassu, H.; Kibret, A.; Ellis, S.J.; Bardonneau, C.; Zijlstra, E.E.; et al. A Randomized Trial of AmBisome Monotherapy and AmBisome and Miltefosine Combination to Treat Visceral Leishmaniasis in HIV Co-Infected Patients in Ethiopia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13*, e0006988. [CrossRef] [PubMed]
43. Mondégo-Oliveira, R.; de Sá Sousa, J.C.; Moragas-Tellis, C.J.; de Souza, P.V.; dos Santos Chagas, M.D.; Behrens, M.D.; de Jesus Hardoim, D.; Taniwaki, N.N.; Chometon, T.Q.; Bertho, A.L.; et al. Vernonia brasiliensis (L.) Druce Induces Ultrastructural Changes and Apoptosis-like Death of Leishmania Infantum promastigotes. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *133*, 111025. [CrossRef] [PubMed]
44. Intakhan, N.; Channmol, W.; Sombon, P.; Bates, M.D.; Yardley, V.; Bates, P.A.; Jariyapan, N. Antileishmanial Activity and Synergistic Effects of Amphotericin b Deoxycholate with Allicin and Andrographolide against Leishmania Martiniensis in Vitro. *Pathogens* **2020**, *9*, 49. [CrossRef] [PubMed]
45. Magalhães, T.B.; Silva, D.K.C.; da Silva Teixeira, J.; De Lima, J.D.T.; Barbosa-Filho, J.M.; Moreira, D.R.M.; Guimarães, E.T.; Soares, M.B.P. A Betulinic Acid Derivative, BA5, Induces G0/G1 Cell Arrest, Apoptosis Like-Death, and Morphological Alterations in Leishmania sp. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 846123. [CrossRef]
46. Nikou, T.; Witt, M.; Stathopoulos, P.; Barsch, A.; Halabalaki, M. Olive Oil Quality and Authenticity Assessment Aspects Employing FIA-MRMS and LC-Orbitrap MS Metabolomic Approaches. *Front. Public Health* **2020**, *8*, 558226. [CrossRef]
47. Determination of Biophenols in Olive Oil by HPLC. Available online: <https://www.internationaloliveoil.org/what-we-do/chemistry-standardisation-unit/standards-and-methods/> (accessed on 4 August 2022).
48. Koutsoni, O.; Barhoumi, M.; Guizani, I.; Dotsika, E. Leishmania Eukaryotic Initiation Factor (LeIF) Inhibits Parasite Growth in Murine Macrophages. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e97319. [CrossRef]
49. Koutsoni, O.; Karampetsou, K.; Dotsika, E. In Vitro Screening of Antileishmanial Activity of Natural Product Compounds: Determination of IC50, CC50 and SI Values. *Bio-Protocol* **2019**, *9*, e3410. [CrossRef]
50. Mallick, S.; Dey, S.; Mandal, S.; Dutta, A.; Mukherjee, D.; Biswas, G.; Chatterjee, S.; Mallick, S.; Lai, T.K.; Acharya, K.; et al. A Novel Triterpene from Astraeus Hygrometricus Induces Reactive Oxygen Species Leading to Death in Leishmania Donovanii. *Future Microbiol.* **2015**, *10*, 763–789. [CrossRef]
51. Fivelman, Q.L.; Adagu, I.S.; Warhurst, D.C. Modified Fixed-Ratio Isobologram Method for Studying in Vitro Interactions between Atovaquone and Proguanil or Dihydroartemisinin against Drug-Resistant Strains of Plasmodium Falciparum. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 4097–4102. [CrossRef]

Βιογραφικό σημείωμα

Προσωπικές πληροφορίες	
Όνοματεπώνυμο:	Γεωργία Γώγου
Ημερομηνία γέννησης:	09/07/1994
Φύλο:	Θύλη
Εθνικότητα:	Ελληνική
Διεύθυνση κατοικίας:	Παγκράτι 116 34, Αθήνα, Ελλάδα
Τηλέφωνο επικοινωνίας:	+30 6985930902
e-mail:	gogo94go122@hotmail.com
Εκπαίδευση	
Μάρτιος 2019 – Φεβρουάριος 2023:	<p>Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής (PhD) <u>Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων</u>, Φαρμακευτική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών και <u>Εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας</u>, Τμήμα Μικροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα</p> <p>Θέμα: «Νέες προοπτικές της θεραπευτικής δράσης των βιοφαινολών του ελαιολάδου σε παρασιτικά νοσήματα: διερεύνηση ρυθμιστικών μοριακών ανοσολογικών μηχανισμών»</p> <p>Επιβλέπουσα: Δρ. Ντότσικα Ελένη</p>
Ιούλιος 2019:	<p>Εκπαίδευση στο Εργαστήριο Παρασιτολογίας, Εθνικό Κέντρο Μικροβιολογίας, Ινστιτούτο “de Salud Carlos III”, Συνεργαζόμενο Κέντρο για Λεισμανιάσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ.), Μαδρίτη, Ισπανία (2 εβδομάδες)</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Εκπαίδευση σε τεχνικές: Μοριακή διάγνωση, προσδιορισμός και χαρακτηρισμός παρασίτων του γένους <i>Leishmania</i>
Μάιος 2019:	<p>Biotalent Project στο πλαίσιο του προγράμματος Erasmus + (Talent in Biodiversity-13 εβδομάδες / 80 ώρες)</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Με εταίρους τα Μουσεία Φυσικής Ιστορίας των Βρυξελλών, της Ουγγαρίας και του Παν/μιου Κρήτης (Παιδαγωγικό τμήμα και UCNET), το Κέντρο Κατάρτισης Ενηλίκων EduFor, καθώς και η μεγαλύτερη κοινοπραξία των Μουσείων Φυσικής Ιστορίας, Βοτανικών κήπων κι άλλων φορέων Φυσικής Ιστορίας από την Ευρώπη (Consortium of European Taxonomic Facilities-CETAF)

	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Στοιχεία μάθησης στο διαδίκτυο (40 ώρες): βιοποικιλότητα, κλιματική αλλαγή και φαρμακευτικά φυτά ➤ Στοιχεία μάθησης στο Πεδίο - Ηράκλειο Κρήτης (40 ώρες) (επιλεχθείσα μαζί με άλλους 19 υποψήφιους Πανερωπαϊκά για τα μαθήματα Πεδίου): ταυτοποίηση, συλλογή, τεχνικές μελέτης πεδίου, συντήρηση στο πεδίο, επίσκεψη σε επιχείρηση βιοποικιλότητας και παρακολούθηση παρασκευής αρωμάτων με τη χρήση βοτάνων από βιολογικές καλλιέργειες (BIOAROMA) ➤ Απόκτηση 8 μονάδων ECVET* που πιστοποιούν τις γνώσεις, τις δεξιότητες και τις ικανότητες που έχουν αποκτηθεί κατά την ολοκλήρωση του προγράμματος (* European Credit system for Vocational Education and Training)
2016 – 2017:	<p>Μεταπτυχιακό Δίπλωμα επιπέδου 7 στη Βιολογία (Integrated Master Degree), του Εθνικού και Ευρωπαϊκού Πλαισίου Προσόντων Ιατρική Σχολή, <u>Εργαστήριο Φαρμακολογίας</u>, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών και Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών της Σχολής Επιστημών Υγείας, <u>Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας</u>, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων</p> <p>Θέμα: «Μελέτη των βιολογικών <i>in vitro</i> δράσεων της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης στα καρκινικά κύτταρα του ήπατος, <i>HerG2</i>»</p> <p>Επιβλέποντες: Καθηγητής Πάντος Κωνσταντίνος και Καθηγητής Σταμάτης Χαράλαμπος</p>
2012 – 2017:	<p>Πτυχίο στη Βιολογία Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, Ελλάδα</p>
Επαγγελματική πορεία	
Οκτώβριος 2022 – Απρίλιος 2023:	<p>Βιολόγος Εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας, Τμήμα Μικροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα, Ελλάδα</p> <p>Θέση απασχόλησης: «Αξιοποίηση παραπροϊόντων ελαιουργίας, για την παραγωγή καινοτόμων βιολειτουργικών ζωοτροφών και ποιοτικών ζωικών προϊόντων»</p>
Μάιος 2020 – Σεπτέμβριος 2020:	<p>Νέος επιστήμονας – Βιολόγος ΠΕ Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακογνωσίας</p>

	& Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Πανεπιστημιούπολη, Ζωγράφου, Αθήνα, Ελλάδα Θέση απασχόλησης: «Εύρεση μορίων - βιοδεικτών για την ταυτοποίηση των αμιγών μελιών με βάση τη βοτανική και τη γεωγραφική προέλευση»
Ιούνιος 2018 – Μάρτιος 2019:	Επιστημονικός Συνεργάτης (Επιλεχθείσα 1^η από 37 υποψήφιους) Εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας, Τμήμα Μικροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα, Ελλάδα Θέση απασχόλησης: «Φυσικά Προϊόντα και Λείσμανίαση»
Συμμετοχή σε επιστημονικά προγράμματα	
2022 – 2023:	Ερευνητικό Πρόγραμμα OliveFeed , με Κ.Ε. Τ2ΕΔΚ-03891 , στα πλαίσια της Πράξης με τίτλο «Αξιοποίηση παραπροϊόντων ελαιουργίας, για την παραγωγή καινοτόμων βιολειτουργικών ζωοτροφών και ποιοτικών ζωικών προϊόντων»
2020:	Ερευνητικό πρόγραμμα (άρθρο 64 παρ. 3 του ν. 4485/2017) με χρηματοδότη τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας, με Κ.Ε. 15930 και αντικείμενο «Δημιουργία εθνικού ερευνητικού δικτύου στην αλυσίδα αξίας του Μελιού»
2018 – 2019:	Ερευνητικό Πρόγραμμα ΚΡΗΠΙΣ II , με Κ.Ε. 5002486 : «Λοιμώδη, αυτοάνοσα και νευροεκφυλιστικά νοσήματα: μελέτη παθογενετικών μηχανισμών και ανάπτυξη διαγνωστικών, προγνωστικών και θεραπευτικών προσεγγίσεων» στο Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία 2014-2020»
Υποτροφίες	
2021 – 2022:	Υποτροφία του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ (Nostos Foundation)
Δημοσιεύσεις	
	Gogou G. , Koutsoni O. S., Stathopoulos P., Skaltsounis A.-L., Halabalaki M., Dotsika E. "Direct <i>In Vitro</i> Comparison of the Anti-Leishmanial Activity of Different Olive Oil Total Polyphenolic Fractions and Assessment of Their Combined Effects with Miltefosine." <i>Molecules</i> 2022 , 27(19): 6176
	Karampetsou K., Koutsoni O. S., Badounas F., Angelis A., Gogou G. , Skaltsounis A.-L., Halabalaki M., Dotsika E. "Exploring the immunotherapeutic potential of Oleocanthal against murine cutaneous leishmaniasis." <i>Planta Medica</i> 2022 , 88(9-10): 783-793
	Karampetsou K., Koutsoni O. S., Gogou G. , Angeli, A., Skaltsounis A.-L., Dotsika E. "Total Phenolic

	Fraction (TPF) from Extra Virgin Olive Oil: Induction of apoptotic-like cell death in <i>Leishmania</i> spp. promastigotes and in vivo potential of therapeutic immunomodulation." PLOS Neglected Tropical Diseases 2021 , 15(1): e0008968.
	Beteinakis Stavros, Papachristodoulou Anastasia, Gogou Georgia , Katsikis Sotirios, Mikros Emmanuel, Halabalaki Maria, "NMR-based Metabolic Profiling of Edible Olives – Determination of Quality Parameters." Molecules 2020 , 25(15): 3339.
Πρακτικά Συνεδρίων	
Διεθνή Συνέδρια	
	Gogou Georgia , Koutsoni Olga S., Halabalaki Maria, Skaltsounis Leandros-Alexios and Dotsika Eleni. "Antileishmanial potential of a total phenolic fraction rich in hydroxytyrosol and tyrosol and its additive interaction with miltefosine against Leishmania", GA-Congress, August 28-31, 2022 , Thessaloniki, Greece
	Gogou Georgia , Kavallari Andriana, Lypiridou Maria, Stamatis Haralambos and Pantos Constantinos, "In vitro biological effects of hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells", 30 th International Symposium on the Chemistry of Natural Products, November 25-29, 2018 , Athens, Greece
Εθνικά Συνέδρια	
	Γώγου Γ. , Κουτσώνη Όλγα. Σ., Σταθόπουλος Π., Σκαλτσούνης Λ.-Α., Χαλαμπαλάκη Μ. και Ντότσικα Ε., «Η πιθανή επίπτωση ενός ολικού φαινολικού κλάσματος από το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο στην καταπολέμηση της λεισμανίασης: μία νέα θεραπευτική προσέγγιση με την άποψη της ενιαίας υγείας», 15 ^ο Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο, 4-6 Νοεμβρίου, 2022 , Αθήνα, Ελλάδα
	Koutsoni Olga S., Karampetsou Kalliopi, Gogou Georgia , Halabalaki Maria, Skaltsounis Leandros-Alexios, Dotsika Eleni, "Innovative perspectives of cutaneous Leishmaniasis treatment based on Total Phenolic Fraction derived from Extra Virgin Olive Oil and phytotherapy", 70 th Congress EEBMB, 29 November - 1 December, 2019 , Athens, Greece
	Karampetsou Kalliopi, Koutsoni Olga S., Gogou Georgia , Halabalaki Maria, Angelis Apostolos, Skaltsounis Leandros-Alexios and Dotsika Eleni, "Total Phenolic Fraction from Extra Virgin Olive Oil induces apoptotic-like programmed cell death mechanisms in <i>Leishmania</i> spp. promastigotes", 5 ^η Ημερίδα Μεταπτυχιακών και Μεταδιδακτόρων, 26

	Σεπτεμβρίου 2019 , Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα, Ελλάδα
Γλωσσικές Δεξιότητες	Ελληνικά – Μητρική Αγγλικά – Άριστη γνώση (Proficiency, Michigan University) Γαλλικά – Βασική γνώση (DELF B2)
Υπολογιστικές Δεξιότητες	MS Office (UNICERT), SPSS, ANOVA, T-TEST, Adobe Photoshop, FlowJo, Image J®, MEGA and BioEdit Software, EndNote, Βιολογικές Βάσεις Δεδομένων (π.χ. GenBank)