ePublishing

ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΕΚΜΗΡΙΩΣΗΣ
NATIONAL DOCUMENTATION CENTRE

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 49, No 1 (1998)

Effect of Sinefungin on the attachment of the parasite Leishmania to the macrophages cell line J774G8

A. TZORA (Α. ΤΖΩΡΑ), F. LAWRENCE, M. ROBERT-GERO

doi: 10.12681/jhvms.15748

Copyright © 2018, A TZORA, F LAWRENCE, M ROBERT-GERO

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.

To cite this article:

TZORA (A. ΤΖΩΡΑ) A., LAWRENCE, F., & ROBERT-GERO, M. (2018). Effect of Sinefungin on the attachment of the parasite Leishmania to the macrophages cell line J774G8. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, *49*(1), 59–65. https://doi.org/10.12681/jhvms.15748

https://epublishing.ekt.gr | **e-Publisher:** EKT | **Downloaded at:** 13/03/2026 05:45:48

ΔΕΛΤΙΟΝ ΕΛΛ. ΚΤΗΝ. ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 1998, 49(1): 59-65

Η δράση της Σινεφουνγίνης στις αλληλεπιδράσεις του πρωτοζώου Λεϊσμάνια και του ξενιστή κυττάρου *in vitro*

Α.Τζώρα[1], F. Lawrence[2], M. Robert-Gero[2]

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Στην παρούσα ερευνητική εργασία μελετήθηκε η δράση του αντιβιοτικού σινεφουνγίνη στην προσκόλληση επτά στελεχών *Leishmania* των ειδών *L. infantum, L. tropica* και *L. major* στα μακροφάγα της κυτταρικής σειράς J774G8. Αναστολή της προσκόλλησης αρχικού σταδίου της φαγοκυττάρωσης παρατηρήθηκε μόνο για ευαίσθητα στελέχη έναντι της σινεφουνγίνης των ειδών *L. tropica* και *L. major*. Η ύπαρξη συσχέτισης της συμπεριφοράς του πρωτοζώου έναντι της σινεφουνγίνης στις καλλιέργειες των προμαστιγωτών μορφών και των αλληλεπιδράσεών τους με τα μακροφάγα της κυτταρικής σειράς J774G8 διαπιστώθηκε μόνο όταν η σινεφουνγίνη προστέθηκε στις καλλιέργειες των προμαστιγωτών μορφών (72 ώρες με συγκεντρώσεις σινεφουνγίνης 2,6 και 26 μΜ). Μετά από επώαση 2 ωρών των προμαστιγωτών μορφών του ευαίσθητου στελέχους *L. tropica* η αναστολή βρέθηκε 17 και 37% σε συγκεντρώσεις 2,6 και 26 μΜ του αντιβιοτικού αντίστοιχα. Μετά από επώαση 24 ωρών των προμαστιγωτών με τα μακροφάγα η αναστολή προσκόλλησης για το ευαίσθητο στέλεχος *L. tropica* βρέθηκε 52 και 77% και για το ευαίσθητο στέλεχος *L. major* 73 και 86% σε συγκεντρώσεις 2,6 και 26 μΜ του αντιβιοτικού αντίστοιχα. Αποδείχθηκε η απουσία τοξικότητας της σινεφουνγίνης για τα μακροφάγα κύτταρα στα οποία δεν επέφερε μορφολογικές αλλοιώσεις και διαταραχή της ανάπτυξής τους. Η σινεφουνγίνη παρεμβαίνει αποτελεσματικά στην προσκόλληση προμαστιγωτών-μακροφάγων και η δράση της αυτή συσχετίζεται με την έκφραση ευαισθησίας ή ανθεκτικότητας του πρωτοζώου.

[1]*Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα (Τ.Ε.Ι.) Ηπείρου.*
[2]*Institute de Clinic des Substances Naturelles, C.N.R.S., France.*

[1]*Department of Animal Production, Technological Educational Institution of Epirus.*
[2]*Institute de Clinic des Substances Naturelles, C.N.R.S., France.*

Ημερομηνία υποβολής: 12.06.97
Ημερομηνία εγκρίσεως: 09.09.97

ABSTRACT. Tzora A.[1], Lawrence F.[2], Robert-Gero M[2]. Effect of Sinefungin on the attachment of the parasite *Leishmania* to the macrophages cell line J774G8. *Bulletin of the Hellenic Veterinary Medical Society 49(1):59-65.* **The effect of Sinefungin on the attachment of the *Leishmania* strains *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major* to the macrophages cell line J774G8 was studied. Inhibition of the attachment to the surface of macrophages was observed to the Sinefungin sensitive strains *L. tropica* and *L. major*. This inhibition was obtained only for Sinefungin pretreated promastigotes (72 hours with 2.6 and 26 μM Sinefungin) when incubated with macrophages for 2 and 24 hours. After 2 h incubation period of the promastigote forms of the sensitive *L. tropica* with macrophages, the inhibition of the attachment was 100%, whereas for the sensitive L. major strain the inhibition was 17 and 36% at a concentration of Sinefungin 2.6 and 26 μM respectively. The percentage of the inhibition 24 h post infection was in the range of 52 to 77% for the *L. tropica* strain and from 73 to 86% for the *L. major* strain for promastigote pretreated with 2.6 and 26 μM Sinefungin respectively. Controls showed that Sinefungin was not toxic for the macrophages when used for 3 days at the above mentioned concentrations. Inhibition of the protozoa - macrophage cell line J774G8 adherence was a common finding leading us to the conclusion that Sinefungin is involved actively into that process.**

Λέξεις ευρετηρίασης: Σινεφουνγίνη, λεϊσμάνια, μακροφάγα J774G8.

Εισαγωγή

Οι λεϊσμανιώσεις είναι ζωοανθρωπονόσοι με ευρεία εξάπλωση σε περιοχές με εύκρατα και τροπικά κλίματα. Αίτιο είναι τα πρωτόζωα του γένους *Leishmania,* που μολύνουν τον ξενιστή με τις μαστιγοφόρες εξωκυτταρικές μορφές του παρασίτου (προμαστιγωτές) μέσω των νυγμάτων των αιματοφάγων εντόμων του γένους Phlebotomus[1]. Οι προμαστιγωτές μορφές φαγοκυτταρώνονται γρήγορα και μετατρέπονται σε αμαστιγοφόρες-ενδοκυτταρικές μορφές (αμαστιγωτές) στα μακροφάγα του ξενιστή. Η μόλυνση των ευαίσθητων ξενιστών αρχίζει με την αλληλεπίδραση των μακροφάγων τους με το

πρωτόζωο *Leishmania* μέσα στα οποία τα παράσιτα αναπτύσσονται αποκλειστικά.[2]

Το πρώτο στάδιο στη διαδικασία της μόλυνσης αποτελεί η προσκόλληση του πρωτοζώου στην επιφάνεια του ξενιστή κυττάρου. Η διαφοροποίηση του παρασίτου σε αμαστιγωτή μορφή συμβαίνει μετά την προσκόλληση και την είσοδο των προμαστιγωτών μέσα στα μακροφάγα. Οι αλληλεπιδράσεις παρασίτου-μακροφάγου έχουν αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένων ερευνών.[3]

Η σινεφουνγίνη είναι μια φυσική νουκλεοσίδη, που απομονώθηκε το 1971 στα εργαστήρια "Eli Lilly" των ΗΠΑ από καλλιέργειες των μυκήτων *Streptomyces griseolus* και το 1973 στα εργαστήρια "Rhone Poulenc" της Γαλλίας από καλλιέργειες των μυκήτων *Streptomyces incamatus*. Η σινεφουνγίνη είναι ένα μόριο με μεγάλο φάσμα χημειοθεραπευτικής δράσης. Η δράση του αντιβιοτικού αυτού αναφέρεται κατά μυκήτων και παρασίτων με συγκεκριμένη δράση κατά των προμαστιγωτών και αμαστιγωτών μορφών *Leishmania*.[4]

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να καθοριστεί η πιθανή δράση της σινεφουνγίνης στη διαδικασία της προσκόλλησης των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *Leishmania* στα μακροφάγα κύτταρα της συνεχούς κυτταρικής σειράς J774G8, όπως και η συσχέτιση της δράσης αυτής με την εκφρασμένη ευαισθησία ή ανθεκτικότητα στελεχών του πρωτοζώου.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Παράσιτα: Χρησιμοποιήθηκαν επτά στελέχη του γένους *Leishmania* που είχαν απομονωθεί στο τμήμα Παρασιτολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ και στην Παθολογική Κλινική του Τμήματος Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ. κατά τη χρονική περίοδο 1978-1987, από αλλοιώσεις νοσούντων ανθρώπων και σκύλων, που υπέφεραν από τη δερματική και σπλαχνική μορφή της νόσου.[5,6]

Τα στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως *L. tropica* (LA27, LA35 και LA256) και ως *L. infantum* (LΣ273, LΣ275 και LA4) στα εργαστήρια παρασιτολογίας της Ιατρικής Σχολής του πανεπιστημίου της Ιερουσαλήμ και του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ. Το στέλεχος LA549 ταυτοποιήθηκε στο κέντρο ταυτοποίησης λεϊσμανιών στη Γαλλία ως *L. major.*

Η ταυτοποίηση των στελεχών έγινε με βάση τη μελέτη βιοχημικών, ανοσολογικών και ορολογικών χαρακτηριστικών του παρασίτου, δηλαδή ηλεκτροφόρηση και ενζύμων-ισοενζύμων και τον προσδιορισμό του εκκρινόμενου παράγοντα.[7]

Για την απομόνωση των παρασίτων χρησιμοποιήθηκε το κλασικό διφασικό υπόστρωμα NNN[8]. Η διατήρηση των στελεχών επιτυγχανόταν με συνεχείς ανακαλλιέργειες στο υγρό μονοφασικό υλικό 199, την αποθήκευση στους -180°C (υγρό άζωτο) και τον ενδοφθαλμισμό ποντικών balb/c.

Οι προμαστιγωτές μορφές καλλιεργούνταν σε θρεπτικό υλικό 199 (Seromed), το οποίο περιείχε 2 mM L-γλουταμίνης ($C_5H_{10}N_2O_3$-Merck), 25 mM ρυθμιστικού διαλύματος Hepes (N-2-υδροξυ-αιθυλ-πιπεραζινο-N-2-αιθανο-σουλφονικό οξύ, Seromed), 5 μg ml^{-1} στρεπτομυκίνης, 5 μg ml^{-1} καναμυκίνης, 5 UI ml^{-1} πενικιλλίνης και 10% ορού εμβρύου μοσχαριών (FCS, Gibco), αδρανοποιημένου στους 56°C για 30 min. Το pH του διαλύματος ρυθμιζόταν στο 7.4.

Τα πρωτόζωα ενοφθαλμίζονταν στο καλλιεργητικό υλικό σε αναλογία $0.5x10^6$/ml, ενώ η εκτίμηση του αριθμού των ζωντανών προμαστιγωτών γινόταν σε αιμοκυτταρόμετρο τύπου Mallassez. Οι καλλιέργειες επωάζονταν στους 25°C. Είκοσι τέσσερις ώρες αργότερα προσθέτονταν σινεφουνγίνη σε συγκεντρώσεις 2.6 και 26 μM και η επώαση διαρκούσε επιπλέον τρεις μέρες[9]. Παράλληλα τα ίδια στελέχη καλλιεργήθηκαν χωρίς την παρουσία του αντιβιοτικού ως μάρτυρες.

Προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει, ότι τα στελέχη των πρωτοζώων που μελετήθηκαν, παρουσίασαν ευρεία διακύμανση ευαισθησίας στο αντιβιοτικό σινεφουνγίνη, με τα LA35 (*L. tropica*) και LA549 (*L. major*) ως πλέον ευαίσθητα στη σινεφουνγίνη, ενώ τα στελέχη LA4 (*L.infantum*) και LA27 (*L. tropica*) ως πλέον ανθεκτικά[9].

Η προμήθεια της σινεφουνγίνης σε λυοφιλοποιημένη μορφή έγινε από το Institute de Chimie des Substances Naturelles του Centre National de la Recherce Scientifique της Γαλλίας. Η σινεφουνγίνη διαλυόταν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS) και αποστειρωνόταν με διήθηση σε φίλτρα με πόρους 0.22 μm (Fluka). Τα διαλύματα του αντιβιοτικού αποθηκεύονταν σε θερμοκρασία -20°C μέχρι τη χρήση τους.

Μακροφάγα: Μακροφάγα της συνεχούς κυτταρικής σειράς J774G8 παραχωρήθηκαν από το Δρ. Chang (Rockefeller University, New York).

Τα μακροφάγα καλλιεργούνταν σε πλαστικά φιαλίδια ιστοκαλλιεργειών (Sterilin L.t.d.) χωρητικότητας 75 ml και ανακαλλιεργούνταν κάθε 48 ώρες[10]. Ως υλικό καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε το RPMI 1640 (Gibco), του οποίου η σύσταση σε γλουταμίνη, Hepes και αντιβιοτικά ήταν παρόμοια με εκείνη του υλικού καλλιέργειας των πρωτοζώων.

Η επιφάνεια των φιαλιδίων ιστοκαλλιεργειών χωρητικότητας 100 ml επικαλύφθηκε με 10 ml υλικού, το οποίο περιείχε $5x10^6$ μακροφάγα. Δύο ώρες μετά την ανακαλλιέργεια απορρίφθηκαν τα 10 ml μαζί με τα νεκρά κύτταρα και στα μακροφάγα που είχαν προσκολληθεί στην επιφάνεια των φιαλιδίων προστέθηκαν 60 ml υλικού καλλιέργειας που περιείχε σινεφουνγίνη σε συγκεντρώσεις 2.6 και 26 μM. Ταυτόχρονα τα μακρο-

φάγα αναπτύσσονταν σε φιαλίδια κατά τον ίδιο τρόπο, χωρίς σινεφουνγίνη, αλλά με την προσθήκη ίσου όγκου με αυτή αποστειρωμένου PBS (μάρτυρες). Τα κύτταρα επωάζονταν στους 37°C σε ατμόσφαιρα CO_2 5%[10]. Η συλλογή των μακροφάγων γινόταν μετά την αποκόλλησή τους από την επιφάνεια του φιαλιδίου τρεις μέρες μετά την προσθήκη της σινεφουνγίνης.

Πειραματικός σχεδιασμός: Στο πρώτο πείραμα τα μακροφάγα μολύνονταν με πρωτόζωα, τα οποία είχαν καλλιεργηθεί επί τρεις μέρες με σινεφουνγίνη. Κατά το δεύτερο πείραμα, μακροφάγα που είχαν καλλιεργηθεί με σινεφουνγίνη επί τρεις μέρες μολύνονταν με προμαστιγωτές μορφές. Τα μακροφάγα επιστρώνονταν πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες με 1 ml υλικού RPMI 1640 που περιείχε 10^6 μακροφάγα. Τα μακροφάγα επωάζονταν για μισή ώρα στους 37°C σε ατμόσφαιρα CO_2 5%, προκειμένου να σχηματίσουν "ταπήτιο". Ξεπλένονταν με υλικό καλλιέργειας και στη συνέχεια μολύνονταν με 10^7 παράσιτα που εναιωρούνταν σε 1 ml καλλιεργητικού υλικού. Η αναλογία πρωτοζώων:μακροφάγων ήταν 10:1. Ακολουθούσε επώαση σε θερμοκρασία 34°C (L. major, *L. tropica*) και 37°C (*L. infantum*), ανάλογα με το είδος του παρασίτου και σε υγρό περιβάλλον με ατμόσφαιρα CO_2 5%.

Ύστερα από επώαση των αντικειμενοφόρων επί δύο και είκοσι τέσσερις ώρες, έκπλυση με υλικό καλλιέργειας, ξήρανση και παρατήρηση στο μικροσκόπιο μετά από χρώση κατά MayGrunwald-Giemsa, υπολογίστηκε το ποσοστό προσκόλλησης των προμαστιγωτών στην επιφάνεια των μακροφάγων κυττάρων.

Σε κάθε πείραμα παρασκευάζονταν δύο αντικειμενοφόροι για ένα δείγμα. Οι μάρτυρες και για τα δύο πειράματα ήταν οι ίδιοι.

Η εκτίμηση της μόλυνσης των μακροφάγων από τις προμαστιγωτές μορφές έγινε με τη μέτρηση των προσκολλημένων παρασίτων σε 200 μακροφάγα για κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα. Καθορίστηκε επίσης ο μέσος όρος του αριθμού των προμαστιγωτών που προσδένονταν στα μακροφάγα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της δράσης της σινεφουνγίνης στην προσκόλληση προμαστιγωτών - μακροφάγων, μετά την προσθήκη της στις καλλιέργειες των πρωτοζώων και στις κυτταροκαλλιέργειες των μακροφάγων, παρουσιάζονται στους πίνακες 1 και 2.

Τα μακροφάγα κύτταρα που είχαν καλλιεργηθεί επί τρεις μέρες με συγκεντρώσεις σινεφουνγίνης 2.6 και 26 μΜ συμπεριφέρθηκαν όπως και οι μάρτυρες μετά την προσθήκη προμαστιγωτών για δύο ώρες (πίνακας 1). Στο ίδιο πείραμα, όταν προμαστιγωτές και μακροφάγα συγκαλλιεργήθηκαν για 24 ώρες, δεν υπήρξε αναστολή στην προσκόλληση παρασίτων-μακροφάγων σε σχέση με τους μάρτυρες.

Στο χρονικό διάστημα των δύο ωρών για το ευαίσθητο στέλεχος LA35 (*L. tropica*) δεν υπήρξε πρόσδεση προμαστιγωτών στα μακροφάγα, όταν στις καλλιέργειες των πρώτων είχε προστεθεί σινεφουνγίνη επί τρεις μέρες σε συγκεντρώσεις 2.6 και 26 μΜ. Στο ίδιο πείραμα, μετά από 24 ώρες καλλιέργειας των μακροφάγων με τις προμαστιγωτές, η σινεφουνγίνη ανέστειλε την προσκόλληση των πρωτοζώων του ευαίσθητου στελέχους LA35 στην επιφάνεια των μακροφάγων (πίνακας 2). Η δράση του αντιβιοτικού ελάττωσε το ποσοστό προσκόλλησης προμαστιγωτών - μακροφάγων κατά 52% σε σχέση με τους μάρτυρες, όταν η συγκέντρωσή της ήταν 2.6, ενώ κατά 77% όταν η συγκέντρωσή της ήταν 26 μΜ. Επιπλέον διαπιστώθηκε ελάττωση του αριθμού των προμαστιγωτών που συνδέονταν ανά μακροφάγο κατά 22% και 67% αντίστοιχα (πίνακας 2).

Η προσθήκη της σινεφουνγίνης επί τρεις μέρες στις καλλιέργειες των προμαστιγωτών ελάττωσε το ποσοστό προσκόλλησής τους στα μακροφάγα όταν συγκαλλιεργήθηκαν για δύο ώρες. Στο ευαίσθητο στέλεχος LA549 (*L. major*) το ποσοστό προσκόλλησης μειώθηκε κατά 17% και 36% σε σχέση με τους μάρτυρες σε συγκέντρωση σινεφουνγίνης 2.6 και 26 μΜ αντίστοιχα. Διαπιστώθηκε ελάττωση του αριθμού των προμαστιγωτών που προσδένονταν ανά μακροφάγο κατά 11% και 51% αντίστοιχα (πίνακας 2).

Η προσθήκη σινεφουνγίνης επί τρεις μέρες στις καλλιέργειες των προμαστιγωτών ελάττωσε το ποσοστό προσκόλλησής τους στα μακροφάγα, όταν συγκαλλιεργήθηκαν για είκοσι τέσσερις ώρες. Στα στελέχη LA256, LA549 και LΣ273 το ποσοστό προσκόλλησης μειώθηκε κατά 21%, 73% και 29% σε σχέση με τους μάρτυρες σε συγκέντρωση 2.6 μΜ και 37%, 86% και 34% σε σχέση με τους μάρτυρες σε συγκέντρωση 26 μΜ. Για τα ίδια στελέχη ο αριθμός των προμαστιγωτών που προσδένονταν ανά μακροφάγο σε συγκέντρωση σινεφουνγίνης 2.6 μΜ ελαττωνόταν κατά 7%, 60% και 18%, ενώ σε συγκέντρωση 26 μΜ ελαττωνόταν κατά 38%, 78% και 33% αντίστοιχα (πίνακας 2).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ρόλος των μακροφάγων κυττάρων του μονοπυρηνικού-φαγοκυτταρικού συστήματος στη λεϊσμανίωση είναι διττός· αφ' ενός αποτελούν τα κύτταρα - ξενιστές του πρωτοζώου και αφ' ετέρου ένα ανοσολογικό ρυθμιστή στην άμυνα του οργανισμού. Η διαδικασία της μόλυνσης εξαρτάται από την ικανότητα των προμαστιγωτών να φαγοκυτταρώνονται από τα μακροφάγα, να επιβιώνουν ως αμαστιγωτές μορφές και να πολλαπλασιάζονται στα φαγολυσοσώματα των μακροφάγων[11].

Πίνακας 1. Δράση της σινεφουνγίνης στην προσκόλληση των προμαστιγωτών στη μεμβράνη των μακροφάγων J774G8 μετά από 2 ώρες μόλυνσής τους.

Στελέχη πρωτοζώων	Συγκέντρωση σινεφουνγίνης (μM)	Ποσοστό μολυσμένων μακροφάγων (%)	Αριθμός προμαστιγωτών μορφών ανά μακροφάγο
MHOM Gr-87 LA 549 *(L. major)*		69	4.5
MHOM Gr-81 LA35 *(L. tropica)*	0	56	4.5
MHOM Gr-85 LA256 *(L. tropica)*		67	4.1
MHOM Gr-81 LA27 *(L. tropica)*		60	4.0
MCAN Gr-84 LΣ273 *(L. infantum)*		73	3.5
MCAN Gr-86 LΣ275 *(L. infantum)*		57	3.3
MHOM Gr-78 LA4 *(L. infantum)*		58	3.5
MHOM Gr-87 LA 549 *(L. major)*		57	4.0
MHOM Gr-81 LA35 *(L. tropica)*	2.6 στις καλλιέργειες πρωτοζώων	Δεν υπήρξε προσκόλληση πρωτοζώων-μακροφάγων	Αλλοίωση της μορφολογικής εικόνας των προμαστιγωτών μορφών
MHOM Gr-85 LA256 *(L. tropica)*		70	4.1
MHOM Gr-81 LA27 *(L. tropica)*		64	4.0
MCAN Gr-84 LΣ273 *(L. infantum)*		69	3.5
MCAN Gr-86 LΣ275 *(L. infantum)*		56	3.5
MHOM Gr-78 LA4 *(L. infantum)*		56	3.4
MHOM Gr-87 LA 549 *(L. major)*		44	2.2
MHOM Gr-81 LA35 *(L. tropica)*	26 στις καλλιέργειες πρωτοζώων	Δεν υπήρξε προσκόλληση πρωτοζώων-μακροφάγων	-
MHOM Gr-85 LA256 *(L. tropica)*		63	3.7
MHOM Gr-81 LA27 *(L. tropica)*		60	4.2
MCAN Gr-84 LΣ273 *(L. infantum)*		61	4.0
MCAN Gr-86 LΣ275 *(L. infantum)*		50	3.3
MHOM Gr-78 LA4 *(L. infantum)*		50	3.4
MHOM Gr-87 LA 549 *(L. major)*		64	4.2
MHOM Gr-81 LA35 *(L. tropica)*		54	3.1
MHOM Gr-85 LA256 *(L. tropica)*	2.6 στις καλλιέργειες μακροφάγων	62	2.5
MHOM Gr-81 LA27 *(L. tropica)*		65	4.2
MCAN Gr-84 LΣ273 *(L. infantum)*		75	3.5
MCAN Gr-86 LΣ275 *(L. infantum)*		62	3.2
MHOM Gr-78 LA4 *(L. infantum)*		48	3.9
MHOM Gr-87 LA 549 *(L. major)*		64	4.5
MHOM Gr-81 LA35 *(L. tropica)*		50	4.0
MHOM Gr-85 LA256 *(L. tropica)*	26 στις καλλιέργειες μακροφάγων	65	4.0
MHOM Gr-81 LA27 *(L. tropica)*		65	3.7
MCAN Gr-84 LΣ273 *(L. infantum)*		65	3.8
MCAN Gr-86 LΣ275 *(L. infantum)*		55	3.5
MHOM Gr-78 LA4 *(L. infantum)*		47	4.2

Η φαγοκυττάρωση είναι ουσιαστική λειτουργία των μακροφάγων για την άμυνα του οργανισμού και πραγματοποιείται κύρια σε δύο στάδια: το στάδιο της προσκόλλησης (attachment) και το στάδιο της εισόδου του παρασίτου στο κύτταρο (ingestion).[12]

Προκειμένου να διαλευκανθεί ο μηχανισμός με τον οποίο φαγοκυτταρώνονται οι προμαστιγωτές μορφές από τα μακροφάγα μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις τους. Παρ' όλα αυτά, δεν έχει διευκρινιστεί, εάν τα μακροφάγα παθητικά φαγοκυτταρώνουν τις προμαστιγωτές μορφές του πρωτοζώου ή τα πρωτόζωα ενεργά εισχωρούν στο κύτταρο. Παλαιότερες έρευνες αναφέρουν, ότι οι προμαστιγωτές μορφές της *L. donovani* εισέρχονται στα μακροφάγα κρικητών διεισδύοντας με την άκρη του μαστιγίου τους, δείχνοντας έτσι την ενερ-

Πίνακας 2. Δράση της σινεφουνγίνης στην προσκόλληση των προμαστιγωτών στη μεμβράνη των μακροφάγων J774G8 μετά από 24 ώρες μόλυνσής τους.

Στελέχη πρωτόζωων	Συγκέντρωση σινεφουνγίνης (μM)	Ποσοστό μολυσμένων μακροφάγων (%)	Αριθμός προμαστιγωτών μορφών ανά μακροφάγο
MHOM Gr-87 LA 549 *(L. major)*		50	5.0
MHOM Gr-81 LA35 *(L. tropica)*	0	44	3.2
MHOM Gr-85 LA256 *(L. tropica)*		75	4.5
MHOM Gr-81 LA27 *(L. tropica)*		53	3.8
MCAN Gr-84 LΣ273 *(L. infantum)*		83	5.5
MCAN Gr-86 LΣ275 *(L. infantum)*		58	3.75
MHOM Gr-78 LA4 *(L. infantum)*		37	3.5
MHOM Gr-87 LA 549 *(L. major)*		13	2.0
MHOM Gr-81 LA35 *(L. tropica)*		21	2.5
MHOM Gr-85 LA256 *(L. tropica)*	2.6	59	4.2
MHOM Gr-81 LA27 *(L. tropica)*	στις καλλιέργειες	55	4.0
MCAN Gr-84 LΣ273 *(L. infantum)*	πρωτοζώων	59	4.5
MCAN Gr-86 LΣ275 *(L. infantum)*		65	3.5
MHOM Gr-78 LA4 *(L. infantum)*		31	3.5
MHOM Gr-87 LA 549 *(L. major)*		7	1.1
MHOM Gr-81 LA35 *(L. tropica)*		10	1.5
MHOM Gr-85 LA256 *(L. tropica)*	2.6	47	2.8
MHOM Gr-81 LA27 *(L. tropica)*	στις καλλιέργειες	46	4.5
MCAN Gr-84 LΣ273 *(L. infantum)*	πρωτοζώων	55	3.7
MCAN Gr-86 LΣ275 *(L. infantum)*		50	3.0
MHOM Gr-78 LA4 *(L. infantum)*		35	3.0
MHOM Gr-87 LA 549 *(L. major)*		47	4.5
MHOM Gr-81 LA35 *(L. tropica)*		39	3.5
MHOM Gr-85 LA256 *(L. tropica)*	2.6	64	5.0
MHOM Gr-81 LA27 *(L. tropica)*	στις καλλιέργειες	50	4.5
MCAN Gr-84 LΣ273 *(L. infantum)*	μακροφάγων	75	5.0
MCAN Gr-86 LΣ275 *(L. infantum)*		56	3.6
MHOM Gr-78 LA4 *(L. infantum)*		36	4.0
MHOM Gr-87 LA 549 *(L. major)*		49	4.6
MHOM Gr-81 LA35 *(L. tropica)*		37	3.5
MHOM Gr-85 LA256 *(L. tropica)*	26	67	4.3
MHOM Gr-81 LA27 *(L. tropica)*	στις καλλιέργειες	50	4.0
MCAN Gr-84 LΣ273 *(L. nfantum)*	μακροφάγων	70	5.0
MCAN Gr-86 LΣ275 *(L. infantum)*		52	3.5
MHOM Gr-78 LA4 *(L. infantum)*		42	3.0

γό είσοδό τους στα μακροφάγα[13]. Αργότερα παρόμοιες παρατηρήσεις αναφέρθηκαν και από άλλους ερευνητές για το είδος *L. mexicana,* οι προμαστιγωτές μορφές του οποίου μόλυναν κύτταρα σαρκώματος παρά την ύπαρξη του αντιφαγοκυτταρικού παράγοντα cytochalasin B[14].

Αντίθετα, σε άλλα πειραματικά μοντέλα ερευνητές έχουν περιγράψει την εμφάνιση άφθονων ψευδοποδίων μακροφάγων γύρω από τις προμαστιγωτές μορφές, οι οποίες φαγοκυτταρώνονται χωρίς κάποιο ιδιαίτερο προσανατολισμό τους, υποστηρίζοντας έτσι την άποψη της ύπαρξης ενεργού μηχανισμού φαγοκυττάρωσης[15].

Η παρούσα εργασία μελετά τη δράση της σινεφουνγίνης στο πρώτο στάδιο της φαγοκυττάρωσης, στην προσκόλληση προμαστιγωτών μορφών σε μακροφάγα J774G8. Η χρήση της κυτταρικής σειράς J774G8 στο πείραμα μας εξασφάλισε ομοιομορφία δειγμάτων και μεγάλο αριθμό κυττάρων. Τα πρωτόζωα που χρησιμοποιήσαμε, βρίσκονταν στη αρχή της φάσης στασιμότητας, κατά την οποία έχουν τη μεγαλύτερη δυνατή ικανότητα μόλυνσης[16]. Στη συγκαλλιέργεια των προμαστιγωτών μορφών

με τα μακροφάγα για δύο ώρες ήταν προφανής η προσκόλλησή τους στην επιφάνεια των μακροφάγων ως επί το πλείστον με την άκρη του μαστιγίου τους. Τα στελέχη που μελετήθηκαν, δεν παρουσίασαν ποσοστιαία μεταβολή του βαθμού προσκόλλησής τους στην επιφάνεια των μακροφάγων, όταν ο χρόνος επώασης αυξήθηκε από 2 σε 24 ώρες. Πρέπει να σημειωθεί, ότι στις 24 ώρες καλλιέργειας των προμαστιγωτών μορφών με τα μακροφάγα τα πρωτόζωα προσκολλιόνταν στην επιφάνεια των κυττάρων ξενιστών χωρίς κάποιο ιδιαίτερο προσανατολισμό και σε μικρότερο βαθμό με την άκρη του μαστιγίου. Επομένως τα αποτελέσματά μας συνηγορούν υπέρ της άποψης, ότι το σημαντικότερο ρόλο στη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης διαδραματίζουν τα μακροφάγα[17].

Η εμφάνιση των αμαστιγωτών μορφών παρατηρείται μετά από συγκαλλιέργεια των μακροφάγων J774G8 με προμαστιγωτές μορφές μετά από επώαση 72 ωρών σε θερμοκρασία 37°C και παρουσία CO_2 5%[18].

Από τα αποτελέσματά μας διαπιστώνουμε, ότι η σινεφουνγίνη αναστέλλει την προσκόλληση των προμαστιγωτών μορφών των ευαίσθητων στελεχών στα μακροφάγα μόνο όταν τα τελευταία μολύνονται με προμαστιγωτά, στα οποία είχε προστεθεί το αντιβιοτικό για 72 ώρες. Αντίθετα, δεν παρουσιάζει καμία δράση, όταν έχει προστεθεί στις καλλιέργειες των μακροφάγων, στα οποία δεν επιφέρει αλλαγή της μορφολογίας και δεν επιδρά στην ανάπτυξή τους. Το γεγονός αυτό ενισχύει την άποψη, ότι η σινεφουνγίνη δεν είναι τοξική για τα μακροφάγα, ενώ μπορεί να είναι τοξική για τα πρωτόζωα και συγχρόνως συγκλίνει με τα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών με τη συνεχή κυτταρική σειρά P388D.[19]

Η ανασταλτική δράση της σινεφουνγίνης στην πρόσδεση ευαίσθητων στελεχών στα μακροφάγα ερμηνεύεται ως αποτέλεσμα της δράσης της σε επιφανειακά μόρια της μεμβράνης του πρωτοζώου που είναι υπεύθυνα για την προσκόλληση στα μακροφάγα ή σε κάποια αλλοίωση του μαστιγίου του πρωτοζώου από το αντιβιοτικό. Η έκφραση δύο γλυκοπρωτεϊνών στην εξωτερική μεμβράνη των προμαστιγωτών μορφών συνδέεται με τη λοιμογόνο δύναμη των πρωτοζώων[20]. Τα μόρια αυτά είναι η επιφανειακή γλυκοπρωτεϊνη gp63 και η λιποσφωγλυκάνη, τα κύρια συστατικά του εκκρινόμενου παράγοντα (excreted factor). Τα δύο μόρια καλύπτουν τη μεγαλύτερη επιφάνεια των προμαστιγωτών μορφών και είναι υπεύθυνα για την πρόσδεση των προμαστιγωτών στα μακροφάγα. Η γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 63 kd (gp63) περιέχει μαννόζη, N-ακετυλογλυκοζαμίνη και N-ακετυλογαλακτοζαμίνη και μπορεί να αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα του συμπληρώματος και με τον υποδοχέα της μαννόζης-φουκόζης των μακροφάγων, ανεξάρτητα από την παρουσία ή μη ορού[21]. Η αποδεδειγμένη ανασταλτική δράση της σινεφουνγίνης στη σύνθεση του DNA των πρωτοζώων που έχουν υψηλό βαθμό ευαισθησίας[22], ίσως συνδέεται με την έκφραση των άνω γλυκοπρωτεϊνών σε μικρότερες ποσότητες στην εξωτερική μεμβράνη του πρωτοζώου. Σε ανθεκτικά στελέχη του πρωτοζώου στη σινεφουνγίνη βρέθηκε αυξημένη η γλυκοπρωτεΐνη gp63.[23] Η αναστολή των αλληλεπιδράσεων πρωτοζώου-μακροφάγου παρουσία σινεφουνγίνης μπορεί να αποδοθεί στη δράση του αντιβιοτικού στα δύο αυτά μόρια.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Zuckerman A, Lainson R. Leishmania in: Kreir, JP (Ed) Parasite Protozoa chapt 1977, 3:57-133 Academic Press, New York, San Francisco, London.
2. Mosser DM, Rosenthal LA. Leishmania-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. Seminars in cell biology 1993, 4:315-22.
3. Prina E, Lang T, Glaichenhaus N, Antoine JC.. Presentation of the protective parasite antigen LACK by Leishmania-infected macrophages. J. Immun 1960,154: 4318-27
4. Bachrach U, Schnur LF, EI-on J, Greenblatt CL, Pearlman E, Robert Gero M, Lederer E. Inhibitory activity of Sinefungin and SIBA (5′-Deoxy-5′-S-isobutyl-thioadenosine) on the growth of promastigotes and amastigotes of different species of Leishmania. FEBS Lett 1980, 121: 287-291
5. Χατζηαντωνίου Μ. Μαζική καλλιέργεια της προμαστιγωτής μορφής του παρασίτου λεϊσμάνια - παρασκευή νέου μονοφασικού υλικού. Διδακτορική διατριβή. Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών 1984.
6. Κοντός Β. Συμβολή στη μελέτη της λεϊσμανίασης του σκύλου. Κλινική, ορολογική και πειραματική διερεύνηση. Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης 1986
7. Frank C. Serologische Klassifizierung und biochemische indentifizierung von in Griechenland isolierten Leishmania -Stammen (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Dissertation-Universitat Tubingen,1991
8. Tzamouranis N, Schnum LF, Garifallou A, Pateraki E, Serie C. Leishmaniasis in Greece. I. Isolation and Identification of the parasite causing human and canine visceral leishmaniasis. Ann. Trop. Med. and Parasite 1984, 78: 4: 363-368.
9. Tzora-Skoufou A, Lawrence F, Robert-Gero M, and Hadziandoniou M. Recherche de resistants spontanés à la Sinefungine dans les souches de leishmanies provenant de Grece. Bulletin de la Sosiété Francaise de Parasitologie 1990, 8:1:19-24
10. Chang KP. Human Cutaneus leishmaniasis in a mouse macrophage line:propagation and isolation of intracellular parasites. Sciences 1980, 209:1240-1242
11. Chang KP, Fong D, Bray RS. Biology of leishmania and leishmaniasis. Elsevier Science Publishers B.V. Part 1, P, 1985:1-30
12. Skamene E, Gros P. Role of macrophages in resistance against infectious diseases. Clin Immun. All 1983, 3:539560
13. Pulvertratt RJV, Hogle GF. Stages in the life cycle of Leishmania donovani. Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg 1960, 54:191-196

14. Wyler DJ. In vitro parasite-monocyte interactions in human leishmaniasis. Evidence for an active role of the parasite in attachment. J. Clin. Invest 1982, 70: 82-88

15. Chang KP. Leishmania donovani: Promastigote-macrophage surface interactions in vitro. Exp. Parasitol 1979, 48:175-189

16. Sacks DL, Dasilva RP. The generation of infective stage leishmania major promastigotes is associated with the cell surface expression and release of a developmentally regulated glycolipid. J. Immunol,1987:139-3099

17. Ash C. Macrophages at the centre of infection. Parasitology Today 1991, 7:2-4

18. Pan AA, McMahon, Pratt D. Monochonal antibodies specific for the amastigote stage of leishmania pifanoi. I. characterization of antigens associated with stage and species - specific determinants. J. Immun 1988, 140:2406- 2414

19. Paolantonacci P, Lawrence F, Nolan LL, Robert-Gero M. Inhibition of leishmanial DNA synthesis by sinefungin. Biochem Pharmacol 1987,36:2813-2820

20. Sacks DL, Perkins PV. Identification of an infective stage of leishmania promastigotes. Science 1984, 223:1417 - 1419

21. Dutta M, Bandyopadhyay R, Basu MK. Neoglycosylated liposomes as efficient ligands for the evaluation of specific sugar receptors on macrophages in health and in experimental leishmaniasis. Parasitology 1994,109: 2:139-47

22.Τζώρα-Σκούφου Α, Lawrence F, Robert-Gero M. Η δράση της σινεφουνγίνης στη βιοσύνθεση των μεγαλομορίων του πρωτοζώου Λεϊσμάνια. 7^{ο} Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη, 1997

23. Soteriadou KP, Tzinia AK, Mamalaki A, Phelouzat MA, Lawrence F, Robert-Gero M. Expression of the major surface glycoprotein of leishmania, gp63, in wild-type and sinefungin resistant promastigotes. Eur J Biochem 1994,223:61-68