

## Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 49, No 2 (1998)



### The effect of sinefungin on the macromolecular biosynthesis of *Leishmania* species

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

doi: [10.12681/jhvms.15765](https://doi.org/10.12681/jhvms.15765)

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



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

#### To cite this article:

TZORA (A. TZΩΠΑ) A., LAWRENCE, F., & ROBERT-GERO, M. (2018). The effect of sinefungin on the macromolecular biosynthesis of *Leishmania* species. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 49(2), 137–142.  
<https://doi.org/10.12681/jhvms.15765>

## Η δράση της Σινεφουνγίνης στη βιοσύνθεση των μεγαλομορίων του πρωτοζώου Λεισμάνια

A. Τζώρα<sup>1</sup>, F. Lawrence<sup>2</sup>, M. Robert-Gero<sup>2</sup>

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ.** Χρησιμοποιήθηκαν τρία στελέχη του πρωτοζώου λεισμάνια, δηλαδή ένα ευαίσθητο στη σινεφουνγίνη του είδους *L. tropica* και δύο φυσικώς ανθεκτικά των ειδών *L. tropica* και *L. infantum*. Η μελέτη έγινε με τη βοήθεια ραδιοσημασμένων ουσιών που ήταν η τριτιωμένη θυμιδίνη, η ουριδίνη και η λευκίνη. Τα μεγαλομόρια του παρασίτου που είχαν σημαθεί με τα ως άνω ραδιενεργά στοιχεία βρίσκονταν σε δύο διαφορετικές φάσεις, στερεά και υγρή, και αναλύονταν με τη μέθοδο του *Schneider*. Οι μετρήσεις διενεργούνταν σε μετρητή υγρού σπινθηρισμού (*Beckman*) και η ενσωμάτωση των ραδιοϊσοτόπων εκφραζόταν σε χρούσεις ανά λεπτό (*cpm*). Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών των παρασίτων καθορίστηκε με τη μέθοδο *Lowry*. Η ενσωμάτωση των ραδιενεργών στοιχείων στα μεγαλομόρια εκφράζεται σε *cpm/mg* πρωτεϊνών του πρωτοζώου. Παρατηρήθηκε σημαντικό βαθμό αναστολή της ενσωμάτωσης της θυμιδίνης που ήταν ανάλογη της συγκέντρωσης της σινεφουνγίνης και του χρόνου έκθεσης των καλλιέργειών των προμαστιγωτών μορφών του ευαίσθητου στελέχους *L. tropica* στο αντιβιοτικό. Η αναστολή της βιοσύνθεσης του DNA που επέφερε η σινεφουνγίνη σε συγκέντρωση 2,6 μM (υπερδεκαπλάσια της λεισμανιοστατικής και υποδεκαπλάσια της λεισμανιοκτόνου) στο ευαίσθητο στέλεχος *L. tropica* κυμάνθηκε από 25% έως 64% σε χρόνους δράσης της μας και είκοσι τεσσάρων ωρών αντίστοιχα. Δε σημειώθηκε αναστολή της βιοσύνθεσης του RNA στο πρωτόζωο. Σχετικά με την ενσωμάτωση της λευκίνης παρατηρήθηκε μικρότερου βαθμού αναστολή στο ίδιο στέλεχος σε σχέση με την αντίστοιχη της θυμιδίνης που κυμάνθηκε από 10% έως 24%. Αντίθετα, η σύνθεση του DNA των ανθεκτικών στελεχών δεν επηρεάστηκε ακόμα και όταν οι χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις της σινεφουνγίνης για έξι ώρες ήταν η λεισμανιοκτόνος 26 μM και

πολλαπλάσιες αυτής. Η δράση του αντιβιοτικού σινεφουνγίνη στις βιοσυνθετικές λειτουργίες του πρωτοζώου λεισμάνια είναι ανεξάρτητη του είδους και συσχετίζεται με την έκφραση της ευαισθησίας ή ανθεκτικότητας του στελέχους. Η σινεφουνγίνη παρεμβαίνει στη σύνθεση του DNA των πρωτοζώων που έχουν υψηλό βαθμό ευαισθησίας σ' αυτήν.

**ABSTRACT.** A. Tzora, F. Lawrence, M. Robert-Gero. The effect of sinefungin on the macromolecular biosynthesis of Leishmania species. *Bulletin of the Hellenic Veterinary Medical Society 1998, 49(2):137-142.* The aim of the work presented here was the *in vitro* study of the action of the antibiotic sinefungin on the macromolecules DNA, RNA and the proteins of different isolates of *Leishmania spp.* in relation to the resistance or to the sensitivity of the strains examined. The mode of action of sinefungin of the Leishmania strains was detected by incorporating radiolabelled thymidine, uridine and leucine into promastigote forms, to study the synthesis of DNA, RNA and proteins respectively. In the sensitive strain *L. tropica* a statistically significant reduction of the rate of incorporation of thymidine to the DNA of the parasite, resulted to a 64% inhibition of leishmanial DNA synthesis by sinefungin at a concentration of 2.6 mM, when the time of action of the drug was 24 hours. In the sensitive strain *L. tropica* the reduction of the rate of incorporation of thymidine was depended on the concentration and the time of action of the drug. No inhibition of leishmanial RNA synthesis was observed. Our research showed that the action of the antibiotic sinefungin to the macromolecular biosynthesis of the protozoan Leishmania is independent of the strain and is strongly related with the expression of the sensitivity and the resistance of the strain. The main target of the antibiotic examined was the DNA of the Leishmania strains sensitive to the drug.

<sup>1</sup>Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα (Τ.Ε.Ι.) Ηπείρου

<sup>2</sup>Institute de Chimie des Substances Naturelles, C.N.R.S., France

<sup>1</sup>Department of Animal Production, Technological Educational Institution of Epirus

<sup>2</sup>Institute de Chimie des Substances Naturelles, C.N.R.S., France

Ημερομηνία υποβολής: 10.09.97

Ημερομηνία εγκρίσεως: 03.12.97

**Λέξεις ευρετηρίασης:** Σινεφουνγίνη, λεισμάνια, μεγαλομόρια.

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η σινεφουνγίνη είναι μια φυσική νουκλεοσίδη, που απομονώθηκε από καλλιέργειες του *Streptomyces incarnatus* και *S. griseolus*, με αντιμυκητιακές και αντιπαρασιτικές ιδιότητες *in vitro* και *in vivo*<sup>1,2,3</sup>.

Αποκαλύφθηκε ότι το μόριο της σινεφουγγίνης ήταν ανάλογο των μορίων της S-αδενοσυλομεθειονίνης (SAM) και της S-αδενοσυλομοκυστεΐνης (SAH), υποστρώματος και αναστολέα των μεθυλοτρανσφερασών αντίστοιχα<sup>1</sup>. Η αναλογία δομής κατέστησε τις μεθυλοτρανσφεράσες πιθανό δυναμικό στόχο της σινεφουγγίνης. Πράγματι αποδείχτηκε ισχυρή η ανασταλτική δράση της σινεφουγγίνης για τα ένζυμα αυτά σε διάφορα ευκαρυωτικά κύτταρα<sup>5,6</sup>. Σε αντίθεση με ό,τι αναμενόταν, η σινεφουγγίνη επέδειξε ελάχιστη ανασταλτική δράση για τις πρωτεϊνικές μεθυλοτρανσφεράσες I και III του παρασίτου λείσμανια *in vitro* και *in vivo*<sup>7,8</sup>.

Δεδομένης της ανασταλτικής δράσης της σινεφουγγίνης στην ανάπτυξη των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου λείσμανια<sup>9</sup>, διερευνήσαμε το αποτέλεσμα του αντιβιοτικού σε άλλα κυτταρικά επίπεδα. Σκοπός της εργασίας ήταν να επισημανθούν οι πιθανοί στόχοι της σινεφουγγίνης στο πρωτόζωο λείσμανια με τη μελέτη της δράσης της στη σύνθεση των μεγαλομορίων DNA, RNA και των πρωτεϊνών των ειδών *Leishmania infantum* και *Leishmania tropica*, καθώς και η σχέση αυτών με την έκφραση ευαισθησίας ή ανθεκτικότητας του πρωτοζώου.

## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

**Παράσιτα:** Χρησιμοποιήθηκαν τρία στελέχη του γένους *Leishmania* που είχαν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί στο τμήμα Παρασιτολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Πασέρ<sup>10,11</sup>. Ένα στέλεχος ευαίσθητο στη σινεφουγγίνη του είδους *L. tropica* (MHOM/Gr/81/LA35) και δύο στελέχη φυσικώς ανθεκτικά στη σινεφουγγίνη των ειδών *L. tropica* (MHOM/GR/81/LA27) και *L. infantum* (MHOM/Gr/78/LA4)<sup>9</sup>.

Οι προμαστιγωτές μορφές καλλιεργούνταν και αναπτύσσονταν σε υγρό θρεπτικό υλικό 199 (Seromed), το οποίο περιείχε 2 mM L-γλουταμίνης (C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Merck), 25 mM ρυθμιστικού διαλύματος Hepes (N-2-υδροξυ-αιθυλ-πιπεραζινο-N-2-αιθανοσυλφονικό οξύ, Seromed), 5 μg ml<sup>-1</sup> στρεπτομυκίνης, 5 μg ml<sup>-1</sup> καναμυκίνης, 5 U ml<sup>-1</sup> πενικιλίνης και 10% ορού εμβρύου μύσων (FCS, Gibco), αδρανοποιημένου στους 56 °C για 30 min. Το pH του διαλύματος ρυθμιζόταν στο 7,4.

Τα παράσιτα καλλιεργούνταν σε πλαστικά φιαλίδια ιστοκαλλιεργειών (Sterilin L.t.d) που περιείχαν 5 ml θρεπτικού υλικού 199. Ο αριθμός των πρωτοζώων που ενοφθαλμιζόνταν ήταν καθορισμένος για κάθε στέλεχος, έτσι ώστε ο αριθμός των πρωτοζώων στο καλλιεργητικό υλικό μετά από 24 ώρες να ήταν τουλάχιστον 25 x10<sup>6,12</sup>. Η επώαση των καλλιεργειών των προμαστιγωτών μορφών γινόταν στους 25 °C και η εκτίμηση του αριθμού των ζωντανών προμαστιγωτών γινόταν σε αιμοκυτταρόμετρο τύπου Mallassez<sup>13</sup>.

Η προμήθεια της σινεφουγγίνης έγινε σε λυοφιλοποιη-

μένη μορφή από το Institute de Chimie des Substances Naturelles του Centre National de la Recherche Scientifique της Γαλλίας. Η σινεφουγγίνη 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.

**Ραδιοσημασμένες ουσίες:** Η χρήση των ραδιοσημασμένων ουσιών στο πείραμα αποσκοπούσε στη σήμανση των κυττάρων στόχων. Η μέθοδος σήμανσης των ευκαρυωτικών κυττάρων με ραδιοϊσότοπα έχει ευρύτατο πεδίο εφαρμογής. Ως γνωστό, τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα ενσωματώνουν τη θυμιδίνη κατά τη σύνθεση του DNA. Η πρόσληψη του ραδιενεργού στοιχείου συντελείται κατά τη S-φάση, στάδιο σύνθεσης και διπλασιασμού της ποσότητας του DNA των ευκαρυωτικών κυττάρων, που αποτελεί ένα μεγάλο τμήμα του κυτταρικού τους κύκλου<sup>14</sup>.

Η χρησιμοποίηση της θυμιδίνης από τα πρωτόζωα του γένους *Leishmania* διενεργείται από αντιδράσεις περιώσεως, κατά τις οποίες τα κύτταρα κάνουν χρήση εξωγενώς χρησιμοποιούμενης θυμιδίνης<sup>15</sup>.

Οι ραδιοσημασμένες ουσίες που επιλέχθηκαν για μελέτη της δράσης της σινεφουγγίνης στη σύνθεση του DNA, RNA και πρωτεϊνών κατά σειρά αντιστοιχίας ήταν:

- Η σεσημασμένη με ραδιενεργό τρίτιο θυμιδίνη, [methyl-3H] Thimidine, με ειδική δραστηριότητα (specific activity) 41 ci/mmol και ολική δραστηριότητα (total activity) 5,4 mci/5 ml.

- Η σεσημασμένη με ραδιενεργό τρίτιο ουριδίνη, [5-3H] Uridine, με ειδική δραστηριότητα 30 ci/mmol και ολική δραστηριότητα 1 mci/0,5 ml και

- Η σεσημασμένη με ραδιενεργό τρίτιο λευκίνη L-[4,5-3H] Leucine, με ειδική δραστηριότητα 30 ci/mmol και ολική 1 mci/0,5 ml (Amersham, USA).

**Πειραματικός σχεδιασμός:** Η μεθολογία ραδιοσήμανσης στελεχών του πρωτοζώου *Leishmania* περιγράφεται από τους Paolantonacci και συν.<sup>12</sup>

Για κάθε στέλεχος και για κάθε ραδιοσημασμένη ουσία χρησιμοποιούνταν δέκα φιαλίδια. Είκοσι τέσσερις ώρες μετά τον ενδοφθalmισμό των πρωτοζώων και αφού μετριόταν ο αριθμός τους στα δέκα φιαλίδια, προσθετόταν σινεφουγγίνη στα πέντε σε τελική συγκέντρωση 2,6 μM (1 μg/ml) (50 ml διαλύματος σινεφουγγίνης). Οι καλλιέργειες επώαζονταν στους 25 °C για χρόνο που διέφερε ανά δύο φιαλίδια: μια ώρα, τρεις ώρες, έξι ώρες, δέκα πέντε ώρες και είκοσι τέσσερις ώρες. Στο τέλος του χρόνου επώασης προσθέτονταν οι ραδιοσημασμένες ουσίες σε συγκέντρωση 5,4 mci/ml.

Οι καλλιέργειες 30 min μετά την προσθήκη του ραδιενεργού στοιχείου φυγοκεντρούνταν σε 420 g για 10 min. Ακολουθούσε έκπλυση με διάλυμα PBS. Η προσθήκη δια-

**Πίνακας 1.** Επίδραση της σινεφουνγίνης (συγκέντρωση 2,6 μΜ) στην ενσωμάτωση προδρομών ουσιών μεγαλομορίων προμαστιγωτών μορφών των στελεχών: MHOM/Gr/81/LA27 (*L. tropica*), MHOM/Gr81/LA35 (*L. tropica*), MHOM/Gr78/LA4 (*L. infantum*).

		MHOM/Gr/81/LA27		MHOM/Gr81/LA35		MHOM/Gr78/LA4	
		TCA-διαλυτή φάση	TCA-αδιάλυτη φάση	TCA-διαλυτή φάση	TCA-αδιάλυτη φάση	TCA-διαλυτή φάση	TCA-αδιάλυτη φάση
ΠΟ	T	%E	%E	%E	%E	%E	%E
Θ	1	125	99	141	79	120	90
	3	120	98 P<0,1	136	66 P<0,01	109	90 P>0,1
	6	103	96	133	50	120	140
	15	99	107	120	46	120	142
	24	104	104	128	36	90	100
Ο	1	95	107	90	126	102	89
	3	120	115 P>0,1	140	113 P>0,1	105	95 P>0,1
	6	111	105	142	119	114	105
	15	102	99	98	114	95	90
	24	107	95	90	72	97	87
Α	1	116	105	122	89	101	94
	3	126	98	105	90 P<0,01	89	102 P>0,1
	6	108	106 P>0,1	107	85	108	106
	15	109	97	114	87	109	97
	24	94	134	103	76	94	134

**Υπόμνημα:** Π.Ο.: πρόδρομη ουσία, Θ: Θυμιδίνη, Ο: ουριδίνη, Α: λευκίνη, T: Χρόνος επώασης σε ώρες

%E: % ποσοστιαία ενσωμάτωση πρόδρομης ουσίας σε καλλιέργεια με σινεφουνγίνη (συγκέντρωση 2,6 μΜ) σε σχέση με το μάρτυρά της.

λύματος TCA (Trichloroacetic acid) 5%, θερμοκρασίας 4 °C, στο ίζημα αποσκοπούσε στην αποφυγή της υδρόλυσης των μεγαλομορίων. Το διάλυμα περνούσε από φίλτρο (GF/C) σε πλαστικούς σωλήνες με τη βοήθεια κενού αέρα και στη συνέχεια το φίλτρο ξεπλενόταν με 3 ml διαλύματος TCA 5%, θερμοκρασίας 4 °C.

Τα μεγαλομόρια που είχαν σημανθεί με ραδιενεργά στοιχεία βρίσκονταν σε δύο διαφορετικές φάσεις στερεά και υγρή και αναλύονταν με τη μέθοδο του Schneider<sup>16</sup>. Ακολουθούσε αλκαλική υδρόλυση των πρωτεϊνών της στερεάς φάσης με διάλυμα NaOH 1N σε θερμοκρασία 80 °C για μια ώρα. Οι μετρήσεις των ενσωματωμένων ραδιενεργών στοιχείων από κάθε φάση ήταν δύο και γίνονταν σε πλαστικούς σωλήνες υγρού σπινθηρισμού (FIOLE) μαζί με 5 ml υγρού σπινθηρισμού (ACS, Amersham, USA).

Οι μετρήσεις διενεργούνταν σε μετρητή υγρού σπινθηρισμού (Beckman) και η ενσωμάτωση των ραδιοϊσοτόπων εκφραζόταν σε κρούσεις ανά λεπτό (cpm/min).

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών των παρασίτων καθορίστηκε με τη μέθοδο των Lowry και συν.<sup>17</sup>

Σε ένα δεύτερο πειραματικό σχεδιασμό τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις της σινεφουνγίνης προστέθηκαν στα ίδια στελέχη του παρασίτου με κοινό χρόνο επώασης έξι ωρών. Οι δοκιμαζόμενες συγκεντρώσεις του υπό μελέτη αντιβιοτικού ήταν: 26 μΜ (10 μg/ml), 130 μΜ (50

μg/ml) και 260 μΜ (100 μg/ml). Η πειραματική διαδικασία ήταν ανάλογη της προηγούμενης.

**Στατιστική ανάλυση.** Στατιστική ανάλυση και σύγκριση των αποτελεσμάτων ενσωμάτωσης κάθε ραδιοσημασμένης ουσίας στην TCA-αδιάλυτη φάση κάθε στελέχους έγινε με τη μέθοδο της ανάλυσης της διακύμανσης<sup>18</sup>.

Για τη σύγκριση του ποσοστού ενσωμάτωσης προδρομών ουσιών μεγαλομορίων προμαστιγωτών μορφών με διάφορες συγκεντρώσεις σινεφουνγίνης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Student's t-test<sup>19</sup>.

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η σύνθεση των μεγαλομορίων DNA, RNA και πρωτεϊνών ενός ευαίσθητου στελέχους (*L. tropica*) και δύο φυσιολογικά ανθεκτικών (*L. tropica* και *L. infantum*) μελετήθηκε με διαφορετικούς χρόνους επώασης κατά την παρουσία ή μη σινεφουνγίνης σε συγκέντρωση 2,6 μΜ (1 μg/ml), που ήταν δεκαπλάσια της λείσμανιοστατικής και υποδεκαπλάσια της λείσμανιοκτόνου.

Οι ραδιενεργές ουσίες ενσωματώθηκαν στα μεγαλομόρια δύο διαφορετικών φάσεων, της TCA-διαλυτής φάσης και της TCA-αδιάλυτης φάσης. Η TCA-διαλυτή φάση αντιπροσωπεύει τις ραδιοσημασμένες TMP, TDM και TTP (μονοφωσφορική, διφωσφορική και τριφωσφορική θυμιδίνη), καθώς και τις UMP, UDP και UTP (μονοφω-

**Πίνακας 2.** Επίδραση της σινεφουγγίνης στην ενσωμάτωση προδρόμων ουσιών μεγαλομορίων προμαστιγωτών μορφών μετά την επώασή τους επί έξι ώρες, των στελεχών: MHOM/Gr81/LA27 (*L. tropica*), MHOM/Gr81/LA35 (*L. tropica*), MHOM/Gr78/LA4 (*L. infantum*).

ΠΟ	C	MHOM/Gr81/LA27		MHOM/Gr81/LA35		MHOM/Gr78/LA4	
		TCA-διαλυτή φάση %E	TCA-αδιάλυτη φάση %E	TCA-διαλυτή φάση %E	TCA-αδιάλυτη φάση %E	TCA-διαλυτή φάση %E	TCA-αδιάλυτη φάση %E
Θ	0	100	100	100	100	100	100
	26	116	102 <sup>α</sup>	124	47 <sup>ε</sup>	115	133 <sup>ε</sup>
	130	117	100 <sup>α</sup>	120	33 <sup>ε</sup>	130	127 <sup>ε</sup>
	260	115	110 <sup>δ</sup>	108	26 <sup>ε</sup>	120	122 <sup>ε</sup>
Ο	0	100	100	100	100	100	100
	26	120	110 <sup>ε</sup>	140	103 <sup>α</sup>	115	110 <sup>δ</sup>
	130	114	113 <sup>α</sup>	130	100 <sup>α</sup>	108	115 <sup>ε</sup>
	260	118	120 <sup>ε</sup>	115	104 <sup>α</sup>	120	106 <sup>γ</sup>
Α	0	100	100	100	100	100	100
	26	114	108 <sup>ε</sup>	110	82 <sup>ε</sup>	102	100 <sup>α</sup>
	130	117	113 <sup>ε</sup>	115	84 <sup>ε</sup>	90	104 <sup>α</sup>
	260	116	86 <sup>ε</sup>	96	78 <sup>ε</sup>	98	101 <sup>α</sup>

**Υπόμνημα:** Π.Ο.: πρόδρομη ουσία, Θ: Θυμιδίνη, Ο: ουριδίνη, Α: λευκίνη, C: συγκεντρωση σινεφουγγίνης (μM)

%E: % ποσοστιαία ενσωμάτωση πρόδρομης ουσίας σε καλλιέργεια με σινεφουγγίνη (συγκεντρώσεις 26, 130 και 260 μM) σε σχέση με το μάρτυρά της.

α: P>0,1, β: P<0,1, γ: P<0,05, δ: P<0,02, ε: P<0,01

σφορική, διφωσφορική και τριφωσφορική ουριδίνη). Η TCA-αδιάλυτη φάση αντιπροσωπεύει τις ραδιοσημασμένες πρωτεΐνες και πεπτίδια (>8 αμινοξέα), το RNA (tRNA, rRNA και mRNA), καθώς και το DNA.

Η ενσωμάτωση των ραδιενεργών στοιχείων στα μεγαλομόρια εκφράζεται σε cpm/mg πρωτεϊνών του πρωτοζώου. Στον πίνακα 1 παρουσιάζεται η επίδραση της σινεφουγγίνης (συγκεντρωση 2,6 μM) στην ενσωμάτωση προδρόμων ουσιών μεγαλομορίων, από τα προμαστιγωτά των εξεταζόμενων στελεχών.

Στο φυσικά ανθεκτικό στέλεχος *L. tropica*, όπως εμφανίζεται στον πίνακα 1, δεν υπήρξε αναστολή της ενσωμάτωσης των ραδιενεργών στοιχείων παρουσία 2,6 μM σινεφουγγίνης και σε όλους τους εξετασθέντες χρόνους επώασης σε σχέση με αυτή των μαρτύρων.

Στο ευαίσθητο έναντι της σινεφουγγίνης στέλεχος (*L. tropica*), η ενσωμάτωση της θυμιδίνης αναστάλη παρουσία της σινεφουγγίνης. Η αναστολή ήταν ανάλογη με το χρόνο έκθεσης του πρωτοζώου στο φάρμακο και κυμάνθηκε από 21% έως 64%.

Η παρουσία της σινεφουγγίνης (2,6 μM) στις προμαστιγωτές μορφές του παραπάνω στελέχους για 24 ώρες ανέστειλε την ενσωμάτωση της ουριδίνης κατά 28%. Η προκαλούμενη αναστολή της ενσωμάτωσης της λευκίνης ήταν μικρή και ανάλογη του χρόνου έκθεσης του πρωτοζώου

στο φάρμακο κυμαινόμενη από 10% έως 24% (πίνακας 1).

Η ενσωμάτωση των ραδιενεργών στοιχείων στα μεγαλομόρια του στελέχους (*L. infantum*) δεν επηρεάστηκε από την παρουσία 2,6 μM σινεφουγγίνης στους εξετασθέντες χρόνους προσθήκης της στις καλλιέργειες του πρωτοζώου (πίνακας 1).

Η μελέτη της δράσης της σινεφουγγίνης στο πρωτόζωο λεισμία επιτελέστηκε με κοινό χρόνο έκθεσης των καλλιεργειών στη σινεφουγγίνη και για τις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις της.

Ο χρόνος των έξι ωρών κρίθηκε καταλληλότερος για τη διεξαγωγή του πειράματος, επειδή ήταν αφ' ενός μικρότερος του χρόνου διπλασιασμού των μελετώμενων στελεχών και αφ' ετέρου στο χρόνο αυτό ολοκληρωνόταν η σύνθεση των μεγαλομορίων του πρωτοζώου. Οι δοκιμαζόμενες συγκεντρώσεις της σινεφουγγίνης ήταν η λεισμανιοκτόνος 26 μM, η πενταπλάσια και η δεκαπλάσια αυτής.

Τα αποτελέσματα με το φυσικό ανθεκτικό στέλεχος *L. tropica* έδειξαν, ότι η ενσωμάτωση των ραδιενεργών στοιχείων στα μεγαλομόρια του στελέχους δεν επηρεάστηκε παρουσία και των τριών συγκεντρώσεων της σινεφουγγίνης (πίνακας 2).

Στο ευαίσθητο στέλεχος *L. tropica* παρατηρήθηκε σημαντική αναστολή της ενσωμάτωσης της θυμιδίνης κατά 53% έως 64%. Η ενσωμάτωση της λευκίνης αναστάλη κα-

τά 16% έως 22% (πίνακας 2).

Τέλος, στο φυσικά ανθεκτικό στέλεχος *L. infantum* δεν παρατηρήθηκε αναστολή της ενσωμάτωσης των ραδιενεργών στοιχείων στα μεγαλομόρια του πρωτοζώου (πίνακας 2).

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο μηχανισμός σύνθεσης των βάσεων των νουκλεοτιδίων από τη λείσμανια επιτελείται με αντιδράσεις περίσωσης και όχι με αντιδράσεις της *de novo* σύνθεσης<sup>15</sup>. Τη βιοσυνθετική αυτή λειτουργία του πρωτοζώου μπορεί να μιμηθεί η φυσική νουκλεοσίδη σινεφουνγίνη, που ανταγωνίζεται τις νουκλεοσίδες του καλλιεργητικού μέσου για την είσοδό της στα κύτταρα. Οι McCammon και Parks<sup>20</sup> μελετώντας την επίδραση της σινεφουνγίνης στο μύκητα *Saccharomyces cerevisiae* απέδειξαν τη μεταφορά της από το καλλιεργητικό υλικό στο εσωτερικό του κυττάρου.

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρονται στην αναστολή της ενσωμάτωσης της θυμιδίνης στο DNA των προμαστιγωτών μορφών των ειδών *L. donovani*, *L. tropica* και *L. enrietti* από τη σινεφουνγίνη. Ερευνητικές μελέτες έδειξαν, ότι η δράση της σινεφουνγίνης είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη αναστολή σύνθεσης του DNA των προμαστιγωτών μορφών στο στέλεχος του είδους *L. donovani* από ό,τι τα στελέχη των ειδών *L. tropica* και *L. enrietti*. Συγκεκριμένα, η προσθήκη της σινεφουνγίνης στις καλλιέργειες επί έξι ώρες σε συγκέντρωση 0,26  $\mu\text{M}$  προκάλεσε αναστολή της σύνθεσης του DNA των *L. donovani* και *L. tropica* κατά 91% και 83% αντίστοιχα<sup>12</sup>. Οι ίδιοι ερευνητές υποστήριξαν, ότι η προσθήκη της σινεφουνγίνης σε συγκεντρώσεις 0,026  $\mu\text{M}$  και 0,26  $\mu\text{M}$  για έξι ώρες στις καλλιέργειες του στελέχους *L. donovani* προκάλεσαν αναστολή της σύνθεσης του DNA κατά 70 και 91% αντίστοιχα.

Από τα αποτελέσματά μας διαπιστώνεται σημαντική αναστολή της ενσωμάτωσης της τριτωμένης θυμιδίνης στο DNA των προμαστιγωτών μόνο στο ευαίσθητο στέλεχος *L. tropica*. Το γεγονός αυτό δηλώνει την αναστολή της σύνθεσης του DNA του πρωτοζώου παρουσία 2,6  $\mu\text{M}$  σινεφουνγίνης, η οποία είναι ανάλογη του χρόνου έκθεσης στο φάρμακο, κυμαινόμενη από 25% στη μία ώρα, 50% στις έξι ώρες και 64% στις είκοσι τέσσερις ώρες.

Η ραδιενεργός θυμιδίνη ενσωματώνεται στις προμαστιγωτές και αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου<sup>21</sup>. Με τα αποτελέσματά μας διαπιστώνεται η αύξηση της ενσωμάτωσης της ραδιενεργού θυμιδίνης στην TCA-διαλυτή φάση, με συνέπεια η αναστολή της ενσωμάτωσης της θυμιδίνης να οφείλεται μόνο στην παρουσία της σινεφουνγίνης.

Η σύνθεση του DNA των ανθεκτικών στελεχών δεν επηρεάστηκε ακόμα και όταν οι χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις της σινεφουνγίνης για έξι ώρες ήταν η λείσμανιοκτόνος 26  $\mu\text{M}$ <sup>8</sup> και η πενταπλάσια και δεκαπλάσια αυτής. Αντίθετα, κάτω από τις ίδιες συνθήκες η αναστολή

της σύνθεσης του DNA του ευαίσθητου στελέχους *L. tropica* ήταν ανάλογη της συγκέντρωσης της σινεφουνγίνης, παρουσιάζοντας 53% αναστολή στη συγκέντρωση 26  $\mu\text{M}$ , 67% στη συγκέντρωση 130  $\mu\text{M}$  και 74% στη συγκέντρωση 260  $\mu\text{M}$ .

Η σινεφουνγίνη δεν επηρέασε τη σύνθεση του RNA και των πρωτεϊνών του πρωτοζώου. Μικρή αναστολή παρατηρήθηκε στη σύνθεση των πρωτεϊνών του ευαίσθητου στελέχους *L. tropica*.

Η αναστολή της σύνθεσης του DNA του ευαίσθητου στελέχους *L. tropica* από τη σινεφουνγίνη με χρόνο δράσης μικρότερο του χρόνου διπλασιασμού του πρωτόζωου<sup>8</sup> θεωρούμε πως επιτυγχάνεται από το ότι η νουκλεοσίδη αυτή παρεμβαίνει στη διαδικασία ανατύπωσης του DNA (DNA replication).

Τα αποτελέσματά μας δηλώνουν, ότι η δράση της σινεφουνγίνης στις βιοσυνθετικές λειτουργίες της λείσμανιας είναι ανεξάρτητη του είδους του πρωτοζώου και συμβαδίζει με την έκφραση της ευαισθησίας ή της ανθεκτικότητας του στελέχους έναντι του αντιβιοτικού.

Μελέτες αναφέρουν, ότι η σινεφουνγίνη έχει εκλεκτική δράση στο πρωτόζωο και όχι στα μακροφάγα κύτταρα του αμυντικού μηχανισμού, εφόσον η σύνθεση του DNA τους δεν επηρεάστηκε σε συγκεντρώσεις δεκαπλάσιες έως εκατονταπλάσιες από εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν για τα πρωτόζωα<sup>3,22</sup>. Η μη επίδραση της σινεφουνγίνης στα μακροφάγα κύτταρα δεν οφειλόταν στην ελλιπή πρόσληψη του φαρμάκου από τα κύτταρα όπου, ως γνωστόν, η σινεφουνγίνη εισέρχεται και αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των αμαστιγωτών μορφών<sup>3</sup>. Η διαφορετική συμπεριφορά της στις προμαστιγωτές μορφές και στα μακροφάγα αποδίδεται στην πολυμεράση του DNA. Η DNA πολυμεράση θα μπορούσε να αποτελέσει στόχο της σινεφουνγίνης κατά της λείσμανιας, εφόσον το ευκαρυωτικό αυτό ένζυμο αντιγραφής στις τρυπανοσωμίδες είναι βιοχημικά και ανοσολογικά διαφορετικό από το αντίστοιχο των κυττάρων των θηλαστικών<sup>23</sup>.

Τα συμπεράσματα της έρευνας αυτής συνοψίζονται στα εξής: (α) Η δράση της σινεφουνγίνης στις βιοσυνθετικές λειτουργίες του πρωτοζώου είναι ανεξάρτητη του είδους και συνδέεται με την έκφραση της ευαισθησίας ή ανθεκτικότητας του στελέχους. (β) Η σινεφουνγίνη παρεμβαίνει ουσιαστικά στη σύνθεση του DNA των πρωτοζώων, που έχουν υψηλό βαθμό ευαισθησίας έναντι αυτής.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Hamill R, Hoehn M. A9145, a new adenine containing antifugal antibiotic. I. Discovery and isolation. *J Antibiot* 1973,26:463 - 465
2. Gordee RS, Butler TF. A9145, a new adenine containing antifugal antibiotic. II. Biological activity. *J Antibiot* 1973,26:466 - 470
3. Bachrach V, Schnur LF, El-On J, Greenblatt CL, Pearlman

- M, Robert-Gero M, Lederer E. Inhibitory activity of sinefungin and SIBA on the growth of promastigotes and amastigotes. *FEBS Lett* 1980,121:287 - 291
4. Fuller RW, Nagarajan R. Inhibition of methyltransferases by some new analogs of S-adenosylhomocysteine. *Biochem Pharmacol* 1978,27:1981 - 1983
  5. Vedel M, Lawrence F, Robert-Gero M, Lederer E. The antifungal antibiotic sinefungin as a very active inhibitor of methyltransferases and of the transformation of chick embryo fibroblasts by Rous Sarcoma Virus. *Res Commun* 1978,85:371 - 376
  6. Borchardt RT, Eideo LE, Wu 8, Rutledge CO. Sinefungin a potent inhibitor of SAM-protein-0-methyltransferases. *Biochem Biophys Res Commun* 1979,89:919 - 924
  7. Paolantonacci P, Lawrence F, Robert-Gero M. Differential effect of sinefungin and its analogs on the multiplication of three leishmania species. [Antimicrob Agents Chemother](#) 1985,28:528 - 531
  8. Τζώρα-Σκούφου Α. Μελέτη του μηχανισμού δράσης του αντιβιοτικού σινεφονγίνης στις προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου λείσμανία. Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης 1992.
  9. Tzora-Skoufou A, Lawrence F, Robert-Gero M, Hadziandoniou M. Recherche de résistants spontanés à la sinefungine dans les souches de leishmanies provenant de Grèce. *Bulletin de la Société de Parasitologie* 1990,8:1:19 - 24
  10. Tzarnouranis N, Schnur LF, Gerifellou 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
  11. Frank C. Serologische Klassifizierung und biochemische Identifizierung von in Griechenland isolierten Leishmania-Stämmen (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Dissertation-Universität Tubingen, 1991
  12. Paolantonacci P, Lawrence F, Nolan LL, Robert Gero M. Inhibition of leishmanial DNA synthesis by sinefungin. *Biochem Pharmacol* 1987,36:2813 - 2820
  13. Χαντζηαντωνίου Μ. Μαζική καλλιέργεια της προμαστιγωτής μορφής του παρασίτου λείσμανία-Παρασκευή νέου μονοφασικού υλικού. Διδακτορική διατριβή. Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών 1984.
  14. Τσιρογιάννης Ε, Τσαγγάρης Θ. Ο κυτταρικός κύκλος και οι διαταραχές του. Γενική Παθολογική Ανατομική. Αφοί Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη 1982, 47-49.
  15. Glew RH, Saha AK, Das S, Remaley AT. Biochemistry of the leishmania species. *Microbiological Reviews* 1988,412 - 432
  16. Schneider WC. Phosphorous compounds in animal tissues: extraction and estimation of deoxyribose nucleic acid and pentose nucleic acid. *J Biol Chem* 1945,161:293 - 303
  17. Lowry QH, Rosebrough NL, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. [J Biol Chem](#) 1951,193:265 - 275
  18. Tabachnick 8, Fidll L. Using multivariate Statistics. Harper and Row 1983, New York
  19. Armitage P. Statistical Methods in Medical Research. Blackwell Scientific Publications 1973, Oxford
  20. McCammon MT, Parks W. Inhibition of sterol transmethylation by S-adenosyl-homocysteine analogs. *J Bacter* 1981,145:106 - 112
  21. Brun R, Krassner MS. Quantitative Ultrastructural Investigations of mitochondrial development in leishmania donovani during transformation. *J Protozool* 1976,23:493 - 497
  22. Neal RA, Croff SL. An in vitro system for determining the activity of compounds against the intracellular amastigote form of *Leishmania donovani*. [J Antimicrob Chemother](#) 1984,14:463 - 475
  23. Holmes AM, Cheriathindam E, Kalinski A, Chang LMS. Isolation and Partial Characterization of DNA polymerase from *Crithidia fasciculata*. *Mol Biochem Parasitol* 1984,239:21-29