ePublishing

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

doi: 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.

To cite this article:

TZORA (A. ΤΖΩΡΑ) 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

https://epublishing.ekt.gr | **e-Publisher:** EKT | **Downloaded at:** 20/07/2025 04:12:08

ΔΕΛΤΙΟΝ ΕΛΛ. ΚΤΗΝ. ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 1998, 49(2): 137-142

Η δράση της Σινεφουνγίνης στη βιοσύνθεση των μεγαλομορίων του πρωτοζώου Λεϊσμάνια

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Χρησιμοποιήθηκαν τρία στελέχη του πρωτοζώου λεϊσμάνια, 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 ραδιοσεσημασμένων ουσιών που ήταν η τριτιωμένη θυμιδίνη, η ουριδίνη και η λευκίνη. Τα μεγαλομόρια του παρασίτου που είχαν σημανθεί 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 κρούσεις ανά λεπτό (*cpm*). Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών των παρασίτων καθορίστηκε με τη μέθοδο *Lowry*. Η ενσωμάτωση των ραδιενεργών στοιχείων στα μεγαλομόρια εκφράζεται σε cmp/mg πρωτεϊνών του πρωτοζώου. Παρατηρήθηκε σημαντικού βαθμού αναστολή της ενσωμάτωσης της θυμιδίνης που ήταν ανάλογη της συγκέντρωσης της σινεφουνγίνης και του χρόνου έκθεσης των καλλιεργειών 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 λεϊσμανιοστατικής και υποδεκαπλάσια της λεϊσμανιοκτόνου) στο ευαίσθητο στέλεχος *L. tropica* κυμάνθηκε από 25% έως 64% σε χρόνους δράσης της μιας 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 λεϊσμανιοκτόνος 26 μM και πολλαπλάσιες αυτής. Η δράση του αντιβιοτικού σινεφουνγίνη στις βιοσυνθετικές λειτουργίες του πρωτοζώου λεϊσμάνια 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.

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

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

Ημερομηνία υποβολής: 10.09.97
Ημερομηνία εγκρίσεως: 03.12.97

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 *Leismannia 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 syntesis 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.**

Λέξεις ευρετηρίασης: Σινεφουνγίνη, λεϊσμάνια, μεγαλομόρια.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η σινεφουνγίνη είναι μια φυσική νουκλεοσίδη, που απομονώθηκε από καλλιέργειες του *Streptomyces incarnatus* και *S. griseolus*, με αντιμυκητικές και αντιπαρασιτικές ιδιότητες *in vitro* και *in vivo*[1,2,3].

Αποκαλύφθηκε ότι το μόριο της σινεφουνγίνης ήταν ανάλογο των μορίων της S-αδενοσυλομεθειονίνης (SAM) και της S-αδενοσυλομοκυστεΐνης (SAH), υποστρώματος και αναστολέα των μεθυλοτρανσφερασών αντίστοιχα[4]. Η αναλογία δομής κατέστησε τις μεθυλοτρανσφεράσες πιθανό δυναμικό στόχο της σινεφουνγίνης. Πράγματι αποδείχτηκε ισχυρή η ανασταλτική δράση της σινεφουγίνης για τα ένζυμα αυτά σε διάφορα ευκαρυωτικά κύτταρα[5,6]. Σε αντίθεση με ό,τι αναμενόταν, η σινεφουνγίνη επέδειξε ελάχιστη ανασταλτική δράση για τις πρωτεϊνικές μεθυλοτρανσφεράσες I και III του παρασίτου λεϊσμάνια *in vitro* και *in vivo*[7,8].

Δεδομένης της ανασταλτικής δράσης της σινεφουνγίνης στην ανάπτυξη των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου λεϊσμάνια[9],διερευνήσαμε το αποτέλεσμα του αντιβιοτικού σε άλλα κυτταρικά επίπεδα. Σκοπός της εργασίας ήταν να επισημανθούν οι πιθανοί στόχοι της σινεφουνγίνης στο πρωτόζωο λεϊσμάνια 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 Παστέρ[10,11]. Ένα στέλεχος ευαίσθητο στη σινεφουνγίνη του είδους *L. tropica* (MHOM/Gr/81/LA35) και δύο στελέχη φυσικώς ανθεκτικά στη σινεφουνγίνη των ειδών *L. tropica* (MHOM/GR/81/LA27) και *L. infantum* (MHOM/Gr/ 78/ LA4)[9].

Οι προμαστιγωτές μορφές καλλιεργούνταν και αναπτύσσονταν σε υγρό 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-αιθανοσουλφονικό οξύ, Seromed), 5 μg ml^{-1} στρεπτομυκίνης, 5 μg ml^{-1} καναμυκίνης, 5 Ul ml^{-1} πενικιλλίνης και 10% ορού εμβρύου μόσχων (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 ενοφθαλμίζονταν ήταν καθορισμένος για κάθε στέλεχος, έτσι ώστε ο αριθμός των πρωτοζώων στο καλλιεργητικό υλικό μετά από 24 ώρες να ήταν τουλάχιστον 25 x10^6[12]. Η επώαση των καλλιεργειών των προμαστιγωτών μορφών γινόταν στους 25°C και η εκτίμηση του αριθμού των ζωντανών προμαστιγωτών γινόταν σε αιμοκυτταρόμετρο τύπου Mallassez[13].

Η προμήθεια της σινεφουνγίνης έγινε σε λυοφιλοποιημένη μορφή από το Institute de Chimie des Substances Naturelles του Centre National de la Recherche 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.

Ραδιοσεσημασμένες ουσίες: Η χρήση των ραδιοσεσημασμένων 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[14].

Η χρησιμοποίηση της θυμιδίνης από τα πρωτόζωα του γένους *Leishmania* διενεργείται από αντιδράσεις περίσωσης, κατά τις οποίες τα κύτταρα κάνουν χρήση εξωγενώς χρησιμοποιούμενης θυμιδίνης[15].

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

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

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

- Η σεσημασμένη με ραδιενεργό τρίτιο λευκίνη L-[4,5-3H] Leucine, με ειδική δραστικότητα 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.[12]

Για κάθε στέλεχος και για κάθε ραδιοσεσημασμένη ουσία χρησιμοποιούνταν δέκα φιαλίδια. Είκοσι τέσσερις ώρες μετά τον ενδοφθαλμισό των πρωτοζώων και αφού μετριόταν ο αριθμός τους στα δέκα φιαλίδια, προσθετόταν σινεφουνγίνη στα πέντε σε τελική συγκέντρωση 2,6 μM (1 μg/ml) (50 ml διαλύματος σινεφουνγίνης). Οι καλλιέργειες επωάζονταν 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 ραδιοσεσημασμένες ουσίες σε συγκέντρωση 5,4 μci/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 μM) στην ενσωμάτωση προδρόμων 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	**Τ**	**%Ε**	**%Ε**	**%Ε**	**%Ε**	**%Ε**	**%Ε**
	1	125	99	141	79	120	90
Θ	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
	1	95	107	90	126	102	89
Ο	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
	1	116	105	122	89	101	94
Λ	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,* ***Λ:*** *λευκίνη,* ***Τ:*** *Χρόνος επώασης σε ώρες*
%Ε: *% ποσοστιαία ενσωμάτωση πρόδρομης ουσίας σε καλλιέργεια με σινεφουνγίνη (συγκέντρωση 2,6 μM) 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[16]. 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 (FIOLLE) 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.[17]

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 μM (10 μg/ml), 130 μM (50 μg/ml) και 260 μM (100 μg/ml). Η πειραματική διαδικασία ήταν ανάλογη της προηγούμενης.

Στατιστική ανάλυση. Στατιστική ανάλυση και σύγκριση των αποτελεσμάτων ενσωμάτωσης κάθε ραδιοσεσημασμένης ουσίας στην TCA-αδιάλυτη φάση κάθε στελέχους έγινε με τη μέθοδο της ανάλυσης της διακύμανσης[18].

Για τη σύγκριση του ποσοστού ενσωμάτωσης προδρόμων ουσιών μεγαλομορίων προμαστιγωτών μορφών με διάφορες συγκεντρώσεις σινεφουνγίνης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Student's t-test[19].

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

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

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

Πίνακας 2. Επίδραση της σινεφουνγίνης στην ενσωμάτωση προδρόμων ουσιών μεγαλομορίων προμαστιγωτών μορφών μετά την επώασή τους επί έξι ώρες, 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	**C**	**%E**	**%E**	**%E**	**%E**	**%E**	**%E**
	0	100	100	100	100	100	100
Θ	26	116	102^{α}	124	47^{ε}	115	133^{ε}
	130	117	100^{α}	120	33^{ε}	130	127^{ε}
	260	115	110^{δ}	108	26^{ε}	120	122^{ε}
	0	100	100	100	100	100	100
Ο	26	120	110^{ε}	140	103^{α}	115	110^{δ}
	130	114	113^{α}	130	100^{α}	108	115^{ε}
	260	118	120^{ε}	115	104^{α}	120	106^{γ}
	0	100	100	100	100	100	100
Λ	26	114	108^{ε}	110	82^{ε}	102	100^{α}
	130	117	113^{ε}	115	84^{ε}	90	104^{α}
	260	116	86^{ε}	96	78^{ε}	98	101^{α}

Υπόμνημα: Π.Ο.: *πρόδρομη ουσία,* ***Θ:*** *Θυμιδίνη,* ***Ο:*** *ουριδίνη,* ***Λ:*** *λευκίνη,* ***C:*** *συγκέντρωση σινεφουνγίνης (μM)*
%E: *% ποσοστιαία ενσωμάτωση πρόδρομης ουσίας σε καλλιέργεια με σινεφουνγίνη (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 ραδιοσεσημασμένες 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 σινεφουνγίνης (συγκέντρωση 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 σινεφουνγίνης και σε όλους τους εξετασθέντες χρόνους επώασης σε σχέση με αυτή των μαρτύρων.

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

Η παρουσία της σινεφουνγίνης (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 σινεφουνγίνης στους εξετασθέντες χρόνους προσθήκης της στις καλλιέργειες του πρωτοζώου (πίνακας 1).

Η μελέτη της δράσης της σινεφουνγίνης στο πρωτόζωο λεϊσμάνια επιτελέστηκε με κοινό χρόνο έκθεσης των καλλιεργειών στη σινεφουνγίνη 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 σινεφουνγίνης ήταν η λεϊσμανιοκτόνος 26 μM, η πενταπλάσια και η δεκαπλάσια αυτής.

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

Στο ευαίσθητο στέλεχος *L. tropica* παρατηρήθηκε σημαντική αναστολή της ενσωμάτωσης της θυμιδίνης κατά 53% έως 64%. Η ενσωμάτωση της λευκίνης ανεστάλη 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 λεϊσμάνια επιτελείται με αντιδράσεις περίσωσης και όχι με αντιδράσεις της de novo σύνθεσης[15]. 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[20] 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 μM προκάλεσε αναστολή της σύνθεσης του DNA των *L. donovani* και *L. tropica* κατά 91% και 83% αντίστοιχα[12]. Οι ίδιοι ερευνητές υποστήριξαν, ότι η προσθήκη της σινεφουνγίνης σε συγκεντρώσεις 0,026 μM και 0,26 μM 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 τριτιωμένης 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 μM 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[21]. 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 λεϊσμανιοκτόνος 26 μM[8] 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 μM, 67% στη συγκέντρωση 130 μM και 74% στη συγκέντρωση 260 μM.

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[8] 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 λεϊσμάνιας 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[3,22]. 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[3]. 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 λεϊσμάνιας, εφόσον το ευκαρυωτικό αυτό ένζυμο αντιγραφής στις τρυπανοσωμίδες είναι βιοχημικά και ανοσολογικά διαφορετικό από το αντίστοιχο των κυττάρων των θηλαστικών[23].

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.l. 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 antifugal 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-methyltrasferases. Biochem Biophys Res Commun 1979,89:919 - 924
7. Paotantonacci P, Lawrence F, Robert-Gero M. Differential effect of sinefungin and its analogs on the multiplica5on of three leishmania species. Antimicrob Agents Chemother 1985,28:528 - 531
8. Τζώρα-Σκούφου Α. Μελέτη του μηχανισμού δράσης του αντιβιοτικού σινεφουνγίνη στις προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου λεϊσμάνια. Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης 1992.
9. Tzora-Skoufou A, Lawrence F, Robert-Gero M, Hadziandoniou M. Recherche de resistents spontanes a Ia sinefungine dans les souches de leishmanies provenant de Grece. Bulletin de la Societe de Pasitologie 1990,8:1:19 - 24
10. Tzarnouranis N, Schnur LF, Gerifellou A, Pateraki E, Serie C. Leishmanissis in Greece. I .Isolation and identification of the parssite causing human and canine visceral leishmaniasis. Ann Trop Med and Parasite 1984,78:4:363 - 368
11. Frank C. Serologische Klassifizierung und biochemische indentifizierung von in Griecheland isolierten Leishmania-Stammen (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Dissertation-Universitat Tubingen, 1991
12. Paolantonecci P, Lawrence F, Nolan LL, Robert Gero M, lohibition of leishmanial DNA synthesis by sinefungin. Biochem Pharmecol 1987,36:2813 - 2820
13. Χαντζηαντωνίου Μ. Μαζική καλλιέργεια της προμαστιγωτής μορφής του παρασίτου λεϊσμάνια-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 deoxypentose nucleic acid and pentose nudeic acid. J Biol Chem 1945,161:293 - 303
17. Lowry QH, Rosebrough NL, Farr AL, Randall RJ. Protein measurment with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951,193:265 - 275
18. Tabachnick 8, Fidll L. Using multivariate Siatisticks. Harper and Row 1983, New York
19. Armitage P. Statistical Methods in Medical Research. Blackwell Scientific Publications 1973,0xford
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. Quantitave 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, Cheriathyndam E, Kalinski A, Chang LMS. Isolation and Partial Characterization of DNA polymerase from Crithidia fasciculata. Mol Biochem Parasitol 1984,239:21-29