ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

Φαρμακευτικά φυτά στη μελέτη της θεραπευτικής αντιμετώπισης της Λεϊσμανίασης

ΤΡΙΑΝΤΗ ΜΑΡΓΑΡΙΤΑ

ΑΜ: 62115052

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ

Δρ. Βογιατζάκη Χρυσάνθη
Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας|Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Δρ. Καραγκούνη Ευδοκία
Εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας
Τμήμα Μικροβιολογίας
Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Αθήνα, 2020

UNIVERSITY OF WEST ATTICA

FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES

SECTOR OF MEDICAL LABORATORIES

DISSERTATION

PHARMACEUTICAL PLANTS FOR THE TREATMENT OF LEISMANIASIS

TRIANTI MARGARITA

CV: 62115052

SUPERVISORS

Dr Voyiatzaki Chrysanthi
Laboratory of Molecular Microbiology and Immunology
Department of Biomedical Sciences
University of West Attica

Dr Karagouni Evdokia
Laboratory of Cellular Immunology
Department of Microbiology
Hellenic Pasteur Institute

Athens, 2020

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση μίας πειραματικής πτυχιακής εργασίας για μία φοιτήτρια που δεν έχει προηγούμενη παρόμοια εμπειρία αποτελεί μία νέα αν και δύσκολη πρόκληση. Η σελίδα αυτή είναι αφιερωμένη στα άτομα που συνέβαλλαν ποικιλοτρόπως στην πραγματοποίησή της.Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Ελένη και Παναγιώτη και τον αδερφό μου Νίκο για την αγάπη, την αμέριστη υποστήριξη και τη συμπαράστασή τους όλο αυτό το διάστημα. Η συνεχής παρουσίας τους στο πλευρό μου υπήρξε η πολυτιμότερη συμβολή. Η παρούσα εργασία είναι αφιερωμένη σε εκείνους.Ευχαριστώ την υπεύθυνη καθηγήτριά μου Δρ. Χρύσα Βογιατζάκη που μου ανέθεσε το συγκεκριμένο ενδιαφέρον θέμα και έκανε πραγματικότητα την εκπόνηση μίας πειραματικής πτυχιακής εργασίας, στο ΕΙΠ. Εξασφάλισε την προμήθεια και τη μεταφορά των φαμακευτικών ουσιών.Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας Λοιμώξεων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ κατά την περίοδο 2019-2020, υπό την επίβλεψη της Διευθύντριας Ερευνών του εργαστηρίου Δρ. Ευδοκίας Καραγκούνη. Θέλω να την ευχαριστήσω που με δέχθηκε σαν μέλος της ομάδα της δίνοντας την ευκαιρία σε μία προπτυχιακή φοιτήτρια να αποκομίσει την εμπειρία εκπόνησης μίας πειραματικής εργασίας. Για την υποστήριξη και τη βοήθειά της στις δύσκολες συνθήκες. Ευχαριστώ τα μέλη της ομάδας που με δέχτηκαν, απάντησαν στις απορίες μου και φρόντισαν να εγκλιματιστώ. Ευχαριστώ ιδιαιτέρως την Δρ. Αντωνία Ευσταθίου μεταδιδακτορική ερευνήτρια του εργαστηρίου Ανοσολογίας Λοιμώξεων του ΕΙΠ, η οποία ανέλαβε την εκπαίδευση και κατάρτισή μου στις απαραίτητες τεχνικές, βρισκόταν εκεί για τις απορίες μου όλες τις ώρες. Χωρίς την ίδια, την και την καθοδήγησή της δεν θα πραγματοποιούνταν οι παρούσες πειραματικές δοκιμές. Η βοήθεια και η υποστήριξή της υπήρξαν καίριες όλο αυτό το διάστημα. Ιδιαίτερες ευχαριστίες στο θείο μου Δρ. Τριαντάφυλλο Λιλόγλου, λέκτορα στο Πανεπιστήμιο του Λίβερπουλ, για τη βοήθεια και τη συμβολή του σχετικά με τη μεθοδολογία συγγραφής. Η συμβολή του και η ψυχολογική υποστήριξή του ήταν καίριας σημασίας. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τις υπεύθυνες αποστείρωσης κ. Μυρσίνη Ακσαραφλού και Μαρία Κανδρή για τη συμβολή και τη βοήθειά τους στην αποστείρωση των μπουκαλιών των δυναμοποιημένων ουσιών. Ευχαριστώ τον φαρμακοποιό κ. Μάρκο Φυλιάνο για την ευγενική χορηγία της ουσίας Antimoniate Sulphate (Sb_2S_3), για την επεξήγηση και επίδειξη των ομοιοπαθητικών μεθόδων. Θα ήθελα να ευχαριστήσωτην Ομάδα της Κορρές για την επιστημονική συνεργασία και αρωγή στην παρασκευή των δυναμοποιημένων υγρών και στερεών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν και ιδιαίτερα τον κο Δημητρίου Σταύρο για την παρασκευή του συνόλου των δυναμοποιημένων ομοιοπαθητικών διαλυμάτων και λειοτριβήσεων, την κα Πανταζή Σταυρούλα, τον κο Κορρέ Αποστόλη για την συναίνεση και ενθάρρυνση στην όλη συνεργασία, καθώς και το προσωπικό του Naxos Apothecary για την συνεργασία τους στην παρασκευή των τελικών δυναμοποιημένων ομοιοπαθητικών διαλυμάτων. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τη φίλη και συνάδελφό μου Ελένη- Μαρία Δουλφή για τις συμβουλές και τη βοήθεια της στη συγγραφή της εργασίας.

Aut inveniam viam aut faciam"

" Είτε θα βρω δρόμο, ή θα ανοίξω δικό μου''

Αννίβας 212 π.Χ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα πρωτόζωα *Leishmania spp.* ανήκουν στην οικογένεια των τρυπανοσωματίδων και είναι υπεύθυνα γα τη λεϊσμανίαση, μία νόσο η οποία εμφανίζεται με ένα ευρύ φάσμα κλινικών συμπτωμάτων. Η λεϊσμανίαση κατατάσσεται στην κατηγορία των ''πιο παραμελημένων νόσων'' (most neglected diseases). Προκαλεί τη μεγαλύτερη επιβάρυνση στη δημόσια υγεία, σημειώνοντας παγκοσμίως 1.5-2 εκατομμύρια νέα κρούσματα το χρόνο. Η νόσος είναι μεγάλης κοινωνικής και οικονομικής σημασίας, λόγω του κοινωνικού στίγματος που τη συνοδεύει , καθώς και της στατιστικής της συσχέτισηςμε τα φτωχότερα στρώματα. Η τρέχουσα θεραπεία της νόσου, πέραν του υψηλού της κόστους, παρουσιάζει τοξικότητα, ενώ έχει παρατηρηθεί ήδη η ανάπτυξη αντοχής των παρασίτων έναντι ορισμένων διαθέσιμων φαρμάκων. Επίσης στον τομέα της πρόληψης παρουσιάζεται έλλειψη ειδικών προστατευτικών εμβολίων.

Στα πλαίσια αναζήτησης νέων θεραπευτικών αγωγών, αναπτύσσονται και δοκιμάζονται νέα φάρμακα. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται και τα τοπικά διαθέσιμα φυτικά σκευάσματα. Οι αντιλεϊσμανιακές ενώσεις που προέρχονται από φυτά έχουν προσελκύσει παγκόσμια προσοχή λόγω του εναλλακτικού μηχανισμού δράσης τους, της χαμηλής τοξικότητας, του χαμηλού κόστους και της εύκολης διαθεσιμότητάς τους.

Στην παρούσα εργασία, επικεντρωθήκαμε στη μελέτη των εναλλακτικών προσεγγίσεων, και πιο συγκεκριμένα με την ομοιοπαθητική μέθοδο, η οποία περιλαμβάνει σκευάσματα φυτικής προέλευσης με ενθαρρυντικά βιβλιογραφικά στοιχεία σχετικά με την αντιπαρασιτική δράση ορισμένων σκευασμάτων. Η μελέτη αφορά τα ομοιοπαθητικά σκευάσματα: *Antimonium crudum, Andrographis paniculata* και *Ferrum arsenicum.* Τα σκευάσματα αυτά αξιολογήθηκαν *in vitro* σε διαφορετικές δυναμοποιήσεις, ως προς την αντιλεϊσμανιακή και την κυτταροτοξικής τους δράση. Στόχος μας ήταν να διαπιστώσουμε εάν θα μπορούσαν να αποτελέσουν, υπό συγκεκριμένες προϋποθέσεις, μία πιθανή εναλλακτική μορφή που θα ήταν απαλλαγμένη από την τοξικότητα, που αποτελεί μέιζον μειονέκτημα των χημειοθεραπευτικών που εφαρμόζονται τώρα.

Τα σκευάσματα στο σύνολό παρουσίασαν ανασταλτική δράση <40 %. Εξαίρεση αποτελούν δύο περιπτώσεις που παρατηρήθηκαν στις ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *L.infantum* ευαίσθητου στην τρέχουσα θεραπεία. Το *Antimonium crudum* στη δυναμοποίηση 12 cH παρουσίασε ανασταλτική δράση ίση με 47.8% και το *Ferrum arsenicum* στη δυναμοποίηση 10 cH παρουσίασε ανασταλτική δράση ίση με 41.8%. Παράλληλα παρατηρήθηκε απουσία κυτταροτοξικής δράσης σε όλες τις υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις. Τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, παρέχοντάς μας τη δυνατότητα να στραφούμεμε αισιοδοξία σε μελλοντικές διερευνήσεις. Οι περαιτέρω μελέτες μπορούν να παράσχουν πληροφορίες σχετικά με τον προσδιορισμό περισσότερων παραμέτρων και να συμπεριλάβουν ένα ευρύ φάσμα ομοιοπαθητικών ουσιών, οι οποίες σε συγκεκριμένες δυναμοποιήσεις θα μπορούσαν να επιτύχουν την αναστολή του παρασίτου της *Leishmania.*

ABSTRACT

Protozoan of the genus *Leishmania spp.* are trypanosomatid parasites that cause a desease called leishmaniasis that appears a wide spectrum of clinical symptoms. Leishmaniasis is classified in the category of the “most neglected diseases”. Leishmaniasis imposes a massive burden to public health, noting globally 1.5-2 million new cases annually. The disease reflects a great social and economical impact, because of the social stigma and the statistical correlation with poorer population.The current treatment of the disease, besides high cost, presents toxicity, whilst certain available drugs parasite resistance has already been observed. Also, at prevention sector appears lack of vaccines

In order to discover new treatments, scientists develop and test new drugs. This includes locally available herbal components. The antileishmanial compounds thar are extracted from plants have attracted global attention, because of their alternative mechanism of action, low toxicity, low cost and their availability.

In the current study we focused on the study of alternative approaches specifically with the homeopathic method that includes herbal remedies with encouraging references related to the antiparasitic action of certain remedies. The study refers to homeopathic remedies: *Antimonium crudum, Andrographis paniculata* και *Ferrum arsenicum.* These remedies were evaluated *in vitro* in different succussions in terms of their antileishmanial action and cytotoxicity. The purpose was to ascertain if they could under certain circumstances stand as alternative form that would be eliminated from toxicity which is a major disadvantage of the current chemotherapeutic treatment.

The remedies in their total presented inhibitory action <40%. Two cases from the αρνητικός μάρτυρας of the intracellular amastigote forms of the *L.infantum sensitive* to the current treatment were the exceptions. *Antimonium crudum* in 12 cH succussion presented inhibitory action equal to 47.8% and *Ferrum arsenicum* in 10 cH succussion presented inhibitory action equal to 41.8%. Also an absence of cytotoxicity was observed in the total of the tested succussions. The results are agreeable to previous studies providing the potential to turn with optimism into future research. Further studies including more parameters and can provide more information.Also, whether a wider spectrum of different homeopathic remedies under specific succussions could succeed the inhibition of the *Leishmania* parasite.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 4
ABSTRACT 5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 11
1.1 Κατάταξη του παρασίτου *Leishmania spp.* 11
1.2 Ιστορικά Στοιχεία 11
1.3 Μετάδοση 12
1.4 Μολυσματικοί παράγοντες του παρασίτου 12
1.5 Γενετική του παρασίτου-Γονιδίωμα και Γονιδιακή Οργάνωση 13
1.6 Μορφολογία 13
1.7 Κύκλος ζωής του παρασίτου 14
1.7.1 Στάδια στον ασπόνδυλο ξενιστή 14
1.7.2 Στάδια στον σπονδυλωτό ξενιστή 14
1.8 Αλληλεπίδραση παρασίτου και θηλαστικού-ξενιστή 15
1.8.1. Κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος 15
1.8.2 Μικροβιοκτόνα μόρια 16
1.8.3 Κυτταροκίνες 16
1.9 Μηχανισμοί δράσης του παρασίτου 17
1.9.1 Είσοδος στα Μονοκύτταρα/Μακροφάγα 17
1.9.2 Επιβίωση εντός των μακροφάγων 17
1.9.3 Μηχανισμοί έναντι του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή 18
1.10 Διαβιβαστές-Ξενιστές 19
1.10.1 Ενδιάμεσοι Ξενιστές-Διαβιβαστές 19
1.10.2 Τελικοί Ξενιστές 20
1.11 Λεϊσμανίαση 20
1.11.1 Κλινικές μορφές λεϊσμανίασης 21
1.11.1.1 Δερματική Λεϊσμανίαση (Cutaneous Leishmaniasis, CL) 21
1.11.1.2 Σπλαχνική Λεϊσμανίαση (Visceral *Leishmania*sis, VL) 21
1.11.1.3 Βλεννογονοδερματική Λεϊσμανίαση (MCL) 23

1.11.1.4 Ασυμπτωματικός παρασιτισμός 23
1.11.2 Λεϊσμανίαση και Ανοσοκαταστολή 24
1.12 Επιδημιολογία της λεϊσμανίασης 24
1.12.1 Λεϊσμανίαση στην Ελλάδα 25
1.13 Παράγοντες Κινδύνου Εξάπλωσης της Νόσου 25
1.13.1 Κλιματικές αλλαγές 25
1.13.1 Περιβαλλοντικοί Παράγοντες 25
1.13.2 Ανθρωπογενείς Παράγοντες 26
1.14 Διάγνωση 27
1.15 Θεραπευτική αντιμετώπιση 29
1.16 Εμπόδια στην εφαρμογή της αγωγής 31
1.16.2 Ανάπτυξη Αντοχής 31
1.17 Εμβόλιο 32
1.18 Άλλες στρατηγικές αντιμετώπισης 32
1.18.1 Έλεγχος Διαβιβαστών 32
1.19 Εναλλακτικές μορφές Θεραπείας της Λεϊσμανίασης 33
1.19.1 Τα φυτά ως παράγοντες αντιμετώπισης του παρασίτου *Leishmania spp.* 35
1.20 Ομοιοπαθητική θεραπευτική Μέθοδος 35
1.20.1 Ομοιοπαθητικά Σκευάσματα 37
1.20.2 Ορισμός της ομοιοπαθητικής 37
1.20.3 Ιστορική αναδρομή της ομοιοπαθητικής 38
1.20.5 Μέθοδοι παρασκευής των ομοιοπαθητικών σκευασμάτων 39
1.20.5.1 Ομοιοπαθητικές Φαρμακοποιίες 39
1.20.5.2 Παρασκευή ομοιοπαθητικών σκευασμάτων 40
1.20.6 Δράση των ομοιοπαθητικών σκευασμάτων 40
1.20.6.1 Θεωρίες δράσης των σκευασμάτων της ομοιοπαθητικής 40
1.20.7 Εφαρμογές των Ομοιοπαθητικών Σκευασμάτων 41
1.20.7.1 Ομοιοπαθητικά στην Ανοσολογία 42
1.20.7.2 Διερεύνηση της χρησιμοποίησης ομοιοπαθητικών σκευασμάτων στη θεραπεία Παρασιτικών Νοσημάτων 43
1.20.7.2.1 Διερεύνηση της χρησιμοποίησης ομοιοπαθητικών σκευασμάτων στη τοξοπλάσμωση 43
1.20.7.2.2 Διερεύνηση της χρησιμοποίησης ομοιοπαθητικών σκευασμάτων στην τρυπανοσωμίαση 43

1.20.7.2.3 Διερεύνηση της χρησιμοποίησης ομοιοπαθητικών σκευασμάτων στην λεϊσμανίαση 44
1.21 Ομοιοπαθητικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη 44
1.21.1 *Andrographis paniculata* 44
1.21.1.1 Αντιπαρασιτική Δράση 45
1.22 *Antimonium crudum* (Sb_2S_3) 46
1.23 *Ferrum arsenicum* 47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΣΚΟΠΟΣ 48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 49
ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ 49
3.1 Υλικά 49
3.1.1 Αντιδραστήρια 49
3.1.2 Αναλώσιμα υλικά 49
3.1.3 Εργαστηριακός εξοπλισμός 49
3.1.4 Διαλύματα 50
3.1.5 Παρασιτικό στέλεχος– Κυτταρική σειρά μακροφάγων 50
3.1.6 Ομοιοπαθητικά σκευάσματα 50
3.1.6.1 Παρασκευή διαλυτοποιήσεων ομοιοπαθητικών φαρμάκων-Πρώτη πειραματική δοκιμή 51
3.1.6.2 Παρασκευή διαλυτοποιήσεων ομοιοπαθητικών φαρμάκων-Δεύτερη πειραματική δοκιμή 51
3.1.7 Αμφοτερικίνη Β 52
3.2 Μέθοδοι 53
3.2.1 Κυτταροκαλλιέργειες 53
3.2.1.1 Παράσιτα *Leishmania* 53
3.2.1.2 Μακροφάγα J774.1 53
3.3 Έλεγχος *in vitro* κυτταρικής επιβίωσης/πολλαπλασιασμού. 53
3.3.1 Εφαρμογή της μεθόδου Alamar blue 53
3.3.1.1 Εφαρμογή της μεθόδου *Alamar blue* σε προμαστιγωτά παράσιτα *Leishmania* 54
3.3.1.2 Εφαρμογή της μεθόδου Alamar blue σε μακροφάγα J774.1 55
3.3.1.3 Εφαρμογή της μεθόδου Alamar blue σε ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές ... 55
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 57
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 57
4.1 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας των ομοιοπαθητικών ουσιών σε μακροφάγα J774.1 57

***4.1.1* Δράση του *Antimonium crudum I* (*AC I*)** 57

4.1.2 Δράση του *Antimonium crudum II* (AC II) 58

4.1.3 Δράση του *Ferrum arsenicum* (FA) 59

4.1.4 Δράση του *Andrographis paniculata* (AP) 60

4.2 Προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *Leishmania* 61

4.2.1 Δράση των ομοιοπαθητικών ουσιών έναντι των ανθεκτικών προμαστιγωτών μορφών *L. infantum* 61

4.2.1.1 Δράση του *Antimonium crudum I* (AC I) 61

4.2.1.2 Δράση του *Antimonium crudum II* (AC II) 62

4.1.1.3 Δράση του *Ferrum arsenicum* (FA) 64

4.1.1.4 Δράση του *Andrographis paniculata* (AP) 65

4.2.2 Δράση των ομοιοπαθητικών ουσιών έναντι των ευαίσθητων προμαστιγωτών μορφών *L. infantum* 67

4.2.2.1 Δράση του *Antimonium crudum I* (*AC I*) 67

4.2.2.2 Δράση του *Antimonium crudum II* (AC II) 68

***Antimonium crudum II* (AC II)** 69

4.2.2.3 Δράση του *Ferrum arsenicum* (FA) 69

4.2.2.4 Δράση του *Andrographis paniculata* (AP) 70

4.2.3.1 Δράση του *Antimonium crudum I* (*AC I*) 72

4.2.3.2 Δράση του *Antimonium crudum II* (AC II) 73

4.2.3.3 Δράση του *Ferrum arsenicum* (FA) 74

4.2.3.4 Δράση του *Andrographis paniculata* (AP) 74

4.2.4.1 Δράση του *Antimonium crudum I* (*AC I*) 76

4.2.4.2 Δράση του *Antimonium crudum II* (AC II) 77

4.2.4.3 Δράση του *Ferrum arsenicum* (FA) 78

4.2.4.4 Δράση του *Andrographis paniculata* (AP) 79

4.3 Ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *Leishmania* 81

4.3.1 Δράση των ομοιοπαθητικών ουσιών έναντι των ανθεκτικών ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. infantum* 81

4.3.1.1 Δράση του *Antimonium crudum I*(*AC I*) 81

4.3.1.2 Δράση του *Antimonium crudum II* (AC II) 82

4.3.1.3 Δράση του *Ferrum arsenicum* (FA) 83

4.3.1.4 Δράση του *Andrographis paniculata* (AP) 84

4.3.2 Δράση των ομοιοπαθητικών ουσιών έναντι των ευαίσθητων ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. infantum* 85

4.3.2.1 Δράση του *Antimonium crudum I* (*AC II*) 85
4.3.2.2 Δράση του *Antimonium crudum II* (AC II) 86
4.3.2.3 Δράση του *Ferrum arsenicum* (FA) 87
4.3.2.4 Δράση του *Andrographis paniculata* (AP) 88
4.3.3 Δράση των ομοιοπαθητικών ουσιών έναντι των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. amazonensis* 90
4.3.3.1 Δράση του *Antimonium crudum I* (*AC I*) 90
4.3.3.2 Δράση του *Antimonium crudum II (AC II)* 91
4.3.3.3 Δράση του *Ferrum arsenicum* (FA) 92
4.3.3.4 Δράση του *Andrographis paniculata* (AP) 93
4.3.4.1 Δράση του *Antimonium crudum I (AC I)* 94
4.3.4.2 Δράση του *Antimonium crudum II* (AC II) 95
4.3.4.3 Δράση του *Ferrum arsenicum* (FA) 96
4.3.4.4 Δράση του *Andrographis paniculata* (AP) 97
4.4 Αμφοτερικίνη Β 99
4.4.1 Προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *Leishmania* 99
4.4.2 Ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *Leishmania* 102
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 106
ΣΥΖΗΤΗΣΗ 106
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ 111
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 112
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 112

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 Κατάταξη του παρασίτου *Leishmania spp.*

Η *Leishmania* αποτελεί ένα ενδοκυτταρικό πρωτόζωο και μεταδίδεται μέσω του δήγματος της θηλυκής φλεβοτόμου (κοινώς σκνίπα). Το γένος *Leishmania* ανήκει στην τάξη των κινητοπλαστοειδών *(Kinetoplastida)* και στην εξελικτικά αρχέγονη οικογένεια των τρυπανοσωματίδων *(Trypanosomatidae)* (Choi and El-Sayed, 2012, Almeida and Araujo, 2013).

Τα παράσιτα κατηγοριοποιούνται σε δύο υπογένη (subgenera: *Leishmania* και *Viannia*) με βάση τον εντοπισμό τους στο έντερο του ασπόνδυλου ξενιστή. Τα είδη του υπογένους *Leishmania* αναπτύσσονται στο πρόσθιο τμήμα του εντέρου ενώ τα είδη του υπογένους *Viannia* στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου του ασπόνδυλου ξενιστή (Lukes et al., 2007). Το υπογένος *Leishmania* περιλαμβάνει: Το σύμπλεγμα της *L. donovani* με δύο κύρια είδη *(L. donovani και L. infantum)* και τα συμπλέγματα των *L. mexicana, L. tropica, L. major και L. aethiopica*. Συνολικά, το γένος *Leishmania* περιλαμβάνει 30 περίπου είδη από τα οποία περίπου τα 20 είναι ικανά να μολύνουν τον άνθρωπο. Τα διαφορετικά είδη που συμπεριλαμβάνονται στο γένος *Leishmania*, παρότι είναι μορφολογικά όμοια, εμφανίζουν διαφορές κατά την ανάλυση των ισοενζύμων τους και ευθύνονται για τις διαφορετικές μορφές της κλινικής εικόνας της μόλυνσης από το παράσιτο, η οποία καλείται λεϊσμανίαση. Κάθε είδος μπορεί να αποτελείται από έναν αριθμό διαφορετικών «ζυμοδεμάτων» καθένα από τα οποία χαρακτηρίζεται από ένα μοναδικό σύνολο ισοενζύμων (Hommel, 1999). Η εφαρμογή ολοένα και πιο σύγχρονων μεθόδων μοριακής τεχνικής και γενετικής ανάλυσης έχει σαν αποτέλεσμα τη συνεχή ανανέωση της κατάταξης των ειδών του παρασίτου.

1.2 Ιστορικά Στοιχεία

Βλάβες που υποδηλώνουν δερματική λεϊσμανίαση (CL) έχουν καταγραφεί στην Αίγυπτο ήδη από το 2000 π.Χ. (O.Y. Oumeish, 1999) και στην Ασσύρια από το 650 π.Χ. Αναφορές του 18^{ου} αιώνα που εντοπίζονται στην Κρήτη και την Αλγερία (R.S Bray, 1987), καθώς και στοιχεία τα οποία βρέθηκαν πρόσφατα στις αρχαίες αιγυπτιακές μούμιες από την περίοδο του Μεσαίου Βασιλείου (2050-1650 π.Χ.), υποδηλώνουν την εμφάνιση της σπλαχνικής λεϊσμανίασης (VL) (Zink et al., 2006). Η πρώτη επίσημη αναφορά σπλαχνικής λεϊσμανίασης ήταν το 1824 στο Jessore της Ινδίας (σημερινό Μπανγκλαντές), όπου παρατηρήθηκαν περιστατικά ασθενών οι οποίοι δεν ανταποκρίνονταν στην κινίνη και παρουσίαζαν πυρετό σε συνδυασμό με προοδευτική απίσχναση.

Μέχρι το 1862, η ασθένεια είχε εξαπλωθεί στο Burdwan και αποτελούσε πλέον επιδημία, με το ιατρικό προσωπικό να δίνει την ονομασία «πυρετός Burdwan» ή «καλά-αζαρ». Η πλέον γνωστή ονομασία είναι «καλά-αζαρ» και στα σανσκριτικά μεταφράζεται ως «μαύρος πυρετός». Ο William Leishman (1865-1926) υπήρξε ο πρώτος που παρατήρησε το παράσιτο στο σπλήνα ενός Άγγλου στρατιώτη που είχε πεθάνει από τον πυρετό Dumdum στο Dum-Dum της Ινδίας το 1900. Αγνοώντας την ανακάλυψη του Leishman, ο Charles Donovan (1863–1951), ενώ υπηρετούσε στην Ινδική Ιατρική Υπηρεσία επιβεβαιώνει αυτό που είναι γνωστό ως μικροοργανισμοί *Leishman – Donovan*, δίνοντας την πρώτη περιγραφή της σχέσης μεταξύ του παρασίτου και του καλά-αζαρ. Εν τέλει, ο Ronald Ross (1857-1932) σε δική του έρευνα στην Καλκούτα, συνειδητοποιεί πως το παράσιτο που ανακάλυψε ο

Donovan είναι το ίδιο με αυτό που παρατηρεί ο Leishman. Ο Ross δημιουργεί το γένος *Leishmania* και ονομάζει το παράσιτο *Leishmania donovani* προς τιμήν τους (WHO, 2010).

1.3 Μετάδοση

Η μετάδοση των παρασίτων της *Leishmania* στους σπονδυλωτούς ξενιστές επιτυγχάνεται μέσω της θηλυκής φλεβοτόμου. Το έντομο καθώς διατρέφεται με το αίμα ξενιστή (άνθρωποι, κυνοειδή ,αρουραίοι, άλογα) ο οποίος είναι μολυσμένος με *Leishmania,* προσλαμβάνει στο έντερό του τα παράσιτα. Η σκνίπα 8-20 ημέρες αργότερα έχει την ικανότητα να μολύνει με παράσιτα το επόμενο θηλαστικό που θα τραφεί. Η φλεβοτόμος θα παραμείνει μολυσμένη για ολόκληρη τη ζωή της (μερικές εβδομάδες), κατά τη διάρκεια της οποίας μεταδίδει επιτυχώς το παράσιτο στους σπονδυλωτούς ξενιστές (Sharma et al., 2008). Περιστατικά μετάδοσης έχουν επίσης αναφερθεί κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα, μέσω μετάγγισης αίματος (Kubar et al., 1997), μέσω χρήσης μολυσμένης σύριγγας από τοξικομανείς, κατά την αιμοκάθαρση (Luz et al., 1997), κατά τη μεταμόσχευση οργάνων (Berenguer et al., 1998) και μέσω επαφής με εκκρίσεις μολυσμένων ζώων. Σε μικρό ποσοστό έχει παρατηρηθεί η συγγενής μετάδοση, από τη μητέρα στο έμβρυο μέσω του διαπλακουντιακού φραγμού (Eltoum et al., 1992) καθώς και η μετάδοση μέσω σεξουαλικής επαφής (Symmers, 1960).

1.4 Μολυσματικοί παράγοντες του παρασίτου

Μεταγχρωματικά κοκκία (metachromatic granules): φέρουν επίσης και τις ονομασίες «βολουτίνη» (voloutine) και «κενοτόπια έγκλεισης» (inclusion *vacuole*s). Εκτός από την αποθήκευση και απελευθέρωση Ca^{2+} με σκοπό τη μεταγωγή μηνυμάτων, τα μεταγχρωματικά κοκκία εμπλέκονται στη διατήρηση του pH και τη ρύθμιση της οσμωτικής πίεσης των παρασίτων (Vannier-Santos et al., 1999).

Μόρια επιφάνειας παρασίτου:

gp63 (glycoprotein leishmanolysin-major *surface* protease, 63 kDa): είναι μία γλυκοπρωτεΐνη με δράση πρωτεάσης. Η gp63 συμβάλλει στη διευκόλυνση της κίνησης των παρασίτων κάτω από την επιφάνεια του δέρματος μετά τη μόλυνση(McGwire et al., 2003). Η γλυκοπρωτεϊνη αυτή προκαλεί την εισροή ουδετερόφιλων και φλεγμονωδών μονοκυττάρων και εξουδετερώνει διάφορους έμφυτους παράγοντες ανοσοαπόκρισης μέσω άμεσης απενεργοποίησης των υποδοχέων τους (Lieke et al., 2008). Εντοπίζεται στην επιφάνεια των προμαστιγωτών μορφών, ενώ στις αμαστιγωτές μορφές εντοπίζεται στη θήκη του μαστιγίου (Cunningham, 2002).

Μόρια όξινης φωσφατάσης: η δράση τους εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη και τη θήκη του μαστιγίου των προμαστιγωτών μορφών υπό τη μορφή δύο ενζύμων. Τα μόρια αυτά δρουν αναστέλλοντας την παραγωγή του υπεροξειδίου από τα ουδετερόφιλα (Glew et al., 1988).

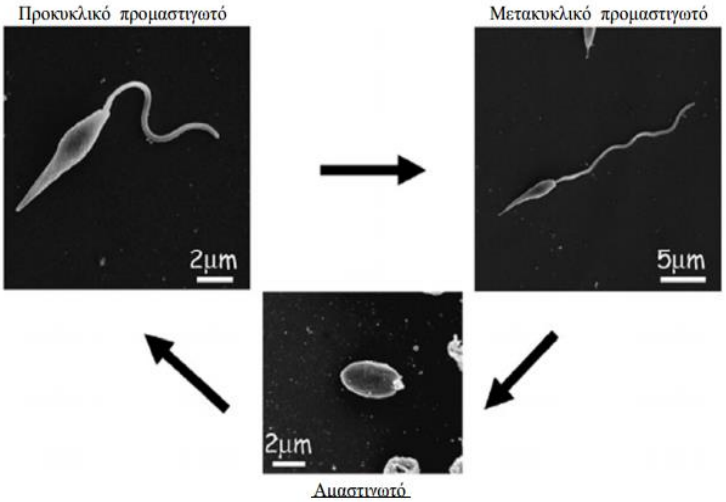
Η λιποφωσφογλυκάνη (LPG): είναι ένα επιφανειακό γλυκολιπίδιο που συμβάλλει στην καθυστέρηση της ωρίμανσης του λεϊσμανιοφόρου φαγοσώματος, μέσω της απενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC)α (Holm et al., 2001) και επηρεάζει το σχηματισμό των παρασιτοφόρων κενοτοπίων (PV), προάγοντας την επιβίωση του παρασίτου (Podinovskaia et al., 2015).

1.5 Γενετική του παρασίτου-Γονιδίωμα και Γονιδιακή Οργάνωση

Το γονιδίωμα του παρασίτου *Leishmania* αποτελείται από δύο τύπους DNA το πυρηνικό και το μιτοχονδριακό, γνωστό και ως κινητοπλαστικό DNA. Στα παράσιτα *Leishmania spp.* και *Trypanosoma spp.,* τα χρωμοσώματα οργανώνονται σε ομάδες/συμπλέγματα γονιδίων που βρίσκονται στην ίδια αλυσίδα DNA (Myler et al., 2000). Τα είδη του Παλαιού Κόσμου (Ευρώπη, Ασία και Αφρική) *L. major, L. infantum, L. tropica, και L. aethiopica* αποτελούνται από 36 χρωμοσώματα και του Νέου Κόσμου (Αμερική) *L. braziliensis και L. mexicana* από 35 και 34 χρωμοσώματα, αντίστοιχα (M. Sisk et al., 2005).

1.6 Μορφολογία

Τα παράσιτα *Leishmania* παρουσιάζουν διμορφικό κύκλο ζωής μεταξύ της προμαστιγωτής και της ενδοκυτταρικής αμαστιγωτής μορφής. Η προμαστιγωτή (προκυκλική και μετακυκλική), αποτελεί εξωκυττάρια μολυσματική μορφή και εντοπίζεται στο μεσεντέριο της φλεβοτόμου (διαβιβαστής). Η προμαστιγωτή μορφή του παρασίτου είναι επιμήκης 5-20 x 1-4 μm και φέρει μαστίγιο μήκους έως 20μm, ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης (Wright and Silverstein, 1983, Rosenthal et al., 1996). Η αμαστιγωτή είναι η ενδοκυττάρια μολυσματική μορφή του παρασίτου, η οποία εντοπίζεται εντός των φαγολυσοσωμάτων των μονοπύρηνων/μακροφάγων του τελικού ξενιστή, έχει σχήμα ωοειδές με διάμετρο 2-6 μm x 1.5-2 μm και φέρει έκκεντρο πυρήνα με πυρηνίσκο και ένα κινητοπλάστη που καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος του κυττάρου. Και οι δύο αναπτυξιακές μορφές φέρουν μαστίγιο, το οποίο στις προμαστιγωτές αναδύεται από μια θήκη (flagellar pocket), ενώ στις αμαστιγωτές περιορίζεται εντός αυτής (ενδοπλασματικό) (Alexander, 1978) (Εικόνα 1).



<u>Εικόνα 1:</u> Μορφολογικά στάδια του παρασίτου *Leishmania*. Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (πηγή: Besteiro et al., 2007, τροποποιημένο).

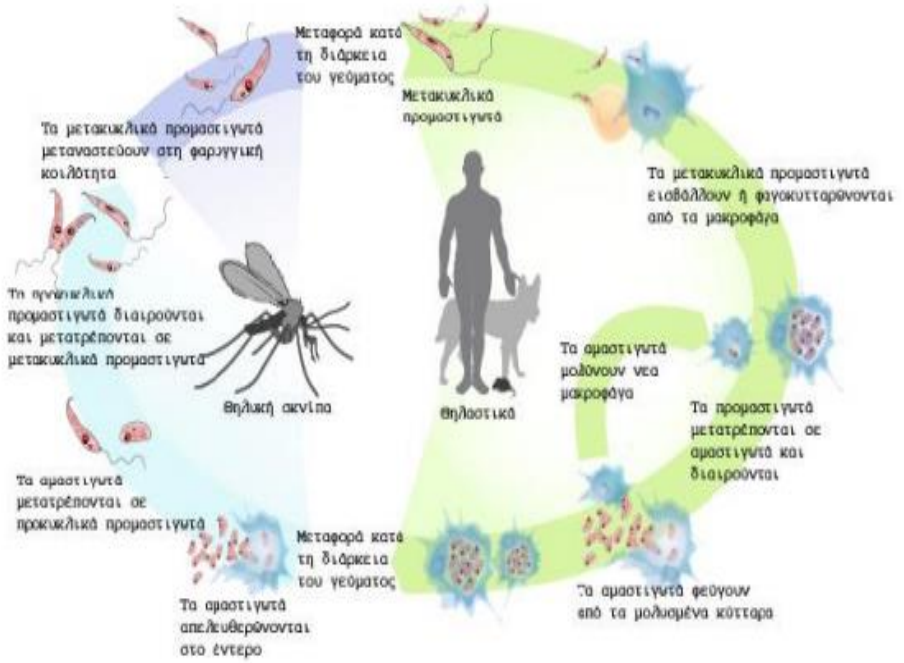
1.7 Κύκλος ζωής του παρασίτου

1.7.1 Στάδια στον ασπόνδυλο ξενιστή

Η θηλυκή φλεβοτόμος μέσω της τροφής της προσλαμβάνει στο έντερό της μακροφάγα επιμολυσμένα με το παράσιτο σε αμαστιγωτή μορφή. Εν συνεχεία, τα παράσιτα περνούν στο μεσεντέριο όπου μετατρέπονται στη προκυκλική προμαστιγωτή μορφή. Έπειτα, τα παράσιτα υφίστανται μία σειρά από έντονες μορφολογικές και βιοχημικές τροποποιήσεις καθώς μετατρέπονται από τη μη μολυσματική προκυκλική στη μολυσματική μετακυκλική μορφή τους (Schlein et al., 1992).

1.7.2 Στάδια στον σπονδυλωτό ξενιστή

Η μολυσματική μετακυκλική μορφή του παρασίτου κατά την είσοδό του στο δέρμα του ξενιστή φαγοκυτταρώνεται άμεσα από τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα και τα δενδριτικά τα οποία στρατολογήθηκαν στην περιοχή της πληγής του ξενιστή (Moradin and Descoteaux, 2012). Εντός του φαγολυσοσώματος του μακροφάγου τα παράσιτα μεταβαίνουν στο στάδιο της αμαστιγωτής μορφής, όπου στη συνέχεια πολλαπλασιάζονται με δυαδική σχάση. Όταν ο αριθμός των παρασίτων φτάσει τα 16-32, ακολουθεί λύση των κυττάρων και απελευθέρωσή των παρασίτων στον περιβάλλοντα ιστικό χώρο από όπου και μολύνουν γειτονικά μακροφάγα. Στόχος των παρασίτων αποτελούν διάφορα όργανα όπως ο σπλήνας, το ήπαρ και ο μυελός των οστών. Ο κύκλος ολοκληρώνεται όταν μια μη μολυσμένη φλεβοτόμος τραφεί με αίμα ξενιστή που περιέχει είτε παράσιτα σε αμαστιγωτή μορφή, είτε μολυσμένα φαγοκύτταρα (Podinovskaia et al., 2015),(Εικόνα 2).



<u>Εικόνα 2</u>: Σχηματική Αναπαράσταση του κύκλου ζωής του παρασίτου *Leishmania* (πηγή:Wikipedia, τροποποιημένο.

1.8 Αλληλεπίδραση παρασίτου και θηλαστικού-ξενιστή

Ανοσολογική Απόκριση Ξενιστή

Η κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος του ασθενή αποτελεί ρόλο-κλειδί για την εξέλιξη της νόσου καθώς η ανοσολογική απόκριση, έμφυτη και προσαρμοστική, είναι υπεύθυνη για την οργάνωση της αντίστασης του οργανισμού έναντι του παρασίτου(Assche et al., 2011). Πολλές μελέτες κατέληξαν στο συμπέρασμα πως το προφίλ των κυτταροκινών του ξενιστή, αλλά και των κυττάρων που απαρτίζουν το ανοσοποιητικό του σύστημα διαδραματίζουν θεμελιώδη ρόλο στην αποθεραπεία της νόσου τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα. Επίσης, είναι γνωστό πως το σύστημα του συμπληρώματος συμμετέχει ενεργά στην εξάλειψη των προμαστιγωτών που εντοπίζονται στο αίμα ενός μολυσμένου ξενιστή (Rezai et al., 1969).

1.8.1. Κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος

Ουδετερόφιλα: είναι τα πρώτα κύτταρα του ξενιστή που φθάνουν μέσα σε λίγες ώρες στο σημείο της μόλυνσης από το παράσιτο *Leishmania*. Τα ουδετερόφιλα φαγοκυτταρώνουν τις προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου και παράγουν μια σειρά μικροβιοκτόνων παραγόντων όπως το νιτρικό οξείδιο (NO). Οι προμαστιγώτες επιβιώνουν στα ουδετερόφιλα αλλά δεν διαφοροποιούνται προς την αμαστιγωτή μορφή (Peters and Sacks, 2009 , Beattie and Kaye, 2011). Παρέχουν προστασία απέναντι στις περισσότερες μορφές λοιμώξεων από *Leishmania*, αν και τα αποτελέσματα εξαρτώνται από το στέλεχος, το γενετικό υπόβαθρο του ξενιστή και την αποπτωτική ή νεκρωτική κατάσταση των ιδίων των ουδετερόφιλων (Afonso et al., 2008).

Κύτταρα φυσικοί φονείς (Natural Killers, NK): επιστρατεύονται επίσης στο σημείο της μόλυνσης από τα παράσιτα, αμέσως μετά τα ουδετερόφιλα. Όντας πηγή παραγωγής IFN-γ, τα κύτταρα αυτά ευνοούν τη διαφοροποίηση των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων και μεσολαβούν στην άμεση λύση των παρασίτων (Müller et al., 2001).

Δενδριτικά (Dendritic Cells, DC): δρουν κατά τη διάρκεια της μόλυνσης μεταφέροντας τα παράσιτα στους αντίστοιχους λεμφαδένες και ενεργοποιώντας την διαφοροποίηση των ειδικών Τ-λεμφοκυττάρων (Walker et al., 2014).

Λεμφοκύτταρα: συμβάλλουν κυρίως μέσω της ρύθμισης των κυτταροκινών, οι οποίες αντίστοιχα ενεργοποιούν ή μειώνουν την αντιπαρασιτική δράση των μακροφάγων. Η παραγωγή των Th1 βοηθητικών κυττάρων (T helper cells) δρα προστατευτικά κατά τη διάρκεια της λοίμωξης. Αντιθέτως, η αυξημενηπαραγωγή των Th2 κυττάρων επιδεινώνει τη νόσο και για το λόγο αυτό τα επίπεδα τους πρέπει να διατηρούνται υπό έλεγχο κατά τη διάρκεια της νόσου(Jones, et al., 1998, Kushawaha et al., 2011).

Μακροφάγα: η ενεργοποίηση των μακροφάγων χαρακτηρίζεται από την παραγωγή των κυτταροκινών IL-12 και TNFα και του μορίου μονοξείδιο του αζώτου (NO). Τα μακροφάγα είναι υπεύθυνα και για την έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων CD40, CD80, CD86 με τα οποία επιτυγχάνεται η σύνδεση και η επικοινωνία με τους πληθυσμούς των Τ-λεμφοκυττάρων.

1.8.2 Μικροβιοκτόνα μόρια

Τα πιο σημαντικά μικροβιοκτόνα μόρια είναι το μονοξείδιο του αζώτου (NO), τα ανιόντα υπεροξειδίου (O_2^-) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2).

Η συντονισμένη παραγωγή του NO και του H_2O_2 συμβάλλει στην καταστροφή του παρασίτου. Συγκεκριμένα το μονοξείδιο του αζώτου είναι προϊόν της αντίδρασης του αμινοξέος L-αργινίνη με το μοριακό οξυγόνο (Bogdan, 2000), η οποία καταλύεται από το ένζυμο της συνθετάσης του NO (NOS, nitric oxide synthase). Η συνθετάση του NO απαντάται σε δύο ισομορφές: τη συνεχώς εκφραζόμενη μορφή του ενζύμου cNOS (constitutive NOS) και την επαγόμενη μορφή του ενζύμου iNOS (inducible NOS). Η παραγωγή της iNOS διεγείρεται από τα NK και τη συνδυασμένη δράση των κυτταροκινών IFN-γ και TNF-α (Kane and Mosser, 2000, Prajeeth et al., 2011).

1.8.3 Κυτταροκίνες

IFN-γ: η ενεργοποίηση της IFN-γ προέρχεται από τα Th1 κύτταρα, από τα CD8 $^+$ T κυτταροτοξικά κύτταρα ως μέρος της επίκτητης ανοσοαπόκρισης και από τα ενεργοποιημένα NK, ως μέρος της έμφυτης απόκρισης. Η συγκεκριμένη κυτταροκίνη συμβάλλει στην ενεργοποίηση των μολυσμένων μακροφάγων και στην ενίσχυση της λεϊσμανιοκτόνου δράσης τους καθώς διεγείρει την έκφραση iNOS και την παραγωγή NO από τα μακροφάγα, με σκοπό τη θανάτωση των παρασίτων. Η κλασική ενεργοποίηση της IFN-γ μέσω της IL-12 οδηγεί σε φλεγμονώδεις αποκρίσεις, στην ανάπτυξη αποκρίσεων Th1 , στην έκφραση των γονιδίων MHC II και στην παραγωγή αντισωμάτων μέσω των παραγόντων του συμπληρώματος. (Barral-Netto et al., 1992, Cunningham, 2002, Podinovskaia et al., 2015).

IL-12: είναι μία κυτταροκίνη υπεύθυνη για την ενορχήστρωση τόσο της έμφυτης όσο και της επίκτητης ανοσίας. Η παραγωγή IL-12 από τα μολυσμένα κύτταρα προκαλεί ενεργοποίηση των NK, διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό των βοηθητικών T κυττάρων σε Th1 CD4 $^+$ και επαγωγή της έκφρασης της IFN-γ (Jones et al., 1998). Η ρύθμιση της παραγωγής της επιτυγχάνεται μέσω των αντιφλεγμονώδων κυτοκινών όπως η TGF-β, η IL-10, και η PGE2 (Barral-Netto et al., 1992).

MAP κινάσες (Mitogen Activated Protein kinases): είναι πρωτεϊνικές κινάσες οι οποίες στα θηλαστικά απαντώνται σε 3 οικογένειες (ERK1/2, p38 και JNK1/2). Οι MAP κινάσες είναι παρούσες σε όλες τις πτυχές της ανοσοαπόκρισης, καθώς συμμετέχουν σε έναν από τους αρχαιότερους εξελικτικά μηχανισμούς μεταγωγής μηνυμάτων. Επιπλέον, οι κινάσες αυτές ρυθμίζουν την απόπτωση, τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Ravindran et al., 2004).

NF-κB (Nuclear Factor–κB): είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας γνωστός για τις διεγερτικές του λειτουργίες στο ανοσοποιητικό σύστημα, ιδίως στα B-κύτταρα και τα μακροφάγα. Η ενεργοποίηση αυτών των κυττάρων σε συνδυασμό με τη δράση μεγάλου αριθμού κινασών, συμπεριλαμβανομένων και των MAP κινασών, προκαλεί μία σειρά αντιδράσεων που οδηγούν στην ενεργοποίηση του NF-κB (Spiecker et al., 1997), η οποία με τη σειρά της επάγει τη γονιδιακή έκφραση των προφλεγμονώδων κυτταροκινών IL-1, IL-6 και του TNFα (Carrera et al., 1996). Ο NF-κB ρυθμίζει επίσης θετικά την έκφραση των

μικροβιοκτόνων μορίων και ενζύμων που δρουν ως καταλύτες στην παραγωγή ενεργών παραγώγων (iNOS), την έκφραση των μορίων MHC και των συνδιεγερτικών CD80 και CD86 που βρίσκονται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (Li and Verma, 2002).

1.9 Μηχανισμοί δράσης του παρασίτου

1.9.1 Είσοδος στα Μονοκύτταρα/Μακροφάγα

Τα μόρια gp63 και LPG της μεμβράνης του παρασίτου, στιςπρομαστιγωτέςκαι στις αμαστιγωτές μορφές, διευκολύνουν την είσοδο του παρασίτου εντός του κυττάρου στόχου. Η αρχική «προσκόλληση» και είσοδος των προμαστιγωτών είναι αποτέλεσμα της εγκατάστασης «γεφυρών» μεταξύ παραγόντων του συμπληρώματος (C3, C3b και C3bi) και των αντίστοιχων υποδοχέων (CR3 και CR1) που βρίσκονται στην επιφάνεια των φαγοκυττάρων (Olivier et al., 2005 ,Cecilio et al., 2014). Η gp63 πρωτεάση αποδομεί τον παράγοντα του συμπληρώματος C3b σε C3bi, ο οποίος μεσολαβεί στην είσοδο των προμαστιγωτών στα μονοκύτταρα/ μακροφάγα μέσω του υποδοχέα CR3 παρεμποδίζοντας τη λύση τους (Isnard, 2012, Olivier et al., 2012). Έναλλακτικά, η εισαγωγή των αμαστιγωτών παρασίτων στα κύτταρα επιτυγχάνεται με την αναγνώριση από τον υποδοχέα Fc των μακροφάγων, των ανοσοσυμπλεγμάτων που δημιουργούνται μεταξύ μορίων της μεμβράνης των παρασίτων και των ανοσοσφαιρινών (Peters et al., 1995, Alexander et al., 1999, Bosetto and Giorgio, 2007).

1.9.2 Επιβίωση εντός των μακροφάγων

Μετά τη φαγοκυττάρωση, αν και αρκετά παράσιτα καταστρέφονται από τα μακροφάγα, κάποια αποφεύγουν τη μικροβιοκτόνο δύναμη του φαγολυσοσώματος και τη δράση των λυσοσωμικών ενζύμων. Η διαβίωση του παρασίτου στο εσωτερικό του μακροφάγου είναι ένας ιδανικός τρόπος διαφυγής από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, ενώ καθιστά ταυτόχρονα δυνατή τη πρόσβαση στα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά που επιτρέπουν τον πολλαπλασιασμό του (Hartley et al., 2014). Τα μόρια LPG του παρασίτου τροποποιώντας τη λιπιδική διπλοστοιβάδα του φαγοσώματος, αποτρέπουν τη σύντηξη του φαγοσώματος με το λυσόσωμα ή/και αυξάνουν την ενέργεια που απαιτείται για την σύντηξη των δύο σωματιδίων. Με αυτό τον τρόπο καθυστερείται η δημιουργία του φαγολυσοσώματος, προκειμένου να διαφοροποιηθούν έγκαιρα τα παράσιτα από την προμαστιγωτή στην αμαστιγωτή μορφή. Η διαφοροποίηση των παρασίτων πραγματοποιείται όπως προαναφέρθηκε εντός του φαγολυσοσώματος και χαρακτηρίζεται από πολλαπλές μορφολογικές και βιοχημικές μεταβολές. Η διαφοροποίηση αυτή των παρασίτων είναι απαραίτητη για την επιβίωση και την εξάπλωση τους έναντι του εχθρικού περιβάλλοντος του φαγολυσοσώματος όπου επικρατούν συνθήκες πολύ χαμηλού pH (4,5-5,5) και υψηλής θερμοκρασίας στο ομοιοθερμικό σπονδυλωτό σε σχέση με τη θερμοκρασία στο ποικιλοθερμικό έντομο (Rosenthal et al., 1996, Goyard et al., 2003).

Πιο συγκεκριμένα, το πρόσφατα σχηματισμένο φαγόσωμα που περιέχει παράσιτα, μετά τις τροποποιήσεις από τους παράγοντες παθογένειας όπως η LPG, μετατρέπεται σε παρασιτοφόρο κενοτόπιο (PV, Parasitophorus Vacuole). Τα παρασιτοφόρα κενοτόπια προάγουν την ανάπτυξη των παρασίτων (Podinovskaia et al., 2015) και προστατεύουν το

παράσιτο από την οξειδωτική βλάβη και από την ανοσολογική αναγνώριση που επιτυγχάνεται μέσω της αντιγονοπαρουσίασης. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας οι προμαστιγωτές μορφέςμετατρέπονται σεναμαστιγώτ΄ές εντός 12-24 ωρών. Στη συνέχεια, σε αυτή τη μορφή τα παράσιτα συνεχίζουν να αναπτύσσονται και να διαιρούνται εντός του φαγολυσοσωμικού διαμερίσματος (Antoine et al., 1998, Courret et al., 2002, Moradin and Descoteaux, 2012).

Καθώς το παράσιτο πολλαπλασιάζεται εντός του κυττάρου, το μακροφάγο μπορεί τελικά να υποστεί απόπτωση. Το παράσιτο, αν και αρχικά καθυστερεί την απόπτωση του κυττάρου, εν τέλει εκμεταλλεύεται το αποπτωτικό κύτταρο-ξενιστή για να εξαπλωθεί σε γειτονικά μη μολυσμένα μακροφάγα, με ελάχιστη έκθεση σε εξωκυτταρικά συστήματα αναγνώρισης του ανοσοποιητικού συστήματος (Real et al., 2014).

1.9.3 Μηχανισμοί έναντι του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή

Τα παράσιτα *Leishmania* απελευθερώνουν παράγοντες ενδοκυτταρικής επιβίωσης, οι οποίοι αναστέλλουν την πρόκληση προφλεγμονωδών οδών και εμπλέκονται στον επαναπρογραμματισμό του μακροφάγου με σκοπό την προώθηση της μόλυνσης. Ακόμη, έχουν αναπτύξει μηχανισμούς αντοχής για να αποφεύγουν τα ένζυμα πέψης της φλεβοτόμου, την έμφυτη ανοσοαπόκριση του ξενιστή των θηλαστικών όπως είναι το σύστημα του συμπληρώματος και τους αμυντικούς μηχανισμούς που εμφανίζονται εντός του μακροφάγου (NO και ενεργές μορφές οξυγόνου, ROS) (Rosenthal et al., 1996). Η σημαντική μείωση των επιπέδων του NO οδηγεί τα μακροφάγα σε αυτοφαγία και επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό των αμαστιγωτών μορφών (Podinovskaia et al., 2015). Επιπλέον, έχει αναφερθεί πως η μείωση των επιπέδων NO στα μακροφάγα προκαλεί τη μεθυλίωση του DNA και ως συνέπεια την απενεργοποίηση των γονιδίων που ελέγχουν μικροβιοκτόνες οδούς (Arango- Duque et al., 2015).

Γενικά, η παρεμπόδιση της ενεργοποίησης των Th1 λεμφοκυττάρων μπορεί να οφείλεται σε αποτυχία παραγωγής IL-12 ή εναλλακτικά στην παραγωγή IL-4 / IL-13 που αναστέλλει την παραγωγή της IL-12 (Alexander et al., 2012). Η IL-4 επίσης ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των Th2 κυττάρων και είναι υπεύθυνη για την ευαισθησία του ξενιστή απέναντι στο παράσιτο (Vouldoukis et al., 1997). Το σύνολο των παραπάνω οδηγεί στην ανεξέλεκτη αναπαραγωγή παρασίτων εντός των μολυσμένων κυττάρων και στην αναστολή της φλεγμονής η οποία διευκολύνεται από την παραγωγή της αντιφλεγμονώδους IL-10 του κυττάρου του ξενιστή (Alexander et al., 2005).

Συγκεκριμένα, τα παράσιτ διεγείρουν την παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών συμπεριλαμβανομένης της IL-10 αλλα και των PGE2 και TGF-β. Η κυτταροκίνη TGF-β διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην επιβίωση του παρασίτου οδηγώντας σε αύξηση της αποδόμησης του iNOS (Vodovotz et al., 1993).

Οι προμαστιγώτες και οι αμαστιγώτες μειώνουν αμφότεροι αρνητικά την παραγωγή της IL-12 και της iNOS μέσω ενός μηχανισμού αποφωσφορυλιώσης και των τριών MAP κινασών. Χωρίς την IL-12, δημιουργείται αδυναμία ενεργοποίησης των Τ-λεμφοκυττάρων και κατά συνέπεια της συναρμολόγησης υπομονάδων του υποδοχέα IFN-γ, κυτταροκίνη η οποία απαιτείται για την ενεργοποίηση των παρασιτοκτόνων μηχανισμών των μακροφάγων, εξασφαλίζοντας έτσι την επιβίωση του παρασίτου (Sen et al., 2011).Τέλος, το παράσιτο αποτρέπει την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων παρεμποδίζοντας τις

αντιγονοπαρουσιαστικές ιδιότητες των μακροφάγων μέσω της παρεμπόδισης της έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί τα μόρια MHC-II και της σύνδεσης των αντιγονικών επιτόπων στα μόρια MHC-II (Olivier et al., 2005, Gregory and Olivier, 2005).

1.10 Διαβιβαστές-Ξενιστές

Για νόσους που μεταδίδονται μέσω διαβιβαστή, όπως η λεϊσμανίαση, δύο ξενιστές πρέπει να ληφθούν υπόψιν: οι ξενιστές που ανήκουν στα ασπόνδυλα (διαβιβαστές) και αυτοί που ανήκουν στα θηλαστικά (δεξαμενές) (Rogers and Bates, 2007).

1.10.1 Ενδιάμεσοι Ξενιστές-Διαβιβαστές

Ο βιολογικός κύκλος του παρασίτου απαιτεί την ανάπτυξη σε ενδιάμεσο ξενιστή που είναι αιματοφάγα δίπτερα έντομα του γένους *Phlebotomus* και *Sergentomyia,* υπεύθυνα για τη μετάδοση της νόσου στους ξενιστές στις χώρες του Παλαιού Κόσμου και του γένος *Lutzomyia* για το Νέο Κόσμο.Έχουν βρεθεί 30 είδη φλεβοτόμου, παθογόνα για τον άνθρωπο, τα οποία είναι διαβιβαστές για 20 είδη *Leishmania* (Ashford, 2000, Bates, 2007) (Εικόνα 3).

A. B.

<u>Εικόνα 3</u>:Φλεβοτόμοι των ειδών. Α.*Phlebotomus spp.* Β. *Lutzomyia spp*. (πηγή: VectorBase).

Στην Ελλάδα είναι γνωστά 12 είδη , 9 από τα οποία ανήκουν στο γένος *Phlebotomus* και 3 στο γένος *Sergentomyia*. Στη Μεσόγειο δυνητικός διαβιβαστής του παρασίτου *L. infantum* είναι το είδος *Phlebotomus neglectus*, το οποίο είναι και από τα πιο συχνά απαντώμενα είδη στον Ελλαδικό χώρο (Christodoulou et al., 2012). Παρά το γεγονός ότι επιτίθεται σπανίως στον άνθρωπο, ο *P. neglectus* θεωρείται ο κύριος μεταδότης στον άνθρωπο στη χώρα μας. Πιθανοί μεταδότες θεωρούνται επίσης οι *P. sergetti, P. balcanicus και P. simici* (Charalabidis and Diakou, 2004).Η φλεβοτόμος φαίνεται να παρουσιάζει μεγαλύτερη ενεργότητα από το σούρουπο έως την αυγή (Seaman et al., 1996).

Σίελος: τα συστατικά της σιέλου ή/και των σιελογόνων αδένων της φλεβοτόμου προωθούν την εξέλιξη της μόλυνσης. Στη σίελο περιέχονται φαρμακολογικά ενεργά υποστρώματα που αναστέλλουν τους αιμοστατικούς μηχανισμούς του ξενιστή, προκαλούν αγγειοδιαστολή, αναστολή των μικροβιοκτόνων αποκρίσεων και της αντιγονοπαρουσίασης. Μέσω της σιέλου, ρυθμίζεται θετικά και η επιβλαβής δραστηριότητα των Th2 και παράλληλα η μείωση των προστατευτικών αποκρίσεων των Th1 (Tselentis et al., 1994 , Hall et al., 1995 , Waitumbi and Warburg, 1998).

1.10.2 Τελικοί Ξενιστές

Ως τελικοί ξενιστές ορίζονται εκείνοι οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τη διατήρηση του παρασίτου στη φύση (θηλαστικά). Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα θηλαστικά των τάξεων: *Edentata* (π.χ. αρμαντίλο, βραδύποδες*), Carnivora* (π.χ. γάτες, σκύλοι), *Hyracoidea* (π.χ. υρακοειδή), *Rodentia* (π.χ. αρουραίοι, γερβίλοι-αρουραίοι της ερήμου), *Primates* (π.χ. άνθρωποι, πίθηκοι), *Marsupialia* (π.χ. οπόσουμ), και *Perissodactyla* (π.χ. άλογα) (Ashford, 1996 Saliba and Oumeish, 1999, Gramiccia and Gradoni, 2005).

Τα κυνοειδή, αποτελούν την κυριότερη δεξαμενή για την *L. infantum,* αίτιο της ζωονοτικής σπλαχνικής λεϊσμανίασης (ZVL). Συγκεκριμένα, ο οικόσιτος σκύλος θεωρείται η κύρια δεξαμενή *L. infantum* στην Κίνα, τη λεκάνη της Μεσογείου και την Αμερική, λόγω της στενής του σχέσης με τον άνθρωπο (Ashford, 1996, Moreno and Alvar, 2002, Gramiccia and Gradoni, 2005, Dantas-Torres and Brandao-Filho, 2006). Παρόλα αυτά, η πιθανότητα συμμετοχής και άλλων ξενιστών όπως οι γάτες (Maroli et al., 2007), στον κύκλο μετάδοσης της *L. infantum*, δε μπορεί να αποκλεισθεί.

Ο άνθρωπος αποτελεί τυχαίο ξενιστή για το παράσιτο. Η εμφάνιση της νόσου στον άνθρωπο εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες που σχετίζονται τόσο με τον ξενιστή (π.χ. ηλικία, διατροφική κατάσταση, γενετικό υπόβαθρο) όσο και με το παράσιτο (π.χ. είδος, στέλεχος) (Cruz et al., 2002).

1.11 Λεϊσμανίαση

Η λεϊσμανίαση αποτελεί την κλινική εκδήλωση της μόλυνσης από το παράσιτο *Leishmania*. Κατατάσσεται στις πιο σημαντικές παρασιτικές λοιμώξεις μαζί με την τοξοπλάσμωση και την κρυπτοσπορίδιαση (Oryan et al., 2016). Η ισχυρή σύνδεση της νόσου αυτής με τη φτώχεια, την κατατάσσει στην κατηγορία των ‘‘πιο παραμελημένων ’’ νόσων (most neglected diseases). Ο όρος αυτός αναπτύχθηκε αρχικά με σκοπό τη προώθηση επενδύσεων για την καταπολέμησή τους και εκτός από τη λεϊσμανίαση συμπεριλαμβάνει ακόμη μολυσματικές ασθένειες όπως η νόσος Chagas, η Αφρικανική Τρυπανοσωμίαση (sleeping sickness) και η τοξοπλάσμωση. Μεταξύ των παραμελημένων νόσων, η λεϊσμανίαση είναι αυτή με το μεγαλύτερο αντίκτυπο βάσει κριτηρίων που αφορούν την ευρεία γεωγραφική της κατανομή, τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα που παρουσιάζει (Yamey and Toreele, 2002).

Η λεϊσμανίαση περιλαμβάνει μια ομάδα νοσημάτων με ευρύ φάσμα κλινικών συμπτωμάτων, από αυτοπεριοριζόμενες δερματικές έως και σπλαχνικές βλάβες που οδηγούν στο θάνατο αν δεν ληφθεί η απαραίτητη θεραπεία. Οι διάφορες εμφανίσεις των κλινικών μορφών της νόσου σχετίζονται άμεσα με το είδος του παράσιτου και την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή (Solbach and Laskay, 2000).

Ανάλογα με το είδος του ξενιστή στο οποίο εμφανίζεται η νόσος διακρίνεται σε:

I. **Ανθρωπονόσο** (άνθρωπος-φλεβοτόμος-άνθρωπος) όπου η μοναδική δεξαμενή παρασίτου είναι ο ίδιος ο άνθρωπος .
II. **Ζωονόσο** (ζώο-φλεβοτόμος –ζώο). Στους ζωονοτικούς κύκλους μετάδοσης τα ζώα είναι οι δεξαμενές που διατηρούν και μεταδίδουν τα παράσιτα της *Leishmania* (Desjeux, 2001).
III. **Ανθρωποζωονόσο** (ζώο-φλεβοτόμος-άνθρωπος). Κύρια δεξαμενή αποτελούν τα θηλαστικά, ιδίως ο σκύλος, μολύνοντας δευτερογενώς τον άνθρωπο.

1.11.1 Κλινικές μορφές λεϊσμανίασης

Η λεϊσμανίαση, βάσει του είδους του παρασίτου και της ανοσολογική απόκρισης του ασθενούς (είτε ανθρώπου, είτε ζώου) εκδηλώνεται με 3 κύριες κλινικές μορφές: 1. Δερματική (CL, Cutaneous *Leishmania*sis), 2. Σπλαχνική (VL, Visceral *Leishmania*sis) 3. Βλεννογονοδερματική Λεϊσμανίαση (MCL, Mucocutaneous *Leishmania*sis) (WHO, 2010).

1.11.1.1 Δερματική Λεϊσμανίαση (Cutaneous Leishmaniasis, CL)

Η δερματική λεϊσμανίαση προκαλείται από την *Leishmania tropica* και την *Leishmania aethiopica*, αποτελεί την πιο κοινή κλινική εκδήλωση της ασθένειας στον Παλαιό Κόσμο και είναι συνήθως αυτοπεριοριζόμενη(Gradoni, 2018).

Η διάχυτη δερματική λεϊσμανίαση (DCL, Diffuse Cutaneous *Leishmania*sis), είναι μια σπάνια εκδήλωση της δερματικής λεϊσμανίασης, που οφείλεται σε παράσιτα του είδους *L. aethiopica*, και *L. amazonensis* (Νότια Αμερική) και παρατηρείται σε άτομα με ελαττωματική κυτταρομεσολαβούμενη ανοσοαπόκριση. Η σοβαρότητα της προκύπτει από διάχυτες βλάβες που ομοιάζουν με εκείνες της λεπρωματώδους λέπρας. Οι νοσούντες ποτέ δεν θεραπεύονται αυθόρμητα, είναι ιδιαίτερα ανθεκτικοί στη χημειοθεραπεία και υποτροπιάζουν μετά από θεραπεία με οποιαδήποτε μέχρις σήμερα διαθέσιμη αγωγή. Λόγω των καταστροφικών της συνεπειών για τον ασθενή, η DCL αναγνωρίζεται ως πρόβλημα Δημόσιας Υγείας (Desjeux, 2004). Για τη Ζωονοτική Δερματική Λεϊσμανίαση (ZCL) ευθύνεται η *L. major* στον Παλαιό Κόσμο, ενώ σε περιστατικά αγροτικών/περιαστικών στη Μέση Ανατολή υπεύθυνη για τη μετάδοση είναι η *L. tropica*. Αμφότερες προκαλούν εντετοπισμένες δερματικές αλλοιώσεις οι οποίες συνήθως είναι αυτοπεριοριζόμενες με επακόλουθη ανοσία (Gradoni, 2018).

Α. Β. Γ.

<u>Εικόνα 4:</u> Ασθενείς με δερματική λεϊσμανίαση. Α.(πηγή: WHO/Christopher Black), Β., Γ. (πηγή: Khanand Muneeb, 2005).

1.11.1.2 Σπλαχνική Λεϊσμανίαση (Visceral *Leishmania*sis, VL)

Η σπλαχνική λεϊσμανίαση, γνωστή και ως καλά-αζαρ, αποτελεί τη σοβαρότερη μορφή της νόσου με 500.000 νέα περιστατικά και πάνω από 50.000 θανάτους ετησίως (WHO, 2010). Η μετάδοση της VL, πραγματοποιείται μέσω της *L. donovani* στην Ινδία και την Ανατολική Αφρική και μέσω της *L. infantum* στην Κεντρική και Νότια Αμερική και στις περιοχές της Μεσογειακής λεκάνης. Η κλινική μορφή αυτή, είναι το αποτέλεσμα της

εισβολής του παρασίτου εντός του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος του ανθρώπου. Υπάρχουν ωστόσο, ορισμένα περιστατικά όπου δεν παρατηρείται πλήρης ανάπτυξη της νόσου με επακόλουθη, αυθόρμητη αυτοΐαση (Ali and Ashford, 1994).

Η συμπτωματολογία της σπλαχνικης λεϊσμανίασης περιλαμβάνει πυρετό, αναιμία, απώλεια βάρους, επίμονη διάρροια, βήχα, απίσχναση, αναιμία, σπληνομεγαλία και ηπατομεγαλία (λόγω παρασιτικής διήθησης του ήπατος και του σπλήνα), λεμφογαγγλιομεγαλία ή/και λεμφαδενοπάθεια, ενώ ενδέχεται να παρατηρηθεί πολύ ισχυρή ορολογική απόκριση (Εικόνες 5Α, 5Β). Αν οι καταστάσεις αυτές αφεθούν χωρίς θεραπεία, αποβαίνουν σχεδόν πάντα θανατηφόρες.

Η θρομβοκυτταροπενία μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχές της αιμόστασης και εντερικές αιμορραγίες οι οποίες με ταυτόχρονες δευτερογενείς λοιμώξεις όπως πνευμονία και σηψαιμία αποτελούν τις κύριες αιτίες θανάτου (Ali and Ashford, 1994, Desjeux, 2004). Η σπλαχνική μορφή λεϊσμανίασης προκαλεί επιδημίες μεγάλης κλίμακας. Με την έλευση των επιδημιών του HIV, η VL εμφανίστηκε ως ευκαιριακή λοίμωξη σε ασθενείς που πάσχουν από AIDS (Jarvis and Lockwood, 2013).

Μετά την επιτυχή αποθεραπεία της VL οι ασθενείς ενδέχεται 6 μήνες έως 2 χρόνια μετά να εμφανίσουν μετα καλα-αζάρ δερματική λεϊσμανίαση (post kala-azar dermal *Leishmania*sis, PKDL). Η PKDL αποτελεί μια επιπλοκή, η οποία εμφανίζεται σαν χρόνια μορφή CL και εμφανίζει διάσπαρτες δερματικές αλλοιώσεις (υπόχρωμες κηλίδες, ερύθημα, οζίδια) κυρίως στον κορμό, στους βραχίονες, στο μηρό και την κνήμη (Εικόνα 5Γ). Παρατηρούνται δύο τύποι μετα καλα-αζάρ δερματικής λεϊσμανίασης: ο Ινδικός με πιθανότητα εμφάνισης 5-10% και ο Αφρικανικός με πιθανότητα εμφάνισης 50%. Ο Αφρικανικός τύπος θεραπεύεται αυθόρμητα στις περισσότερες περιπτώσεις, σε αντίθεση με τους ασθενείς στην Ινδία όπου συνήθως απαιτείται μακρά και δαπανηρή θεραπεία. Σύμφωνα με τον ΠΟΥ, οι ασθενείς με PKDL θεωρούνται πιθανές «δεξαμενές» της σπλαχνικής μορφής της νόσου, επηρεάζοντας την επιδημιολογία της στις ενδημικές περιοχές (WHO, 2010, Desjeux, 1996).

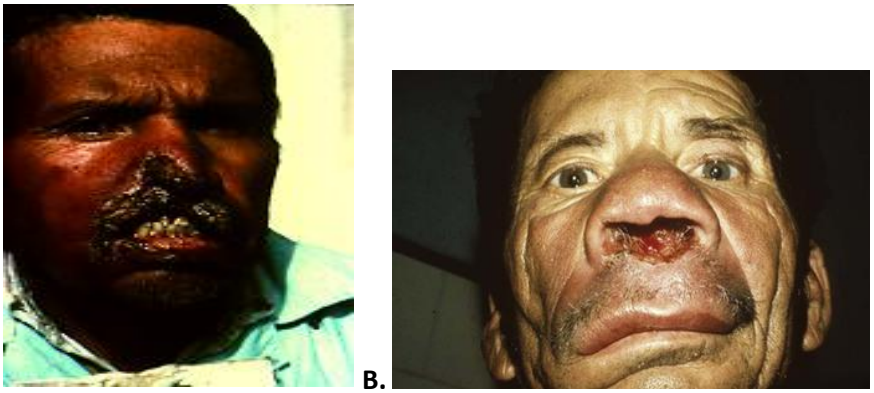
Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός εμφάνισης περιστατικών PKDL σε άτομα που δεν είχαν ιστορικό σπλαχνικής λεϊσμανίασης (Ashford, 2000). Σε μία μελέτη, βρέθηκε ότι τα άτομα που ζούσαν στην ίδια οικία με έναν πρόσφατο ασθενή με ανθρωπονοτική σπλαχνική λεϊσμανίαση (AVL), είχαν 26 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης της ασθένειας, υπογραμμίζοντας έτσι το ρόλο των ασθενών που δεν έχουν υποβληθεί σε θεραπεία, ως κύριες δεξαμενές μόλυνσης (Bern et al., 2005).

Η ζωονοτική σπλαχνική λεϊσμανίαση (ZVL), εμφανίζεται κυρίως στη Λατινική Αμερική, στη λεκάνη της Μεσογείου και στην Ασία με υπεύθυνο το παράσιτο της *L. infantum*. Η ZVL προκαλεί σοβαρή χρόνια εξουθενωτική νόσο, την σπλαχνική λεϊσμανίαση σε σκύλους (canine VL) (Killick-Kendrick, 1990, Cunha et al., 1995)(Εικόνα 5Δ). Εντούτοις, τα ζώα μπορεί να μην εμφανίσουν κλινικά συμπτώματα VL για χρόνια ή ακόμη και για ολόκληρη τη ζωή τους (Moreno and Alvar, 2002). Υπάρχει όμως πιθανότητα να εμφανίσουν έντονο δερματικό παρασιτισμό από τους αμαστιγώτες του παρασίτου, αυξάνοντας έτσι τη πιθανότητα μετάδοσης στον άνθρωπο (Dantas-Torres and Brandao-Filho, 2006).

Εικόνα 5: **Α. Παιδιά με VL στη Νότια Αιθιοπία (πηγή: http://vl-ethiopia.huji.act.il), Β. Κορίτσι που πάσχει από VL διόγκωση ήπατος και σπληνός (πηγή: WHO), Γ. Ασθενής με PKDL, όπου στο παρελθόν είχε λάβει επιτυχώς θεραπεία για VL (πηγή: WHO, leishmaniasis/disease/clinical forms of leishmaniases), Δ. Σκύλος που πάσχει από καλα-αζάρ (πηγή: Leishmaniases: the Diseases).**

1.11.1.3 Βλεννογονοδερματική Λεϊσμανίαση (MCL)

Η MCL εμφανίζει δερματικές αλλοιώσεις όπου αργότερα παρουσιάζουν μεταστάσεις και προκαλούν εκτεταμένη καταστροφή στις στοματικές-ρινικές και φαρυγγικές κοιλότητες. Οι ασθενείς υφίστανται ακρωτηριασμό του προσώπου τους και υποφέρουν από δεινοπάθεια εφ' όρου ζωής (Εικόνες 6Α, 6Β). Η MCL, ως επί το πλείστον συνδέεται με τα είδη *L. braziliensis και L. guyanensis* του Νέου Κόσμου, ενώ σημειώνονται και περισταστικά στον Παλαιό Κόσμο ενοχοποιώντας τα παράσιτα *L. donovani* και *L. major* (Desjeux, 2004).



Εικόνα 6: **Α. Ασθενείς με βλεννογονοδερματική λεϊσμανίαση (espundia). Α.(πηγή: Leishmaniases: the Diseases), Β.(πηγή: Oncohema KeyFastest Oncology & Hematology Insight Engine).**

1.11.1.4 Ασυμπτωματικός παρασιτισμός

Πρόσφατες μελέτες, στις ενδημικές περιοχές αποκάλυψαν ένα σημαντικό αριθμό μολυσμένων ατόμων από το είδος *L. infantum* οι οποίοι παρέμεναν ασυμπτωματικοί. Τα

άτομα αυτά δεν ανέπτυξαν δερματικές αλλοιώσεις ούτε εμφάνισαν άλλα κλινικά συμπτώματα της νόσου (Stauch et al., 2014). Οι ασυμπτωματικές και ολιγοσυμπτωματικές λοιμώξεις αριθμούνται ως οι συχνότερες και σύμφωνα με τον ΠΟΥ, μόνο το 10 έως 20% των μολυσμένων ατόμων αναπτύσσουν σοβαρές μορφές της νόσου (Alvar et al., 1997).

1.11.2 Λεϊσμανίαση και Ανοσοκαταστολή

Η λεϊσμανίαση έχει αναγνωριστεί ως ευκαιριακή λοίμωξη σε άτομα με ανοσοκαταστολή, καθώς οδηγεί σε αυξημένη ευαισθησία σε de novo λοίμωξη από *Leishmania*. Η πιο συχνή περίπτωση ανοσοκατεσταλμένων είναι αυτή των ατόμων με HIV λοίμωξη (Cruz et al., 2006, Jarvis and Lockwood, 2013). Οι περισσότερες από τις ενδημικές χώρες ως προς τη λεϊσμανίαση αντιμετωπίζουν επιδημία HIV οδηγώντας έτσι σε υψηλά ποσοστά συλλοίμωξης, η οποία έχει χαρακτηριστεί ως μια σημαντική επιπλοκή της λεϊσμανίασης. Η συλλοίμωξη HIV-σπλαχνικής λεϊσμανίασης χαρακτηρίζεται από συχνές υποτροπές και υψηλό ποσοστό θνησιμότητας. Καθώς το παράσιτο στοχεύει τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, τα οποία καταστρέφει παράλληλα ο ιός HIV, επιδεινώνει την κατάσταση του ασθενή και καθιστά τα περιστατικά αυτά σημαντικές δεξαμενές μόλυνσης (Alvar et al., 2008). Ταυτόχρονη μόλυνση από HIV και *Leishmania* θεωρείται αναδυόμενη νόσος σε τουλάχιστον 30 χώρες, με το AIDS να εκτιμάται πως αυξάνει τον κίνδυνο σπλαχνικής λεϊσμανίασης κατά 100-1000 φορές στη Νότια Ευρώπη και στην Αμερική (Dejseux and Alvar, 2003, Singh, 2006, Jarvis and Lockwood, 2013).

Έχει επίσης παρατηρηθεί αν και σε μικρότερο βαθμό σε άτομα που έχουν υποβληθεί σε χημειοθεραπεία για κακοήθεια ή σε μεταμόσχευση οργάνου, εξαιτίας των ανοσοκατασταλτικών που λαμβάνουν, τα οποία εμποδίζουν την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των Τ-κυττάρων. Επιπλέον, σε σπάνιες περιπτώσεις, οι λήπτες των μοσχευμάτων κινδυνεύουν από τη λήψη οργάνου μολυσμένου με παράσιτα (Molina et al.,2002, Basset et al., 2005). Τα άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό (Immunocompromised), που επισκέπτονται ενδημικές περιοχές ενδέχεται να υποφέρουν από *de novo* μόλυνση από *Leishmania* και ευθύνονται για τις περιπτώσεις εισαγωγής λεϊσμανιάσεων στις μη ενδημικές χώρες τους, φαινόμενο που παρατηρείται όλο και συχνότερα (Gramiccia et al., 1995, Chicharro et al., 2003).

1.12 Επιδημιολογία της λεϊσμανίασης

Η επιδημιολογία της λεϊσμανίασης εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά των ειδών του παρασίτου, τα οικολογικά χαρακτηριστικά των περιοχών μετάδοσης, την τρέχουσα και προηγούμενη έκθεση του πληθυσμού στο παράσιτο και την ανθρώπινη συμπεριφορά (WHO). Περισσότερα από 12 εκατομμύρια άτομα έχουν μολυνθεί από το παράσιτο της *Leishamania*, ενώ η νόσος αποτελεί απειλή για πάνω από 350 εκατομμύρια ανθρώπους σε 98 χώρες σύμφωνα με το Κίνημα «Drugs for Neglected Diseases initiative» (DNDi), το οποίο έχει αναλάβει την πρωτοβουλία για την ανακάλυψη φαρμάκων για τις παραμελημένες ασθένειες. Κάθε χρόνο αναφέρονται παγκοσμίως 1,5-2 εκατομμύρια νέα περιστατικά (Murray et al., 2005). Ήδη από το 1908 έχουμε πληροφορίες για ενδημικές ζωονόσους στη Μεσόγειο και τη Μέση Ανατολή (Tselentis et al., 1994). Σήμερα, οι δύο μορφές την νόσου που ενδημούν στις χώρες της Μεσογείου προκαλούνται από 3 είδη: 1.*Leishmania infantum*

(ζωονοτική VL και CL) 2. *Leishmania tropica* (ανθρωπονοτική και ζωονοτική CL) και 3. *Leishmania major* (ζωονοτική CL) (Schonian et al., 2008).

Παρά την έλλειψη αξιόπιστων δεδομένων, δεν υπάρχει αμφιβολία ότι ο αριθμός των περιστατικών που σημειώνονται σε όλο τον κόσμο είναι σημαντικά μεγαλύτερος από αυτά που καταγράφονται επίσημα, και ο αριθμός των λοιμώξεων είναι ακόμα μεγαλύτερος (Desjeux, 2004).

1.12.1 Λεϊσμανίαση στην Ελλάδα

Στην Ελλάδα, η πρώτη αναφορά κρούσματος έγινε το 1905 στην Κρήτη**.** Κατά τη δεκαετία του 1940, αναφέρονταν ετησίως 160 περιστατικά σπλαχνικής λεϊσμανίασης στον άνθρωπο. Τις επόμενες δεκαετίες εμφανίζεται μια ελαφριά αριθμητική κάμψη στην εμφάνιση των κρουσμάτων. Πιο συγκεκριμένα, από το 1962 έως 1992 στο Υπουργείο Υγείας αναφέρονται 1005 περιστατικά σπλαχνικής λεϊσμανίασης για την Αττική (Tselentis et al., 1994). Παρ' όλα αυτά, τα τελευταία χρόνια η νόσος φαίνεται να ανακάμπτει (Christodoulou et al., 2012).

1.13 Παράγοντες Κινδύνου Εξάπλωσης της Νόσου

Η αύξηση των παραγόντων κινδύνου εξάπλωσης της λεϊσμανίασης τόσο σε περιβαλλοντικό επίπεδο όσο και σε ανθρωπογενές επίπεδο, καθιστά τη νόσο αυτή μια αυξανόμενη ανησυχία για τη δημόσια υγεία για πολλές χώρες ανά τον κόσμο (Desjeux, 1996).

1.13.1 Κλιματικές αλλαγές

Η λεϊσμανίαση, όπως και άλλες λοιμώξεις που μεταδίδονται μέσω διαβιβαστή θεωρείται νόσημα που επηρεάζεται δυνητικά από μεταβολές στις κλιματικές παραμέτρους (βροχόπτωση, θερμοκρασία υγρασία). Η υπερθέρμανση του πλανήτη φέρει σαν συνέπεια την πιθανότητα οι λεϊσμανιάσεις να εξαπλωθούν σε ζώνες με έντονες θερμοκρασίες, όπου η αυξημένη μέση θερμοκρασία θα μπορούσε να επιτρέψει την επέκταση των εποχών αναπαραγωγής της φλεβοτόμου και ταυτόχρονα να έχει άμεση επίδραση στον κύκλο ανάπτυξης της *Leishmania* εντός των φλεβοτόμων (Hlavacova et al., 2013, Alten et al., 2016). Αντίθετα, σε περιοχές με χαμηλές θερμοκρασίες έχει αποτραπεί η διαχείμαση των φορέων στο στάδιο της προνύμφης (Ferroglio et al., 2006). Έμμεσες επιπτώσεις όπως η ξηρασία, ο λιμός και οι πλημμύρες, θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μαζική μετανάστευση ανθρώπων από περιοχές που ενδημεί η λεϊσμανίαση (Hlavacova et al., 2013).

1.13.1 Περιβαλλοντικοί Παράγοντες

Οι μέθοδοι συλλογής απορριμμάτων, η έλλειψη διαχείρισης αποβλήτων και οι ανοιχτές αποχετεύσεις (Εικόνα 7Α). οι στοίβες από φύλλα, οι ραγισμένοι τοίχοι που έχουν κατασκευαστεί από λάσπη το αποξηραμένο γρασίδι καθώς και οι τρύπες των τρωκτικών, επιτρέπουν την εγκατάσταση της σκνίπας και παρέχουν θέσεις ανάπαυσης του εντόμουκατά τη διάρκεια της ημέρας (Εικόνα 7Β). Τα υγρά χωμάτινα δάπεδα παρατείνουν την επιβίωσή της και ευνοούν την αναπαραγωγή της, επιτυγχάνοντας ευκολότερη πρόσβαση στο ανθρώπινο αίμα.

Άλλο περιβαλλοντικό παράγοντα αποτελεί η παρουσία ζώων εντός των σπιτιών (σκύλοι) ή δίπλα στις οικίες (κυρίως βοοειδή, χοίροι και τρωκτικά)(Εικόνα 7Γ)(Reithinger et al., 2003). Σαν παράδειγμα, στο Σανλιούρφα (νότια Anatolia) μια απότομη αύξηση των περιπτώσεων ACL έχει καταγραφεί σε προάστια όπου τα ζώα βρίσκονται σε αυτοσχέδια υπόστεγα, ακριβώς δίπλα στις οικίες, ενώ συνήθειες όπως η χρήση της κοπριάς από τις αγελάδες σαν καύσιμο για μαγείρεμα αυξάνει την πιθανότητα μόλυνσης των ανθρώπων από τα ζώα. Παρ' όλα αυτά έχει παρατηρηθεί πως η παρουσία βοοειδών (αγελάδες και βουβάλια) μπορεί να είναι και προστατευτική καθώς αυτά τα ζώα πιθανώς αποτρέπουν έναν αριθμό διαβιβαστών από το να τσιμπήσουν το τον άνθρωπο, αφού αποτελούν μέρος της διατροφής της σκνίπας. Το προστατευτικό αποτέλεσμα θα μπορούσε να σχετίζεται και με την καλύτερη διατροφική κατάσταση στην οποία βρίσκονται οι ιδιοκτήτες βοοειδών (Le Pont, 1994, Desjeux, 2001).

A.

B.

Γ.

<u>Εικόνα 7</u>: Α. Συνθήκες διαβίωσης στις χώρες που ενδημούν οι «παραμελημένες τροπικές νόσοι» (NTD's)(πηγή: The gender dimensions of NTD's, 2019), Β. Οικίες ασθενών με CL στη Σρι Λάνκα (πηγή: Wijerathna et al., 2018),Γ. Υπόστεγα βοοειδών δίπλα στις οικίες στην Ινδία (πηγή: Desjeux 2001).

1.13.2 Ανθρωπογενείς Παράγοντες

Παραδοσιακά, οι λεϊσμανιάσεις αποτελούσαν κυρίως ασθένειες που σχετίζονταν με συγκεκριμένες δραστηριότητες όπως η χύτευση καουτσούκ, οι στρατιωτικές αποστολές και η κατασκευή δρόμων.

Όσον αφορά τους τουρίστες που παραθερίζουν σε φυσικά καταφύγια συχνά δεν λαμβάνουν την κατάλληλη προστασία από τσιμπήματα, με αποτέλεσμα καταγράφονται όλο και περισσότερο δερματικές βλάβες που προκαλούνται από διαφορετικά είδη *Leishmania* (Gradoni, 2018, Ahluwalia et al., 2003).

Λόγω της στενής αλλά σύνθετης σχέσης της λεϊσμανίασης με τη φτώχεια, έχει χαρακτηριστεί ως «νόσος της φτώχειας». Είναι αποδεδειγμένο πως το βάρος της νόσου άπτεται δυσανάλογα στα φτωχότερα τμήματα του παγκόσμιου πληθυσμού, τα οποία αντιμετωπίζουν δυσκολία πρόσβασης στο επίσημο σύστημα υγειονομικής περίθαλψης σε ποσοστό άνω του 50% των ασθενών παρεμποδίζοντας έτσι την έγκαιρη διάγνωση και την κατάλληλη θεραπεία (Alvar et al., 2006). Οι συνθήκες διαβίωσης των φτωχότερων πληθυσμών, όπως η συγκατοίκηση μεγάλου αριθμού ανθρώπων σε μικρά δωμάτια παρέχει μία μεγάλη βιομάζα που προσελκύει τις φλεβοτόμους (Ansteadet al., 2001). Επιπροσθέτως, η έλλειψη μέτρων προσωπικής προστασίας και συνήθειες όπως ο ύπνος σε εξωτερικό χώρο καθιστούν τους ανθρώπους ευάλωτους στη μόλυνση από *Leishmania* (Ranjan et al., 2005). Ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας κινδύνου ανθρωπονοτικής δερματικής λεϊσμανίασης (ACL) είναι η μετανάστευση από τις αγροτικές περιοχές σε φτωχά προάστια αστικών περιοχών (αστικοποίηση) εξαιτίας ποικίλων αιτιών (οικονομικές, κοινωνικές, πολιτιστικές, θρησκευτικές, πόλεμοι). Εάν η μετανάστευση είναι εποχική και διαρκεί μόνο για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, τότε και κατά την επιστροφή των μεταναστών από την πόλη στα χωριά τους αυξάνεται ο κίνδυνος διάδοσης της ACL (Daulaire, 1999).

Η κακή διατροφή κυρίως λόγω ανεπαρκούς πρόσληψης θρεπτικών συστατικών δύναται επιπλέον να εντείνει τη νοσηρότητα, τη θνησιμότητα και τη γενικότερη εξέλιξη της νόσου και παρατηρείται κυρίως σε παιδιά και στις γυναίκες κατά τη διάρκεια κυοφορίας και γαλουχίας. Τα παραπάνω άτομα, των οποίων η διατροφή είναι φτωχή, σε περίπτωση μόλυνσης από το παράσιτο της *Leishmania*, έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα εξέλιξης της μόλυνσης σε καλα-αζάρ (Harrison et al., 1986, Cerf et al., 1987).

Η νόσος συμβαδίζει και με τον αναλφαβητισμό και με χαμηλότερα επίπεδα εκπαίδευση. Στις περιπτώσεις αυτές παρατηρείται αδυναμία αναγνώρισης της νόσου και κατανόησης των διαδικασιών που πρέπει να ακολουθηθούν. Έτσι κατά την αναζήτηση φροντίδας για την AVL, οι κάτοικοι των φτωχών κοινοτήτων τείνουν να εφαρμόζουν την εξής ιεραρχική δομή στις αποφάσεις τους: απευθύνονται πρώτα στους τοπικούς ανειδίκευτους ιατρούς ή στους θρησκευτικούς θεραπευτές, ενώ το επίσημο σύστημα υγειονομικής περίθαλψης αποτελεί την τελευταία τους επιλογή και μόνο όταν η σοβαρότητα της νόσου είναι βέβαιη. Ειδικά για τη δερματική λεϊσμανίαση, εφαρμόζεται μια ευρεία ποικιλία από σπιτικές θεραπευτικές αγωγές- γιατροσόφια, όπως το οξύ μπαταρίας, το πετρέλαιο και ο καυτηριασμός με φωτιά γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε πολύ χειρότερα σημάδια από ό,τι η παντελής απουσία στην εφαρμογή θεραπείας (Weigel and Armijos, 2001).

1.14 Διάγνωση

Υπάρχει πιθανότητα σύγχυσης της σπλαχνικής μορφής της λεϊσμανίασης με άλλες νόσους όπως η ελονοσία, η τροπική σπληνομεγαλία, η σχιστοσωμίαση, η αφρικανική τρυπανοσωμίαση, η φυματίωση, η βρουκέλλωση, ο τυφοειδής πυρετός, η βακτηριακή ενδοκαρδίτιδα, η ιστοπλάσμωση, τα αυτοάνοσα νοσήματα, το λέμφωμα και τη λευχαιμία. Γι αυτό είναι επιτακτική η ανάγκη διαφοροποίησης της με αποτελεσματικές διαγνωστικές μεθόδους (Singh et al., 2003). Η διάγνωση της λεϊσμανίασης βασίζεται κυρίως στην κλινική εξέταση και επιβεβαιώνεται με την εντόπιση των ιδίων των παρασίτων ή του DNA αυτών, σε δείγματα μολυσμένων ιστών (αίμα, δέρμα, σπλήνας, λεμφαδένες και μυελός των

οστών). Η επιβεβαίωσή της διάγνωσης επιτυγχάνεται με εξειδικευμένες παρασιτολογικές εξετάσεις όπως η καλλιέργεια και η μικροσκόπηση όσον αφορά τον εντοπισμό των παρασίτων, καθώς και με ορολογικές και μοριακές μεθόδους. Η διάγνωση των υποκλινικών αυτοϊάσιμων περιπτώσεων VL, επιτυγχάνεται με το συνδυασμό ορολογικών και δερματικών δοκιμασιών. Επιπλέον, η αναγνώριση της ασυμπτωματικής λοίμωξης σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς καθώς και σε όσους λαμβάνουν ανοσορρυθμιστική αγωγή, είναι χρήσιμη για τη διαχείριση και για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των μέτρων ελέγχου των ασθενειών (Gomes Salles Tiburcio et al., 2013).

Μικροσκοπική εξέταση: ο εντοπισμός του παρασίτου επιτυγχάνεται σε επιχρίσματα κυτταρολογικού υλικού με χρώση Giemsa. Για τη δερματική λεϊσμανίαση λαμβάνεται επίχρισμα ή υλικό βιοψίας από τη βλάβη. Για τη σπλαχνική λεϊσμανίαση πραγματοποιείται είτε βιοψία, εξέταση δι' αναρροφήσεως με λεπτή βελόνη (FNA), είτε από το σπλήνα, το ήπαρ, τους λεμφαδένες, ή το μυελό των οστών (Singh et al., 2005, Akhoundi et al., 2013). Οι παραπάνω μέθοδοι, αν και απλές παραμένουν επεμβατικές. Συνήθως, στα νοσοκομεία των ενδημικών περιοχών δεν υπάρχουν εγκαταστάσεις για την εκτέλεση και την ανάγνωση των αποτελεσμάτων (Desjeux, 2004). Ωστόσο, σε αρκετές περιοχές, εξακολουθούν να αποτελούν μια χρήσιμη διαγνωστική προσέγγιση για την Πρωτοβάθμια Υγειονομική Περίθαλψη λόγω της οικονομικής αποδοτικότητας και της ταχύτητάς τους (Akhoundi et al., 2016). Σε άτομα με συλλοίμωξη *Leishmania*/HIV, πραγματοποιείται παρατήρηση των αμαστιγωτών μορφών σε επίχρισμα σπληνός και μυελού των οστών. Ακόμη, η ανίχνευση παρασιταιμίας (αμαστιγωτών μορφών) στο υπερκείμενο περιφερικού αίματος (Buffy coat) αν και εφαρμόζεται σπάνια στους ανοσοεπαρκείς είναι συχνή στα άτομα αυτά και σε ασθενείς που λαμβάνουν ανοσοκατασταλτική θεραπεία, γι αυτό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν διαγνωστικό εργαλείο (Martinez et al., 1993, Maggi et al., 2004).

Ορολογικές δοκιμασίες:

Ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA (Enzyme- Linked Immunosorbent Assay): στην ELISA χρησιμοποιείται διαλυτό αντιγόνο το οποίο προσδίδει στη μέθοδο μεγαλύτερη ειδικότητα και ευελιξία με σκοπό την ανίχνευση των αντισωμάτων έναντι του παρασίτου στον ορό των ασθενών. Με αυτή τη λογική αναπτύχθηκαν και αντίστοιχα κιτ ELISA (Singh, 2006). Η ανοσολογική διάγνωση είναι η απλούστερη και η πλέον χρησιμοποιούμενη διαγνωστική μέθοδος (Sundar and Rai, 2002).

Έμμεσος Ανοσοφθορισμός, IFA (Indirect Fluorescence Antibody): είναι μία από τις συνήθεις δοκιμές που στοχεύει στην ανίχνευση αντισωμάτων έναντι της *Leishmania*, στον ορό του ασθενούς. Στη δοκιμασία αυτή χρησιμοποιούνται σταθερές προμαστιγωτές μορφές και φθορίζοντα anti-Ab *Leishmania*. Βασίζεται στην ανίχνευση αντισωμάτων, τα οποία εμφανίζονται στα πολύ πρώιμα στάδια της μόλυνσης (IgM) και είναι μη ανιχνεύσιμα 6 έως 9 μήνες μετά θεραπεία (Boelaert et al., 2004, Singh et al., 2005).

Άμεσος Ανοσοφθορισμός, DFA (Direct Fluorescence Antibody): στοχεύει στην ανίχνευση του αντιγόνου (αμαστιγωτά) που προέρχονται από τομές ιστών ή επιχρίσματα ασθενών. Ως ιχνηθέτες, χρησιμοποιούνται αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσα χρωστική. Η μέθοδος αυτή είναι πιο χρήσιμη στη διάγνωση των CL, MCL και PKDL .

Άμεση Οροσυγκόλληση, DAT (Direct Agglutination Test): για μεγάλο χρονικό διάστημα η DAT παρέμεινε διαγνωστικό εργαλείο πρώτης γραμμής σε φτωχές χώρες λόγω του

κόστους και της απλότητας στην εκτέλεση. Η μέθοδος αυτή έχει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα και βασίζεται στην ανίχνευση αντιλεϊσμανιακών αντισωμάτων σε δείγματα ορού και αίματος που συλλέγονται σε διηθητικό χαρτί (Liarte et al., 2001, Tavares et al., 2003).

Οι ορολογικές IFA και DAT χρησιμοποιούν ως πηγή αντιγόνου ολόκληρα παράσιτα και είναι αρκετά επιτυχημένες τις τελευταίες δεκαετίες αν και η χρησιμοποίηση των παρασίτων τις καθιστά λιγότερο ειδικές. Από τις δύο προαναφερθείσες όμως, καμία δεν είναι χρήσιμη για δερματική και βλεννογονοδερματική λεϊσμανίαση. Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως τα αντισώματα τείνουν να είναι μη ανιχνεύσιμα ή βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα λόγω κακής χυμικής απόκρισης (Amaral et al., 2000, Ahluwalia et al., 2004)

Ανοσοχρωματογραφικές ταινίες: τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί πλήθος ορολογικών τεστ με τη χρήση ανοσοχρωματογραφικών ταινιών οι οποίες βασίζονται στην ανίχνευση του ακινητοποιημένου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης αντιγόνου rk39 (υπερεκφράζεται από τις αμαστιγωτές μορφές) από τα αντισώματα του ορού του ασθενούς. Η ειδικότητα τους κυμαίνεται μεταξύ 88-100% (Sundar and Rai, 2002).

Ενδοδερμικές δοκιμασίες: τα *Leishmania* skin test (LST) και Montenegro Test μετρούν την αντίδραση καθυστερημένης υπερευαισθησίας (DTH) έπειτα από την ενδοδερμική ένεση εναιωρήματος νεκρών προμαστιγωτών παρασίτων *Leishmania*. Είναι ένα χρήσιμο και σημαντικό εργαλείο λόγω της απλότητας, της ευαισθησίας και της ειδικότητάς του. Ωστόσο, δεν επιτρέπει την ταυτοποίηση των ειδών *Leishmania* και δεν κάνει διάκριση μεταξύ παρελθοντικών και τρεχόντων λοιμώξεων (Weigle et al., 1991).

Καλλιέργεια προμαστιγωτών μορφών: η καλλιέργεια πραγματοποιείται ύστερα από λήψη υλικού από το δέρμα, τους βλεννογόνους ή τα λεμφογάγγλια. Δυστυχώς, η ανάκτηση των παρασίτων σε καλλιέργεια σπάνια ξεπερνά το 70%, ακόμη και για στελέχη που διατηρούνται εύκολα *in vitro*. Αποτελεί χρονοβόρα και ακριβή μέθοδο που απαιτεί μια εξελιγμένη εργαστηριακή εγκατάσταση. Από την άλλη πλευρά, οι καλλιέργειες παρασίτων αξιοποιούνται σε ορισμένες μεθόδους όπου με βάση το DNA και τις πρωτεΐνες τους γίνεται διάκριση μεταξύ των ειδών *Leishmania* (Berman, 1997).

Ανίχνευση γενετικού υλικού παρασίτου: η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, PCR (Polymerase Chain Reaction) θεωρείται περισσότερο ευαίσθητη (μπορεί να φτάσει το 100% με τους κατάλληλους εκκινητές) και ειδική σε σχέση με τις μεθόδους μικροσκόπησης, οι οποίες απαιτούν εξειδικευμένο και έμπειρο προσωπικό για την παρατήρηση και επεξεργασία των δειγμάτων. Σημαντικό μειονέκτημα της PCR είναι το υψηλό κόστος, η διαθεσιμότητα σε αντιδραστήρια και εξοπλισμό και η δυσκολία εφαρμογής σε μελέτες πεδίου (Sundar et al., 1998). Μοριακές τεχνικές όπως η PCR-RLFP (Restriction Fragment Length Polymorphism), η μέθοδος της ισοενζυμικής πολυεστιακής ηλεκτροφόρησης (MLEE, Multilocus Enzyme Electrophoresis) και η αλληλούχιση παρέχουν τη δυνατότητα διαχωρισμού των ειδών *Leishmania*, πράγμα χρήσιμο σε επιδημιολογικό και κλινικό επίπεδο στις ενδημικές περιοχές όπου παρατηρείται πάνω από ένα είδος του παρασίτου (Sundar and Rai, 2002).

1.15 Θεραπευτική αντιμετώπιση

Το μεγάλο όπλο ενάντια στη λεϊσμανία είναι η φαρμακευτική αγωγή η οποία βασίζεται στη χρήση λεϊσμανιοκτόνων ή λεϊσμανιοστατικών φαρμάκων. Η επιλογή του σχήματος καθορίζεται από τη βαρύτητα του νοσήματος και από το είδος της *Leishmania*. Επίσης,

επηρεάζεται από τη διαθεσιμότητα του φαρμάκου στην εκάστοτε χώρα, αλλά και την εμπειρία του ιατρικού προσωπικού. Ο έλεγχος της λοίμωξης βασίζεται σε Πρώτης και Δεύτερης Γραμμής χημειοθεραπευτικά σχήματα (Kumari et al., 2008).

Πέραν των παραπάνω, τα τελευταία χρόνια πραγματοποιούνται κλινικές δοκιμές μικρής κλίμακας εστιάζοντας στις εφαρμογές χημειοθεραπείας σε συνδυασμό με 30 ανοσοπαρεμβατικές μεθόδους. Άλλες προσεγγίσεις που αφορούν τη θεραπευτική αντιμετώπιση της λεϊσμανίασης αφορούν χορήγηση κυτταροκινών όπως η IFN-γ, η IL-2 και ο GM-CSF, εστιάζουν στην παρεμπόδιση της επαγόμενης από τον TNF φλεγμονής και την τοπική χορήγηση ανοσορυθμιστικών μορίων (Murray et al., 2005).

Πρώτης Γραμμής: σε αυτά συμπεριλαμβάνονται τα άλατα πεντασθενούς αντιμονίου (SbV) τα οποία είναι ευρεως χρησιμοποιούμενα όπως το Pentostam (Sodium Stibogluconate), το Solustibosan και το Glucantime (Meglumine Antimoniate). Αναπτύχθηκαν το 1945, και παραμένουν η θεραπεία πρώτης επιλογής για τη σπλαχνική και τη δερματική λεϊσμανίαση στα περισσότερα μέρη του κόσμου. Χορηγούνται παρεντερικά για 20 ή περισσότερες ημέρες, αλλά έχουν υψηλή τοξικότητα. Για τα φάρμακα αυτά αναφέρονται παρενέργειες όπως πόνος στους σκελετικούς μύες, ναυτία, έμετος, διάρροια, κοιλιακό άλγος, κεφαλαλγία, ανορεξία, αδυναμία, κόπωση, πυρετός, εξάνθημα, ερύθημα και κνίδωση (Fernández—Guerrero et al., 2004).

Δεύτερης Γραμμής: σε αυτά ανήκουν η Μιλτεφοσίνη, η Πενταμιδίνη , η λιποσωμική Αμφοτερικίνη Β (σε λιποσώματα) και το Cohleates, το οποίο περιορίζεται στις εκβιομηχανοποιημένες χώρες λόγω του υψηλού του κόστους. Σε αυτή την κατηγορία συμπεριλαμβάνονται και τα λεϊσμανιοστατικά: Αλλοπουρινόλη, Αμινοσιδίνη και Παρομομυκίνη. Η χορήγησή τους γίνεται σε συνδυασμό και με άλλα σκευάσματα (Desjeux, 2004).

Αμφοτερικίνη Β (AmB): αποτελεί μία χαμηλότερης τοξικότητας θεραπευτική αντιμετώπιση για τις μυκητιασικές λοιμώξεις και έχει επιστρατευτεί για την θεραπεία της λεϊσμανίασης. Λόγω της χαμηλής της διαλυτότητας δεν απορροφάται από το γαστρεντερικό σωλήνα, εξ' ου και η χορήγησή της πραγματοποιείται με αργή ενδοφλέβια έγχυση (παρεντερική χορήγηση), καθιστώντας μακροχρόνιες τη απαιτούμενη νοσηλεία όσο και τη χορήγησή της (Müller et al., 2001, Patra et al., 2012). Η λιποσωμική Αμφοτερικίνη Β (AmBisome) χαρακτηρίζεται ως η βελτιωμένη της μορφή όπου έχει μεταπηδήσει στην πρώτη γραμμή έναντι της VL σε Ευρώπη και ΗΠΑ. Η συγκεκριμένη ουσία παρουσιάζει υψηλά ποσοστά ίασης και λιγότερες παρενέργειες ενώ το κόστος της παραμένει υψηλό, καθιστώντας την απαγορευτική στις αναπτυσσόμενες χώρες (Bern et al., 2006, Sundar et al., 2010, Patra et al., 2012).

Πενταμιδίνη: εφαρμόζεται κυρίως για τη θεραπεία της VL και σε ορισμένες συνδυαστικές στρατηγικές. Στην Ινδία, η μειωμένη αποτελεσματικότητά της και ο υψηλός κίνδυνος αντοχής έχουν οδηγήσει στην αναστολή χρήσης της (Das et al., 2001). Η χορήγηση της πενταμιδίνης πραγματοποιείται ενδοφλεβίως και απαιτείται εντατική παρατήρηση των ασθενών που τη λαμβάνουν, λόγω του μεγάλου εύρους ανεπιθύμητων ενεργειών που παρουσιάζει (McGwire and Satoskar, 2013).

Μιλτεφοσίνη: είναι ένα αλκυλφωσφολιπίδιο, το οποίο χρησιμοποιείτο έναντι των νεοπλασμάτων (καρκίνος του δέρματος). Η μιλτεφοσίνη αποτέλεσε την πρώτη εκ του στόματος θεραπεία της σπλαχνικής λεϊσμανίασης, η χορήγηση της οποίας πρέπει να

αποφεύγεται σε εγκύους, εξαιτίας ορισμένων αναφορών πρόκλησης τερατογένεσης (McGwire and Satoskar, 2013).

Η μιλτεφοσίνη μαζί με τη σιταμικίνη (Sitamaquine) και τις αντιμυκητιασικές αζόλες (ketonazole, fluconazole, *itraconazole*) είναι οι νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις έναντι της VL. Η σιταμακίνη, χημικώς 8-αμινοκινολίνη, είναι το μοναδικό φαρμακευτικό σκεύασμα που αναπτύχθηκε στοχευμένα για τη θεραπεία της VL με χορήγηση εκ του στόματος (Sundar and Chatterjee, 2006). Ωστόσο, οι παραπάνω ανακαλύψεις των τελευταίων ετών, παρά την υψηλή αποτελεσματικότητά τους, παρουσιάζουν επίσης σοβαρές παρενέργειες (Bunney and Katan, 2011).

Cochleates: βασίζεται σε ένα σύστημα μεταφοράς σε λιπιδικά σωματίδια, παρέχοντας τη δυνατότητα σε φάρμακα όπως η αμφοτερικίνη να χορηγηθούν από το στόμα (Santangelo et al., 2000).

Παρομομυκίνη: είναι ένα αντιβιοτικό φαρμακο το οποίο αποτελεί τη μοναδική αμινογλυκοσίδη με κλινικά σημαντική δράση τόσο για τη VL και τη CL. Η παρομομυκίνη χορηγείται παρεντερικά ή τοπικά, λόγω της μειωμένης εκ του στόματος απορροφητικότητας. Η περιορισμένη διαθεσιμότητά της στις ενδημικές περιοχές έχει σαν αποτέλεσμα και την περιορισμένη χρήση της, ενώ οι παρενέργειες από τη συστηματική χρήση είναι παρόμοιες με αυτές άλλων αμινογλυκοσίδων (κυτταροτοξικότητα, αστάθεια από το αιθουσαίο και νεφροτοξικότητα) (Thakur CP et al., 2000, Thakur BB, 2003).

1.16 Εμπόδια στην εφαρμογή της αγωγής

Παρά τη σημαντική πρόοδο που έχει σημειωθεί τα τελευταία χρόνια σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα έναντι της λεϊσμανίασης εμφανίζονται σημαντικά μειονεκτήματα μεταξύ των οποίων η τοξικότητα, οι επακόλουθες παρενέργειες καθώς και η κακή συμμόρφωση από πλευράς του ασθενούς λόγω της απαιτούμενης καθημερινής συστηματικής (ενδοφλέβια ή ενδομυϊκή) χορήγησης των αγωγών για περιόδους που κυμαίνονται από 3 έως 5 εβδομάδες. Άλλοι περιορισμοί εξίσου σημαντικοί είναι το κόστος εξαιτίας και η οικονομική κατάσταση των ασθενών, η αποτελεσματικότητα που εξαρτάται από παράγοντες όπως η ανοσολογική κατάστασης του ασθενή και φυσικά η ολοένα αυξανόμενη πιθανότητα ανάπτυξης αντίστασης (Singh et al.,2012, Mcguire and Satoskar,2013).

Σε πολλές χώρες έχει παρατηρηθεί και η ανεξέλεγκτη χορήγηση η οποία οδηγεί σε μείωση της απόδοσης της θεραπείας και μακροπρόθεσμα ανάπτυξη αντίστασης του παρασίτου(denBoer et al., 2011).

1.16.2 Ανάπτυξη Αντοχής

Έχει παρατηρηθεί πως παράσιτα με μειωμένη ευαισθησία έναντι των φαρμάκων σχετίζονται με την αποτυχία της θεραπείας. Η κύρια θεραπευτική αντιμετώπιση ενώ εξακολουθεί να βασίζεται στη χρήση του SbV, έχει πλέον χαρακτηριστεί ως ’’απαρχαιωμένη’’ καθώς έχει συνδεθεί με την ολοένα αυξανόμενη αντίσταση των παρασίτων σε αρκετές γεωγραφικές περιοχές (Desjeux, 2004). Σε χώρες όπως η Ινδία και η Κένυα έχουν εγκαταλειφθεί ήδη από το 1980 και 1970 αντίστοιχα, λόγω της ευρείας ανθεκτικότητας των παρασίτων στις ουσίες με αντιμόνιο (Croft, 2001, Croft et al., 2006).

Στην Ινδία, σε εστίες αποκλειστικής χορήγησης του SbV, η επιδημία μετατρέπεται σε ενδημικό φαινόμενο ενώ αποτελεί χαρακτηριστικό της εντατικής μετάδοσης της *L. donovani* στον άνθρωπο (Hepburn, 2000).

1.17 Εμβόλιο

Μέχρι στιγμής δεν υπάρχει εμβόλιο έναντι της VL για τον άνθρωπο, παρά τις ενδείξεις για δυνατότητα ανάπτυξης φυσικής ανοσίας από τον οργανισμό. Η ανάγκη για την ανάπτυξη ενός εμβολίου είναι επιτακτική για τους εξής λόγους: α) την ολοένα αυξανόμενη αντοχή του παρασίτου, β) την τοξικότητα της χημειοθεραπείας και γ) την αυξημένη επίπτωση της νόσου σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα (Palatnik-de-Sousa, 2008). Η ικανότητα του παρασίτου να τροποποιεί την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή καθιστά δύσκολο τον σχεδιασμό ενός αποτελεσματικού εμβολίου (Podinovskaia et al., 2015).

1.18 Άλλες στρατηγικές αντιμετώπισης

Η απουσία του εμβολίου καθώς και τα μειονεκτήματα που παρατηρούνται στη φαρμακευτική αγωγή έχουν οδηγήσει στην επιστράτευση μεθόδων που στοχεύουν στη μείωση της επαφής ανθρώπου-διαβιβαστή. Ως εκ τούτου, πέραν της θεραπευτικής αντιμετώπισης ορισμένες χώρες παρέχουν διαφορετικές στρατηγικές ελέγχου των δεξαμενών (ζώα) και των διαβιβαστών (φλεβοτόμοι). Σε κάποιες χώρες όπως η Κίνα χρησιμοποιούνται μέθοδοι όπως η εξόντωση των μολυσμένων σκύλων και η χρήση δηλητηριασμένων δολωμάτων στο πλαίσιο ελέγχου των ζώων (animal control) (Sharma and Singh, 2008, WHO, 2010).

Στην Ελλάδα, το Π.Δ 400/83 άρθρο 9 παρ 4.5 καθιστά ως μέτρο πρόληψης της νόσου την υποχρεωτική την ευθανασία των σκύλων που έχουν διαγνωστεί με λεϊσμανίαση. Το μέτρο πλέον δεν εφαρμόζεται λόγω της αντίδρασης από πλευράς ιδιοκτητών και κτηνιάτρων και χάρη στην ικανοποιητική, πλέον αντιμετώπιση της νόσου (Otranto and Dantas-Torres, 2013).

Σημαντικό μέτρο ελέγχου αποτελεί η προστασία των σκύλων στις ενδημικές περιοχές. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω εφαρμογής συστηματικής εντομοαπώθησης κατά την περίοδο δραστηριότητας των φλεβοτόμων (από τον Μάιο έως τον Νοέμβριο), την έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία των ζώων που νοσούν και εφαρμογή προληπτικού εμβολιασμού. Ο έλεγχος των τρωκτικών επιτυγχάνεται μέσω περιβαλλοντικής διαχείρισης αν και είναι δαπανηρός και δύσκολος στην εφαρμογή (WHO, 1996).

1.18.1 Έλεγχος Διαβιβαστών

Χημικός έλεγχος: οι κύριες μέθοδοι χημικού ελέγχου για την καταπολέμηση της φλεβοτόμου είναι ο ψεκασμός εντομοκτόνων σε εσωτερικούς χώρους, η χρήση υφασμάτων εμποτισμένων με εντομοκτόνα όπως σεντόνια, κουρτίνες και κουνουπιέρες και η προσωπική προστασία μέσω εφαρμογής απωθητικών στο δέρμα. Μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος χημικού ελέγχου είναι η χρήση συνθετικών φερομονών για την προσέλκυση ενηλίκων φλεβοτόμων σε παγίδες (WHO, 2010, Kishore et al., 2006). Όσον αφορά τους ταξιδιώτες συνίσταται, πέραν των κατάλληλων υφασμάτων, και η χρήση κολάρων εμποτισμένων με απωθητικά για τα κατοικίδια (Reithinger, 2005). Ο ψεκασμός αν και αποτελεσματικός ενέχει λογικούς περιορισμούς και υψηλό κόστος, ενώ η διακοπή στις

εκστρατείες ψεκασμού οδηγεί στην επανεμφάνιση της λεϊσμανίασης (Desjeux, 2004). Επιπλέον παρατηρούνται ελάχιστες κουνουπιέρες διότι ξεπερνούν τις οικονομικές δυνατότητες των κατοίκων των χωριών σε πολλές ενδημικές χώρες. Στο Αφγανιστάν για παράδειγμα, το 78% των ερωτηθέντων δήλωσαν ότι δεν έχουν την οικονομική δυνατότητα ούτε να αγοράσουν κρεβάτι (Alvar et al., 2006).

Περιβαλλοντικός έλεγχος: στο πλαίσιο του τεχνολογικού έλεγχου των φλεβοτόμων, είναι δυνατή η επικάλυψη των τοιχωμάτων των οικημάτων και η πλήρωση των ρωγμών με λάσπη και ασβέστη καθώς αποτελούν τους χώρους ανάπαυσης και αναπαραγωγής των διαβιβαστών (WHO, 2010).

1.19 Εναλλακτικές μορφές Θεραπείας της Λεϊσμανίασης

Είναι γενικώς αποδεκτό πως οι ισχύουσες θεραπευτικές αγωγές έναντι του παρασίτου *Leishmania* έχουν περιορισμένη αποτελεσματικότητα. Ως εκ τούτου, αποτελεί άμεση προτεραιότητα για τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας να αναπτυχθούν νέες, αποτελεσματικότερες θεραπείες για την αντιμετώπιση του παρασίτου (WHO,2010). Στα πλαίσια αναζήτησης νέων φαρμάκων το ενδιαφέρον των επιστημόνων έχει στραφεί και σε εναλλακτικές μορφές θεραπευτικών αγωγών πέραν της συμβατικής ιατρικής του Δυτικού Κόσμου.

Για αιώνες οι φυσικές ουσίες και ιδιαιτέρως τα φυτά, χρησιμοποιούνταν από την παραδοσιακή ιατρική για τη θεραπευτική αντιμετώπιση ασθενειών (Soejarto et al., 1989). Το έγγραφο «Ebers Papyrus», χρονολογείται από το 1500 π.Χ. και αποτελεί το πρώτο πιο γνωστό αρχείο της αιγυπτιακής φαρμακευτικής πρακτικής, στο οποίο περιγράφονται περισσότερα από 700 φάρμακα, κυρίως φυτικής προέλευσης να χορηγούνται σε πόσιμη μορφή ή σε τοπικά επιθέματα (Tyler et al., 1998). Το 78 μ.Χ. ο Διοσκουρίδης τεκμηρίωσε επισήμως για πρώτη φορά τη φαρμακευτική χρήση των φυσικών ουσιών και από τότε μέχρι και σήμερα, χιλιάδες φαρμακευτικά φυτά που περιγράφηκαν τότε παρέμειναν στη σύγχρονη ιατρική (Newman and Cragg, 2007).

Μετά από μια μακρά περίοδο παραμέλησης, υπήρξε ένα ανανεωμένο ενδιαφέρον για την ανάλυση των φυσικών προϊόντων με στόχο να βρεθούν αναστολείς ενζύμων απαραίτητοι για την κυτταρική αναπαραγωγή, τη ρύθμιση κυτταρικού κύκλου κ.ά.(Kayser et al. 2003a, Salem and Werbovetz 2006). Υπάρχουν περίπου 250.000 είδη φυτών παγκοσμίως από τα οποία έχει μελετηθεί μόνο ένα μέρος μέχρι σήμερα, υποδεικνύοντας ισχυρές χημειοθεραπευτικές ιδιότητες. Μερικά παραδείγματα φυτικών παρασκευασμάτων εμφανίζουν ιδιότητες αντιβακτηριακές (Hedge et al., 2004, Datar, et al., 2010), αντιφιλαριασικές (Maurya et al., 2015), αντιμυκητιασικές (Navarro et al., 2003), ανθελονοσιακές (Misra et al., 2013) αντιφλεγμονώδεις και αναλγητικές (Ferrante et al., 1990 Navarro et al., 2003) και είναι: το εκχύλισμα banderol από το φλοιό του δέντρου *Otoba parvifolia (Myristicaceae)* και το σκεύασμα samento που προέρχεται από το φλοιό του φυτού *Uncaria guianensis (Rubiaceae),* τα οποία παρουσιάζουν αντιβακτηριακή δράση έναντι της *Borrelia burgdorferi* (Datar, et al., 2010). Ακόμη, το *samento* είναι γνωστό για τις αντιοξειδωτικές του δράσεις χρησιμοποιείται έναντι του μύκητα *Candida albicans* (Navarro et al., 2003). Το εκχύλισμα από τα φύλλα του *Andrographis paniculata* (*Acanthaceae),* το οποίο είναι επίσης γνωστό για την αντιοξειδωτική του δράση, έχει εμφανίσει ανθελονοσιακή δράση έναντι του *Plasmodium berghei* (Misra et al., 2013), καθώς και αντιφιλαριασική δράση (Maurya et al., 2015). Τα υδατικά μεθανολικά εκχυλίσματα του φυτού *Polygonum cuspidatum* εμφανίζουν αντιβακτηριακή δράση *(Polygonaceae)* (Hedge et

al., 2004) και οι ρίζες του φυτού Smilax officinalis (Smilacaceae) παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες έναντι του βακτηρίου *Borellia burgdorferi* (Navarro et al., 2003). Όλα τα παραπάνω φυτικά σκευάσματα, έχουν χρησιμοποιηθεί, επίσης για την αντιμετώπιση του βακτηρίου *Borrelia burgdorferi* και άλλα σύνδρομα, όπως όπως είναι το σύνδρομο χρόνιου πόνου, ο οδοντικός πόνος, σοβαρές ημικρανίες, και σύνδρομα που περιλαμβάνουν: το γαστρεντερικό σωλήνα (σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου, φλεγμονώδης νόσος του εντέρου) και την ουρογεννητική οδό (διάμεση κυστίτιδα, κολπική νευραλγία) (Liebert, 2012). Η αρτεμισινίνη αποτελεί τη φαρμακευτικώς δραστική ουσία που προέρχεται από τα φύλλα του εκχυλίσματος του φυτού Αρτεμισία το αψίνθιο (*Artemisia Absinthium*). Τα φαρμακευτικά σκευάσματα που βασίζονται στην αρτεμισινίνη ανήκουν στα φάρμακα πρώτης γραμμής για τη θεραπεία της ελονοσίας που προκαλειται από *Plasmodium falciparum*. Σε αντίθεση με τη κινίνη, αλλά και άλλα συνθετικά ανθελονοσιακά φάρμακα, η αρτεμισινίνη δεν περιέχει στο μόριό της άζωτο (δεν είναι αλκαλοειδές, αλλά τερπενική ένωση) και η τοξικότητά της είναι συγκριτικά ελάχιστη. Για την ανακάλυψη της αρτεμισινίνης, τη σύνθεση του παραγώγου της (διϋδροαρτεμισινίνης ή αρτεμινόλης) και τη μελέτη των ανθελονοσιακών ιδιοτήτων τους η Κινέζα ερευνήτρια-φαρμακοποιός Tu You you τιμήθηκε το 2011 με το βραβείο Lasker στη Φαρμακευτική Χημεία, αφού χάρις στα φάρμακα αυτά σώθηκε η ζωή εκατομμυρίων ασθενών. (Liao, 2009).

Τα φυτικά εκχυλίσματα του *Andrographis paniculata (*AP) και του *Hedyotis corymbosa* (HC) είναι γνωστά για την ηπατοπροστατευτική και την αντιπυρετική τους δράση από την αρχαιότητα και χρησιμοποιούνται στη νότια Ασία. Τα μεθανολικά εκχυλίσματα αυτών των δύο φυτών εξετάστηκαν για την ανθελονοσιακή τους δράση *in vivo* έναντι του *Plasmodium berghei*, το οποίο προκαλεί ελονοσία στα τρωκτικά και *in vitro* έναντι ευαίσθητων στη χλωροκίνη (MRC-pf-20) και ανθεκτικών (MRC-pf-303) στελεχών *Plasmodium falciparum*, το οποίο είναι υπεύθυνο για την πρόκληση ελονοσίας στον άνθρωπο. Αυτά τα δύο φυτικά εκχυλίσματα ελέγχθηκαν ξεχωριστά αλλά και σε συνδυασμό και παρουσίασαν ανθελονοσιακή δράση *in vitro* και *in vivo* (Mishra et al., 2009). Τα αποτελέσματα της δράσης τους ήταν συγκρίσιμα με αυτά της κουρκουμίνης η οποία προέρχεται από τις ρίζες του φυτού *Curcuma longa* (Zingiberaceae), της οποίας η ανθελονοσιακή δράση είναι αποδεδειγμένη (Mishra et al., 2009) Ο νηματώδης σκώληκας *Onchocerca ochengi*, που προκαλεί τη φιλαρίαση των βοοειδών μελετήθηκε από τον Ndjonka και συν. και παρουσίασαν πως τα αιθανολικά εκχυλίσματα του φλοιού των φυτών *Anogeissus leiocarpus (Combretaceae)* και *Khaya senegalensis (Meliaceae)* καθώς και τα φύλλα του *K. senegalensis* και του φυτού *Euphorbia hirta (Euphorbiaciaea)* εμφανίζουν υψηλές μακρο και μικρο-αντιφιλαριασικές δράσεις (Ndjonka et al., 2011). Τα προϊόντα φυσικής προέλευσης θα μπορούσαν να αποτελέσουν μία πολύτιμη πηγή νέων χημειοθεραπευτικών συστατικών στη σύγχρονη ιατρική και ιδίως να συμβάλλουν στην ανάπτυξη νέων αντιπαρασιτικών σκευασμάτων με μεγαλύτερη δραστικότητα και μικρότερη τοξικότητα σε σχέση με τις υπάρχουσες θεραπευτικές αγωγές (Tiuman et al., 2011, Cheuka et al., 2017). Η συνδυασμένη χορήγηση προϊόντων φυτικής προέλευσης με τα ήδη υπάρχοντα αντιβιοτικά και τις συνθετικές θεραπευτικές ουσίες διερευνάται ώστε να διαπιστωθεί αν αυξάνει τη δραστικότητά τους (Gupta and Birdi, 2017).

1.19.1 Τα φυτά ως παράγοντες αντιμετώπισης του παρασίτου *Leishmania spp.*

Αρκετοί μεταβολίτες των φυτών έχουν αποδειχθεί πως περιέχουν φυτικά συστατικά με ισχυρή λεϊσμανιοκτόνο δράση (Sen and Chatterjee,2011). Οι αντιλεϊσμανιακές δραστικές ουσίες φυτικής προέλευσης έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον παγκοσμίως λόγω του εναλλακτικού μηχανισμού δράσης τους, του χαμηλότερου ρίσκου τοξικότητας, της φυσικής αφθονίας και των προσιτών τιμών τους. Ωστόσο, τα περισσότερα από αυτά τα φάρμακα παρουσιάζουν περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα, χαμηλή διαλυτότητα και απαιτούν υψηλή δόση για αποτελεσματική θεραπεία (Roy et al., 2012).

Η φυτοχημική έρευνα για το φυτό *Pentalinon andrieuxii* που ενδημεί στο Μεξικό, οδήγησε στην απομόνωση έξι στερολών από τις ρίζες του φυτού, οι οποίες παρουσίασαν αξιοσημείωτη αντιλεϊσμανική δραστικότητα. Συγκεκριμένα η 6,7-διϋδρονεριδενόνη (6,7-dihydroneridienone) εμφάνισε έντονη αντιπαρασιτική δράση έναντι της *L. mexicana.* Παράλληλα, σε μακροφάγα κύτταρα που προέρχονταν από το μυελό των οστών ποντικιών παρουσίασε αμελητέα κυτταροτοξικότητα (Pan et al., 2012).

Η πριμίνη είναι μία κινόνη που απομονώθηκε από τα φύλλα του φυτού *Miconia lepidota*, το οποίο είναι γνωστό για την ανασταλτική του δράση έναντι του παρασίτου του τρυπανοσώματος, έχει συσχετιστεί και με ισχυρή αντιλεϊσμανιακή ισχύ κατά της *L. donovani* και μέτρια κυτταροτοξικότητα σε κύτταρα θηλαστικών (κυτταρική σειρά L6) (Gunatilaka et al., 2001, Tasdemir et al., 2006).

Η διφυλλίνη που απομονώνεται από ολικό εκχύλισμα του φυτού *Haplophyllum bucharicum (Rutaceae)* έχει αποδεδειγμένη ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών της *L. infantum*, ενώ για τις προμαστιγωτές μορφές του ίδιου είδους η δράση της είναι μέτρια. Ωστόσο φαίνεται πως παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων μονοκυττάρων (Di Giorgio et al., 2005).

Έχει παρατηρηθεί πως πολλές ενώσεις που έχουν αντιπαρασιτική δράση κατά των *Trypanosoma spp.* και *Leishmania spp*. και έναντι του *Schistosoma mansoni* προέρχονται τα ολικά εκχυλίσματα, του γένους *Piper* (Piperaceae) (Kato et al., 2007, Nour et al., 2009).

Στις εναλλακτικές μορφές θεραπειών συμπεριλαμβάνεται και η ομοιοπαθητική μέθοδος κατά την οποία χρησιμοποιούνται μεταξύ άλλων σκευάσματα φυτικής προελεύσεως. Μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση στον τομέα της βασικής έρευνας είναι η πειραματική θεραπεία των λοιμώξεων με φυτικής προελεύσης ομοιοπαθητικά σκευάσματα (Nascimento et al., 2017).

1.20 Ομοιοπαθητική θεραπευτική Μέθοδος

Η ομοιοπαθητική θεραπευτική μέθοδος εμφανίστηκε για πρώτη φορά το 19^{ο} αιώνα με τη δημοτικότητά της να παρουσιάζει αύξηση στα τέλη του 20^{ού} με αρχές του 21^{ου} αιώνα σε πολλά μέρη του κόσμου. Η ομοιοπαθητική μέθοδος έχει μία μακρά ιστορία επιστημονικής αντιπαράθεσης γύρω από το όνομά της και παρά τις περιόδους που παρατηρήθηκε εμφανής μείωση της άσκησής της, έχει αποδειχθεί ιδιαιτέρως ανθεκτική και πλέον παγκοσμίως διαδεδομένη σε όλα τα μήκη και πλάτη του κόσμου, αριθμώντας 200 εκατομμύρια ανθρώπους να λαμβάνουν ομοιοπαθητική αγωγή σε καθημερινή βάση (Fisher, 2012).

Το ολοένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα συγκεκριμένα σκευάσματα βασίζεται σε κάποια πλεονεκτήματα που εμφανίζουν σε σύγκριση με τις συμβατικές αγωγές. Τα ομοιοπαθητικά σκευάσματα αποτελούνται από εξαιρετικά αραιωμένες ενώσεις που στην πλειοψηφία τους, λόγω της χαμηλής τοξικότητάς τους, δεν ενέχουν τον κίνδυνο σοβαρών παρενεργειών. Τα συγκεκριμένα σκευάσματα πλεονεκτούν όσον αφορά το κόστος παραγωγής τους καθώς και τη δυνατότητα εγχώριας παρασκευής τους (Wagner and Ulrich-Merzenich, 2009). Η χορήγηση των σκευασμάτων αυτών στοχεύει στη πρόληψη καθώς και τη θεραπευτική αντιμετώπιση των διαφόρων νόσων, μέσω της ενίσχυσης των αποκρίσεων του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών. Σε αρκετές χώρες πλέον προγράμματα εκπαίδευσης στην ομοιοπαθητική προωθούνται από τις ίδιες τις κυβερνήσεις (de Oliveira et al., 2011). Η ομοιοπαθητική έχει συμπεριληφθεί στα εθνικά συστήματα υγείας ορισμένων χωρών όπως η Ελβετία, η Ινδία, η Χιλή, το Μεξικό, το Πακιστάν και τη Βραζιλία στην οποία η χρήση της ομοιοπαθητικής συμπεριλαμβάνεται στο επίσημο Ενοποιημένο Σύστημα Υγείας (SUS) και ακολουθεί τις οδηγίες του Εθνικού Σχεδιασμού που αφορά τις Ολοκληρωμένες και Συμπληρωματικές πρακτικές (PNPIC) του Υπουργείου Υγείας (Rodrigues de Santana et al., 2017). Λόγω της παγκόσμιας απήχησης της ομοιοπαθητικής ο ΠΟΥ έχει εκδώσει οδηγίες ασφαλείας όσον αφορά την Παρασκευή ομοιοπαθητικών φαρμάκων (WHO, 2009). Στην Ευρώπη η ομοιοπαθητική μέθοδος ασκείται στις 40 από τις 42 ευρωπαϊκές χώρες, γι αυτό και η Ευρωπαϊκή Επιτροπή έχει εκδώσει οδηγίες που αποσκοπούν στην τυποποίηση των διαδικασιών εγγραφής των ομοιοπαθητικών προϊόντων, ενώ τα ποιοτικά πρότυπα για τα συγκεκριμένα προϊόντα αυξάνονται όλο και περισσότερο. Από τις ευρωπαϊκές χώρες μέχρι στιγμής μόνο η Ελβετία έχει συμπεριλάβει την ομοιοπαθητική στο εθνικό της σύστημα υγείας. Μελέτη που αξιολόγησε την παραγωγή βιβλιογραφικών ανασκοπήσεων από το 1975 έως το 2017, τοποθέτησε το Ηνωμένο Βασίλειο στην πρώτη θέση, όσον αφορά τη δημοσίευση μελετών, σχετικά με των ομοιοπαθητικών προσεγγίσεων, ακολουθούμενο από τις ΗΠΑ, τη Γερμανία και την Ινδία (Şenel, 2018). Στον τομέα παραγωγής ομοιοπαθητικών σκευασμάτων η Ελβετία εντοπίστηκε ως η πιο παραγωγική ευρωπαϊκή χώρα, ακολουθούμενη από το Ηνωμένο Βασίλειο και τη Νορβηγία (Şenel, 2018). Η Βραζιλία, η Γαλλία, η Γερμανία, η Ινδία και οι ΗΠΑ είναι οι χώρες οι οποίες έχουν τις δικές τους φαρμακοποιίες σύμφωνα με τις οποίες παρασκευάζουν και τυποποιούν τα ομοιοπαθητικά σκευάσματα, εφαρμόζοντας τις αρχές της ομοιοπαθητικής. Εξαίρεση αποτελεί το Ηνωμένο Βασίλειο το οποίο έχει την επονομαζόμενη βρετανική ομοιοπαθητική φαρμακοποιία (British Homeopathic Pharmacopoeia), η οποία δεν είναι επισήμως αναγνωρισμένη από το κράτος όπως και η ομοιοπαθητική μέθοδος, αλλά είναι αποδεκτή από την κοινότητα των ομοιοπαθητικών. Από τα αρχεία διαπιστώνεται ότι η πρώτη ομοιοπαθητική φαρμακοποιία δημοσιεύθηκε από τον Δρ. C. Caspari το 1825 και ήταν η γερμανική (German Homeopathic Pharmacopoeia, GHP). Η πρώτη βρετανική ομοιοπαθητική φαρμακοποιία δημοσιεύθηκε το 1870 και η αμερικανική (Homoeopathic Pharmacopoeia of the United States) δημοσιεύθηκε για πρώτη φορά 1897. Εκτός των προαναφερθέντων, τις επόμενες δεκατίες δημοσιεύθηκαν οι: η ινδική φαρμακοποιία (Homeopathic Pharmacopoeia of India, HPI), η βραζιλιάνικη ομοιοπαθητική φαρμακοποιία (Brazilian Homeopathic Pharmacopeia, BHC) και η γαλλική ομοιοπαθητική φαρμακοποιία (Pharmacopoeia Homoeopathique Francaise, PHF).

1.20.1 Ομοιοπαθητικά Σκευάσματα

Τα ομοιοπαθητικά φάρμακα παρασκευάζονται από ένα ευρύ φάσμα συνθετικών και φυσικών πηγών όπως: ορυκτά ,φυτικά υλικά όπως δέντρα, θάμνοι, βρύα , λειχήνες , φύκη κ.ά. Μπορεί να χρησιμοποιούνται ολόκληρα ή μέρη αυτών όπως οι ρίζες, ο φλοιός, τα φύλλα, τα άνθη και η γύρη. Ακόμη μπορεί να είναι ζωικής προέλευσης (όργανα, ιστοί, εκκρίσεις και κυτταρικές σειρές), ανθρώπινης προέλευσης (ιστοί, εκκρίσεις, ορμόνες κυτταρικές σειρές) και μικροοργανισμοί (μύκητες, βακτήρια, ιοί, παράσιτα) (Braga et al., 2010, Nascimento et al., 2017, Mathie, 2019).

Κατά τους ερευνητές, ένας πιθανός αποτελεσματικός συνδυασμός των ομοιοπαθητικών σκευασμάτων με συμβατικά φάρμακα θα μπορούσε να βελτιώσει την ποιότητα ζωής του ασθενούς και επιπλέον να μειώσει το χρονικό διάστημα της θεραπείας με τη συμβατική αγωγή (Nascimento et al., 2017).

1.20.2 Ορισμός της ομοιοπαθητικής

Ο όρος ομοιοπαθητική προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις «όμοιος» και «πάθος» (στα νέα Ελληνικά σημαίνει πόνος). Εκτός από τον όρο «ομοιοπαθητικά σκευάσματα» συχνά αναφέρεται και ο συνώνυμος όρος «δυναμοποιημένα συστήματα», όροι οι οποίοι αφορούν την ονομασία παρασκευασμάτων που έχουν υποστεί χειρισμό σύμφωνα με την ομοιοπαθητική φαρμακοποιία (Fisher, 2012).

Σύμφωνα με τον επονομαζόμενο Πατέρα της ομοιοπαθητικής Christian Friedrich Samuel Hahnemann (1755-1843) (Εικόνα 8): «Το ύψιστο ιδεώδες μιας θεραπείας είναι η γρήγορη, με ήπιες μεθόδους μόνιμη αποκατάσταση της υγείας ή η εξαφάνιση της νόσου σ' όλη της την έκταση, με τον πιο σύντομο, σωστό και αβλαβή τρόπο σύμφωνα με αρχές οι οποίες είναι σαφώς κατανοητές» (Hahnemann, 1842)

Το επίθετο «ομοιοπαθητικό» που χαρακτήριζε ένα σκεύασμα χρησιμοποιήθηκε από τον Hahnemann για πρώτη φορά το 1807, ενώ ο όρος «ομοιοπαθητική μέθοδος» πρωτοεμφανίστηκε τρία χρόνια μετά, το 1810, στην πρώτη έκδοση του βιβλίου του με τίτλο: «Όργανο της Ομοιοπαθητικής» (Fisher, 2012).

<u>Δυναμοποίηση</u>: στην ομοιοπαθητική φαρμακοποιία, ορίζεται η διαδικασία κατά την οποία η ουσία διαλυτοποιείται υπό συγκεκριμένη αραίωση και ακολουθεί έντονη ανακίνηση,ονομαζόμενη κρούση, καθώς πιστεύεται πως με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η αύξηση της φαρμακευτικής ισχύος της ουσίας (Hahnemann, 1842).

<u>Κρούση</u>: αποτελεί μια διαδικασία έντονων ανακινήσεων οι οποίες κυμαίνονται από 10-100, ανάλογα με την ουσία. Πραγματοποιούνται είτε χειροκίνητα, καθέτως έναντι ελαστικού σώματος, είτε με εξειδικευμένα αυτόματα μηχανήματα, τους δυναμοποιητές ή με τη χρήση υπερήχων. Μέσω των κρούσεων οι ομοιοπαθητικοί επιτυγχάνουν την ανάμιξη και αποτυπώνουν τη δυναμοποίηση μιας ουσίας διαλυτοποιημένης σε αλκοόλη ή αποσταγμένο νερό (Bellavite et al., 2014).

<u>Μητρικό βάμμα</u>: το αρχικό ομοιοπαθητικό παρασκεύασμα το οποίο παρασκευάζεται απευθείας από το υλικό προέλευσης και μπορεί να αποτελέσει τη βάση για τις επόμενες δυναμοποιήσεις. Το μητρικό βάμμα θεωρείται ως η πιο συμπυκνωμένη μορφή ομοιοπαθητικού φαρμάκου και λαμβάνεται από τα αρχικά υλικά σύμφωνα με μια διαδικασία που ορίζεται από κάθε ομοιοπαθητική φαρμακοποιία. Ένα μητρικό βάμμα αντιστοιχεί στην πρώτη δεκαδική αραίωση 1 dH (10^{-1}), εκτός των περιπτώσεων που το υλικό είναι φυτό. Τότε χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη (Homoeopathic Pharmacopoeia India H.P.I.,2016).

<u>Εικόνα 8</u>: Ο Samuel Hahnemann (1755-1843), Πατέρας της ομοιοπαθητικής (πηγή: Encyclopaedia Britannica, Βιβλιοθήκη του Κογκρέσου, Ουάσινγκτον, LC-USZ62-58457)

1.20.3 Ιστορική αναδρομή της ομοιοπαθητικής

Η εμφάνιση της ομοιοπαθητικής χρονολογείται από τον 18^{ο} αιώνα, όταν ο C.F.S. Hahnemann χορήγησε στον εαυτό του *Cinchona officinalis*, μια ουσία που χρησιμοποιούνταν τότε για τη θεραπεία της ελονοσίας, χωρίς όμως να έχει προσβληθεί από το παράσιτο, με σκοπό να καταγράψει τα αποτελέσματα αυτής της χορήγησης. Από τότε καταγράφεται και η σχέση μεταξύ της ομοιοπαθητικής και της παρασιτολογίας. Σε αυτό το πείραμα ο Hahnemann παρατήρησε πως τα συμπτώματα που του προκαλούσε αυτή η ουσία, ήταν παρόμοια με αυτά της ελονοσίας (Aleixo et al., 2014). Στη συνέχεια ο προαναφερθείς επεκτάθηκε σε πειραματισμούς και πολλών άλλων φαρμακευτικών ουσιών. Ο Hahnemann, προκειμένου να διαπιστώσει τις θεραπευτικές ιδιότητες των ουσιών, τις χορήγησε σε αυξανόμενες υποτοξικές δόσεις σε υγιή άτομα και των δύο φύλων σε μια σειρά από επαναλαμβανόμενες δοκιμές. Στον κατάλογο των φαρμακευτικών συμπτωμάτων συμπεριλήφθησαν και τα τοξικολογικά συμπτώματα ορισμένων ουσιών που ήταν γνωστές στα τότε ιατρικά συγγράμματα. Αργότερα δημοσίευσε το βιβλίο του με τίτλο «Materia Medica Pura», ένα πολύτομο σύγγραμμα της ομοιοπαθητικής φαρμακολογίας (Şenel, 2018).

1.20.4 Αρχές

Σύμφωνα με τους ομοιοπαθητικούς επιστήμονες, τα συμπτώματα δεν είναι τίποτε περισσότερο από την έκφραση του αμυντικού μηχανισμού του ανθρώπινου οργανισμού. Για παράδειγμα, η άνοδος της θερμοκρασίας του σώματος, εξυπηρετεί την επιβράδυνση του νοσογόνου παράγοντα (βακτήρια, ιοί, παράσιτα, μύκητες κ.λ.π.) και προάγει την αγγειοδιαστολή που αυξάνει την διακίνηση ανοσοποιητικών κυττάρων. Επομένως ο οργανισμός χρειάζεται τη φαρμακευτική αγωγή πιθανότερα για την υποστήριξη της θεραπευτικής του προσπάθειας παρά την καταστολή του πυρετού. Έτσι, κατά τη χορήγηση της φαρμακευτικής ουσίας στην πραγματικότητα διεγείρεται και συγχρόνως παρέχεται υποστήριξη του αμυντικού μηχανισμού με σκοπό την απαλλαγή του από τη νόσο. Στην ομοιοπαθητική μέθοδο σκοπός είναι η ίαση του ασθενούς να επέλθει χάρη στο ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενή, το οποίο ενισχύεται από τις κατάλληλες ομοιοπαθητικές αγωγές. Οι αγωγές αυτές δεν ομοιάζουν με αυτές της συμβατικής ιατρικής, καθώς διέπονται από τις αρχές της ομοιοπαθητικής μεθόδου (Eskinazi, 1999).

Ο Hahnemann βασιζόμενος στις παρατηρήσεις του, καθόρισε τις αρχές που συνθέτουν τον ορισμό της ομοιοπαθητικής, ο οποίες διαφοροποιούνται από αυτές της συμβατικής ιατρικής. Η πιο αξιοσημείωτη είναι η αρχή της θεραπευτικής ομοιότητας (τα όμοια

θεραπεύονται με όμοια). Σύμφωνα με την Αρχή, μια ουσία μπορεί να προκαλέσει σε έναν υγιή οργανισμό μια σειρά συμπτωμάτων ομοίων με μία συγκεκριμένη νόσο. Υπό ορισμένες συνθήκες, θα μπορούσε να θεραπεύσει τα συμπτώματα της νόσου αυτής, καθώς η δράση της είναι όμοια με αυτή της νόσου (όμοιο πάθος). Χαρακτηριστικό παράδειγμα της αρχής της ομοιότητας αποτελεί η χορήγηση φύλλων του φυτού *Belladona* (*Solanaceae) ,* η οποία ενώ σε υψηλή δόση προκαλεί μυδρίαση του οφθαλμού, χορηγούμενη σε μεγάλη αραίωση σε περιστατικά μυδρίασης επαναφέρει την ίριδα στη φυσιολογική της κατάσταση (Şenel, 2018). Η ιδέα αυτή είχε αναφερθεί αρχικά από τον Ιπποκράτη, στη συνέχεια από τον Παράκελσο και κατόπιν από μεταγενέστερους, ενώ υπάρχουν αναφορές πως και ο Δαρβίνος πραγματοποίησε πειράματα σχετικά με τις επιδράσεις του διαλυτοποιημένου φωσφορικού αμμωνίου (Ammonium phosphate) στο σαρκοφάγο φυτό *Drosera (Droseraceae)* (Bellavite, Ortolani et al., 2006, Ullman 2007, Ullman, 2010, Aleixo et al., 2014). Ο Hahnemann στην αρχή των δοκιμών του χρησιμοποίησε παρόμοιες ή ελάχιστα μικρότερες δοσολογίες συγκριτικά με αυτές των συμβατικών φαρμάκων που χορηγούσαν οι σύγχρονοί του.Οι παρατηρήσεις του οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι εάν οι ενώσεις χορηγηθούν κατόπιν επανηλλειμένων αραιώσεων μπορούν να έχουν ένα προστατευτικό ή θεραπευτικό αποτέλεσμα. Το εγχείρημα του Hahnemann ήταν οι τελικές παρασκευές του να περιλαμβάνουν «υπερμοριακές αραιώσεις» πέραν του αριθμού Avogadro. Είναι γνωστό από τη Χημεία πως η τιμή της σταθεράς του Avogadro που καθορίζει τον αριθμό των σωματιδίων (ατόμων ή μορίων) σε ένα γραμμομόριο καθαρής ουσίας ισούται με: 6.022×10^{23}. Επομένως, οι δυναμοποιήσεις άνω των 23dH (10^{-23}) και 12cH (10^{-24}) αντίστοιχα είναι απίθανο να περιέχουν ένα μόριο της αρχικής ουσίας. Τα ομοιοπαθητικά φάρμακα στα οποία δεν υπάρχει πιθανότητα να υπάρχει το μόριο της αρχικής ουσίας, χαρακτηρίζονται ως «υπερμοριακές εξαιρετικά χαμηλές δυναμοποιήσεις» (ULD, ultra low dilutions) ή αλλιώς πέραν του αριθμού του Avogadro (BRAN, Beyond the Reciprocal of Avogadro's Number). (Calabrese et al., 2006, Fisher, 2012).

1.20.5 Μέθοδοι παρασκευής των ομοιοπαθητικών σκευασμάτων

1.20.5.1 Ομοιοπαθητικές Φαρμακοποιίες

Η κατά Hahnemann μέθοδος δυναμοποίησης των ομοιοπαθητικών σκευασμάτων αποτελεί τη βασική μέθοδο παρασκευής πάνω στην οποία βασίζονται όλες οι φαρμακοποιίες. Ωστόσο κάθε φαρμακοποιία έχει μικρές διαφοροποιήσεις ως προς τη μεθοδολογία παρασκευής όπως ο αριθμός των κρούσεων, οι βαθμοί των αλκοολών που χρησιμοποιούνται για τις δυναμοποιήσεις κ.ά. Άλλες διαφορές που εντοπίζονται αφορούν τα κριτήρια ελέγχου ποιότητας και καθαρότητας των ουσιών και τον τρόπο συμβολισμού των δυναμοποιήσεων (WHO, 2002). Στην αγγλοαμερικανική σύμβαση (βρετανική και αμερικανική ομοιοπαθητική φαρμακοποιία) οι δυναμοποιήσεις σημειώνονται με το σύμβολο x, ενώ η ευρωπαϊκή σύμβαση (γερμανική και γαλλική ομοιοπαθητική φαρμακοποιία) ακολουθεί την κατά Hahnemann κλίμακα. Για παράδειγμα η $5^{η}$ δεκαδική δυναμοποίηση (5 φορές αραίωση 1/10) συμβολίζεται: 5x (αγγλοαμερικανική σύμβαση) και 5dH (ευρωπαϊκή σύμβαση) αντίστοιχα (German Homoeopathic Pharmacopoeia GHP, 1978). Επιπλέον, πέραν του τρόπου γραφής, σκευάσματα που βρίσκονται στις ίδιες δυναμοποιήσεις και έχουν παρασκευαστεί σύμφωνα με διαφορετικές φαρμακοποιίες παρουσιάζουν διαφορές ως προς τη σύσταση και τη συγκέντρωση των ουσιών (Homoeopathic Pharmacopoeia India, HPI, 2016). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το ομοιοπαθητικό *Aconitum napellus* παρασκευασμένο σύμφωνα με τη με τη γερμανική ομοιοπαθητική φαρμακοποιία σε δυναμοποίηση 1dH (1×10^{-1}). Η σύσταση του σκευάσματος έχει περισσότερες ομοιότητες με το μητρικό βάμμα *Aconitum napellus* παρά

με τη 1η δεκαδική δυναμοποίηση 1dH, σε σύγκριση με τις υπόλοιπες φαρμακοποιίες (German Homoeopathic Pharmacopoeia, GHP, 1978).

1.20.5.2 Παρασκευή ομοιοπαθητικών σκευασμάτων

Η κύρια κατά Hahnemann μέθοδος παρασκευής ομοιοπαθητικών σκευασμάτων περιλαμβάνει τις σειριακές δυναμοποιήσεις σε αναλογία 1:100 (εκατοστιαία, cH) και τις σειριακές δυναμοποιήσεις σε αναλογία 1:10 (δεκαδική, dH) (Bellavite, Ortolani et al., 2006).
Εκατοστιαία (centesimal, cH): παρασκευάζεται με 1 μέρος από το μητρικό βάμμα της δραστικής ουσίας και 99 μέρη ανενεργού διαλύτη (π.χ. γαλακτοσάκχαρο, δις απεσταγμένο νερό, απόλυτη αιθανόλη).
Εάν η ουσία είναι υδατοδιαλυτή το μίγμα υποβάλλεται σε δέκα τουλάχιστον κρούσεις. Σε αρκετές περιπτώσεις αναφέρονται και 100 κρούσεις οι οποίες πλέον πραγματοποιούνται με τη βοήθεια των δυναμοποιητών. Από την 1η διαλυτοποίηση, που καλείται πρώτη δυναμοποίηση, λαμβάνεται 1 μέρος, το οποίο επαναδιαλύεται σε 99 μέρη εκδόχου και υποβάλλεται ξανά σε δέκα ισχυρές δονήσεις, λαμβάνοντας έτσι τη δεύτερη δυναμοποίηση. Οι δυναμοποιήσεις συνεχίζουν διαδοχικά κατ' αυτό τον τρόπο και όταν η διαδικασία συνεχίζεται για 10, 20, 30 ή ακόμη και 200 φορές φθάνουν σε πολύ υψηλές αραιώσεις.
Για τις μη υδατοδιαλυτες ουσίες, χρησιμοποιείται η μέθοδος της λειοτρίβησης υπό τις ίδιες αναλογίες: 1 μέρος κονιορτοποιημένης ουσίας (trituration),σε μορφή πούδρας, αναμιγνύεται με 99 μέρη γαλακτοσακχάρου. Το μίγμα αυτό υποβάλλεται σε έντονη λειοτρίβηση μέσα σε γουδί επί μία ώρα, στο τέλος της οποίας λαμβάνεται η αντίστοιχη πρώτη δυναμοποίηση. Η διαδικασία εξακολουθεί μέχρι την 3η δυναμοποίηση. Μέρος της τρίτης δυναμοποίησης αραιώνεται εκ νέου σε αναλογία 1/100 σε αλκοόλη ώστε πλέον η ουσία εκφράζεται σε διαλυτοποίηση βάρους κατ΄όγκο και αντιστοιχεί στην 4η δυναμοποίηση. Η 5η δυναμοποίηση παρασκευάζεται με αραίωση της τέταρτης δυναμοποίησης 1/100 σε αλκοόλη υψηλότερων βαθμών, πέραν της οποίας το μίγμα θεωρείται πλέον υδατοδιαλυτό. Οι επόμενες διαλυτοποιήσεις πραγματοποιούνται με τον ίδιο τρόπο με τις υδατοδιαλυτές ουσίες (Calabrese et al., 2006)

1.20.6 Δράση των ομοιοπαθητικών σκευασμάτων

Ως κλασική φαρμακολογική δράση ορίζεται η αλληλεπίδραση μεταξύ φαρμακολογικά ενεργών μορίων και των υποδοχέων. Εξ' ορισμού οι δυναμοποιήσεις πέρα από το «μοριακό όριο» δεν μπορούν να έχουν τις κλασικές φαρμακολογικές δράσεις. Παραδόξως, τέτοιες δράσεις έχουν παρατηρηθεί συχνά σε δυναμοποιήσεις 10^{-17} – 10^{-18} mol /L ενώ έχουν αναφερθεί και δυναμοποιήσεις έως και 10^{-22} mol /L (Eskinazi, 1999).

1.20.6.1 Θεωρίες δράσης των σκευασμάτων της ομοιοπαθητικής

Οι επιστήμονες στην προσπάθειά τους να αποσαφηνίσουν τον τρόπο δράσης των σκευασμάτων, έχουν αναπτύξει διάφορες θεωρίες. Ορισμένοι προσπαθούν να εξηγήσουν την δράση των ομοιοπαθητικών φαρμάκων μέσω της θεωρίας σχηματισμού «μικρών συσσωματωμάτων του νερού» (small water clusters) (Chaplin, Ju et al., 2004, Zwier 2004), ενώ υπάρχουν και οι υπέρμαχοι της θεωρίας της κβαντικής ηλεκτροδυναμικής υπερακτινοβολίας (quantum electrodynamic, QED)(Marchettini et al., 2010). Ορισμένοι, προσπαθώντας να διασαφηνίσουν τον ομοιοπαθητικό όρο «μνήμη του νερού» ισχυρίζονται πως η δράση τους οφείλεται στην αλλαγή της δομής των μορίων του νερού λόγω της επίδραση της ουσίας που διαλύεται σε συνδυασμό με τις ισχυρές δονήσεις (Bellavite et al., 2014).Ο όρος *«μνήμη του νερού»* χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Jacques

Benveniste το 1988 και έκτοτε καθιερώθηκε στους κύκλους των ομοιοπαθητικών. Στην έρευνα που διεξήγαγε ο Benveniste ισχυρίστηκε, αξιολογώντας βιολογικά πειραματικά δεδομένα, πως οι ομοιοπαθητικές δυναμοποιήσεις ουσιών, παρότι δεν περιέχουν πλέον μόρια της αρχικής ουσίας, παρουσιάζουν βιολογικές επιδράσεις χαρακτηριστικές της αρχικής ουσίας, οι οποίες οφείλονται στο νερό στο οποίο διαλύονται. Το νερό εμφανίζει μεγάλες μετρήσιμες αλλαγές όσον αφορά τις φυσικοχημικές ιδιότητες σε συνάρτηση με τον χρόνο και την ουσία που αρχικά διαλύεται σε αυτό (Davenas et al., 1988, Elia et al., 2007). Μία πιθανή εξήγηση για τις αλλαγές αυτές είναι πως η ετερογενής σύνθεση του νερού θα μπορούσε να επηρεαστεί από διαδραστικά φαινόμενα όπως ο σχηματισμός κολλοειδών νανοφυσαλίδων που περιέχουν αέρια όπως οξυγόνο, άζωτο, διοξείδιο του άνθρακα και πιθανόν και την αρχική ουσία και πραγματοποιείται χάρη στις ισχυρές κρούσεις που εφαρμόζεται. Τα μόρια της δραστικής ουσίας από τη θέση που βρίσκονται, δρουν ως πυρήνες ενισχύοντας το σχηματισμό υπερμοριακών δομών στο διαλύτη (Bellavite et al., 2014).

Θεωρία των συσσωματωμάτων του νερού: τα συσσωματώματα νερού είναι συγκεντρωτικά μόρια νερού που συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου ή με άλλους ασθενείς δεσμούς και μπορούν να δημιουργηθούν μόνο όταν τα μόρια του νερού τοποθετούνται σε διάταξη τύπου πλέγματος γεγονός που επιτυγχάνεται κατά τη διαδικασία της ανάδευσης του υγρού μέσω των ομοιοπαθητικών κρούσεων ή μέσω υπερήχων, παρουσία ή όχι της αρχικής διαλυμένης ουσίας. Η θεωρία αυτή επεκτείνεται και στα υδατικά παρασκευάσματα αιθανόλης τα οποία είναι το αποτέλεσμα προσθήκης της αιθανόλης στο νερό. Τα διαλύματα που προκύπτουν πλέον αποτελούνται από ένα σύνθετο μίγμα στο οποίο κυριαρχούν συσσωματώματα νερού με νερό, συσσωματώματα αιθανόλης με αιθανόλη και συσσωματώματα νερού με αιθανόλη όπου οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται έχουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής από ό,τι στο νερό. Ο σχηματισμός νανοφυσαλίδων ευνοείται, με αποτέλεσμα η ιδιαίτερη συμπεριφορά των υδατικών διαλυμάτων να τονίζεται από την παρουσία αιθανόλης (Chaplin, Ju et al., 2004, Zwier 2004, Bellavite et al., 2014).

Θεωρία της κβαντικής ηλεκτροδυναμικής υπερακτινοβολίας (QED): σύμφωνα με αυτή τη θεωρία το νερό παρουσιάζει 2 φάσεις. Φάση 1: τα μόρια του νερού βρίσκονται σε αέρια μορφή που παράγεται από θερμικές διακυμάνσεις. Φάση 2: περιλαμβάνει το σχηματισμό συνεκτικών δομών (coherence domains, DC) στις οποίες υπάρχουν περιστροφικά διεγερμένα μόρια νερού. Η συγκεκριμένη θεωρία υποδηλώνει τη συμμετοχή εκατομμυρίων μορίων σε σφαιρικές δομές μεγέθους νανομέτρου και παρουσιάζει ελάχιστη έως και μηδαμινή άμεση πειραματική απόδειξη (Marchettini et al., 2010).

1.20.7 Εφαρμογές των Ομοιοπαθητικών Σκευασμάτων

Παρόλο που η ομοιοπαθητική μέθοδος αποτελεί μια δημοφιλή συμπληρωματική θεραπεία, δεν υπάρχουν ακόμη επαρκείς ερευνητικές δοκιμές που να τεκμηριώνουν την αποτελεσματικότητα των σκευασμάτων της. Στο πλαίσιο επιστημονικής τεκμηρίωσης της αποτελεσματικότητας ορισμένων ομοιοπαθητικών σκευασμάτων έχουν δημοσιευθεί ενθαρρυντικές έρευνες σχετικά με παθολογικές καταστάσεις όπως: φλεγμονές (*Maced*o et al., 2004), λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος συμπεριλαμβανομένης και της μέσης ωτίτιδας, αλλεργίες και εποχική αλλεργική ρινίτιδα (Bellavite et al., 2006, Bornhoeft et al., 2006), διάρροια που εμφανίζεται σε άτομα παιδικής ηλικίας (Jacobs et al., 2003), γρίπη (Vickers and Smith, 2006) και ίλιγγοι (vertigo) (Schneider et al., 2005). Ακόμη, χορηγούνται σε περιστατικά αρθρίτιδας ως αναλγητικά (Patil et al., 2011) ,για την μετεγχειρητική αποκατάσταση ορθοπεδικών παθήσεων(Karow et al., 2008). Επιπλέον χορηγούνται σε περιστατικά διαταραχών της εμμήνου ρήσεως (αμηνόρροια,

ολιγομηνόρροια) (Cardigno, 2009), σε περιστατικά αγχώδων διαταραχών (Grzywatz et al., 2006), ενώ εχουν αναφερθεί και περιπτώσεις (όπως στην Αυστραλια) χορήγησης σε ασθενείς διαγεγνωσμένους με κατάθλιψη, όπου ομοιοπαθητικά δίδονται σαν κύρια θεραπεία, αλλά και σε συνδυασμό με ψυχοτρόπες φαρμακευτικές ουσίες (SSRIS, εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης της σεροτονίνης) και τη ψυχοθεραπεία. (Makich et al., 2007)
Τα τελευταία χρόνια αρκετές ερευνητικές ομάδες μελετούν την επίδραση των δυναμοποιήσεων στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος Επίσης, έχει αυξηθεί ο αριθμός των προκλινικών μελετών *in vitro* και *in vivo* που αξιολογούν τη φαρμακολογική δραστικότητα ορισμένων ομοιοπαθητικών θεραπειών υπό συνθήκες που παρέχουν δυνητικά τη δυνατότητα αναπαραγωγής των δοκιμών αυτών και από άλλα εργαστήρια. Ακόμη, διενεργούνται μελέτες που περιλαμβάνουν τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές ομοιοπαθητικών σκευασμάτων, καθώς και μετα-αναλύσεις ερευνών που χρησιμοποιούν τα συγκεκριμένα σκευάσματα με σκοπό να διερευνήσουν αν τα θετικά αποτελέσματα που εμφανίζει η ομοιοπαθητική οφείλονται στο λεγόμενο “placebo effect” (Fisher, 2012, Aleixo et al., 2014, Basu et al., 2017).

1.20.7.1 Ομοιοπαθητικά στην Ανοσολογία

Ορισμένα ομοιοπαθητικά σκευάσματα έχουν εμφανίσει και ικανότητα ρύθμισης του οξειδωτικού στρες και της παραγωγής ΝΟ.
Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η πειραματική μελέτη του ομοιοπαθητικού *Rhus Tox* το οποίο προέρχεται από τα φύλλα του δέντρου *Toxicodendron (Anacardiaceae).* Το ομοιοπαθητικό αυτό ελέχθηκε σε ένα εύρος δυναμοποιήσεων: 4 cH (1 x 10^{-8} mol/L),6 cH (1 x 10^{-12} mol/L), 12 cH (1 x 10^{-24} mol/L) και 15 cH (1 × 10^{-30} mol/L) *in vitro* σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος U-87.Το *Rhus Tox* μείωσε το απελευθέρωση των κυτοκινών TNF-α, IL-1β, IL-6 και IL-10 , υποδηλώνοντας πως εμφάνισε αντιφλεγμονώδη δράση(Magar et al., 2018).
Το ομοιοπαθητικό σύμπλοκο *Canova*, (αποτελούμενο από:19dH *Thuya occidentalis* (Cupresaceae),από το φλοιό, 18 dH *Bryonia alba* (Curcubit*aceae*), από τις ρίζες, 11dH *Aconitum napellus* (Ranunc*ulace*ae), από όλο το φυτό ,19 dH *Arsenicum album* (arsenic trioxide) και 18dH *Lachesis muta* (Viperidae), δηλητήριο), χρησιμοποιείται ως ρυθμιστής του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω της ρύθμισης των μακροφάγων και των λεμφοκυττάρων. Μελέτες που επικεντρώθηκαν στη διερεύνηση των *in vitro* γονιδιοτοξικων ιδιότητων στα λεμφοκύτταρα, επιβεβαιώνουν πως δεν έχει τοξικές επιδράσεις σε χρωμοσωμικό επίπεδο. Η παρατήρηση αυτή προσδίδει άλλο ένα πλεονέκτημα στο συγκεκριμένο σκεύασμα, μαζί με το χαμηλό του κόστος (Larche and Wraith, 2005, Escobar et al., 2005). Μία πιο πρόσφατη μελέτη του ομοιοπαθηικού *Guaiacum officinale,* που προέρχεται από τη ρητίνη του κορμού (gum-resin) του δέντρου *Guaiacum officinale,* σε πειραματικά μοντέλα αρουραίων έδειξε πως το μητρικό βάμμα του ομοιοπαθητικού και οι δυναμοποιήσεις 30cH και 200 cH παρουσίασαν αντι-ρευματοειδή και αντιοξειδωτική δράση. Τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά τις συγκεκριμένες παραμέτρους τα είχαν με φθίνουσα σειρά οι δυναμοποιήσεις: 200 cH, 30 cH και τέλος το μητρικό βάμμα, υποδηλώνοντας πως οι ομοιοπαθητικές δυναμοποιήσεις υψηλής αραίωσης του *G. officinale* έχουν στατιστικά σημαντική αντι-ρευματοειδή και αντιοξειδωτική δράση σε πειραματικά ζωικά μοντέλα (Sarkar et al., 2014).
Η προσθήκη *Mercurius solubilis* σε υλικό καλλιέργειας σε διαφορετικές αραιώσεις (6, 12, 30 και 200 cH), οδήγησε σε αύξηση της παραγωγής της IFN-γ και του ΝΟ από τα μακροφάγα (C.C. De Oliveira et al., 2008, S.M. De Oliveira et al., 2011). Πιο πρόσφατα, αποδείχθηκε πως η θεραπεία *in vitro*, μακροφάγων με *Arnica montana* σε διαφορετικές δυναμοποιήσεις (2 cH έως 15 cH) μπορεί να προκαλέσει μεταβολές στη λειτουργία των κυττάρων μέσω ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης Κατά την πειραματική δοκιμή σε μακροφάγα, τα οποία έχουν προέλθει από τη διαφοροποίηση μονοκυττάρων της κυτταρικής σειράς THP-1

(απομονώνονται από περιστατικά οξείας λευχαιμίας) παρατηρήθηκε μικρή αλλά στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη φλεγμονώδη αντίδραση (Marzotto et al., 2016, Olioso et al., 2016).

1.20.7.2 Διερεύνηση της χρησιμοποίησης ομοιοπαθητικών σκευασμάτων στη θεραπεία Παρασιτικών Νοσημάτων

Αρκετές πρόσφατες πειραματικές δοκιμές απέδειξαν τη βιολογική επίδραση των δυναμοποιημένων ομοιοπαθητικών σκευασμάτων στις παρασιτικές λοιμώξεις. Τα πειραματικά μοντέλα *in vitro* και *in vivo* έχοντας ως βάση την προκαλούμενη από παράσιτα μόλυνση αποτέλεσαν εξαιρετικά εργαλεία για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και του μηχανισμού δράσης των ομοιοπαθητικών σκευασμάτων (Aleixo et al., 2014, Mathie, 2019). Η δράση διαφορετικών σκευασμάτων σε διάφορες δυναμοποιήσεις ελέγχθηκε έναντι παρασίτων όπως *Toxoplasma gondii* (Braga et al., 2010), *Leishmania (Nascimento et al., 2017) Trypanosoma cruzi* (Sandri et al., 2011, Falkowski-Temporini et al. 2016, Aleixo-Brustolin et al. 2017 και πλασμώδιου της ελονοσίας *(Dua et al., 2009, Mishra et al., 2013)*

1.20.7.2.1 Διερεύνηση της χρησιμοποίησης ομοιοπαθητικών σκευασμάτων στη τοξοπλάσμωση

Σε πειραματική δοκιμή, μελετήθηκε in vivo, η δράση του βιοθεραπευτικου *T. gondii* (*BIOT-TG 200)*, που παράγεται από διαλυτοποιημένα εγκεφαλικά κύτταρα ποντικών μολυσμένα με *T. gondii* σε δυναμοποίηση 200 dH έναντι ομάδας ποντικών μολυσμένων με *Toxoplasma gondii*. Στην συγκεκριμένη μελέτη, το υπό δοκιμή σκεύασμα χορηγήθηκε πριν από την πειραματική μόλυνση των ζώων. Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις των ερευνητών, τα ποντίκια που έπασχαν από τοξοπλάσμωση παρουσίασαν καλύτερη κλινική εικόνα με μικρότερο αριθμό βλαβών στα μάτια σε σύγκριση με την ομάδα ποντικών που μολύνθηκαν από το *T. gondii, αλλά* δεν έλαβαν το βιοθεραπευτικό (Braga et al., 2010).
Το *Lycopodium clavatum* είναι το πιο κοινό είδος βρύου που ανήκει στο γένος *Lycopodium (Lycopodiacea)* και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία συμπτωμάτων που σχετίζονται μεταξύ άλλων με τη φλεγμονή των νεφρών και της ουροδόχου κύστης και τους χολόλιθους σε δυναμοποίηση 13cH (Brasil 2011, Vijnovsky 2012, Henrique da Silva et al. 2015). Σε μία πολύ πρόσφατη πειραματική δοκιμή ελέχθηκε η αποτελεσματικότητα του *L. clavatum* έναντι του παρασίτου *Toxoplasma gondii* σε δυναμοποίηση 200dH *in vivo,* σε δύο ομάδες ποντικών:. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, συμπεραίνεται πως όταν το *L. clavatum* χορηγείται έναντι του *Toxoplasma gondii* υπό ανεπαρκή δυναμοποίηση, υπό 200dH, εμφανίζει μία αντίστροφη δράση από τη συνηθισμένη, όπου αντί να βελτιώνει την κλινική εικόνα, οδηγεί σε πιο σοβαρή ιστοπαθολογική βλάβη (Pereira et al., 2020).

1.20.7.2.2 Διερεύνηση της χρησιμοποίησης ομοιοπαθητικών σκευασμάτων στην τρυπανοσωμίαση

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη δυναμοποίηση 13cH του *L. clavatum* χορηγήθηκε *in vivo* σε ποντίκια, τα οποία έπασχαν από επαγόμενη οξεία λοίμωξη από το παράσιτο *Trypanosoma cruzi.* Τα αποτελέσματα έδειξαν μειωμένο παρασιτισμό και μειωμένη φλεγμονώδη αντίδραση, εμφανίζοντας παράλληλα μία ευεργετική ανοσορυθμιστική δράση που μείωσε την παθογόνο εξέλιξη της νόσου Chagas (Falkowski-Temporini et al. 2016, Aleixo-Brustolin et al. 2017). Ωστόσο, ο μηχανισμός δράσης του συγκεκριμένου σκευάσματος κατά της φλεγμονώδους αντίδρασης εξακολουθεί να είναι υπό διερεύνηση.
Η Patricia Sandri έλεγξε *in vivo* την κυτταρική απόπτωση σε ποντίκια στα οποία χορήγησαν το βιοθεραπευτικό *T. cruz*i (BIOT) 17 dH , το οποίο παρασκευάστηκε με την προσθήκη

συμπυκνωμένων τρυπομαστιγωτών σε απεσταγμένο νερό. Από τη στιγμή που επιβεβαιώθηκε η μόλυνση από το παράσιτο τα ποντίκια έλαβαν το βιοθεραπευτικό για 3 ημέρες και έπειτα αξιολογήθηκε ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων από το ήπαρ και το σπλήνα των ζώων και παρατηρήθηκε πως ήταν σημαντικά μεγαλύτερος στην ομάδα που έλαβε το βιοθεραπευτικό, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Sandri et al., 2011). Οι ερευνητές απέδειξαν έτσι πως η απόπτωση αυξάνεται στα ζώα που έλαβαν το συγκεκριμένο σκεύασμα γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία (Jonas et al., 2004)

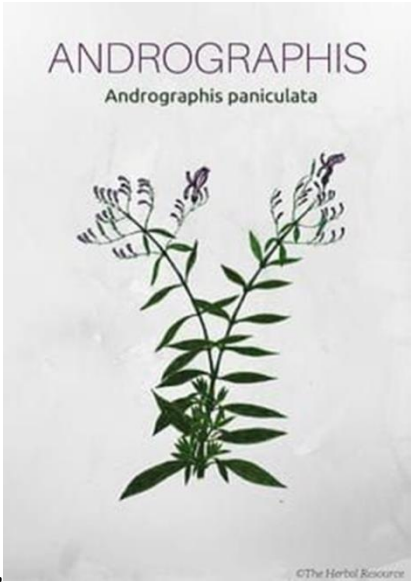
1.20.7.2.3 Διερεύνηση της χρησιμοποίησης ομοιοπαθητικών σκευασμάτων στην λεϊσμανίαση

Μελέτη της αποτελεσματικότητας του ομοιοπαθητικού συμπλέγματος M1, σε κύτταρα μολυσμένα από το παράσιτο *L. amazonensis* (WHOM/BR/75/Josefa) διεξήχθη *in vitro* σε μακροφάγα (RAW 264.7) και *in vivo* σε ποντίκια (BALB/c, αρσενικά). Το ομοιοπαθητικό σύμπλεγμα M1 αποτελείται από ένα μείγμα 15 διαφορετικών φαρμάκων και εξετάστηκε σε διαφορετικές αραιώσεις. Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση του ποσοστού ενδοκυττάρωσης και του επί τις εκατό ποσοστού των μολυσμένων μακροφάγων. Η αύξηση της απόκρισης των Th1 κυττάρων και της IL-10 αποτρέπει την ανάπτυξη βλάβης από την *L. amazonensis* στα ποντίκια. Οι αλλοιώσεις που εμφάνισαν τα ποντίκια δεν ήταν ελκώδεις, ενώ παρατηρήθηκε μείωση στο μέγεθος/πάχος των βλαβών. Μία αποτελεσματική αντιμετώπισή των βλαβών αυτών θα μπορούσε να αποτελέσει ένα ενδιαφέρον κλινικό εργαλείο με χαμηλότερη τοξικότητα, το οποίο σε συνδυασμό με μια κλασική αντιπαρασιτική θεραπεία σε δυνητικά εξασφαλίσει καλύτερη ποιότητα ζωής στους ασθενείς (Nascimento et al., 2017).

1.21 Ομοιοπαθητικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

1.21.1 *Andrographis paniculata*

Το *Andrographis paniculata* (*A. paniculata*) (Εικόνα 9) είναι ένα ποώδες φυτό το οποίο ανήκει στην οικογένεια των *Acanthaceae* και είναι κοινώς γνωστό με την ονομασία «βασιλιάς των πικρών» (king of bitters). Οι διαφορετικές θεραπευτικές ιδιότητες του φυτού αυτού καθιστούν τη χρήση του δημοφιλή, για αρκετούς διαφορετικούς ιατρικούς σκοπούς. Στη σύγχρονη φαρμακολογία το *A. paniculata* έχει χρησιμοποιηθεί για τη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος, κατά του διαβήτη και έναντι της λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος, *in vivo* και *in vitro* (Kishore et al., 2017). Το *A. paniculata* αποτελεί ένα είδος φαρμακευτικής τροφής με τα φύλλα και τις ρίζες του να χρησιμοποιούνται ευρέως εδώ και αιώνες από την παραδοσιακή Ιατρική στην Κίνα, την Ινδία αλλά και την Ευρώπη (Jarukamjorn και Nemoto 2008, Kishore et al., 2017) παρουσιάζοντας αντιφλεγμονώδη, αναλγητική και αντιπαρασιτική δράση. Το *A. paniculata* καλλιεργείται σε όλη την Ινδία, την Ταϊλάνδη και την Κίνα (Jarukamjorn και Nemoto, 2008, Niranjan et al., 2010).

A B. 

<u>Εικόνα 9:</u> Το φυτό *Andrographis paniculata*, Α. Φωτογραφία του *Andrographis paniculata* στο Narsapur της Ινδίας (πηγή: Wikipedia) , Β. (πηγή: The Herbal Resource)

Το κύριο δραστικό συστατικό του *A. paniculata* είναι μία διτερπενοειδής λακτόνη που φέρει την ονομασία «*Andrographolide*» (AG), που απομονώνεται από τα φύλλα του φυτού. Είναι μια άχρωμη, ουδέτερη κρυσταλλική ουσία με πικρή γεύση (Hidalgo et al., 2013). Στην ύπαρξη αυτού του συστατικού και των φυσικών τερπενοειδών αναλόγων του, οφείλονται οι ευεργετικές ικανότητες του *A. paniculata*. Τα τερπενοειδή, αποτελούν ενώσεις οι οποίες εντοπίζονται στα φυτά και πέραν των θεραπευτικών ιδιοτήτων που τους αποδίδονται είναι υπεύθυνες για τις χαρακτηριστικές αρωματικές τους ιδιότητες (ευκάλυπτος, κανέλλα) καθώς και για το χαρακτηριστικό τους χρώμα (ηλιοτρόπιο, ντομάτα). Τα διαφορετικά τερπενοειδή διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον αριθμό των μονάδων ισοπρενίου και των αριθμό των ανθράκων. Το διτερπενοειδές *andrographolide* και άλλα σχετικά τερπενοειδή ανάλογά του θα μπορούσαν αξιοποιηθούν για την πρόληψη ασθενειών λόγω της δομικής τους ομοιότητας με διάφορες φαρμακολογικές δραστηριότητες. Διεξάγονται μελέτες με σκοπό να αποκαλύψουν τους υποκείμενους μηχανισμούς που εμπλέκονται σε αυτές τις βιολογικές δράσεις του andrographolide και των αναλόγων του (Kishore et al., 2017).

1.21.1.1 Αντιπαρασιτική Δράση

Μέχρι τώρα τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση της αντιπαρασιτικής δράσης του *A. paniculata* είναι ενθαρρυντικά υποδεικνύοντας δράση τόσο έναντι εξωπαρασίτων όσο και ενδοπαρασίτων (Buhner, 2005, Mishra et al., 2013). Πειραματικές δοκιμές και μελέτες έχουν αποδείξει την ενεργότητά του ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα παρασιτικών οργανισμών: *Plasmodium spp.*, *Leishmania spp.*, *Wuchereria bancrofti* και *Brugia malayi*, *Ascaris lumbriocoides*, *Dipetalonemia reconditum* και σπειροχαίτη *Leptospira spp.*Πολλοί μικροοργανισμοί από τους παραπάνω είναι υπεύθυνοι για νόσους που μεταδίδονται μέσω διαβιβαστή, όπως το παράσιτο *Leishmania* που μεταδίδεται μέσω της θηλυκής φλεβοτόμου(Buhner, 2005).

Ενδοπαράσιτα**:** μελέτη που διεξήχθη σε ενδημικά φυτά της Ινδίας συμπεριλαμβανομένου και του *A. paniculata*, κατέδειξε την αποτελεσματικότητα του φυτού έναντι της φιλαρίασης. Πιο συγκεκριμένα, το εκχύλισμα από τα φύλλα του *A. paniculata* εμφανίζει αντιφιλαριασική δράση έναντι του Dipetalonema reconditum που προκαλεί μικροφιλαρίαση στους σκύλους (Maurya et al., 2015) και έναντι του ενήλικου νημωτώδους Brugia malayi που προκαλεί λεμφική φιλαρίαση στον άνθρωπο, όταν ελέγχθηκε *in vivo* σε τρωκτικά. (Misra et al., 2011).

Επίσης δοκιμές κατά της φιλαρίασης των σκύλων *in vitro* και *in vivo* έδωσαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Ο συνδυασμός φυτικών σκευασμάτων όπως ρίζες του *Stephania tetrandra* ενός είδους αμπελιού με ή χωρίς αντιβιοτικά έχει αποδειχθεί αποτελεσματικός στην αντιμετώπιση των διαφορετικών μορφών της *B. burgdorferi* και στη θεραπεία επίμονων συμπτωμάτων (Datar et al., 2010).

Αρκετές μελέτες έχουν αξιολογήσει την αντιπρωτοζωική και ανθελονοσιακή δράση του *Andrographis*, δείχνοντας αποτελεσματικότητα τόσο χορηγούμενη μόνη της όσο και σε συνδυασμό με άλλα βότανα (Najib et al., 1999, Dua et al., 2004 Dua et al., 2009, Mishra et al., 2013). Συγκεκριμένα το andrographolide έχει χαρακτηριστεί ως ένας ισχυρός και χαμηλής τοξικότητας αντιλεϊσμανιακός παράγοντας (Roy et al., 2010).

1.21.1.2 Μορφές

Η τοξικότητα που παρουσιάζει το *andrographolide* σε υψηλές δόσεις ώθησε τους ερευνητές να αναπτύξουν κατευθυνόμενα συστήματα παροχής φαρμάκων όπως νανοσωματίδια, μικροσφαιρίδια, λιποσώματα κ.ά. Περαιτέρω έρευνες πραγματοποιούνται με σκοπό να καταστήσουν αυτά τα μόρια κατάλληλα για δοκιμή στον άνθρωπο (Kishore et al., 2017).

Το *A. paniculata* χρησιμοποιείται και από την ομοιοπαθητική, όπου παρασκευάζεται σύμφωνα με τις αρχές της φαρμακοποιίας, σε υψηλές δυναμοποιήσεις. Στην ομοιοπαθητική θεραπεία συνιστάται σε παιδιά που εμφανίζουν συμπτώματα όπως εμετός, διόγκωση του ήπατος και του σπληνός σε συνδυασμό με πυρετό, ενώ χορηγείται και σε περιστατικά παιδικού καλα-αζάρ, σύμφωνα πάντα με την αρχή της «ομοιότητας» (Suvarna and Monteiro, 2018). Κατά την αρχή αυτή, εφόσον το σκεύασμα είναι αποτελεσματικό έναντι της σπληνικής και της ηπατικής διόγκωσης, γι αυτό διερευνάται η πιθανή δραστικότητά του κατά της λεϊσμανίασης, καθώς τα συγκεκριμένα συμπτώματα εμφανίζονται και σε ασθενείς με καλά-αζαρ**.**

1.22 *Antimonium crudum (Sb_2S_3)*

Σε πρόσφατη πειραματική μελέτη, η Fabiana Rodrigues de Santana με την ομάδα της, εξέτασαν τις υψηλές δυναμοποιήσεις Αντιμονίου (Sb_2S_3) που φέρει και την ονομασία *Antimonium crudum* (*AC*), το οποίο παρασκευάστηκε σύμφωνα με τις ομοιοπαθητικές μεθόδους (*AC* 30 cH ή 10^{-58} M και *AC* 200 cH ή 10^{-398} M). Μελέτησαν την *in vitro* επίδραση των εκατοστιαίων αραιώσεων 30 cH και 200 cH του AC έναντι της *Leishmania* amazonensis. Τα παρατηρούμενα αποτελέσματα παρουσίασαν αντιφλεγμονώδη δράση για *AC 30 cH* και συμφωνούσαν με προηγούμενη έρευνα που διεξήγαγαν οι ίδιοι *in vivo* σε ποντίκια παρέχοντας έτσι μία τεκμηρίωση της προηγούμενης έρευνας (Rodrigues de Santana et al., 2017).

Αντίθετα, το συγκεκριμένο σκεύασμα δεν παρουσίασε αντιπαρασιτική δράση αλλά ούτε και ενεργοποίηση των μακροφάγων. Το συμπέρασμα με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής είναι πως η δυνατότητα ανοσολογικής ρύθμισης που εμφανίζει το *Antimonium crudum*, φαίνεται να αποδίδεται σε μηχανισμούς διαφορετικούς από αυτούς που παρατηρούνται όταν χορηγείται το Αντιμόνιο σε γνωστές θεραπευτικές δόσεις. Το Αντιμόνιο της θεραπευτικής γραμμής είναι πεντασθενές και παρουσιάζει αντιπαρασιτικές ιδιότητες οι οποίες σχετίζονται με την αύξηση των επιπέδων των IL-1b και IL-6 στο πλάσμα σε αντίθεση με το τρισθενές αντιμονιο *Antimonium crudum* το οποίο, φαίνεται να έχει απολέσει την αντιπαρασιτική ικανότητα, ενώ ενισχύει την μείωση των συγκεκριμένων κυτταροκινών (IL-6, IL-12p40, INF-γ). Εφόσον η ισορροπία της δραστηριότητας των κυτταροκινών και των μακροφάγων αποτελεί ουσιαστικά σημεία για την κλινική ανάπτυξη δερματικής λεϊσμανίασης (CL) τόσο των ανθρώπων όσο και των ζώων τα ευρήματα αυτά, εάν επιβεβαιωθούν, υποδηλώνουν πως το υψηλά αραιωμένο Αντιμόνιο θα μπορούσε να

αποτελέσει ένα ενδιαφέρον κλινικό εργαλείο σε συνδυασμό ίσως με μια κλασική αντιπαρασιτική θεραπεία. Η αντιφλεγμονώδης δράση που παρουσιάζει, θα μπορούσε δυνητικά να συμβάλλει στη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών, εξασφαλίζοντας χαμηλότερη τοξικότητα και παρασιτική αντίσταση (Rodrigues de Santana et al., 2017).

1.23 *Ferrum arsenicum*

Το *Ferrum arsenicum* (arsenite of iron, $AsFeH_{13}O_9^+$), συμπεριλαμβάνεται στην ομάδα των σκευασμάτων Σιδήρου» κατά τον Boericke, συγγραφέα του εγχειριδίου της ομοιοπαθητικής "Materia Medica". Το *Ferrum arsenicum* χορηγείται σε περιπτώσεις αναιμίας, διόγκωσης σπληνός και ήπατος, όπως επίσης και σε περιστατικά χρόνιας διάρροιας, παθήσεις του δέρματος (εκζέματα, κηρία) ακόμη και σε περιστατικά ψωρίασης (Blackwoodet al., 2002).
Παρατηρήθηκε πως ορισμένα από τα παραπάνω συμπτώματα συναντώνται και στα περιστατικά λεϊσμανίασης. Εγείρεται λοιπόν το εξής ερώτημα: Θα μπορούσε αντίστοιχα το *Ferrum arsenicum*, να έχει θετικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση της λεϊσμανίασης, εφόσον θεραπεύει ορισμένα συμπτώματα που εμφανίζει η συγκεκριμένη νόσος; Μέχρι στιγμής, δεν έχουν δημοσιευθεί σχετικές έρευνες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2
ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας πειραματικής εργασίας ήταν ο προσδιορισμός της αντιλεϊσμανιακής δράσης και ο έλεγχος ενδεχόμενης κυτταροτοξικότητας των ουσιών: *Antimonium crudum, Andrographis paniculata και Ferrum arsenicum*. Οι ουσίες δοκιμάστηκαν σε αρκετές διαφορετικές εκατοστιαίες δυναμοποιήσεις με χαμηλότερη την 5cH και υψηλότερη την 200 cH, επιτυγχάνοντας τον έλεγχο της δραστικότητάς τους σε ένα μεγαλύτερο εύρος δυναμοποιήσεων.

Για την επίτευξη των στόχων αυτών πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω επιμέρους διεργασίες:

- Μελέτη της *in vitro* αντιλεϊσμανιακής δράσης των σκευασμάτων *Antimonium crudum I, Antimonium crudum II, Andrographis paniculata* και *Ferrum arsenicum* σε προμαστιγωτή μορφή του παρασίτου: *Leishmania infantum,* ανθεκτική στην υπάρχουσα θεραπεία, *Leishmania infantum,* ευαίσθητη στην υπάρχουσα θεραπεία, *Leishmania donovani* και *Leishmania amazonensis.*
- Μελέτη της *in vitro* αντιλεϊσμανιακής τους δράσης των σκευασμάτων σε *Antimonium crudum I, Antimonium crudum II, Andrographis paniculata* και *Ferrum arsenicum* στην ενδοκυτταρική μορφή του παρασίτου: *Leishmania infantum,* ανθεκτική στην υπάρχουσα θεραπεία, *Leishmania infantum* ευαίσθητη στην υπάρχουσα θεραπεία, *Leishmania donovani* και *Leishmania amazonensis*.
- Μελέτη της *in vitro* επίδρασης των σκευασμάτων *Antimonium crudum I, Antimonium crudum II, Andrographis paniculata* και *Ferrum arsenicum* στην κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των μακροφάγων J774.1.

Οι παρακευές όλων των ουσιών πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του προσωπικού της Μονάδας Ομοιοπαθητικών Korres.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

3.1.1 Αντιδραστήρια

- Θρεπτικά υλικά για τις κυτταροκαλλιέργειες: RPMI -1640 , εμβρυϊκός ορός από μόσχο (FBS) απενεργοποιημένος στους 56° C για 30 λεπτά (min), Schneider's
- Διάλυμα Hepes
- Αντιβιοτικά για τις κυτταροκαλλιέργειες: πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη
- Αντιδραστήριο Alamar Blue για τον έλεγχο της κυτταρικής επιβίωσης
- Purified Water (Korres)

3.1.2 Αναλώσιμα υλικά

- Δοκιμαστικοί σωλήνες 15 και 50ml (Sarstedt, Greiner)
- Πλαστικά ακρορύγχια (tips) (Greiner bio-one)
- Πλαστικοί σωλήνες "eppendorf" 1,5ml (Sarstedt)
- Φλάσκες καλλιέργειας 25cm^2
- Φλάσκες καλλιέργειας με φίλτρο 25cm^2
- Πλάκες 96 φρεατίων Flat-bottom για καλλιέργεια παρασίτων (Greiner Cellstar)
- Αιμοκυτταρόμετρα (Malassez, για τη μέτρηση παρασίτων/Neubauer για τη μέτρηση των μακροφάγων).
- Αποστειρωμένοι πλαστικοί ξύστες (Kisker Biotech)
- Αποστειρωμένες πλαστικές πιπέτες 2, 5, 10 ml (Greiner).
- Parafilm M Roll (Bemis)
- Αποστειρωμένα φίλτρα με μεμβράνη PES, 22 μm για την αποστείρωση του purified water (Merck Millipore Millex -GP Sterile Syringe Filters with PES Membrane)
- Αποστειρωμένες Σύριγγες 5 ml Luer Slip (bmd)
-

3.1.3 Εργαστηριακός εξοπλισμός

- Υδατόλουτρο (Bioline Scientific)
- Πεχάμετρο (Orion 3-Star pH Benchtop Meter, Thermo Scientific)
- Θερμαινόμενη πλάκα μαγνητικού αναδευτήρα (heating magnetic stirrer)
- Μαγνητικοί αναδευτήρες
- Πιππέτες μεταβλητού όγκου 20μl/200μl και 1000μl (Pippetman P200, P20 Gilson και Transferpette αντίστοιχα).
- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (Tellstar Bio –II-A)
- Επωαστήρας 37° C για την καλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων (New Brunswick, Galaxy 170 S)

- Επωαστήρας 25° C για την καλλιέργεια παρασίτων (Sanyo,MIR-253)
- Μικροσκόπιο για τον προσδιορισμού του αριθμού των παρασίτων και των μακροφάγων (Olympus BH)
- Elisa Plate Reader (Dynatech Laboratories, MRX)
- Υποδοχέας για τις πλαστικές πιπέτες (accu-jet pro, Brand)
- Δυναμοποιητής για την κρούση των ομοιοπαθητικών δυναμοποιήσεων (Electron Power Dynamat 50C)

3.1.4 Διαλύματα

Για την παρασκευή του PBS, χρησιμοποιήθηκε δις-απεσταγμένο απιονισμένο νερό (dd H_2O).

PBS pH 7.4 (1 L), 10X	
NaCL	80g
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	14.4g
KH2PO4	2.4g
KCl	2g

3.1.5 Παρασιτικό στέλεχος– Κυτταρική σειρά μακροφάγων

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

Παράσιτα:

- *Leishmania infantum,* ανθεκτικό στέλεχος στην υπάρχουσα θεραπεία με συνθετικά άλατα πεντασθενούς αντιμονίου
- *Leishmania infantum,* ευαίσθητο στέλεχος στην υπάρχουσα θεραπεία με συνθετικά άλατα πεντασθενούς αντιμονίου
- *Leishmania donovani*,ευαίσθητο στέλεχος στην υπάρχουσα θεραπεία με συνθετικά άλατα πεντασθενούς αντιμονίου
- *Leishmania amazonensis,* ευαίσθητο στέλεχος στην υπάρχουσα θεραπεία με συνθετικά άλατα πεντασθενούς αντιμονίου

Κυτταρική σειρά:

Η κυτταρική σειρά μακροφάγων ποντικού J774.1 της ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA)

3.1.6 Ομοιοπαθητικά σκευάσματα

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής σκευάσματα:

- *Antimonium crudum I*
- *Antimonium crudum II*
- *Andrographis paniculata*
- *Ferrum arsenicum*

Μας δόθηκε η δυνατότητα να εφαρμόσουμε και τις δύο προσεγγίσεις όσον αφορά το ομοιοπαθητικό του *Antimonium crudum.* Στη μία περίπτωση προμηθευτήκαμε το αντιμόνιο

ήδη δυναμοποιημένο στην 4 cH δυναμοποίηση από τη Μονάδα Ομοιοπαθητικών του κ. Αποστόλη Κορρέ, όπου παρασκευάσαμε τις επόμενες δυναμοποιήσεις. Στην άλλη περίπτωση παραλάβαμε την πρώτη ύλη (Antimony Sulfide (III), Alfa Aesar 99.999% metal basis 11683), με την ευγενική χορηγία του φαρμακοποιού κ. Μάρκου Φυλιάνου, με σκοπό να παρασκευαστεί από την πρώτη δυναμοποίηση και έτσι είχαμε τη δυνατότητα να λάβουμε επιπλέον και την 5 cH,την οποία δε μπορούσαμε να λάβουμε από το ήδη δυναμοποιημένο *AC I* και δώσαμε την ονομασία *Antimonium crudum II.* Τα σκευάσματα: *Antimonium crudum I, Andrographis paniculata* και *Ferrum arsenicum* προσφέρθηκαν από τον κ. Κορρέ (Naxos Apothecary. Όλα τα σκευάσματα, συμπεριλαμβανομένου και του *Antimonium crudum II* ,παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τις αρχές της Γερμανικής Ομοιοπαθητικής Φαρμακοποιίας (German Homeopatic *Pharmacopeia)* από τη Μονάδα Παραγωγής Ομοιοπαθητικών Korres. Όλα τα σκευάσματα διαλυτοποιήθηκαν σε αλκοόλη 35% και 50% (Korres).

3.1.6.1 Παρασκευή διαλυτοποιήσεων ομοιοπαθητικών φαρμάκων-Πρώτη πειραματική δοκιμή

Τα σκευάσματα παρελήφθησαν στις αρχικές εκατοστιαίες κατά Hahnemann δυναμοποιήσεις:

- 6 cH
- 11 cH
- 29 cH
- 199 cH

Ο διαλύτης των δυναμοποιήσεων 6cH όλων των ουσιών είναι η αλκοόλη 35%. Ο διαλύτης των δυναμοποιήσεων για όλες τις υπόλοιπες δυναμοποιήσεις (11 cH, 29 cH, 199 cH) όλων των ουσιών είναι αλκοόλη 50%. Οι ουσίες, συμπεριλαμβανομένων και των αλκοολών αραιώθηκαν σε αναλογία 1/100 σε purified water. Κατόπιν ακολούθησαν 10 χειροκίνητες κάθετες κρούσεις ανά διαλυτοποίηση, σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής. Οι τελικές δυναμοποιήσεις που λάβαμε ήταν οι: 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Οι ουσίες προστέθηκαν 100 μl/φρεάτιο μετά τη προσθήκη των παρασίτων.

3.1.6.2 Παρασκευή διαλυτοποιήσεων ομοιοπαθητικών φαρμάκων-Δεύτερη πειραματική δοκιμή

Εκ νέου παραλαβή ουσιών με ορισμένες παραλλαγές στις διαλυτοποιήσεις. Οι ουσίες δόθηκαν στις εξής αρχικές εκατοστιαίες κατά Hahnemann δυναμοποιήσεις:

- *Andrographis paniculata*: 5 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH. Διαλυτοποιήθηκαν σε αλκοόλη 50%.
- *Ferrum arsenicum*: 9 cH, 11 cH και 199 cH. Η δυναμοποίηση 9 cH, διαλυτοποιήθηκε σε αλκοόλη 35 % , ενώ οι 11 cH και 199 cH σε αλκοόλη 50%.
- *Antimonium crudum II*: 6 cH, 11 cH και 199 cH. Η δυναμοποίηση 6 cH διαλυτοποιήθηκε σε αλκοόλη 35 % , ενώ οι 11 cH και 199 cH σε αλκοόλη 50%.

- *Antimonium crudum I*: 6 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH. Η δυναμοποίηση 6 cH, διαλυτοποιήθηκε σε αλκοόλη 35 %, ενώ οι δυναμοποιήσεις 11 cH, 29 cH και 199 cH σε αλκοόλη 50%.
- *Antimonium crudum I* trituration σε δυναμοποίηση 4cH, λειοτριβιοποιημένο σε λακτόζη, με σκοπό να λάβουμε τελική δυναμοποίηση 6 cH.
- *Antimonium crudum II* trituration σε δυναμοποιήσεις 3 cH και 4cH, λειοτριβιοποιημένο σε λακτόζη, με σκοπό να λάβουμε τελική δυναμοποίηση 5cH και 6 cH, αντίστοιχα.
- LactoseMonohydrate 3ο και 4ο trituration της εκατοστιαίας κλίμακας για χρήση ως μάρτυρα για τις λειοτριβιοποιημένες μορφές των *Antimonium crudum I* και *Antimonium crudum II*.

Οι δυναμοποιήσεις όλων των ουσιών πραγματοποιήθηκαν σε purified Water, το οποίο αποστειρώθηκε μέσω φίλτρου Millipore 22 μm. Οι ουσίες αραιώθηκαν σε αναλογία 1/100 και προστέθηκαν σε μπουκαλάκια των 10 ml, τα οποία είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ.

Οι τελικές δυναμοποιήσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της αντιλεϊσμανιακής τους δράσης ήταν:

- *Andrographis paniculata*: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH.
- *Ferrum arsenicum*: 10 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH.
- *Antimonium crudum I*: 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH.
- *Antimonium crudum II*: 7 cH, 12 cH και 200 cH.

Για τις λειοτριβιοποιημένες μορφές πραγματοποιήθηκε επίσης αρχικά δυναμοποίηση 1/100. Οι δυναμοποιήσεις που προέκυψαν, ήταν οι ενδιάμεσες:

- *Antimonium crudum I*: 5 cH
- *Antimonium crudum II*: 4 cH, 5 cH
- Lactose Monohydrate: 4 cH και 5 cH

Αμέσως μετά την αραίωση, όλες οι ουσίες δυναμοποιήθηκαν100 κρούσεις σε δυναμοποιητή. Οι ενδιάμεσες δυναμοποιήσεις των λειοτριβιοποιημένων ουσιών μετά τις 100 κρούσεις αραιώθηκαν σε αναλογία 1/100 με διαλύτη Purified Water. Οι τελικές επιθυμητές δυναμοποιήσεις που λάβαμε για αυτές ήταν: *Antimonium crudum II*: 5 cH, 6 cH, *Antimonium crudum I*: 6 cH και LactoseMonohydrate: 5 cH, 6 cH. Για τις παραπάνω τελικές δυναμοποιήσεις ακολούθησαν εκ νέου 100 κρούσεις.

3.1.7 Αμφοτερικίνη Β

Σαν θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η Αμφοτερικίνη Β. Η Αμφοτερικίνη Β προστέθηκε στις ευαίσθητες και στις ανθεκτικές προμαστιγωτές μορφές και ενδοκυττάριες αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *Leishmania*. Οι τελικές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν : 20 μM , 15 μM, 10 μM, 5 μM, 2.5 μM, 1 μM και 0.5 μM.

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Κυτταροκαλλιέργειες

3.2.1.1 Παράσιτα *Leishmania*

Η καλλιέργεια των προμαστιγωτών μορφών *L. infantum* πραγματοποιείται σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 στο οποίο έχει γίνει εμπλουτισμός με 10% (v/v) FBS (Fetal Bovine Serum), 10mM Hepes και με αντιβιοτικά πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη σε τελική συγκέντρωση 100U/ml. Τα παράσιτα διατηρούνται σε θερμοκρασία 25^0C και απουσία CO_2. Κατόπιν, τα παράσιτα συλλέγονται στη στατική φάση ανάπτυξης ($5^η$-$6^η$ ημέρα καλλιέργειας), κατά την οποία ο αριθμός τους είναι περίπου 2-2.5 x 10^7 παράσιτα/ml. Τα παράσιτα διατηρούνται σε RPMI/20% FBS/10% DMSO για μικρό χρονικό διάστημα στους –80^0C ή εναλλακτικά για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε υγρό άζωτο.

3.2.1.2 Μακροφάγα J774.1

Τα μακροφάγα της κυτταρικής σειράς J774.1 προερχόμενα από μύες καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 στο οποίο έχει γίνει εμπλουτισμός με 10% (v/v) FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco), 10mM Hepes και με τα αντιβιοτικά πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη σε τελική συγκέντρωση 100 U/ml.

Για την καλλιέργεια των μακροφάγων χρησιμοποιούνται 4x10^5 μακροφάγα/ml. Τα μακροφάγα επωάζονται σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37^0C και ατμόσφαιρα 5% CO2. Τα κύτταρα διατηρούνται για ένα διάστημα περίπου 7 ημερών ώσπου να επιτευχθεί η κάλυψη του τάπητα της φλάσκας κατά περίπου 80%. Ο χρόνος διπλασιασμού των μακροφάγων J774.1 είναι 24h. Ζωντανά είναι τα μακροφάγα τα οποία παραμένουν προσκολλημένα στον τάπητα, ενώ νεκρά είναι όσα αιωρούνται στο υλικό κυτταροκαλλιέργειας. Ο αριθμός των μακροφάγων στη στατική φάση ανάπτυξης είναι περίπου 2 x 10^6 μακροφάγα/ml. Κατά την ανακαλλιέργεια αρχικά το υπερκείμενο υλικό απομακρύνεται διότι περιέχει τα νεκρά μακροφάγα και προστίθεται νέο υλικό. Με το 'scraper' ανακτώνται τα ζωντανά μακροφάγα, τα οποία χρησιμοποιούνται στον εμβολιασμό στη νέα κυτταροκαλλιέργεια. Η κυτταρική σειρά J774.1 διατηρείται σε RPMI/20% FBS/10% DMSO για μικρό χρονικό διάστημα στους –80^0C ή εναλλακτικά για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε υγρό άζωτο. Για τα μακροφάγα J774.1 η περισυλλογή επιτυγχάνεται με φυγοκέντρηση στα 1.000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.

3.3 Έλεγχος *in vitro* κυτταρικής επιβίωσης/πολλαπλασιασμού.

3.3.1 Εφαρμογή της μεθόδου Alamar blue

Η Alamar blue αποτελεί μία μη τοξική χρωστική η οποία περιλαμβάνει τη δραστική ουσία ρεσαζουρίνη και χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις επώασης κυττάρων με ουσίες. Εφαρμόζεται με σκοπό την παρακολούθηση τη κυτταρικής βιωσιμότητας και ανάπτυξης. Τα μεταβολικά ενδιάμεσα των ζωντανών κυττάρων (NADH, FADH, NADPH) ανάγουν την Alamar Blue, η οποία είναι οξειδωμένη, δίνοντας ένα μετρήσιμο αποτέλεσμα. Ο πλήρης μεταβολισμός της ρεσαζουρίνης του από τα ζωντανά κύτταρα, έχει σαν αποτέλεσμα η ανηγμένη της μορφή να είναι κόκκινη-ροζ και φθορίζουσα , σε αντίθεση με την αρχική οξειδωμένη της μορφή που είναι μπλε και μη φθορίζουσα (Mikus and Steverding, 2000).

3.3.1.1 Εφαρμογή της μεθόδου *Alamar blue* σε προμαστιγωτά παράσιτα *Leishmania*

α. Για τις προμαστιγωτές μορφές *L. infantum,* ανθεκτικά ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: οι καλλιέργειες βρίσκονταν στη στατική φάση (2.5 x 10^7 παράσιτα/ml). Επιστρώθηκαν 1 x 10^6 παράσιτα σε 200μl ανά φρεάτιο (5 x 10^6 παράσιτα/ml). Τα παράσιτα επωάστηκαν για 72h με τις ομοιοπαθητικές ουσίες σε διαφορετικές δυναμοποιήσεις οι οποίες αναφέρονται στο κεφάλαιο 3.1.6.2. Ως μάρτυρες ανάπτυξης των παρασίτων χρησιμοποιήθηκαν τα φρεάτια όπου έγινε προσθήκη μόνο υλικού κυτταροκαλλιέργειας RPMI 1640. Ως αρνητικοί μάρτυρες ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκαν τα φρεάτια στα οποία προστέθηκε μόνο το υλικό κυτταροκαλλιέργειας απουσία παρασίτων. Ο έλεγχος κάθε συγκέντρωσης ουσίας ή μάρτυρα πραγματοποιήθηκε σε τριπλά φρεάτια. Τα παράσιτα επωάστηκαν σε θερμοκρασία 26^0 C για 72 h.

Οι ουσίες δοκιμάστηκαν με δύο διαφορετικές προσεγγίσεις:

I. Οι ουσίες προστέθηκαν σε μία εφ' άπαξ δόση και αξιολογήθηκαν στις 72h.

II. Μετά την πρώτη προσθήκη ουσίας στα φρεάτια, έγιναν 2 ενισχυτικές θεραπείες στις 24h και στις 48h, όπου οι ουσίες προστέθηκαν σε όγκο ίσο με το 1% του όγκου του θρεπτικού υλικού σε κάθε φρεάτιο (2μl ουσίας/φρεάτιο). Η αντιπαρασιτική δράση των ουσιών αξιολογήθηκε στις 72h.

Και στις δύο περιπτώσεις, μετά το πέρας των 72h προστέθηκε η χρωστική *Alamar blue* σε ποσότητα 20 μl /φρεάτιο και έπειτα τα παράσιτα επωάστηκαν για 24h σε θερμοκρασία 26^0C. Μετά το πέρας των 24h πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση σε *Elisa plate reader* στα 570 nm, με αναφορικό μήκος κύματος τα 630 nm. Στα φρεάτια μάρτυρες ανάπτυξης των παρασίτων, οι τιμές οπτικής πυκνότητας (OD) κυμαίνονταν περίπου μεταξύ 0.9-1 όπου αντιστοιχούν στην 100% ανάπτυξη των παρασίτων. Ο υπολογισμός της ανάπτυξης των παρασίτων τα οποία επωάστηκαν με τις ουσίες επιτυγχάνεται μέσω της σύγκρισης των τιμών OD που λαμβάνονται από τα φρεάτια με τις ουσίες, σε σχέση με τα φρεάτια-μάρτυρες (θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες).

β. Για τις προμαστιγωτές μορφές *Leishmania infantum* ανθεκτικά, *Leishmania* infantum ευαίσθητα, *Leishmania donovani* και *Leishmania amazonensis* ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Οι καλλιέργειες και των 4 ειδών προμαστιγωτών που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονταν στη στατική φάση (2.5 x 10^7 παράσιτα/ml). Επιστρώθηκαν 3125 x 10^3 παράσιτα σε 160 μl ανά φρεάτιο (2.5 x 10^6 παράσιτα/ml). Τα παράσιτα επωάστηκαν με τις ομοιοπαθητικες ουσίες σε διαφορετικές δυναμοποιήσεις οι οποίες αναφέρονται στο κεφάλαιο 3.1.6.2. Οι ουσίες προστέθηκαν σε κάθε φρεάτιο σε όγκο ίσο με το 20% του τελικού όγκου (40 μl). Τα φρεάτια με τους μάρτυρες καθώς και όλη η υπόλοιπη διαδικασία, διεξήχθησαν με τον ίδιο τρόπο με την $1^η$ πειραματική απόπειρα. Στις 24h μετά την πρώτη προσθήκη των ουσιών στις κατάλληλες δυναμοποιήσεις πραγματοποιήθηκε ενισχυτική θεραπεία. Οι ουσίες προστέθηκαν σε όγκο ίσο με το 1% του όγκου του θρεπτικού υλικού σε κάθε φρεάτιο (2μl ουσίας/φρεάτιο). Τα αποτελέσματα της αντιλεϊσμανιακής δράσης των ουσιών αξιολογήθηκαν στις 72h με τη μέθοδο Alamar blue όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.2.1.2

3.3.1.2 Εφαρμογή της μεθόδου Alamar blue σε μακροφάγα J774.1

Σε πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 96 φρεατίων επιστρώθηκαν 8 x 10^4 μακροφάγα (4 x 10^5 μακροφάγα/ml) σε 200μl υλικού κυτταροκαλλιέργειας/φρεάτιο. Τα μακροφάγα επωάστηκαν σε θάλαμο θερμοκρασίας 37^0C σε ατμόσφαιρα 5% CO_2, για 24 h, με σκοπό την προσκόλλησή τους. Στη συνέχεια προστέθηκαν οι ουσίες σε όλες τις επιθυμητές δυναμοποιήσεις, τα φρεάτια θετικοί μάρτυρες και το διάλυμα στο οποίο έγινε μόνο η προσθήκη θρεπτικού υλικού και purified water (Τυφλό διάλυμα) για να ελεγχθεί η τοξικότητα των ουσιών έναντι του κυττάρου-ξενιστή. ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε τριπλά φρεάτια. Έγινε επώαση των μακροφάγων με τις ουσίες για 72h σε θερμοκρασία 37^0C και ατμόσφαιρα 5% CO_2. Μετά το πέρας των 72h, προστίθενται 20 μl Alamar blue/φρεάτιο, γίνεται επώαση για 24 h ε θερμοκρασία 37^0C και ατμόσφαιρα 5% CO_2 και ακολουθεί φωτομέτρηση, όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 3.2.1.1.

3.3.1.3 Εφαρμογή της μεθόδου Alamar blue σε ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές

Κατά τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, ελέγχθηκαν οι ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές: *Leishmania infantum* ανθεκτικά, *Leishmania infantum* ευαίσθητά, *Leishmania donovani* και *Leishmania amazonensis.* Χρησιμοποιήθηκαν οι ουσίες και οι διαλυτοποιήσεις που περιγράφονται στη παράγραφο 3.1.6.2. Τα μακροφάγα μολύνονται με τις προμαστιγωτές μορφές των παρασίτων και επωάζονται για 72h με τις ομοιοπαθητικές ουσίες. Ακολουθεί η λύση των μακροφάγων με σκοπό την ποσοτικοποίηση των παρασίτων που επιβίωσαν εντός των μακροφάγων. Η ποσοτικοποίηση των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μετράται έμμεσα με τη μέθοδο Alamar blue.

Πιο συγκεκριμένα, επιστρώθηκαν σε πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 96 φρεατίων 4x10^4 μακροφάγα σε 200μl υλικού κυτταροκαλλιέργειας/φρεάτιο (2 x 10^5 μακροφάγα/ml). Επωάστηκαν για 24 h, σε θάλαμο θερμοκρασίας στους 37^0C και σε ατμόσφαιρα 5% CO_2. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο υλικό απομακρύνθηκε και ακολούθησε η προσθήκη 8 x 10^5 μετακυκλικών προμαστιγωτών (4 x 10^6 παράσιτα/ml) σε 200μl υλικού κυτταροκαλλιέργειας /φρεάτιο και επωάστηκαν για 24h στους 37^0C σε ατμόσφαιρα 5% CO_2. Στο διάστημα αυτό πραγματοποιείται η μόλυνση των μακροφάγων από τα παράσιτα. Το υπερκείμενο υλικό απομακρύνθηκε και τα προσκολλημένα κύτταρα ξεπλύθηκαν 3 φορές με αποστειρωμένο PBS 1x. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η απομάκρυνση των παρασίτων που δεν έχουν εισέλθει στα μακροφάγα. Έπειτα, προστέθηκαν 160μl θρεπτικού υλικού RPMI/φρεάτιο. Οι ουσίες προστέθηκαν στις διαφορετικές δυναμοποιήσεις σε αναλογία ίση με το 20% του τελικού όγκου του θρεπτικού υλικού (40μl). Με τον ίδιο τρόπο προστέθηκαν και οι μάρτυρες (θετικοί και αρνητικοί). Τα μολυσμένα μακροφάγα επωάστηκαν παρουσία των φαρμάκων στους 37^0C και σε ατμόσφαιρα 5% CO_2. Στις 24h έλαβαν ενισχυτική θεραπεία με την προσθήκη των ουσιών σε αναλογία ίση με το 1% του συνολικού όγκου ανά φρεάτιο (2μl) και επωάστηκαν για επιπλέον 48-72 h στους 37^0C και σε ατμόσφαιρα 5% CO_2 (συνολική επώαση με τις ουσίες 72-96 h). το υπερκείμενο υλικό απομακρύνθηκε και έγινε προσθήκη του διαλύματος 0.01% SDS σε PBS 1x (100μl/φρεάτιο) και οι πλάκες επωάστηκαν για τουλάχιστον 30 λεπτά στους 37^0 C και ατμόσφαιρα 5% CO2. Κατά τη διάρκεια των 30

λεπτών πραγματοποιείται η λύση των μακροφάγων και η απελευθέρωση των αμαστιγωτών μορφών. Στο τέλος, προστέθηκε υλικό Schneider's-20% FBS (100μl/φρεάτιο) και οι πλάκες επωάστηκαν για 48h στους 26^0 C και ακολούθησε η προσθήκη 20μl Alamar blue/φρεάτιο για 24h φωτομέτρηση όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 3.2.1.2

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

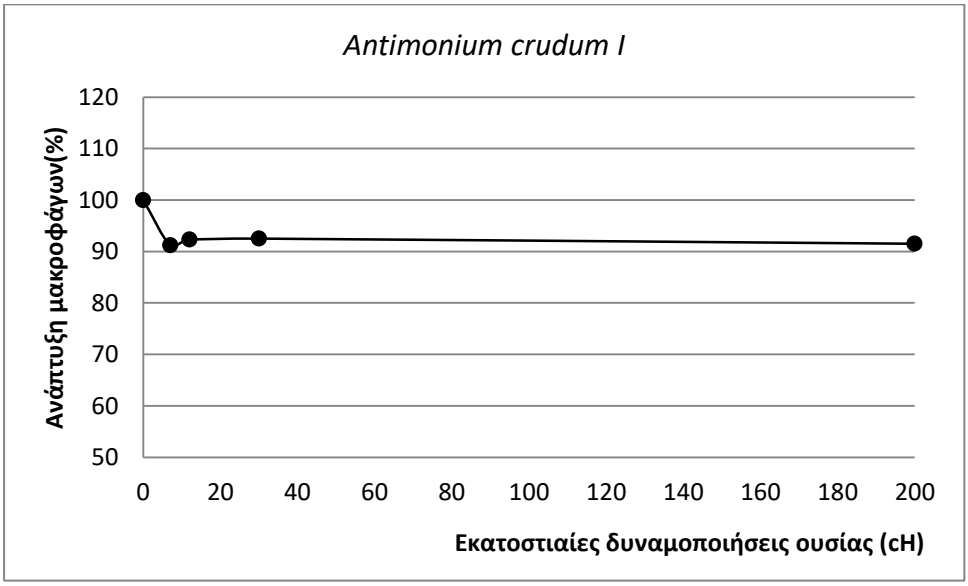
4.1 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας των ομοιοπαθητικών ουσιών σε μακροφάγα J774.1

4.1.1 Δράση του *Antimonium crudum I* (*AC I*)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Antimonium crudum I:* 6 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.1. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH, ελέγχθηκαν για κυτταροτοξικότητα στην κυτταρική σειρά J774.1 των μακροφάγων.

Πίνακας 1: Κυτταροτοξικότητα της ουσίας *Antimonium crudum I* έναντι της κυτταρικής σειράς μακροφάγων J774.1. Η ουσια *AC I* ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Η κυτταροτοξικότητα ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar blue. Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)	Αναστολή (%)- Κυτταρική σειρά μακροφάγων J774.1
***Antimonium crudum I* (*AC I*)**	7 cH	8.8 %
	12 cH	7.7 %
	30 cH	7.5 %
	200 cH	8.5 %



Γράφημα 1 : Ανάπτυξη (%) των μακροφάγων στα οποία προστέθηκε η ουσία *Antimonium crudum I* στις δυναμοποιήσεις: 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100% της ανάπτυξης.

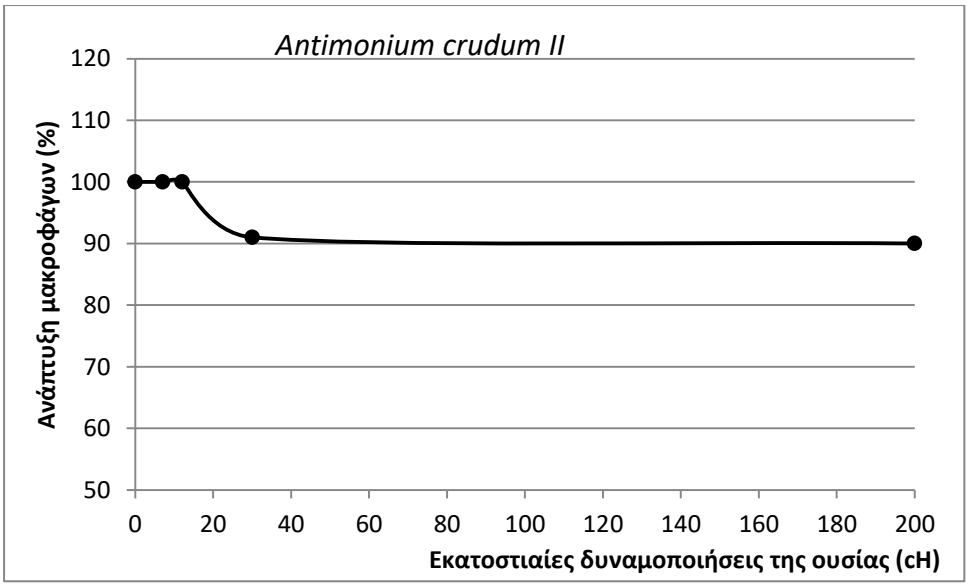
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η ανάπτυξη που παρατηρήθηκε στα μακροφάγα υποδηλώνει πως δεν παρατηρείται κυτταροτοξική δράση της ουσίας *Antimonium crudum I* έναντι των μακροφάγων.

4.1.2 Δράση του *Antimonium crudum II* (AC II)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Antimonium crudum II:* 6 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.1. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH, ελέγχθηκαν για κυτταροτοξικότητα στην κυτταρική σειρά J774.1 των μακροφάγων.

Πίνακας 2: Κυτταροτοξικότητα της ουσίας *Antimonium crudum II* έναντι της κυτταρικής σειράς μακροφάγων J774.1. Η ουσια AC II ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Η κυτταροτοξικότητα ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar blue. Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)	Αναστολή (%)- Κυτταρική σειρά μακροφάγων J774.1
***Antimonium crudum II* (AC 2)**	7 cH	0 %
	12 cH	0 %
	30 cH	8.9 %
	200 cH	9.7 %



Γράφημα 2: Ανάπτυξη (%) των μακροφάγων στα οποία προστέθηκε η ουσία *Antimonium crudum II* στις δυναμοποιήσεις: 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100% της ανάπτυξης.

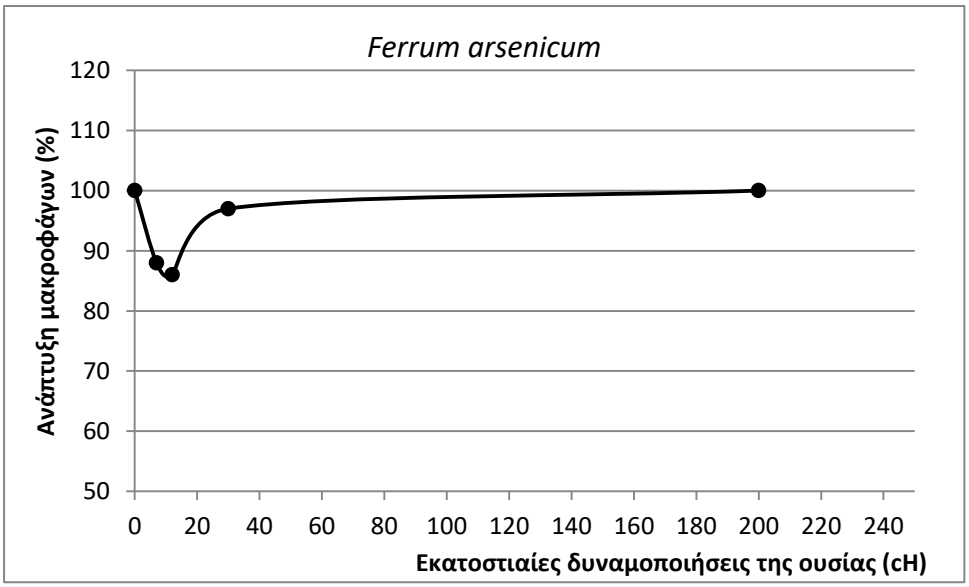
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, , η ανάπτυξη που παρατηρήθηκε στα μακροφάγα υποδηλώνει πως δεν παρατηρείται κυτταροτοξική δράση της ουσίας *Antimonium crudum II* έναντι των μακροφάγων.

4.1.3 Δράση του *Ferrum arsenicum* (FA)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Ferrum arsenicum:* 6 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.1. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH, ελέγχθηκαν για κυτταροτοξικότητα στην κυτταρική σειρά J774.1 των μακροφάγων.

Πίνακας 3: Κυτταροτοξικότητα της ουσίας *Ferrum arsenicum* έναντι της κυτταρικής σειράς μακροφάγων J774.1. Η ουσία FA ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Η κυτταροτοξικότητα ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar blue. Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)	Αναστολή (%)- Κυτταρική σειρά μακροφάγων J774.1
***Ferrum arsenicum* (FA)**	7 cH	11.6 %
	12 cH	14.1 %
	30 cH	3.2 %
	200 cH	7.6 %



Γράφημα 3: Ανάπτυξη (%) των μακροφάγων στα οποία προστέθηκε η ουσία *Ferrum arsenicum* στις δυναμοποιήσεις: 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100% της ανάπτυξης.

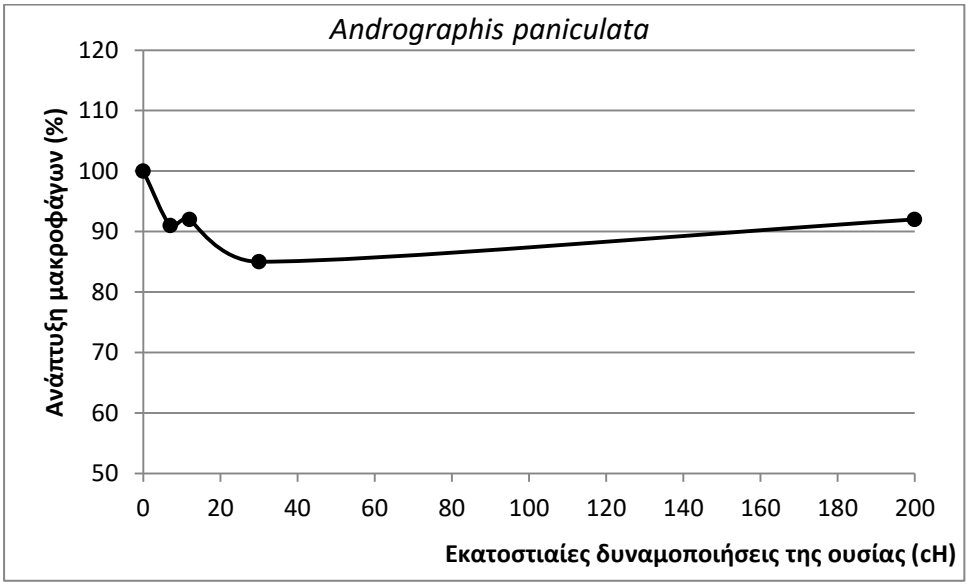
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η ανάπτυξη που παρατηρήθηκε στα μακροφάγα υποδηλώνει πως δεν παρατηρείται κυτταροτοξική δράση της ουσίας *Ferrum arsenicum* έναντι των μακροφάγων.

4.1.4 Δράση του *Andrographis paniculata* (AP)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Andrographis paniculata: 6 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH* δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.1. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH, ελέγχθηκαν για κυτταροτοξικότητα στην κυτταρική σειρά J774.1 των μακροφάγων.

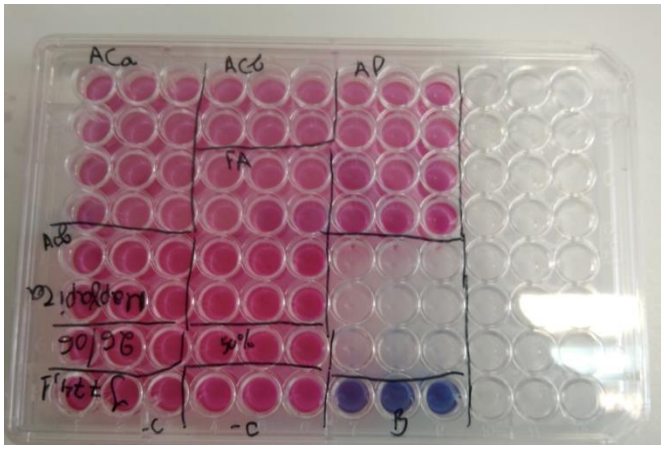
Πίνακας 4: Κυτταροτοξικότητα της ουσίας *Andrographis paniculata* έναντι της κυτταρικής σειράς μακροφάγων J774.1. Η ουσία AP ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Η κυτταροτοξικότητα ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar blue. Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)	Αναστολή (%)- Κυτταρική σειρά μακροφάγων J774.1
***Andrographis paniculata* (AP)**	7 cH	8.8 %
	12 cH	8.3 %
	30 cH	15.2 %
	200 cH	7.6 %



Γράφημα 4: Ανάπτυξη (%) των μακροφάγων στα οποία προστέθηκε η ουσία *Andrographis paniculata* στις δυναμοποιήσεις: 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100% της ανάπτυξης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η ανάπτυξη που παρατηρήθηκε στα μακροφάγα υποδηλώνει πως δεν παρατηρείται κυτταροτοξική δράση της ουσίας *Andrographis paniculata* έναντι των μακροφάγων.



<u>Εικόνα 10:</u> Πλάκα μακροφάγων κυττάρων ποντικού σειράς J 774.1. στις οποίες έχουν προστεθεί οι ουσίες σε διαφορετικές δυναμοποιήσεις. Η κυτταροτοξική δράση των ουσιών αξιολογήθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όπου: *AC 1*α: *Antimonium crudum I*, *AC 1*β: *Antimonium crudum II* , FA: *Ferrum arsenicum*, AP: *Andrographis paniculata*, C: Αρνητικός μάρτυρας, B: Τυφλό διάλυμα, 35% και 50% : Αλκοόλη 35% και 50% αντίστοιχα. Σε όλα τα φρεάτια παρατηρείται πλήρης μεταβολισμός της δραστικής ουσίας ρεσαζουρίνης του αντιδραστηρίου Alamar Blue από τα παράσιτα (ροζ χρώμα) εκτός από αυτά του τυφλού διαλύματος, στα οποία δε παρατηρείται μεταβολισμός της ουσίας όπως αναμένεται (μπλε χρώμα). Η προσθήκη ουσιών πραγματοποιήθηκε στις εξής δυναμοποιήσεις: *Antimonium crudum I*: 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH, *Antimonium crudum II* : 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH, *Ferrum arsenicum*: 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH και *Andrographis paniculata*: 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH

Εφόσον δεν παρατηρήθηκε τοξικότητα στις ελεγχόμενες ουσίες προχωρήσαμε στον έλεγχο των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου της *Leishmania.*

4.2 Προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *Leishmania*

Οι καλλιέργειες των προμαστιγωτών μορφών που ελέγχθηκαν ήταν: *Leishmania infantum* ανθεκτικές στην υπάρχουσα θεραπεία, *Leishmania infantum* ευαίσθητες στην υπάρχουσα θεραπεία, *Leishmania donovani* ευαίσθητες στην υπάρχουσα θεραπεία και *Leishmania amazonensis* ευαίσθητες στην υπάρχουσα θεραπεία. Όλες οι καλλιέργειες προμαστιγωτών διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία 25^0C και απουσία CO_2.

4.2.1 Δράση των ομοιοπαθητικών ουσιών έναντι των ανθεκτικών προμαστιγωτών μορφών *L. infantum*

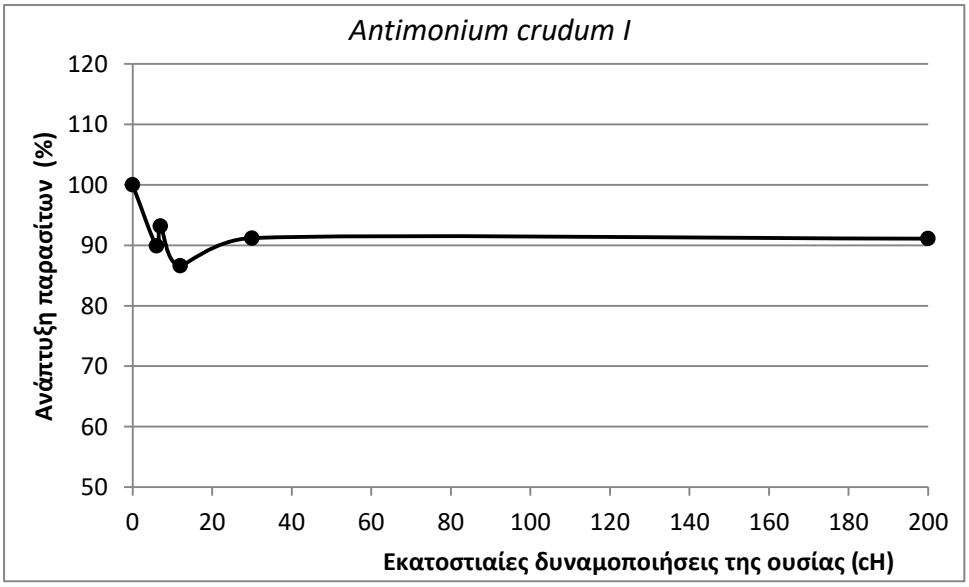
4.2.1.1 Δράση του *Antimonium crudum I* (AC I)

α. Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Antimonium crudum I: 6 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH* δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.1. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH, ελέγχθηκαν για αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις προμαστιγωτές μορφές της *L. infantum,* ανθεκτικές στην υπάρχουσα θεραπεία.

β. Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Antimonium crudum I:* 4cH, 6 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 6 cH,7 cH, 12 cH, 30 cH, 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις προμαστιγωτές μορφές της *L. infantum,* ανθεκτικές στην υπάρχουσα θεραπεία.

Πίνακας 5: Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Antimonium crudum I* έναντι ανθεκτικών προμαστιγωτών *L. infantum*. Η ουσία *AC I* ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	**Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)**	**Αναστολή (%)- προμαστιγωτής μορφής παράσιτα *L. infantum* ανθεκτικά στην υπάρχουσα θεραπεία**
***Antimonium crudum I*(*AC 1*)**	6 cH	10.1 %
	7 cH	6.8 %
	12 cH	13.4 %
	30 cH	8.8 %
	200 cH	8.9 %



Γράφημα 5: Ανάπτυξη (%) προμαστιγωτών μορφών *L. infantum* ανθεκτικών στην υπάρχουσα θεραπεία, στα οποία προστέθηκε η ουσία *Antimonium crudum I* στις δυναμοποιήσεις: 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100% της ανάπτυξης.

Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Antimonium crudum I* που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 86.6 % έως 93.2% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις της ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.

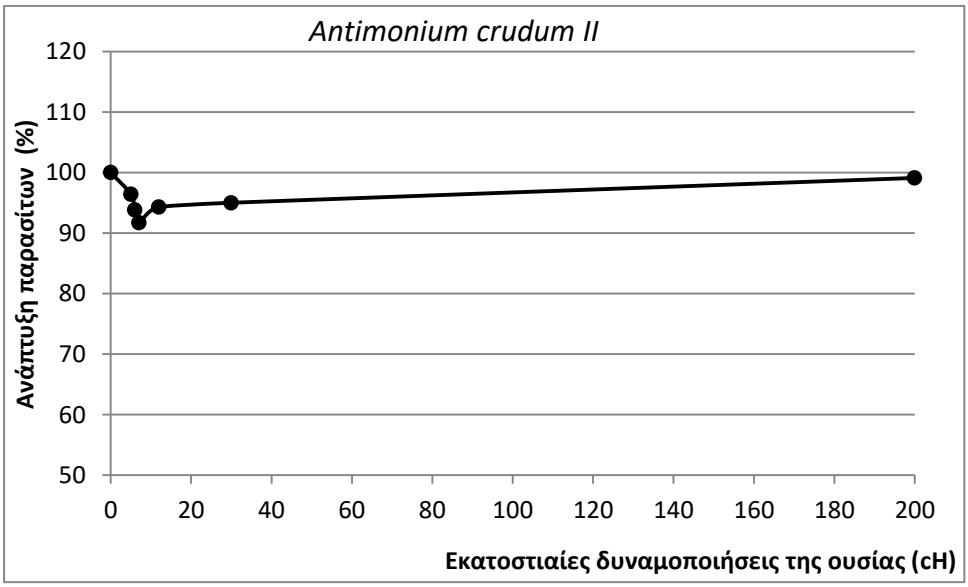
4.2.1.2 Δράση του *Antimonium crudum II* (AC II)

α. Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Antimonium crudum II:* 6 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.1. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH, ελέγχθηκαν για αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις προμαστιγωτές μορφές της *L. infantum,* ανθεκτικές στην υπάρχουσα θεραπεία.

β. Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Antimonium crudum II:* 3 cH, 4cH, 6 cH, 11 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 5 cH, 6 cH, 7 cH, 12 cH, 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις προμαστιγωτές μορφές της *L. infantum,* ανθεκτικές στην υπάρχουσα θεραπεία.

Πίνακας 6: Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Antimonium crudum II* έναντι ανθεκτικών προμαστιγωτών *L. infantum*. Η ουσία AC II ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 5 cH 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	**Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)**	**Αναστολή (%)- προμαστιγωτής μορφής παράσιτα *L. infantum* ανθεκτικά στην υπάρχουσα θεραπεία**
Antimonium crudum II (AC II)	5 cH	3.6 %
	6 cH	6.2 %
	7 cH	8.3 %
	12 cH	5.7 %
	30 cH	5 %
	200 cH	0.9 %



Γράφημα 6: Ανάπτυξη (%) προμαστιγωτών μορφών *L. infantum* ανθεκτικών στην υπάρχουσα θεραπεία, στα οποία προστέθηκε η ουσία *Antimonium crudum II* στις δυναμοποιήσεις: 5 cH, 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100% της ανάπτυξης.

Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Antimonium crudum II* που ελέγχθηκαν,η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 91.7% έως 99.1% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις της ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.

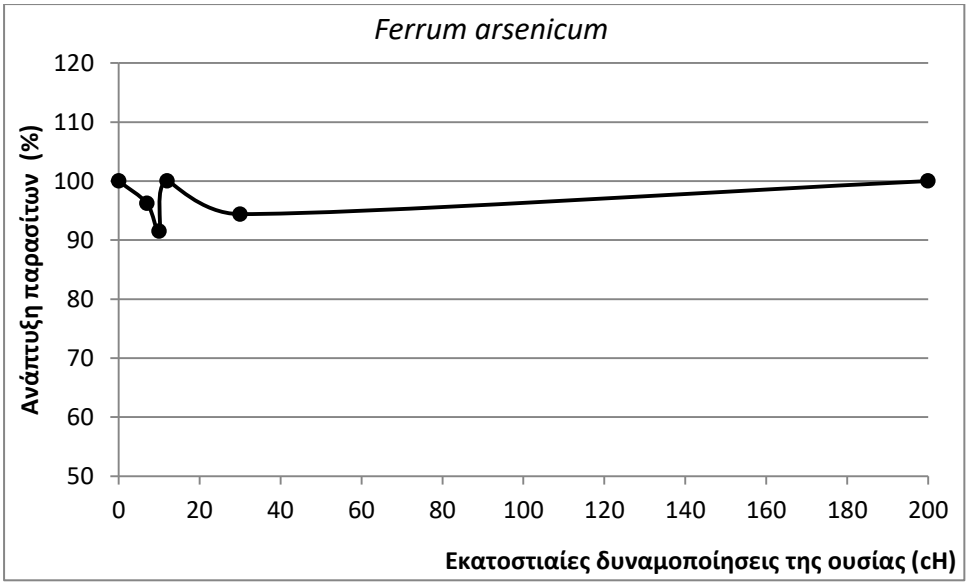
4.1.1.3 Δράση του *Ferrum arsenicum* (FA)

α. Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Ferrum arsenicum:* 6 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.1. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH, ελέγχθηκαν για αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις προμαστιγωτές μορφές της *L. infantum,* ανθεκτικές στην υπάρχουσα θεραπεία.

β. Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Ferrum arsenicum:* 9 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 10 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις προμαστιγωτές μορφές της *L. infantum,* ανθεκτικές στην υπάρχουσα θεραπεία.

Πίνακας 7: Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Ferrum arsenicum* έναντι ανθεκτικών προμαστιγωτών *L. infantum*. Η ουσία FA ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	**Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)**	**Αναστολή (%)- προμαστιγωτής μορφής παράσιτα *L. infantum* ανθεκτικά στην υπάρχουσα θεραπεία**
***Ferrum arsenicum* (FA)**	7 cH	3.8 %
	10 cH	8.5 %
	12 cH	0 %
	30 cH	10.8 %
	200 cH	4.5 %



Γράφημα 7: Ανάπτυξη (%) προμαστιγωτών μορφών *L. infantum* ανθεκτικών στην υπάρχουσα θεραπεία, στα οποία προστέθηκε η ουσία *Ferrum arsenicum* στις δυναμοποιήσεις: 7 cH , 10 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100% της ανάπτυξης.

Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Ferrum arsenicum* που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 91.5% έως 100% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις της ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.

4.1.1.4 Δράση του *Andrographis paniculata* (AP)

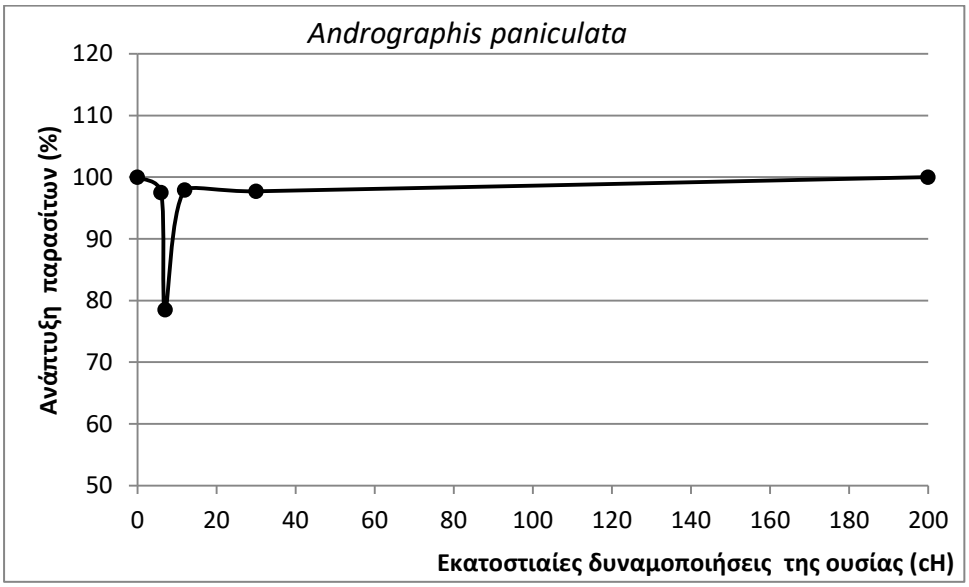
α. Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Andrographis paniculata:* 6 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.1. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH, ελέγχθηκαν για αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις προμαστιγωτές μορφές της *L. infantum,* ανθεκτικές στην υπάρχουσα θεραπεία.

β. Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Andrographis paniculata:* 5 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις προμαστιγωτές μορφές της *L. infantum,* ανθεκτικές στην υπάρχουσα θεραπεία.

Πίνακας 8: Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Andrographis paniculata* έναντι ανθεκτικών προμαστιγωτών *L. infantum*. Η ουσία AP ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

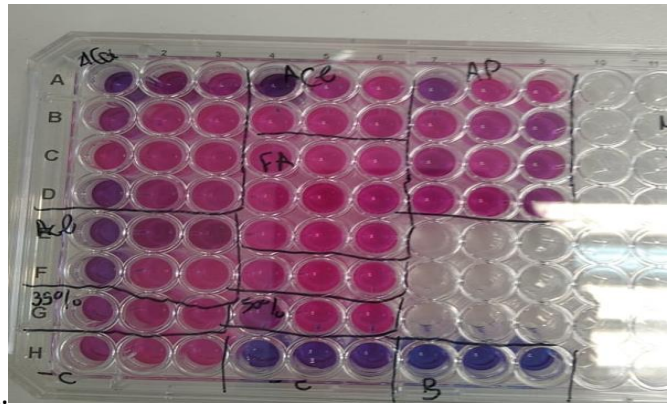
Ομοιοπαθητική Ουσία	Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)	Αναστολή (%)- προμαστιγωτής μορφής παράσιτα *L. infantum* ανθεκτικά στην υπάρχουσα θεραπεία
	6 cH	2.5 %

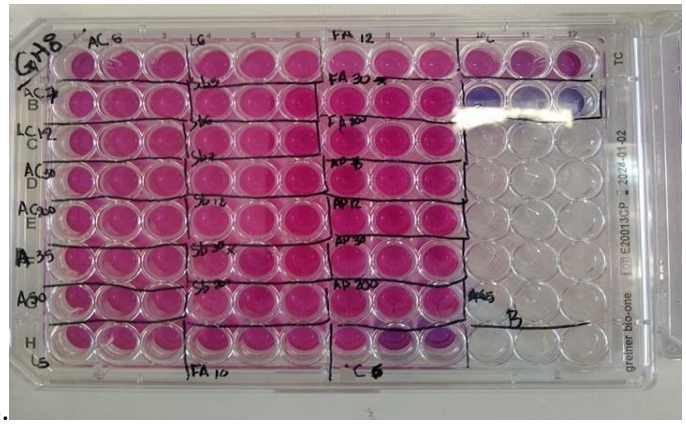
***Andrographis paniculata* (AP)**	7 cH	21.5 %
	12 cH	2.1 %
	30 cH	7.7 %
	200 cH	0 %



Γράφημα 8: Ανάπτυξη (%) προμαστιγωτών μορφών *L. infantum* ανθεκτικών στην υπάρχουσα θεραπεία, στα οποία προστέθηκε η ουσία *Andrographis paniculata* στις δυναμοποιήσεις: 6 cH,7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100% της ανάπτυξης.

Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Andrographis paniculata* που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 78.5% έως 100% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις της ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.

Α. 

B. 

<u>Εικόνα 11:</u> Πλάκα προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L. infantum* ανθεκτικές στην υπάρχουσα θεραπεία, στις οποίες έχουν προστεθεί οι ουσίες σε διαφορετικές δυναμοποιήσεις. Η αντιπαρασιτική δράση των ουσιών αξιολογήθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όπου: *AC* : *Antimonium crudum I*, *Sb*: *Antimonium crudum II*, FA: *Ferrum arsenicum*, AP: *Andrographis paniculata*, C: Αρνητικός μάρτυρας, B: Τυφλό διάλυμα, 35% και 50% : Αλκοόλη 35% και 50% αντίστοιχα. Σε όλα τα φρεάτια παρατηρείται πλήρης μεταβολισμός της δραστικής ουσίας ρεσαζουρίνης του αντιδραστηρίου Alamar Blue από τα παράσιτα (ροζ χρώμα) εκτός από αυτά του τυφλού διαλύματος, στα οποία δε παρατηρείται μεταβολισμός της ουσίας όπως αναμένεται (μπλε χρώμα). **Α.** 1η πειραματική απόπειρα: προσθήκη ουσιών στις εξής δυναμοποιήσεις: *Antimonium crudum I*: 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH, *Antimonium crudum II* : 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH, *Ferrum arsenicum*: 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH και *Andrographis paniculata*: 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH **Β.** 2η πειραματική απόπειρα: προσθήκη ουσιών στις εξής δυναμοποιήσεις: *Antimonium crudum I*: 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH, *Antimonium crudum II* : 5 cH, 6 cH, 7 cH, 12 cH και 200 cH, *Ferrum arsenicum*: 10 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH και *Andrographis paniculata*: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH.

4.2.2 Δράση των ομοιοπαθητικών ουσιών έναντι των ευαίσθητων προμαστιγωτών μορφών *L. infantum*

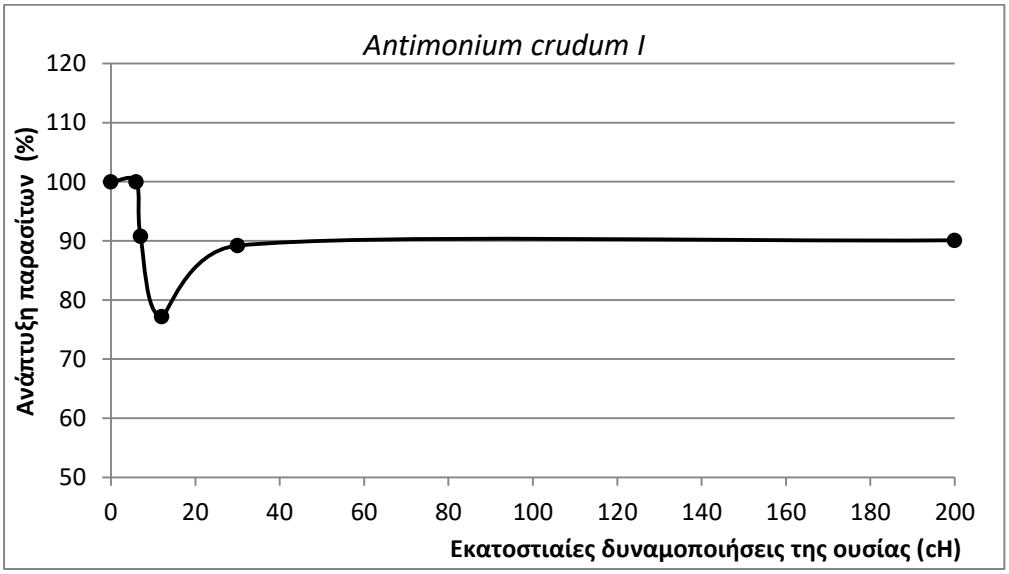
4.2.2.1 Δράση του *Antimonium crudum I* (*AC I*)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Antimonium crudum I:* 4cH, 6 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH, 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις προμαστιγωτές μορφές της *L. infantum,* ευαίσθητες στην υπάρχουσα θεραπεία.

Πίνακας 9: **Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Antimonium crudum I* έναντι ευαίσθητων προμαστιγωτών *L. infantum*.** Η ουσία *AC I* ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)	Αναστολή (%)- προμαστιγωτής μορφής παράσιτα *L. infantum* ευαίσθητα στην υπάρχουσα θεραπεία

***Antimonium crudum I* (*AC I*)**	6 cH	0 %
	7 cH	9.2 %
	12 cH	22.8 %
	30 cH	10.8 %
	200 cH	9.9 %



Γράφημα 9: Ανάπτυξη (%) προμαστιγωτών μορφών *L. infantum* ευαίσθητων στην υπάρχουσα θεραπεία, στα οποία προστέθηκε η ουσία *Antimonium crudum I* στις δυναμοποιήσεις: 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100% της ανάπτυξης.

Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Antimonium crudum I* που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 77.2% έως 100% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.

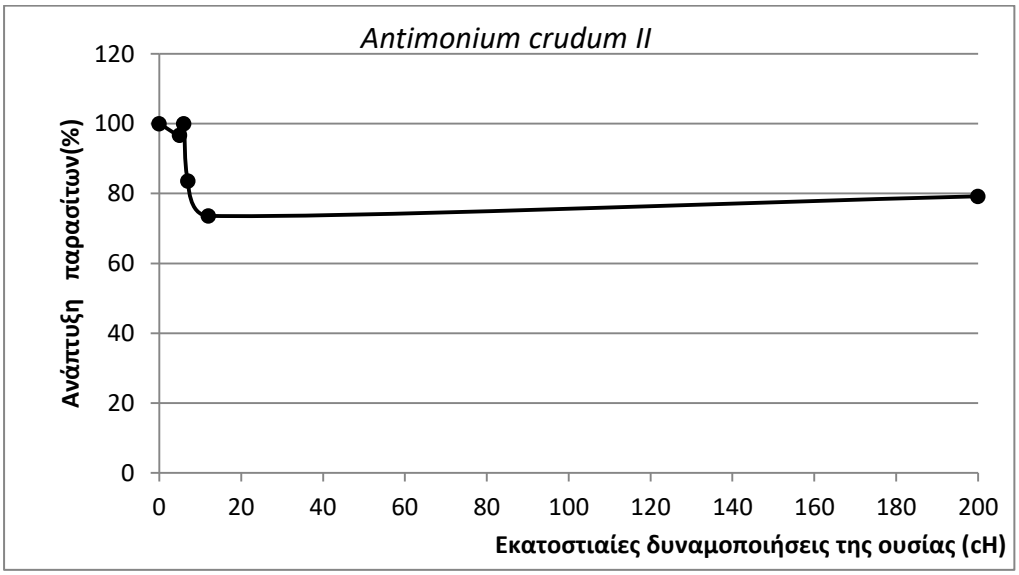
4.2.2.2 Δράση του *Antimonium crudum II* (AC II)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Antimonium crudum II:* 3 cH, 4cH, 6 cH, 11 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 5 cH, 6 cH, 7 cH, 12 cH και 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις προμαστιγωτές μορφές της *L. infantum,* ευαίσθητες στην υπάρχουσα θεραπεία.

Πίνακας 10: **Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Antimonium crudum II* έναντι ευαίσθητων προμαστιγωτών *L. infantum*.** Η ουσία AC II ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 5 cH, 6 cH, 7 cH, 12 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	**Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)**	**Αναστολή (%)- προμαστιγωτής μορφής παράσιτα *L. infantum* ευαίσθητα στην υπάρχουσα θεραπεία**

Antimonium crudum II **(AC II)**	5 cH	3.3 %
	6 cH	14 %
	7 cH	16.4 %
	12 cH	26.4 %
	200 cH	20.8 %



Γράφημα 10: Ανάπτυξη (%) προμαστιγωτών μορφών *L. infantum* ευαίσθητων στην υπάρχουσα θεραπεία, στα οποία προστέθηκε η ουσία *Antimonium crudum II* στις δυναμοποιήσεις: 5 cH, 6 cH, 7 cH, 12 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100% της ανάπτυξης.

Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Antimonium crudum II* που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 73.6% έως 96.7% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις της ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.

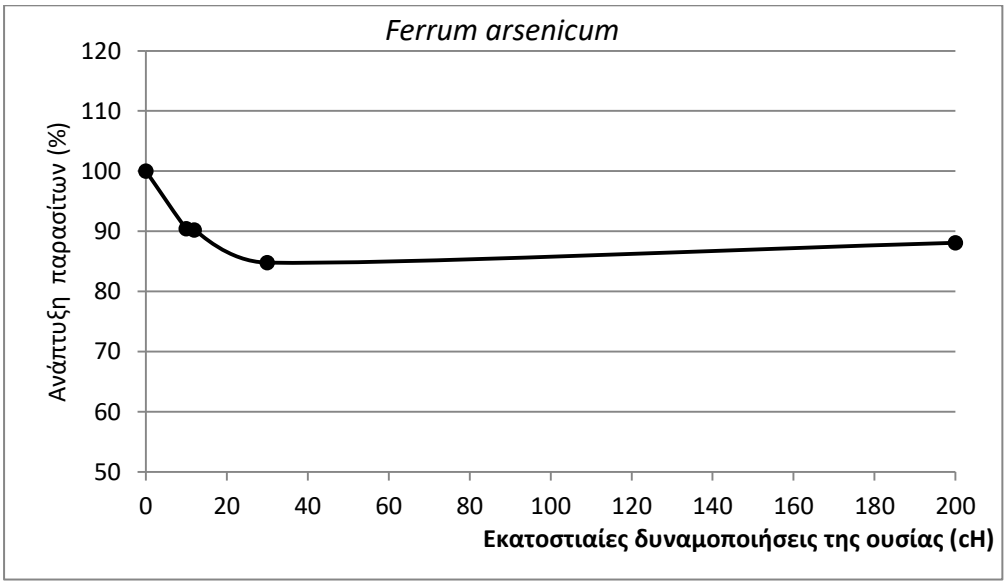
4.2.2.3 Δράση του *Ferrum arsenicum* (FA)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Ferrum arsenicum:* 9 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 10 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις προμαστιγωτές μορφές της *L. infantum,* ευαίσθητες στην υπάρχουσα θεραπεία.

Πίνακας 11: **Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Ferrum arsenicum* έναντι ευαίσθητων προμαστιγωτών *L. infantum*.** Η ουσία FA ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 10 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	**Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)**	**Αναστολή (%)- προμαστιγωτής μορφής παράσιτα *L. infantum* ευαίσθητα στην υπάρχουσα θεραπεία**
***Ferrum arsenicum* (FA)**	10 cH	9.6 %
	12 cH	9.8 %

	30 cH	15.2 %
	200 cH	11.9 %



Γράφημα 11: Ανάπτυξη (%) προμαστιγωτών μορφών *L. infantum* ευαίσθητων στην υπάρχουσα θεραπεία, στα οποία προστέθηκε η ουσία *Ferrum arsenicum* στις δυναμοποιήσεις: 10 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100% της ανάπτυξης.

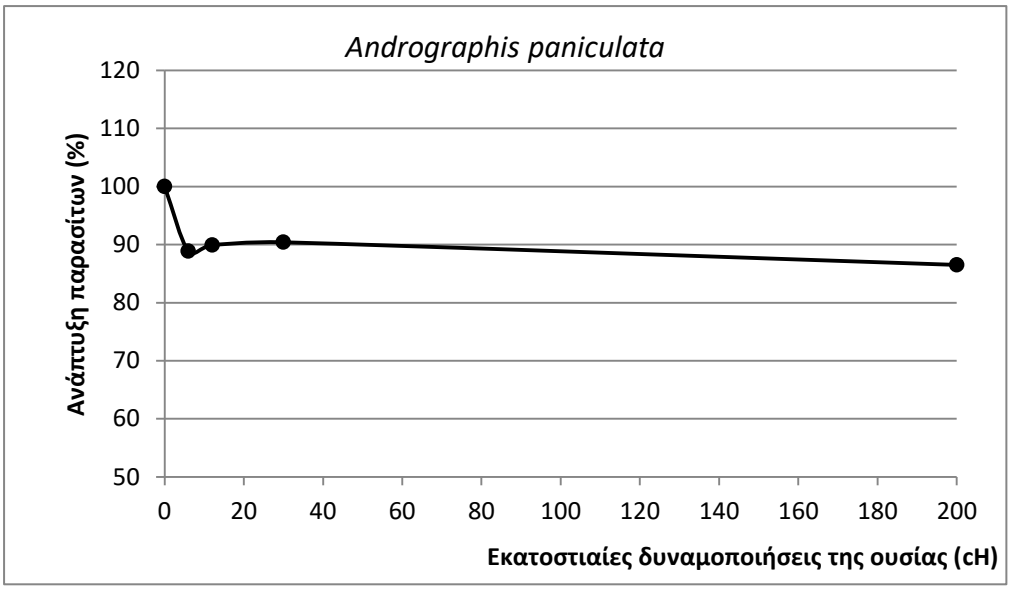
Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Ferrum arsenicum* που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 84.8% έως 90.4% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις της ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.

4.2.2.4 Δράση του *Andrographis paniculata* (AP)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Andrographis paniculata:* 5 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις προμαστιγωτές μορφές της *L. infantum,* ευαίσθητες στην υπάρχουσα θεραπεία.

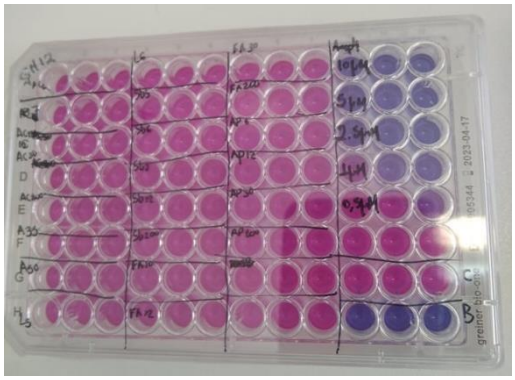
Πίνακας 12: **Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Andrographis paniculata* έναντι ευαίσθητων προμαστιγωτών *L. infantum*.** Η ουσία AP ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	**Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)**	**Αναστολή (%)- προμαστιγωτής μορφής παράσιτα *L. infantum* ευαίσθητα στην υπάρχουσα θεραπεία**
***Andrographis paniculata* (AP)**	6 cH	11.1 %
	12 cH	10.1 %
	30 cH	9.6 %
	200 cH	13.5 %



Γράφημα 12: Ανάπτυξη (%) προμαστιγωτών μορφών *L. infantum* ευαίσθητων στην υπάρχουσα θεραπεία, στα οποία η ουσία *Andrographis paniculata* στις δυναμοποιήσεις: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100% της ανάπτυξης.

Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Andrographis paniculata* που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 86.5% έως 90.4% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις της ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.



<u>Εικόνα 12:</u> Πλάκα προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L. infantum* ευαίσθητες στην υπάρχουσα θεραπεία, στις οποίες έχουν προστεθεί οι ουσίες σε διαφορετικές δυναμοποιήσεις. Η αντιπαρασιτική δράση των ουσιών αξιολογήθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όπου: *AC* : *Antimonium crudum I*, *Sb*: *Antimonium crudum II* , FA: *Ferrum arsenicum*, AP: *Andrographis paniculata*, C: Αρνητικός μάρτυρας, B: Τυφλό διάλυμα, 35% και 50% : Αλκοόλη 35% και 50% αντίστοιχα. Σε όλα τα φρεάτια παρατηρείται πλήρης μεταβολισμός της δραστικής ουσίας ρεσαζουρίνης του αντιδραστηρίου Alamar Blue από τα παράσιτα (ροζ χρώμα) εκτός από αυτά του τυφλού διαλύματος, στα οποία δε παρατηρείται μεταβολισμός της ουσίας όπως αναμένεται (μπλε χρώμα). Η προσθήκη των ουσιών πραγματοποιήθηκε στις εξής δυναμοποιήσεις*: Antimonium crudum I*: 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH, *Antimonium crudum II*: 5 cH, 6 cH, 7 cH, 12 cH και 200 cH, *Ferrum arsenicum*: 10 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH και *Andrographis paniculata*: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH.

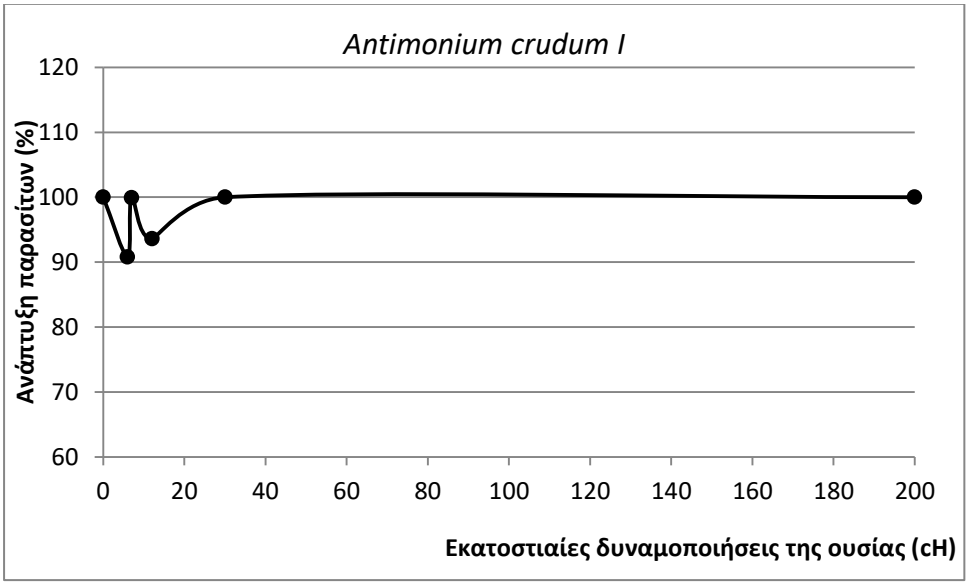
4.2.3 Δράση των ομοιοπαθητικών ουσιών έναντι των προμαστιγωτών μορφών *L. amazonensis*

4.2.3.1 Δράση του *Antimonium crudum I* (*AC I*)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Antimonium crudum I:* 4cH, 6 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 6 cH,7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις προμαστιγωτές μορφές της *L. amazonensis.*

Πίνακας 13: **Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Antimonium crudum I* έναντι των προμαστιγωτών *L. amazonensis* .** Η ουσία *AC I* ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 6 cH, 7cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	**Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)**	**Αναστολή (%)- προμαστιγωτής μορφής παράσιτα *L. amazonensis***
***Antimonium crudum I* (*AC I*)**	6 cH	9.2 %
	7 cH	0.1 %
	12 cH	6.3 %
	30 cH	0 %
	200 cH	0 %



Γράφημα 13: Ανάπτυξη (%) προμαστιγωτών μορφών *L. amazonensis*, στα οποία η ουσία *Antimonium crudum I* στις δυναμοποιήσεις: 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100% της ανάπτυξης.

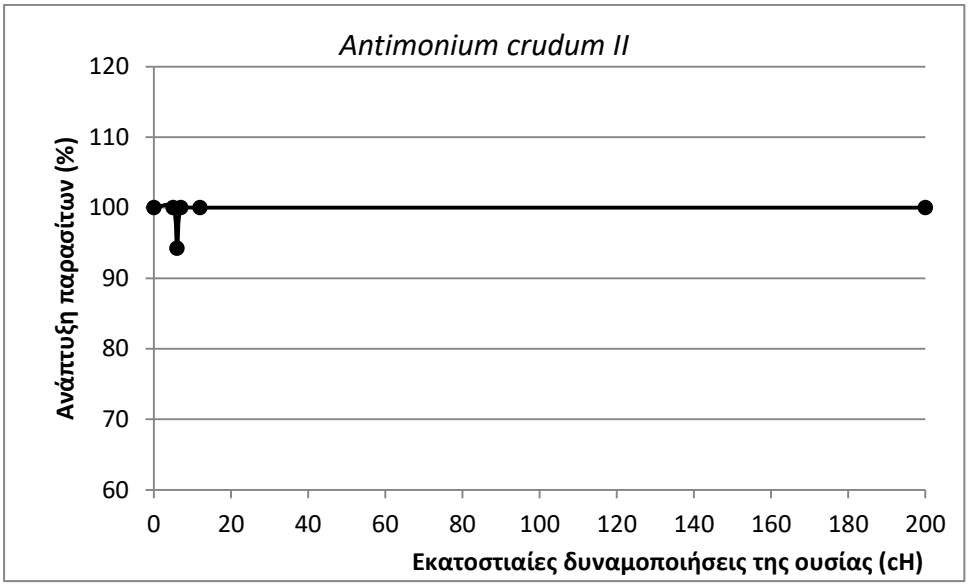
Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Antimonium crudum I* που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 90.8% έως 100% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.

4.2.3.2 Δράση του *Antimonium crudum II* (AC II)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Antimonium crudum II:* 3 cH, 4cH, 6 cH, 11 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 5 cH,6 cH, 7cH, 12 cH και 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις προμαστιγωτές μορφές της *L. amazonensis.*

Πίνακας 14: **Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Antimonium crudum II* έναντι των προμαστιγωτών *L. amazonensis* .** Η ουσία AC II ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 5 cH,6 cH, 7cH, 12 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)	Αναστολή (%)- προμαστιγωτής μορφής παράσιτα *L. amazonensis*
***Antimonium crudum II* (AC II)**	5 cH	0 %
	6 cH	5.8 %
	7 cH	0 %
	12 cH	0 %
	200 cH	0 %



Γράφημα 14: Ανάπτυξη (%) προμαστιγωτών μορφών *L. amazonensis*, στα οποία η ουσία *Antimonium crudum II* στις δυναμοποιήσεις: 5 cH, 6 cH, 7 cH, 12 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100% της ανάπτυξης.

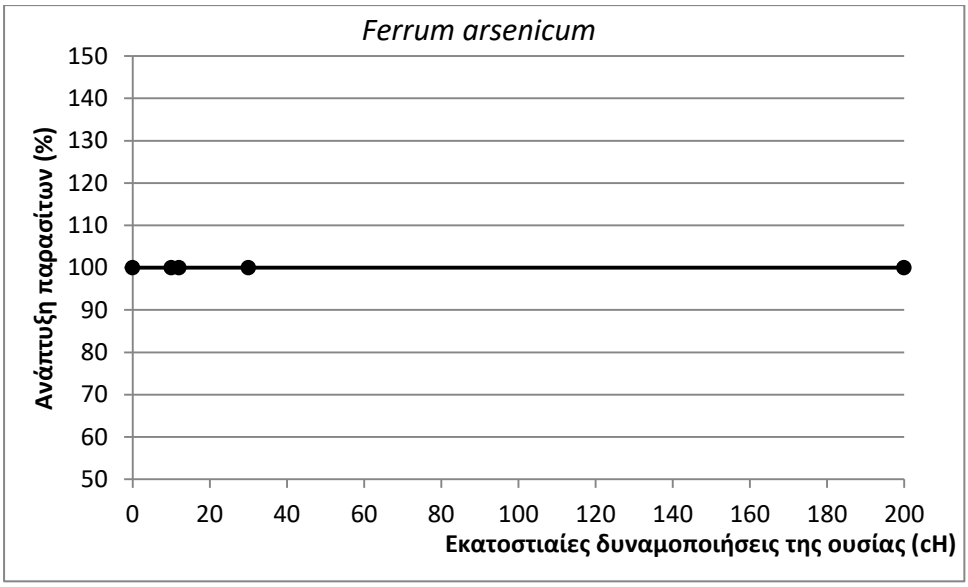
Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Antimonium crudum II* που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 94.2% έως 100% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις της ουσία δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.

4.2.3.3 Δράση του *Ferrum arsenicum* (FA)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Ferrum arsenicum:* 9 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 10 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις προμαστιγωτές μορφές της *L. amazonensis.*

Πίνακας 15: **Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Ferrum arsenicum* έναντι των προμαστιγωτών *L. amazonensis* .** Η ουσία FA ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 10 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)	Αναστολή (%)- προμαστιγωτής μορφής παράσιτα *L. amazonensis*
***Ferrum arsenicum* (FA)**	10 cH	0 %
	12 cH	0 %
	30 cH	0 %
	200 cH	0 %



Γράφημα 15: Ανάπτυξη (%) προμαστιγωτών μορφών *L. amazonensis*, στα οποία η ουσία *Ferrum arsenicum* στις δυναμοποιήσεις: 10 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100% της ανάπτυξης.

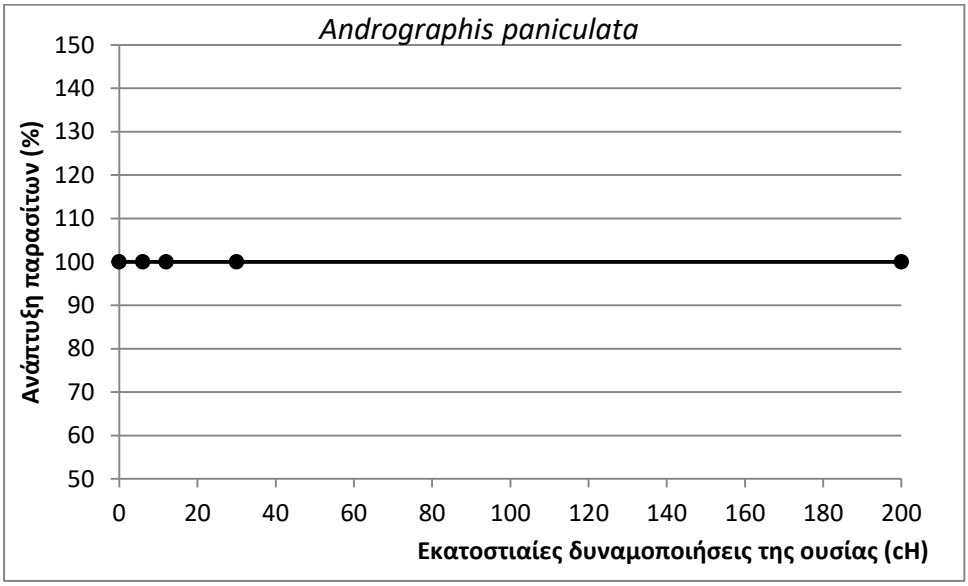
Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Ferrum arsenicum* που ελέγχθηκαν παρατηρήθηκε 100% ανάπτυξη που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις της ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.

4.2.3.4 Δράση του *Andrographis paniculata* (AP)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Andrographis paniculata*: 5 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις προμαστιγωτές μορφές της *L. amazonensis.*

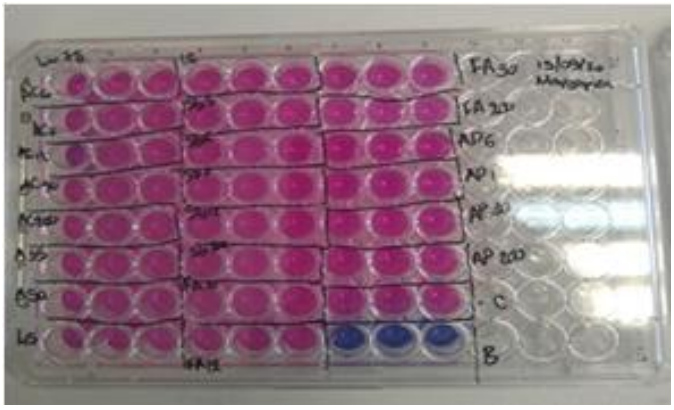
Πίνακας 16: **Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Andrographis paniculata* έναντι των προμαστιγωτών *L. amazonensis* .** Η ουσία ΑΡ ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	**Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)**	**Αναστολή (%)- προμαστιγωτής μορφής παράσιτα *L. amazonensis***
***Andrographis paniculata* (ΑΡ)**	6 cH	0 %
	12 cH	0 %
	30 cH	0 %
	200 cH	0 %



Γράφημα 16: Ανάπτυξη (%) προμαστιγωτών μορφών *L. amazonensis*, στα οποία η ουσία *Andrographis paniculata* στις δυναμοποιήσεις: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100% της ανάπτυξης.

Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Andrographis paniculata* που ελέγχθηκαν παρατηρήθηκε 100% ανάπτυξη που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις της ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.



<u>Εικόνα 13:</u> Πλάκα προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L. amazonensis* , στις οποίες έχουν προστεθεί οι ουσίες σε διαφορετικές δυναμοποιήσεις. Η αντιπαρασιτική δράση των ουσιών αξιολογήθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όπου: *AC* : *Antimonium crudum I*, *Sb*: *Antimonium crudum II* , FA: *Ferrum arsenicum*, AP: *Andrographis paniculata*, C: Αρνητικός μάρτυρας, B: Τυφλό διάλυμα, 35% και 50% : Αλκοόλη 35% και 50% αντίστοιχα. Σε όλα τα φρεάτια παρατηρείται πλήρης μεταβολισμός της δραστικής ουσίας ρεσαζουρίνης του αντιδραστηρίου Alamar Blue από τα παράσιτα (ροζ χρώμα) εκτός από αυτά του τυφλού διαλύματος, στα οποία δε παρατηρείται μεταβολισμός της ουσίας όπως αναμένεται (μπλε χρώμα). Η προσθήκη των ουσιών πραγματοποιήθηκε στις εξής δυναμοποιήσεις*: Antimonium crudum I*: 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH, *Antimonium crudum II*: 5 cH, 6 cH, 7 cH, 12 cH και 200 cH, *Ferrum arsenicum*: 10 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH και *Andrographis paniculata*: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH

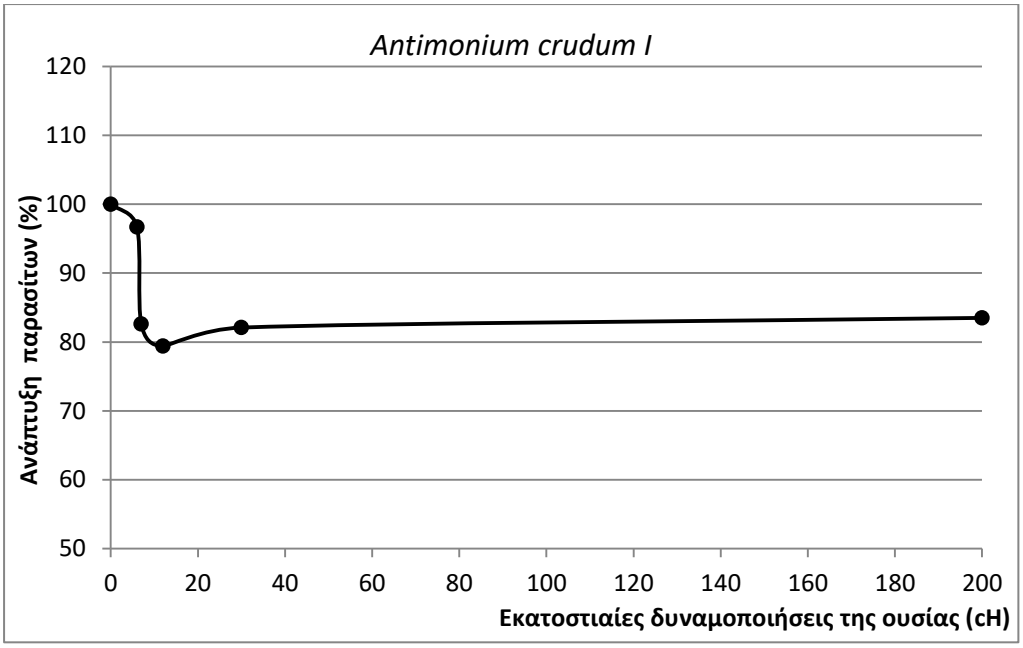
4.2.4 Δράση των ομοιοπαθητικών ουσιών έναντι των προμαστιγωτών μορφών *L. donovani*

4.2.4.1 Δράση του *Antimonium crudum I* (*AC I*)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Antimonium crudum I*: 4cH, 6 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 6 cH,7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις προμαστιγωτές μορφές της *L. donovani.*

Πίνακας 17: **Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Antimonium crudum I* έναντι των προμαστιγωτών *L. donovani*.** Η ουσία *AC I* ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 6 cH,7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	**Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)**	**Αναστολή (%)- προμαστιγωτής μορφής παράσιτα *L. donovani***
***Antimonium crudum I*(*AC I*)**	6 cH	1.8 %
	7 cH	17.4 %
	12 cH	19.4 %
	30 cH	18.2 %
	200 cH	18.8 **%**



Γράφημα 17: Ανάπτυξη (%) προμαστιγωτών μορφών *L. donovani*, στα οποία προστέθηκε η ουσία *Antimonium crudum I* στις δυναμοποιήσεις: 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100% της ανάπτυξης.

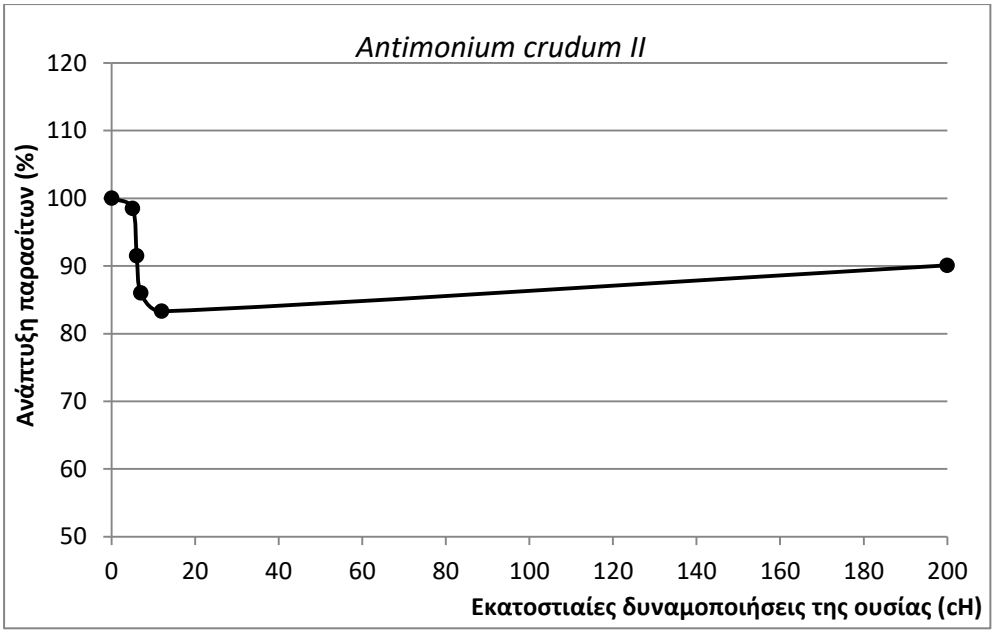
Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Antimonium crudum I* που ελέγχθηκαν,η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 79.4% έως 96.7% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.

4.2.4.2 Δράση του *Antimonium crudum II* (AC II)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Antimonium crudum II:* 3 cH, 4cH, 6 cH, 11 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 5 cH, 6 cH,7 cH, 12 cH και 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις προμαστιγωτές μορφές της *L. donovani.*

Πίνακας 18: **Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Antimonium crudum II* έναντι των προμαστιγωτών *L. donovani*.** Η ουσία AC II ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 5 cH, 6 cH,7 cH, 12 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)	Αναστολή (%)- προμαστιγωτής μορφής παράσιτα *L. donovani*
***Antimonium crudum II* (AC II)**	5 cH	6.5 **%**
	6 cH	11 **%**
	7 cH	14.7 **%**
	12 cH	18.2 **%**
	200 cH	9.3 **%**



Γράφημα 18: Ανάπτυξη (%) προμαστιγωτών μορφών *L. donovani*, στα οποία προστέθηκε η ουσία *Antimonium crudum II* στις δυναμοποιήσεις: 5 cH, 6 cH, 7 cH, 12 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100% της ανάπτυξης.

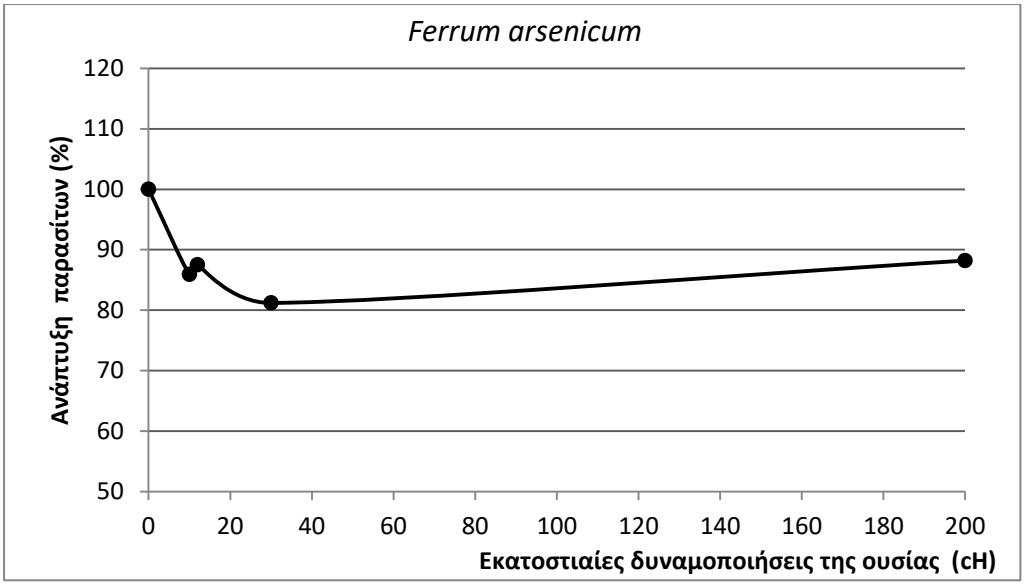
Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Antimonium crudum II* που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 83.3% έως 98.5% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις της ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.

4.2.4.3 Δράση του *Ferrum arsenicum* (FA)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Ferrum arsenicum:* 9 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 10 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις προμαστιγωτές μορφές της *L. donovani.*

Πίνακας 19: **Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Ferrum arsenicum* έναντι των προμαστιγωτών *L. donovani*.** Η ουσία FA ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 10 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	**Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)**	**Αναστολή (%)- προμαστιγωτής μορφής παράσιτα *L. donovani***
***Ferrum arsenicum* (FA)**	10 cH	14.1 **%**
	12 cH	12.5 **%**
	30 cH	18.8 **%**
	200 cH	11.8 **%**



Γράφημα 19: Ανάπτυξη (%) προμαστιγωτών μορφών *L. donovani*, στα οποία προστέθηκε η ουσία *Ferrum arsenicum* στις δυναμοποιήσεις: 10 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100% της ανάπτυξης.

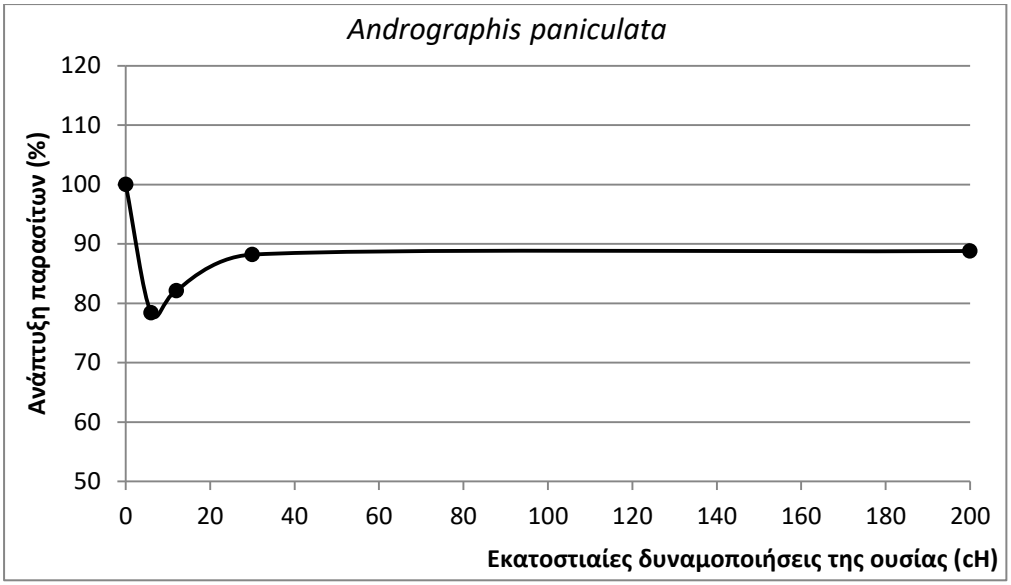
Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Ferrum arsenicum* που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 81.2% έως 88.2% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις της ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.

4.2.4.4 Δράση του *Andrographis paniculata* (AP)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Andrographis paniculata:* 5 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις προμαστιγωτές μορφές της *L. donovani.*

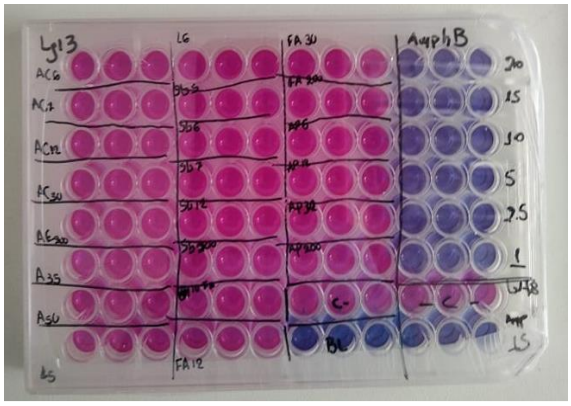
Πίνακας 20: **Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Andrographis paniculata* έναντι των προμαστιγωτών *L. donovani*.** Η ουσία AP ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	**Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)**	**Αναστολή (%)- προμαστιγωτής μορφής παράσιτα *L. donovani***
***Andrographis paniculata* (AP)**	6 cH	21.6 %
	12 cH	17.9 %
	30 cH	11.8 %
	200 cH	11.2 %



Γράφημα 20: Ανάπτυξη (%) προμαστιγωτών μορφών *L. donovani*, στα οποία προστέθηκε η ουσία *Andrographis paniculata* στις δυναμοποιήσεις: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100% της ανάπτυξης.

Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Andrographis paniculata* που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 78.4% έως 88.8% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις της ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.



<u>Εικόνα 14:</u> Πλάκα προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L. donovani* , στις οποίες έχουν προστεθεί οι ουσίες σε διαφορετικές δυναμοποιήσεις. Η αντιπαρασιτική δράση των ουσιών αξιολογήθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όπου: *AC* : *Antimonium crudum I*, *Sb*: *Antimonium crudum II* , FA: *Ferrum arsenicum*, AP: *Andrographis paniculata*, C: Αρνητικός μάρτυρας, B: Τυφλό διάλυμα, 35% και 50% : Αλκοόλη 35% και 50% αντίστοιχα. Σε όλα τα φρεάτια παρατηρείται πλήρης μεταβολισμός της δραστικής ουσίας ρεσαζουρίνης του αντιδραστηρίου Alamar Blue από τα παράσιτα (ροζ χρώμα) εκτός από αυτά του τυφλού διαλύματος, στα οποία δε παρατηρείται μεταβολισμός της ουσίας όπως αναμένεται (μπλε χρώμα). Η προσθήκη των ουσιών πραγματοποιήθηκε στις εξής δυναμοποιήσεις*: Antimonium crudum I*: 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH, *Antimonium crudum II*: 5 cH, 6 cH, 7 cH, 12 cH και 200 cH, *Ferrum arsenicum*: 10 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH και *Andrographis paniculata*: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH

4.3 Ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *Leishmania*

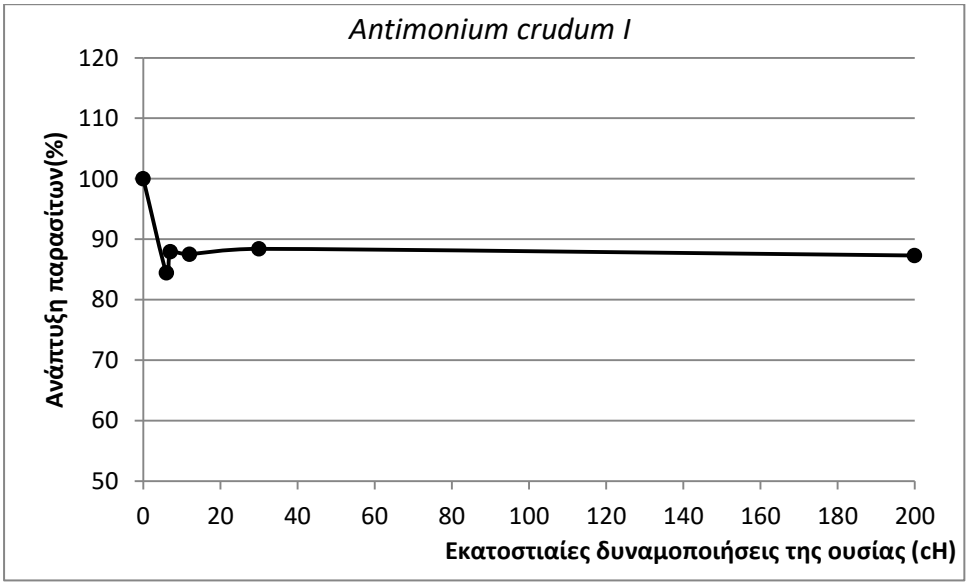
4.3.1 Δράση των ομοιοπαθητικών ουσιών έναντι των ανθεκτικών ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. infantum*

4.3.1.1 Δράση του *Antimonium crudum I*(*AC I*)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Antimonium crudum I:* 4cH, 6 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 6 cH,7 cH, 12 cH, 30 cH, 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές μορφές της *L. infantum,* ανθεκτικές στην υπάρχουσα θεραπεία.

Πίνακας 21: **Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Antimonium crudum I* έναντι ανθεκτικών ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών *L. infantum*.** Η ουσία *AC I* ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 6 cH, 7 cH,12 cH 30 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	**Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)**	**Αναστολή (%) ενδοκυττάρια *αμαστιγωτή μορφή παρασίτου L.infantum* ανθεκτικού στην υπάρχουσα θεραπεία**
***Antimonium crudum I* (*AC I*)**	6 cH	15.6 %
	7 cH	12.1 %
	12 cH	12.5 %
	30 cH	11.6 %
	200 cH	12.7 %



Γράφημα 21: Ανάπτυξη (%)ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. infantum* ανθεκτικών στην υπάρχουσα θεραπεία, στα οποία προστέθηκε η ουσία *Antimonium crudum I*στις δυναμοποιήσεις: 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100% της ανάπτυξης.

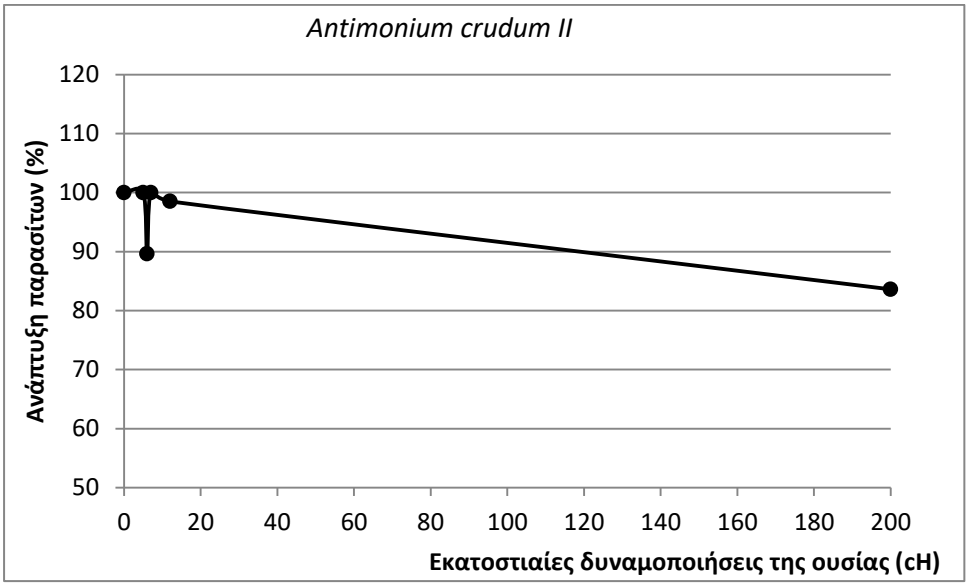
Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Antimonium crudum I* που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 84.4% έως 88.4% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.

4.3.1.2 Δράση του *Antimonium crudum II* (AC II)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Antimonium crudum II:*3 cH, 4cH, 6 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 5 cH, 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH, 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές της *L. infantum,* ανθεκτικές στην υπάρχουσα θεραπεία.

Πίνακας 22: **Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Antimonium crudum II* έναντι ανθεκτικών ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών *L. infantum*.** Η ουσία AC II ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 5 cH, 6 cH, 7 cH,12 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	**Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)**	**Αναστολή (%) ενδοκυττάρια *αμαστιγωτή μορφή παρασίτου L.infantum* ανθεκτικού στην υπάρχουσα θεραπεία**
***Antimonium crudum II* (AC II)**	5 cH	0 %
	6 cH	10.4 %
	7 cH	0 %
	12 cH	1.5 %
	200 cH	16.4 %



Γράφημα 22: Ανάπτυξη (%)ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. infantum* ανθεκτικών στην υπάρχουσα θεραπεία, στα οποία προστέθηκε η ουσία *Antimonium crudum II* στις δυναμοποιήσεις: 5 cH, 6 cH, 7 cH, 12 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100% της ανάπτυξης.

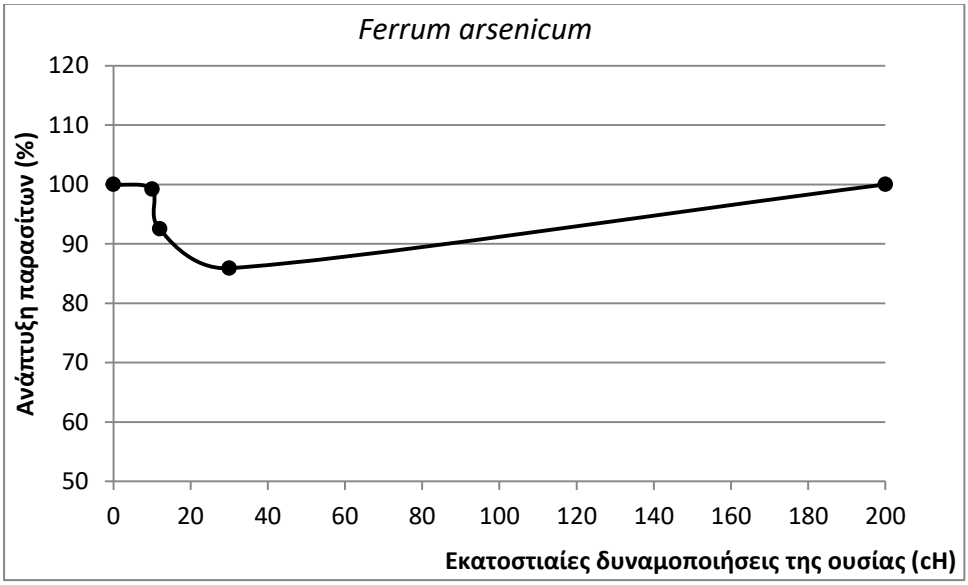
Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Antimonium crudum II* που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 83.6% έως 100% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις της ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.

4.3.1.3 Δράση του *Ferrum arsenicum* (FA)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Ferrum arsenicum:* 9 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 10 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές της *L. infantum,* ανθεκτικές στην υπάρχουσα θεραπεία.

Πίνακας 23: **Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Ferrum arsenicum* έναντι ανθεκτικών ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών *L. infantum*.** Η ουσία FA ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 10 cH,12 cH, 30 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	**Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)**	**Αναστολή (%) ενδοκυττάρια *αμαστιγωτή μορφή παρασίτου L.infantum* ανθεκτικού στην υπάρχουσα θεραπεία**
***Ferrum arsenicum* (FA)**	10 cH	0.8 %
	12 cH	7.5 %
	30 cH	14.1 %
	200 cH	0 %



Γράφημα 23: Ανάπτυξη (%)ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. infantum* ανθεκτικών στην υπάρχουσα θεραπεία, στα οποία προστέθηκε η ουσία *Ferrum arsenicum* στις δυναμοποιήσεις: 10 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100% της ανάπτυξης.

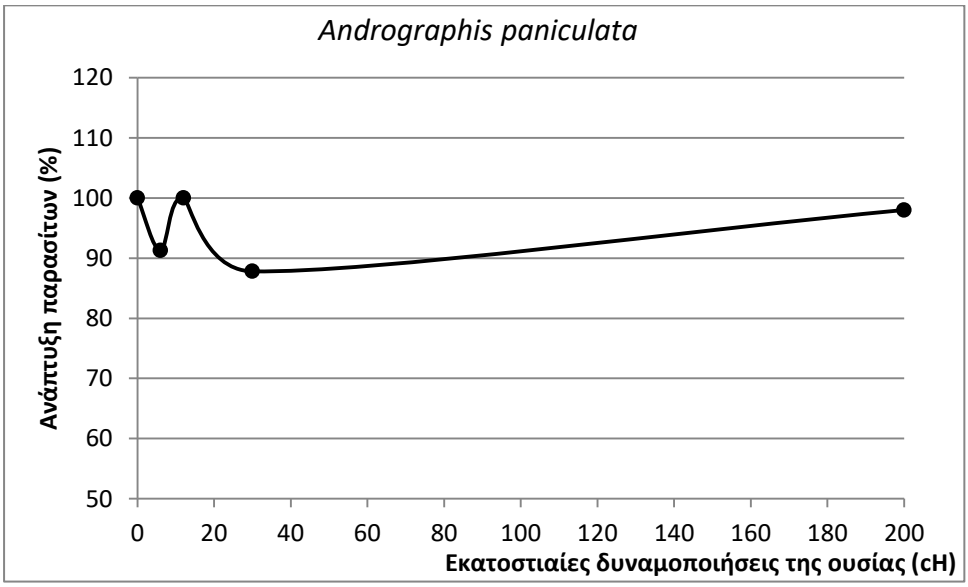
Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Ferrum arsenicum* που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 85.9% έως 100% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις της ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.

4.3.1.4 Δράση του *Andrographis paniculata* (AP)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Andrographis paniculata:* 5 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές της *L. infantum,* ανθεκτικές στην υπάρχουσα θεραπεία.

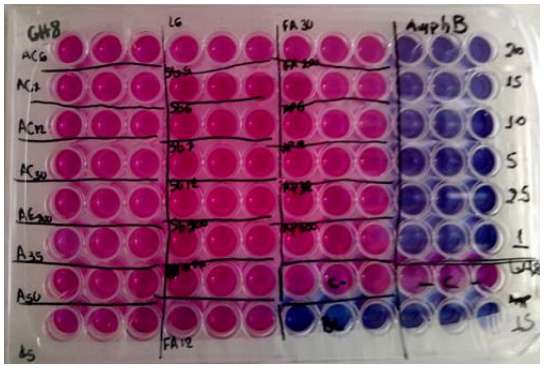
Πίνακας 24: **Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Andrographis paniculata* έναντι ανθεκτικών ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών *L. infantum*.** Η ουσία AP ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 6 cH,12 cH, 30 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	**Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)**	**Αναστολή (%) ενδοκυττάρια *αμαστιγωτή μορφή παρασίτου L.infantum* ανθεκτικού στην υπάρχουσα θεραπεία**
***Andrographis paniculata* (AP)**	6 cH	8.7 %
	12 cH	0 %
	30 cH	12.2 %
	200 cH	2 %



Γράφημα 24: Ανάπτυξη (%)ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. infantum* ανθεκτικών στην υπάρχουσα θεραπεία, στα οποία προστέθηκε η ουσία *Andrographis paniculata* στις δυναμοποιήσεις: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100% της ανάπτυξης.

Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Andrographis paniculata* που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 87.8% έως 100% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις της ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.



<u>Εικόνα 15:</u> Πλάκα ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L. infantum,* ανθεκτικές στην υπάρχουσα θεραπεία στις οποίες έχουν προστεθεί οι ουσίες σε διαφορετικές δυναμοποιήσεις. Η αντιπαρασιτική δράση των ουσιών αξιολογήθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όπου: *AC* : *Antimonium crudum I*, *Sb*: *Antimonium crudum II* , FA: *Ferrum arsenicum*, AP: *Andrographis paniculata*, C: Αρνητικός μάρτυρας, B: Τυφλό διάλυμα, 35% και 50% : Αλκοόλη 35% και 50% αντίστοιχα. Σε όλα τα φρεάτια παρατηρείται πλήρης μεταβολισμός της δραστικής ουσίας ρεσαζουρίνης του αντιδραστηρίου Alamar Blue από τα παράσιτα (ροζ χρώμα) εκτός από αυτά του τυφλού διαλύματος, στα οποία δε παρατηρείται μεταβολισμός της ουσίας όπως αναμένεται (μπλε χρώμα). Η προσθήκη των ουσιών πραγματοποιήθηκε στις εξής δυναμοποιήσεις*: Antimonium crudum I*: 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH, *Antimonium crudum II*: 5 cH, 6 cH, 7 cH, 12 cH και 200 cH, *Ferrum arsenicum*: 10 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH και *Andrographis paniculata*: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH.

4.3.2 Δράση των ομοιοπαθητικών ουσιών έναντι των ευαίσθητων ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. infantum*

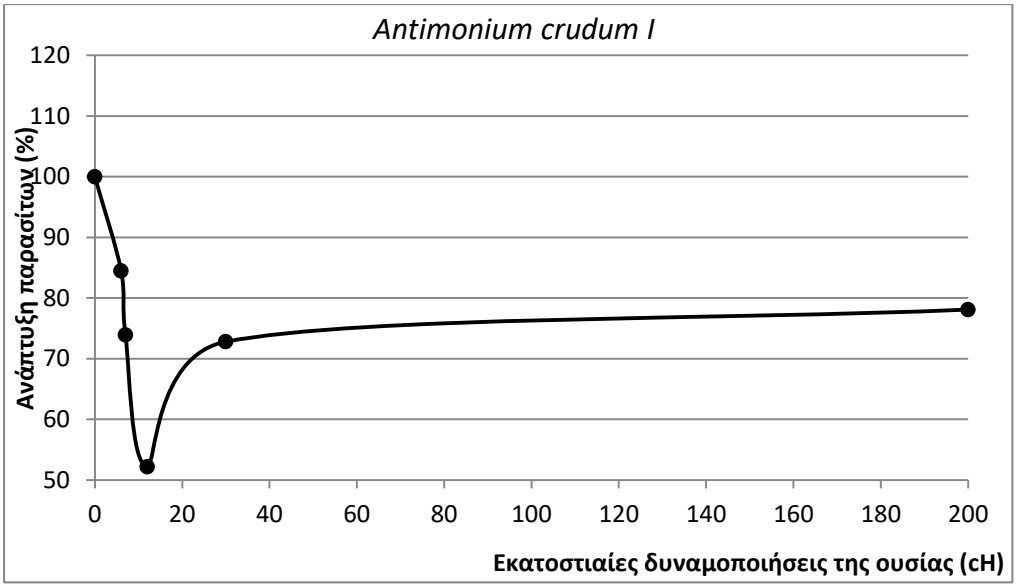
4.3.2.1 Δράση του *Antimonium crudum I* (*AC I*)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Antimonium crudum I:* 4cH, 6 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH, 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές της *L. infantum,* ευαίσθητες στην υπάρχουσα θεραπεία.

Πίνακας 25: **Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Antimonium crudum I* έναντι ευαίσθητων ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών *L. infantum*.** Η ουσία *AC I* ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 5 cH,6 cH,7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	**Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)**	**Αναστολή (%) ενδοκυττάρια *αμαστιγωτή μορφή παρασίτου L.infantum* ευαίσθητου στην υπάρχουσα θεραπεία**
***Antimonium crudum I*(*AC I*)**	6 cH	15.5 %
	7 cH	26.1 %
	12 cH	47.8 %
	30 cH	27.2 %

	200 cH	21.9 %



Γράφημα 25: Ανάπτυξη (%)ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. infantum* ευαίσθητων στην υπάρχουσα θεραπεία, στα οποία προστέθηκε η ουσία *Antimonium crudum I* στις δυναμοποιήσεις: 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100 % της ανάπτυξης.

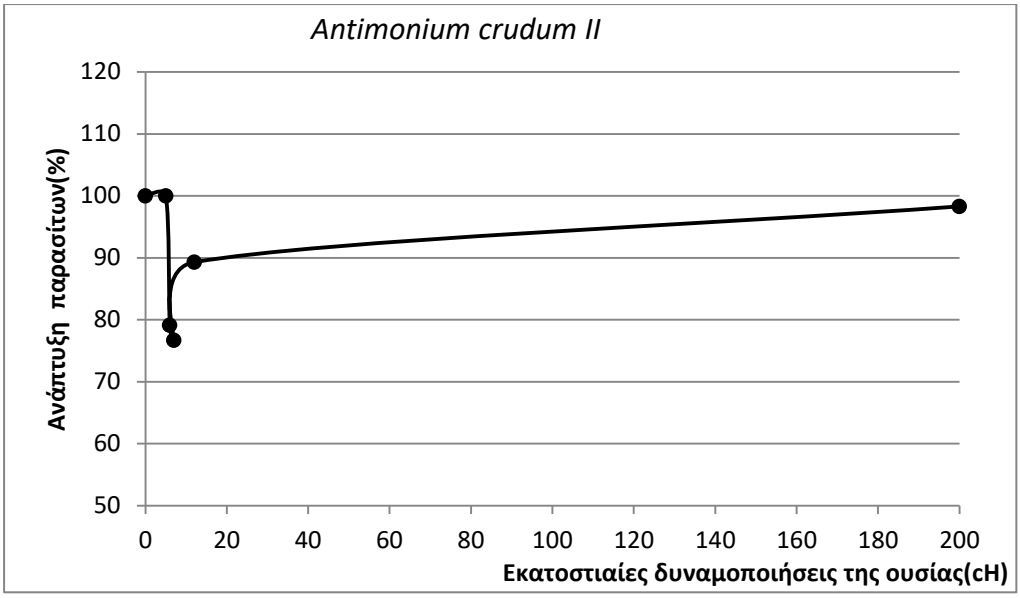
Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Antimonium crudum I* που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 52.2% έως 84.5% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.

4.3.2.2 Δράση του *Antimonium crudum II* (AC II)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Antimonium crudum II:* 3 cH, 4cH, 6 cH, 11 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 5 cH, 6 cH, 7 cH, 12 cH και 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις προμαστιγωτές μορφές της *L. infantum,* ευαίσθητες στην υπάρχουσα θεραπεία.

Πίνακας 26: **Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Antimonium crudum II* έναντι ευαίσθητων ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών *L. infantum*.** Η ουσία AC II ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 5 cH,6 cH,7 cH, 12 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	**Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)**	**Αναστολή (%) ενδοκυττάρια *αμαστιγωτή μορφή παρασίτου L.infantum* ευαίσθητου στην υπάρχουσα θεραπεία**
***Antimonium crudum II* (AC II)**	5 cH	0 %
	6 cH	20.9 %
	7 cH	23.3 %
	12 cH	10.7 %
	200 cH	1.2 %



Γράφημα 26: Ανάπτυξη (%)ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. infantum* ευαίσθητων στην υπάρχουσα θεραπεία, στα οποία προστέθηκε η ουσία *Antimonium crudum II* στις δυναμοποιήσεις: 5 cH, 6 cH, 7 cH, 12 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100 % της ανάπτυξης.

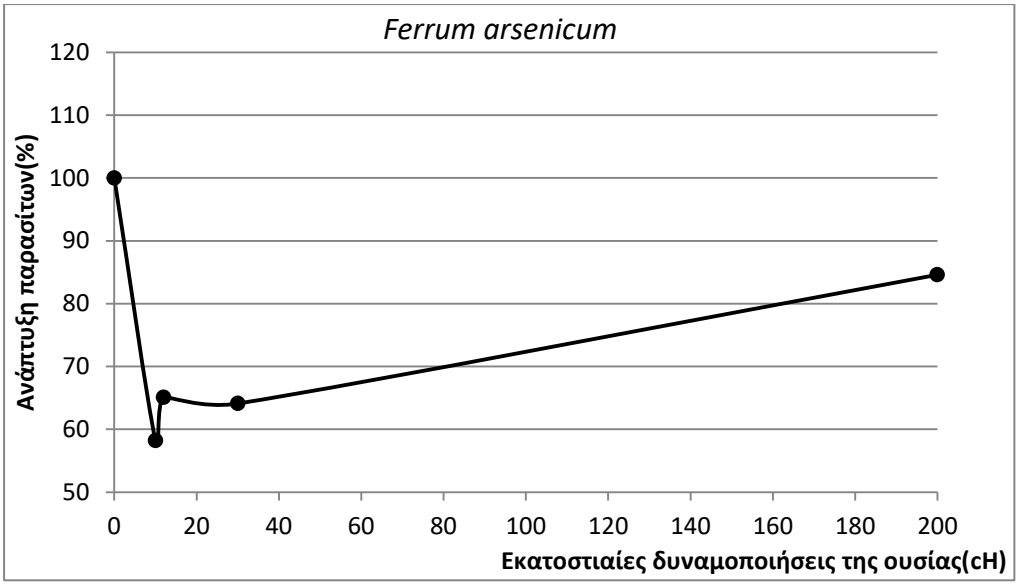
Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Antimonium crudum II* που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 76.7% έως 100% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις της ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.

4.3.2.3 Δράση του *Ferrum arsenicum* (FA)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Ferrum arsenicum:* 9 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 10 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές της *L. infantum,* ευαίσθητες στην υπάρχουσα θεραπεία.

Πίνακας 27: **Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Ferrum arsenicum* έναντι ευαίσθητων ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών *L. infantum*.** Η ουσία FA ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 10 cH, 12 Ch, 30 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	**Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)**	**Αναστολή (%) ενδοκυττάρια *αμαστιγωτή μορφή παρασίτου L.infantum* ευαίσθητου στην υπάρχουσα θεραπεία**
***Ferrum arsenicum* (FA)**	10 cH	41.8 %
	12 cH	34.9 %
	30 cH	35.9 %
	200 cH	15.4 %



Γράφημα 27: Ανάπτυξη (%) ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. infantum* ευαίσθητων στην υπάρχουσα θεραπεία, στα οποία προστέθηκε η ουσία *Ferrum arsenicum* στις δυναμοποιήσεις: 10 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100 % της ανάπτυξης.

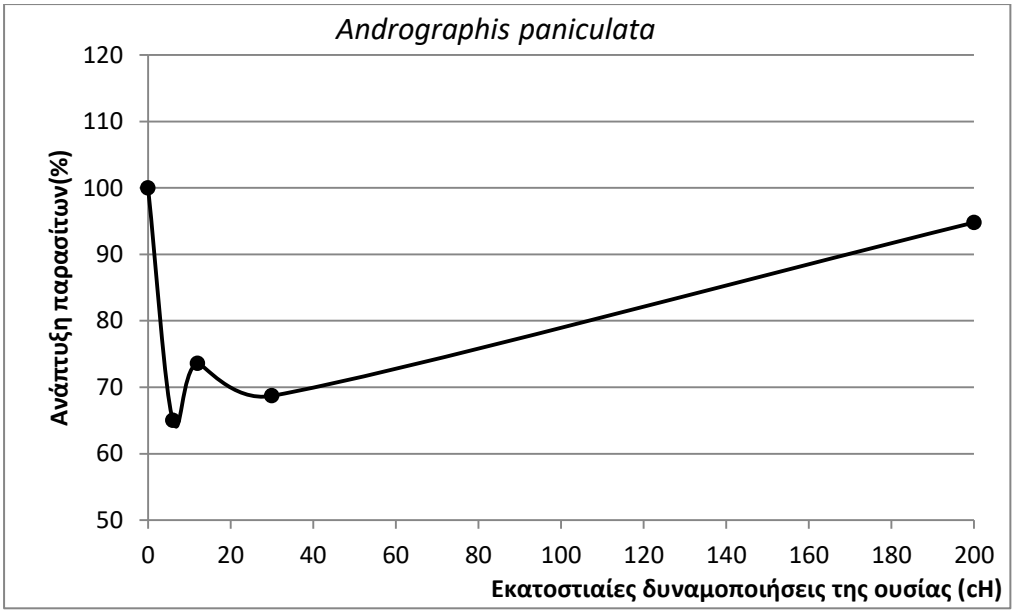
Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Ferrum arsenicum* που ελέγχθηκαν παρατηρήθηκε, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 58.2% έως 84.6% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις της ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.

4.3.2.4 Δράση του *Andrographis paniculata* (AP)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Andrographis paniculata:* 5 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές της *L. infantum,* ευαίσθητες στην υπάρχουσα θεραπεία.

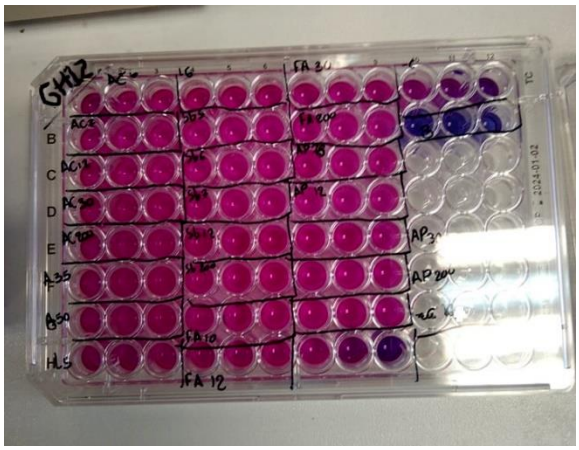
Πίνακας 28: **Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Andrographis paniculata* έναντι ευαίσθητων ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών *L. infantum*.** Η ουσία AP ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	**Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)**	**Αναστολή (%) ενδοκυττάρια *αμαστιγωτή μορφή παρασίτου L.infantum* ευαίσθητου στην υπάρχουσα θεραπεία**
***Andrographis paniculata* (AP)**	6 cH	35 %
	12 cH	26.4 %
	30 cH	31.3 %
	200 cH	5.2 %



Γράφημα 28: Ανάπτυξη (%) ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. infantum* ευαίσθητων στην υπάρχουσα θεραπεία, στα οποία προστέθηκε η *Andrographis paniculata* στις δυναμοποιήσεις: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100 % της ανάπτυξης.

Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Andrographis paniculata* που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνηθηκε από 65% έως 94.8% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις της ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.



<u>Εικόνα 16:</u> Πλάκα ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L. infantum,* ευαίσθητες στην υπάρχουσα θεραπεία στις οποίες έχουν προστεθεί οι ουσίες σε διαφορετικές δυναμοποιήσεις. Η αντιπαρασιτική δράση των ουσιών αξιολογήθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όπου: *AC* : *Antimonium crudum I*, *Sb*: *Antimonium crudum II*, FA: *Ferrum arsenicum*, AP: *Andrographis paniculata*, C: Αρνητικός μάρτυρας, B: Τυφλό διάλυμα, 35% και 50%: Αλκοόλη 35% και 50% αντίστοιχα. Σε όλα τα φρεάτια παρατηρείται πλήρης μεταβολισμός της δραστικής ουσίας ρεσαζουρίνης του αντιδραστηρίου Alamar Blue από τα παράσιτα (ροζ χρώμα) εκτός από αυτά του τυφλού διαλύματος, στα οποία δε παρατηρείται μεταβολισμός της ουσίας όπως αναμένεται (μπλε χρώμα). Η προσθήκη των ουσιών πραγματοποιήθηκε στις εξής δυναμοποιήσεις*: Antimonium crudum I*: 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH, *Antimonium crudum II* : 5 cH, 6 cH, 7 cH, 12 cH και 200 cH, *Ferrum arsenicum*: 10 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH και *Andrographis paniculata*: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH.

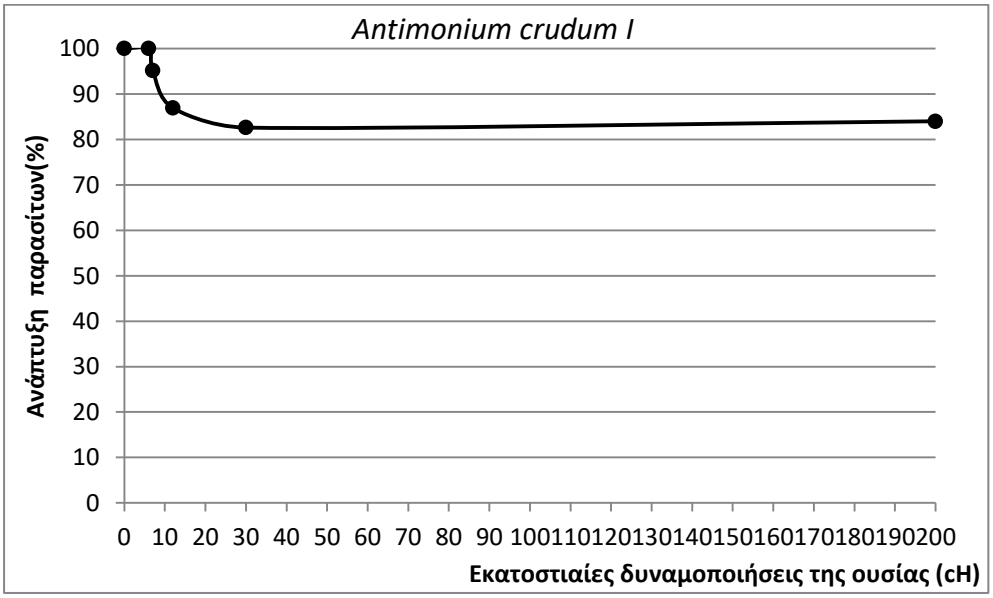
4.3.3 Δράση των ομοιοπαθητικών ουσιών έναντι των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. amazonensis*

4.3.3.1 Δράση του *Antimonium crudum I* (*AC I*)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Antimonium crudum I:* 4cH, 6 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν:6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές της *L. amazonensis.*

Πίνακας 29: **Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Antimonium crudum I* έναντι των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. amazonensis*.** Η ουσία *AC I* ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)	Αναστολή (%) ενδοκυττάρια *αμαστιγωτή μορφή παρασίτου L. amazonensis*
***Antimonium crudum I*(*AC I*)**	6 cH	0 %
	7 cH	4.8 %
	12 cH	13 %
	30 cH	17 %
	200 cH	16 %



Γράφημα 29: Ανάπτυξη (%) ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. amazonensis*, στα οποία προστέθηκε η ουσία *Antimonium crudum I* στις δυναμοποιήσεις: 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100 % της ανάπτυξης.

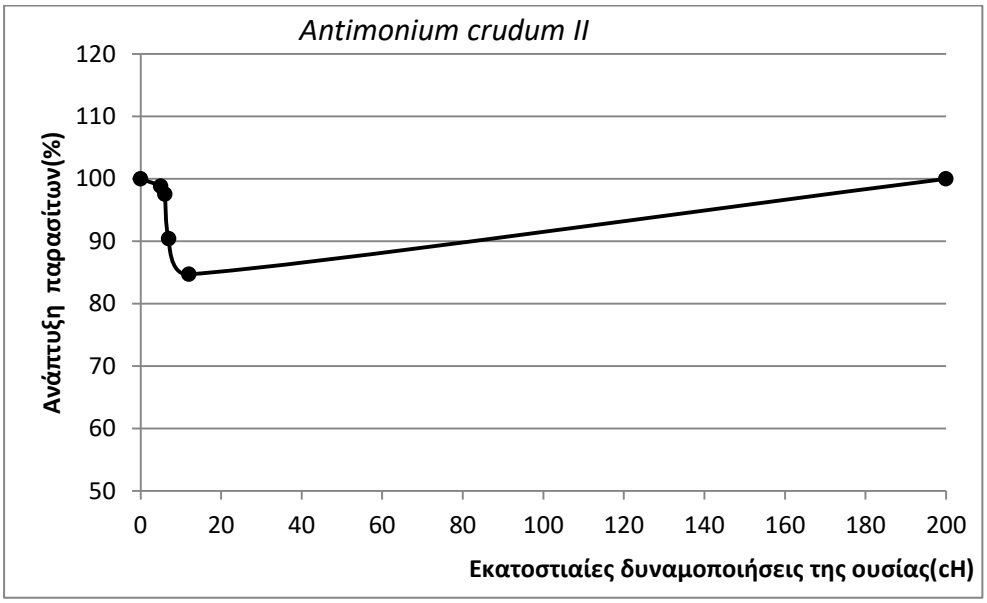
Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Antimonium crudum I* που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 82.6% έως 100% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.

4.3.3.2 Δράση του *Antimonium crudum II (AC II)*

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Antimonium crudum II:* 3 cH, 4cH, 6 cH, 11 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 5 cH,6 cH, 7cH, 12 cH και 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές της *L. amazonensis.*

Πίνακας 30: **Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Antimonium crudum II* έναντι των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. amazonensis*.** Η ουσία AC II ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 5 cH,6 cH, 7 cH 12 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	**Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)**	**Αναστολή (%) ενδοκυττάρια *αμαστιγωτή μορφή παρασίτου L. amazonensis***
Antimonium crudum II (AC II)	5 cH	1.1 %
	6 cH	2.3 %
	7 cH	9.6 %
	12 cH	15.3 %
	200 cH	0 %



Γράφημα 30: Ανάπτυξη (%) ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. amazonensis*, στα οποία προστέθηκε η ουσία *Antimonium crudum II* στις δυναμοποιήσεις: 5 cH, 6 cH, 7 cH, 12 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100 % της ανάπτυξης.

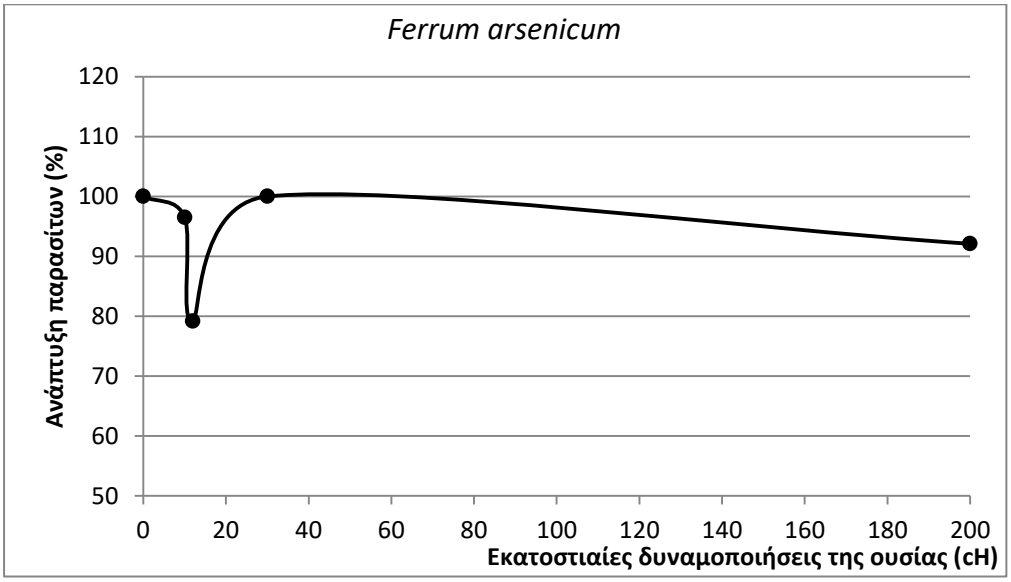
Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Antimonium crudum II* που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 84.7% έως 100% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις της ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.

4.3.3.3 Δράση του *Ferrum arsenicum* (FA)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Ferrum arsenicum:* 9 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 10 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές της *L. amazonensis.*

Πίνακας 31: **Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Ferrum arsenicum* έναντι των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. amazonensis*.** Η ουσία FA ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 10 cH 12 cH, 30 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	**Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)**	**Αναστολή (%) ενδοκυττάρια *αμαστιγωτή μορφή παρασίτου L. amazonensis***
***Ferrum arsenicum* (FA)**	10 cH	3.5 %
	12 cH	20.8 %
	30 cH	0 %
	200 cH	7.9 %



Γράφημα 31: Ανάπτυξη (%) ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. amazonensis*, στα οποία προστέθηκε η ουσία *Ferrum arsenicum* στις δυναμοποιήσεις: 10 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100 % της ανάπτυξης.

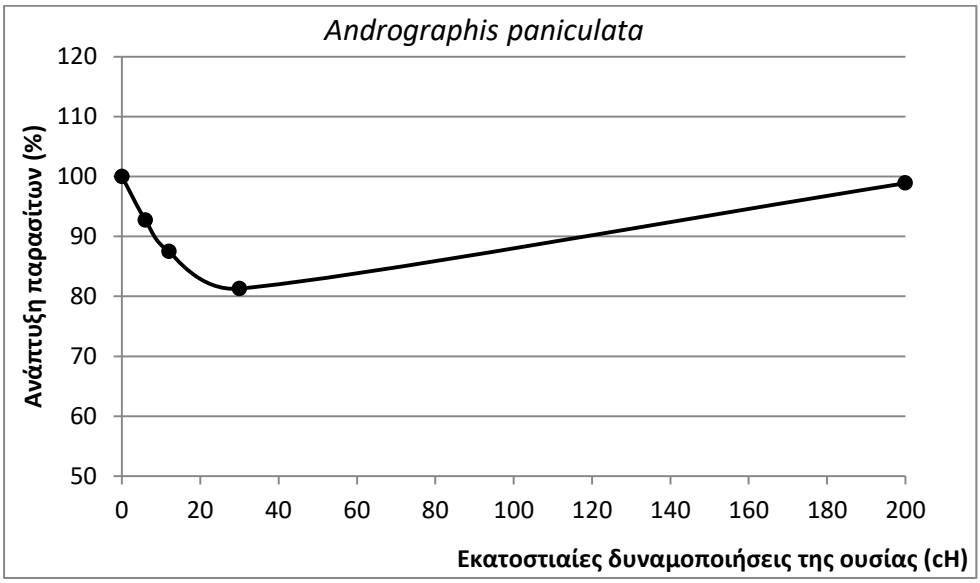
Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Ferrum arsenicum* που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 79.2% έως 100% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις της ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.

4.3.3.4 Δράση του *Andrographis paniculata* (AP)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Andrographis paniculata*: 5 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές της *L. amazonensis.*

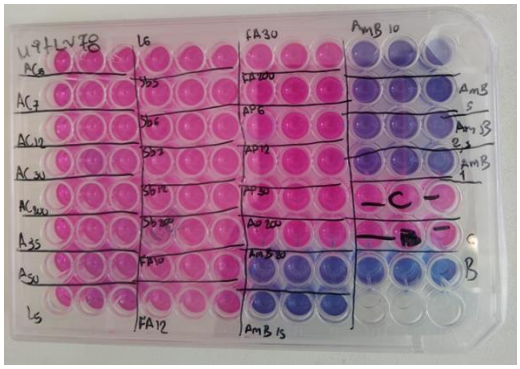
Πίνακας 32: **Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Andrographis paniculata* έναντι των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. amazonensis*.** Η ουσία AP ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 6 cH 12 cH, 30 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue. Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)	Αναστολή (%) ενδοκυττάρια *αμαστιγωτή μορφή παρασίτου L. amazonensis*
***Andrographis paniculata* (AP)**	6 cH	7.3 %
	12 cH	12.5 %
	30 cH	18.7 %
	200 cH	1.1 %



Γράφημα 32: Ανάπτυξη (%) ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. amazonensis*, στα οποία προστέθηκε η ουσία *Andrographis paniculata* στις δυναμοποιήσεις: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100 % της ανάπτυξης.

Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Andrographis paniculata* που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 81.3% έως 98.9% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις της ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.



<u>Εικόνα 17:</u> Πλάκα ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L. amazonensis* στις οποίες έχουν προστεθεί οι ουσίες σε διαφορετικές δυναμοποιήσεις. Η αντιπαρασιτική δράση των ουσιών αξιολογήθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όπου: *AC* : *Antimonium crudum I*, *Sb*: *Antimonium crudum II*, FA: *Ferrum arsenicum*, AP: *Andrographis paniculata*, C: Αρνητικός μάρτυρας, B: Τυφλό διάλυμα, 35% και 50% : Αλκοόλη 35% και 50% αντίστοιχα. Σε όλα τα φρεάτια παρατηρείται πλήρης μεταβολισμός της δραστικής ουσίας ρεσαζουρίνης του αντιδραστηρίου Alamar Blue από τα παράσιτα (ροζ χρώμα) εκτός από αυτά του τυφλού διαλύματος, στα οποία δε παρατηρείται μεταβολισμός της ουσίας όπως αναμένεται (μπλε χρώμα). Η προσθήκη των ουσιών πραγματοποιήθηκε στις εξής δυναμοποιήσεις*: Antimonium crudum I*: 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH, *Antimonium crudum II*: 5 cH, 6 cH, 7 cH, 12 cH και 200 cH, *Ferrum arsenicum*: 10 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH και *Andrographis paniculata*: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH

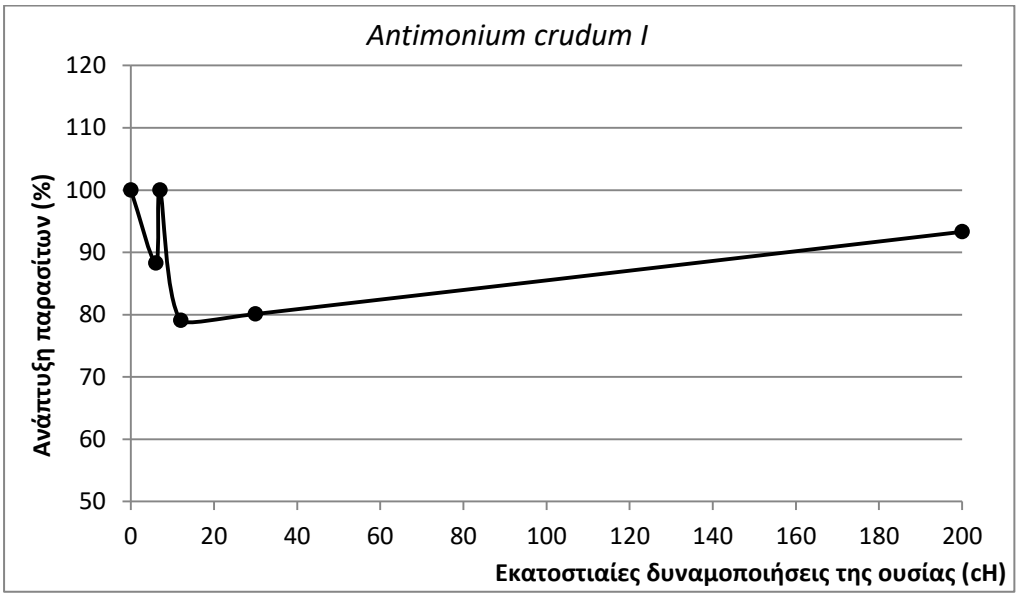
4.3.4 Δράση των ομοιοπαθητικών ουσιών έναντι των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. donovani*

4.3.4.1 Δράση του *Antimonium crudum I (AC I)*

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Antimonium crudum I*: 4cH, 6 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 6 cH,7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές της *L. donovani.*

Πίνακας 33: **Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Antimonium crudum I* έναντι των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών *L. donovani*.** Η ουσία *AC I* ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 6 cH, 7 cH 12 cH, 30 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	**Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)**	**Αναστολή (%) ενδοκυττάρια *αμαστιγωτή μορφή παρασίτου L. donovani***
***Antimonium crudum I* (*AC I*)**	6 cH	11.7 %
	7 cH	0 %
	12 cH	20.9 %
	30 cH	19.9 %
	200 cH	7.7 %



Γράφημα 33: Ανάπτυξη (%) ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. donovani*, στα οποία προστέθηκε η ουσία *Antimonium crudum I* στις δυναμοποιήσεις: 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100 % της ανάπτυξης.

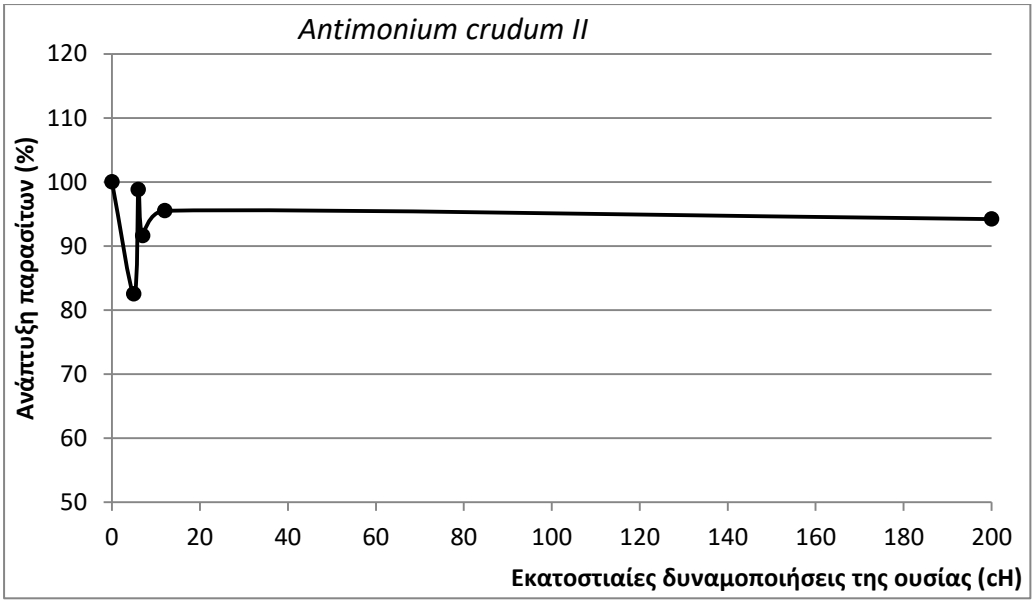
Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Antimonium crudum I* που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 79.1% έως 100% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.

4.3.4.2 Δράση του *Antimonium crudum II* (AC II)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Antimonium crudum II:* 3 cH, 4cH, 6 cH, 11 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 5 cH, 6 cH,7 cH, 12 cH και 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές της *L. donovani.*

Πίνακας 34: **Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Antimonium crudum II* έναντι των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών *L. donovani*.** Η ουσία AC II ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 5 cH,6 cH, 7 cH 12 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	**Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)**	**Αναστολή (%) ενδοκυττάρια *αμαστιγωτή μορφή παρασίτου L. donovani***
***Antimonium crudum II* (AC II)**	5 cH	17.5 %
	6 cH	1.2 %
	7 cH	8.4 %
	12 cH	4.5 %
	200 cH	5.8 %



Γράφημα 34: Ανάπτυξη (%) ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. donovani*, στα οποία προστέθηκε η ουσία *Antimonium crudum II* στις δυναμοποιήσεις: 5 cH, 6 cH, 7 cH, 12 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100 % της ανάπτυξης.

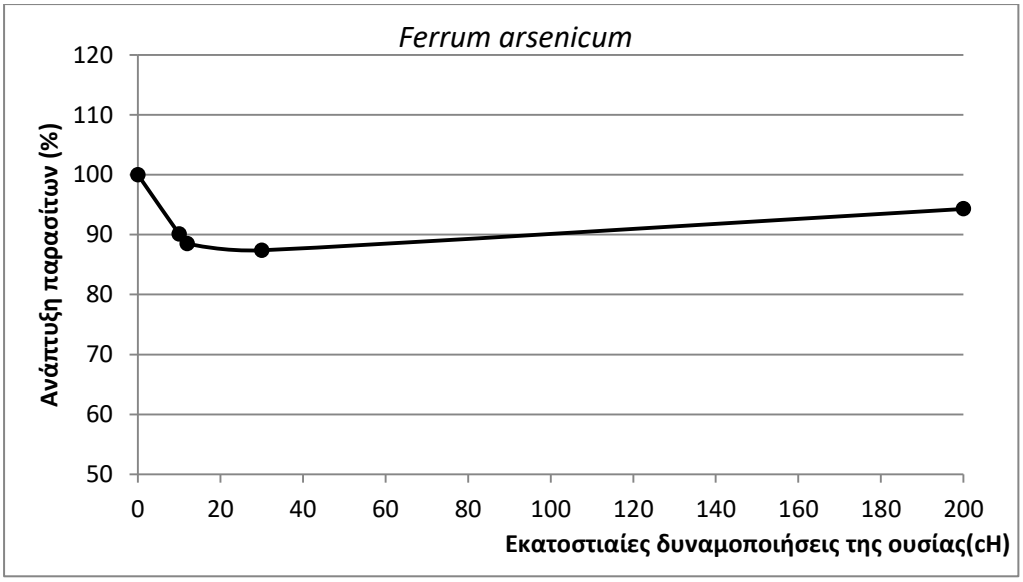
Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Antimonium crudum II* που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 82.5% έως 98.8% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις της ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.

4.3.4.3 Δράση του *Ferrum arsenicum* (FA)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Ferrum arsenicum:* 9 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 10 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές της *L. donovani.*

Πίνακας 35: **Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Ferrum arsenicum* έναντι των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών *L. donovani*.** Η ουσία FA ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 10 cH 12 cH, 30 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	**Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)**	**Αναστολή (%) ενδοκυττάρια *αμαστιγωτή μορφή παρασίτου L. donovani***
***Ferrum arsenicum* (FA)**	10 cH	9.9 %
	12 cH	11.5 %
	30 cH	12.6 %
	200 cH	5.7 %



Γράφημα 35: Ανάπτυξη (%) ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. donovani*, στα οποία προστέθηκε η ουσία *Ferrum arsenicum* στις δυναμοποιήσεις: 10 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100 % της ανάπτυξης.

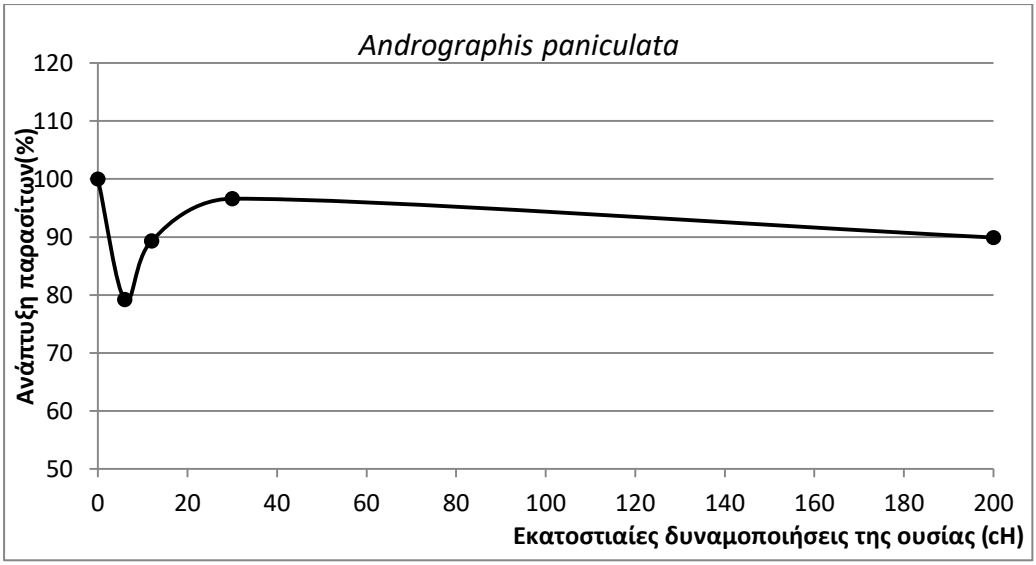
Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Ferrum arsenicum* που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 87.4% έως 94.3% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις της ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.

4.3.4.4 Δράση του *Andrographis paniculata* (AP)

Οι αρχικές δυναμοποιήσεις του *Andrographis paniculata:* 5 cH, 11 cH, 29 cH και 199 cH δυναμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της ομοιοπαθητικής όπως περιγράφηκε στο κεφ. 3.1.6.2. Τα διαλύματα που προέκυψαν: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH ελέγχθηκαν για την αντιλεϊσμανιακή τους δράση στις ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές της *L. donovani.*

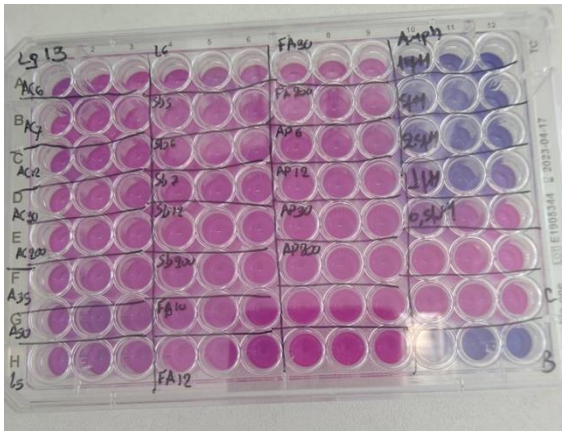
Πίνακας 36: **Αντιλεϊσμανιακή δράση της ουσίας *Andrographis paniculata* έναντι των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών *L. donovani*.** Η ουσία AP ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέγχθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όλα τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ομοιοπαθητική Ουσία	**Εκατοστιαίες Δυναμοποιήσεις κατά Hahnemann (cH)**	**Αναστολή (%) ενδοκυττάρια *αμαστιγωτή μορφή παρασίτου L. donovani***
***Andrographis paniculata* (AP)**	6 cH	20.8 %
	12 cH	10.7 %
	30 cH	3.4 %
	200 cH	10.1 %



Γράφημα 36: Ανάπτυξη (%) ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. donovani*, στα οποία προστέθηκε η ουσία *Andrographis paniculata* στις δυναμοποιήσεις: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100 % της ανάπτυξης.

Σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας *Andrographis paniculata* που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη 79.2% έως 96.6% που υποδηλώνει πως οι υπό δοκιμή δυναμοποιήσεις της ουσίας δεν παρουσίασαν αντιπαρασιτική δράση.



<u>Εικόνα 18:</u> Πλάκα προμαστιγωτών μορφών *L. donovani* στις οποίες έχουν προστεθεί οι ουσίες σε διαφορετικές δυναμοποιήσεις. Η αντιπαρασιτική δράση των ουσιών αξιολογήθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όπου: *AC*: *Antimonium crudum I*, *Sb*: *Antimonium crudum II*, FA: *Ferrum arsenicum*, AP: *Andrographis paniculata*, C: Αρνητικός μάρτυρας, B: Τυφλό διάλυμα, 35% και 50% : Αλκοόλη 35% και 50% αντίστοιχα. Σε όλα τα φρεάτια παρατηρείται πλήρης μεταβολισμός της δραστικής ουσίας ρεσαζουρίνης του αντιδραστηρίου Alamar Blue από τα παράσιτα (ροζ χρώμα) εκτός από αυτά του τυφλού διαλύματος, στα οποία δε παρατηρείται μεταβολισμός της ουσίας όπως αναμένεται (μπλε χρώμα). Η προσθήκη των ουσιών πραγματοποιήθηκε στις εξής δυναμοποιήσεις*: Antimonium crudum I*: 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH, *Antimonium crudum II* : 5 cH, 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH, *Ferrum arsenicum*: 10 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH και *Andrographis paniculata*: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH.

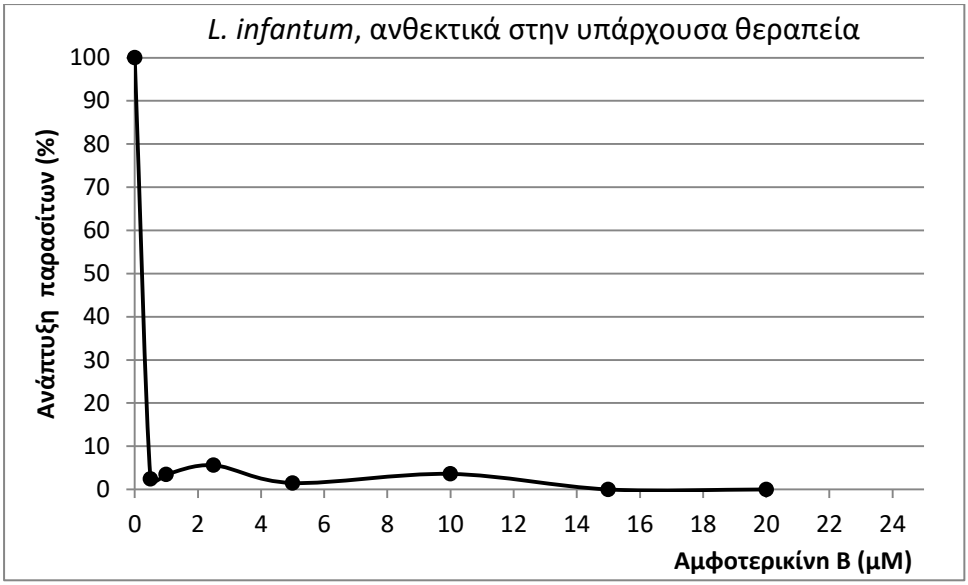
4.4 Αμφοτερικίνη Β

Η αμφοτερικίνη Β χρησιμοποιήθηκε σαν ουσία αναφοράς στις πειραματικές δοκιμές των προμαστιγωτών και των ενδοκυττάριων αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου της *Leishmania*. Η αντιλεϊσμανιακή δράση της αμφοτερικίνης ελέχθηκε με τη μέθοδο Alamar blue. Τα αποτελέσματα ως προς την ανάπτυξη των προμαστιγωτών μορφών: *L. infantum*, ευαίσθητες στην υπάρχουσα θεραπεία, *L. amazonensis* και *L. donovani* παρουσία αμφοτερικίνης σε συγκέντρωση 20 μΜ, 15 μΜ, 10 μΜ, 5, μΜ, 2.5 μΜ, 1 μΜ και 0.5 μΜ παρουσίασαν την αναμενόμενη ανασταλτική δράση . Τα αποτελέσματα προέρχονται από την πραγματοποίηση 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

4.4.1 Προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *Leishmania*

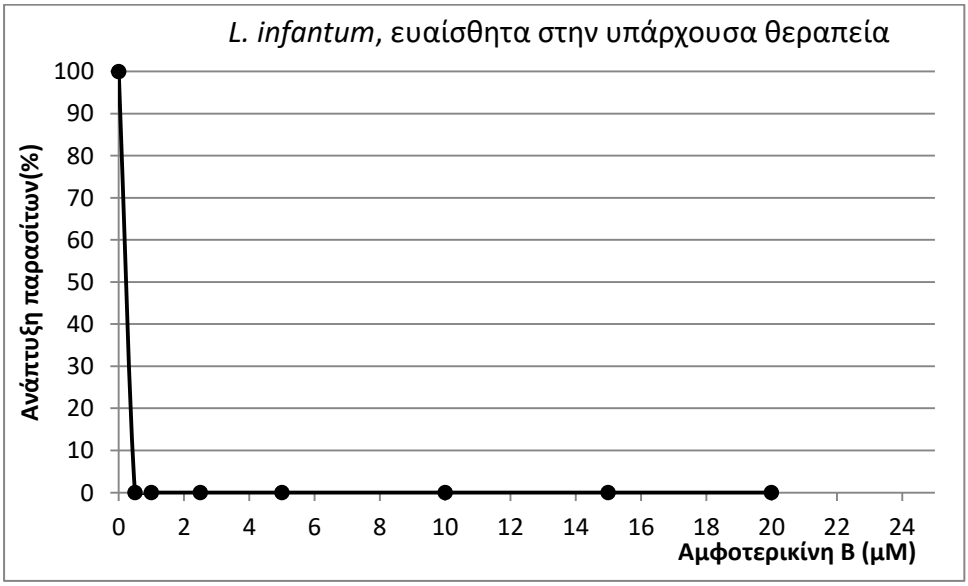
Πίνακας 37: Δράση της αμφοτερικίνης Β σαν ουσία αναφοράς έναντι των προμαστιγωτών μορφών: *L. infantum*, ευαίσθητες στην υπάρχουσα θεραπεία, *L. amazonensis* και *L. donovani*. Τα παράσιτα προμαστιγωτής μορφής επωάστηκαν παρουσία αμφοτερικίνης Β σε συγκεντρώσεις 20 μΜ, 15 μΜ, 10 μΜ, 5, μΜ, 2.5 μΜ, 1 μΜ και 0.5 μΜ. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέχθηκε με τη μέθοδο Alamar blue. Τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Αμφοτερικίνη Β Συγκέντρωση (μΜ)	**Αναστολή (%) Προμαστιγωτές μορφές παρασίτων**			
	***L.infantum*, ανθεκτικά**	***L. infantum*, ευαίσθητα**	***L.amazonensis***	***L. donovani***
20 μΜ	100 %	100 %	100 %	100 %
15 μΜ	100 %	100 %	100 %	100 %
10 μΜ	96.4 %	100 %	93.7 %	100 %
5 μΜ	98.5 %	100 %	92.2 %	100 %
2.5 μΜ	94.4 %	100 %	99 %	100 %
1 μΜ	96.5 %	100 %	97.7 %	100 %
0.5 μΜ	97.6 %	100 %	96.4 %	100 %



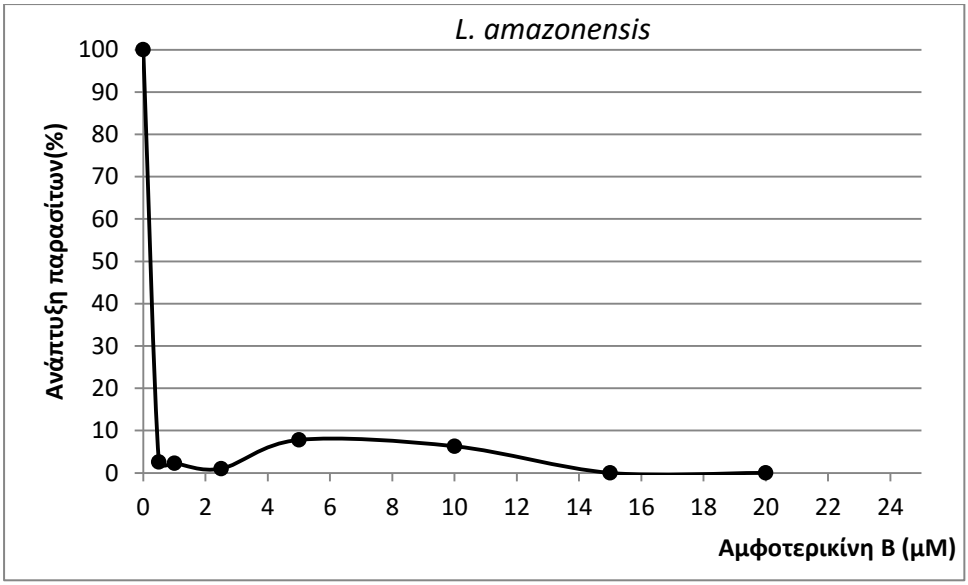
Γράφημα 37: Ανάπτυξη (%) προμαστιγωτών μορφών *L. infantum* ανθεκτικών στην υπάρχουσα θεραπεία, στα οποία προστέθηκε η ουσία αναφοράς αμφοτερικίνη Β σε συγκεντρώσεις: 20 μΜ, 15 μΜ, 10 μ Μ, 5, μΜ, 2.5 μΜ, 1 μΜ και 0.5 μΜ. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100 % της ανάπτυξης.

Σε όλες τις συγκεντρώσεις της ουσίας αμφοτερικίνης Β που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 0% έως 5.6% που υποδηλώνει την αποτελεσματικότητα της ουσίας αναφοράς έναντι των παρασίτων.



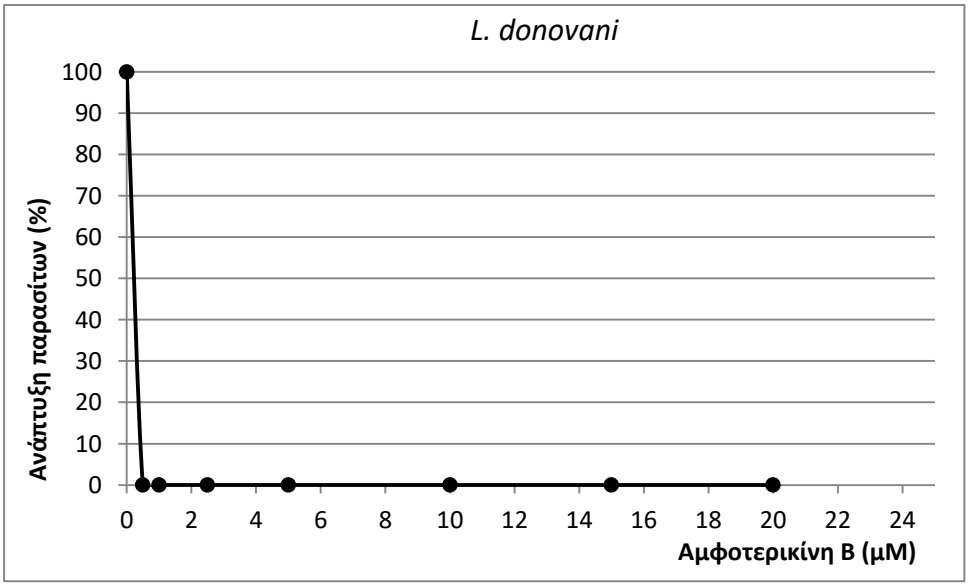
Γράφημα 38: Ανάπτυξη (%) προμαστιγωτών μορφών *L. infantum* ευαίσθητων στην υπάρχουσα θεραπεία, στα οποία προστέθηκε η ουσία αναφοράς αμφοτερικίνη Β σε συγκεντρώσεις: 20 μΜ , 15 μΜ, 10 μΜ, 5, μΜ, 2.5 μΜ, 1 μΜ και 0.5 μΜ. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100 % της ανάπτυξης.

Σε όλες τις συγκεντρώσεις της ουσίας αμφοτερικίνης Β που ελέγχθηκαν, δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη (0 %) που υποδηλώνει πως η ουσία αναφοράς παρουσίασε την αναμενόμενη αντιπαρασιτική δράση.



Γράφημα 39: Ανάπτυξη (%) προμαστιγωτών μορφών *L. amazonensis* στα οποία προστέθηκε η ουσία αναφοράς αμφοτερικίνης Β σε συγκεντρώσεις: 20 μΜ, 15 μΜ, 10 μΜ, 5, μΜ, 2.5 μΜ, 1 μΜ και 0.5 μΜ. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100 % της ανάπτυξης.

Σε όλες τις συγκεντρώσεις της ουσίας αμφοτερικίνης Β που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 0% έως 7.8% που υποδηλώνει πως η ουσία αναφοράς παρουσίασε την αναμενόμενη αντιπαρασιτική δράση.



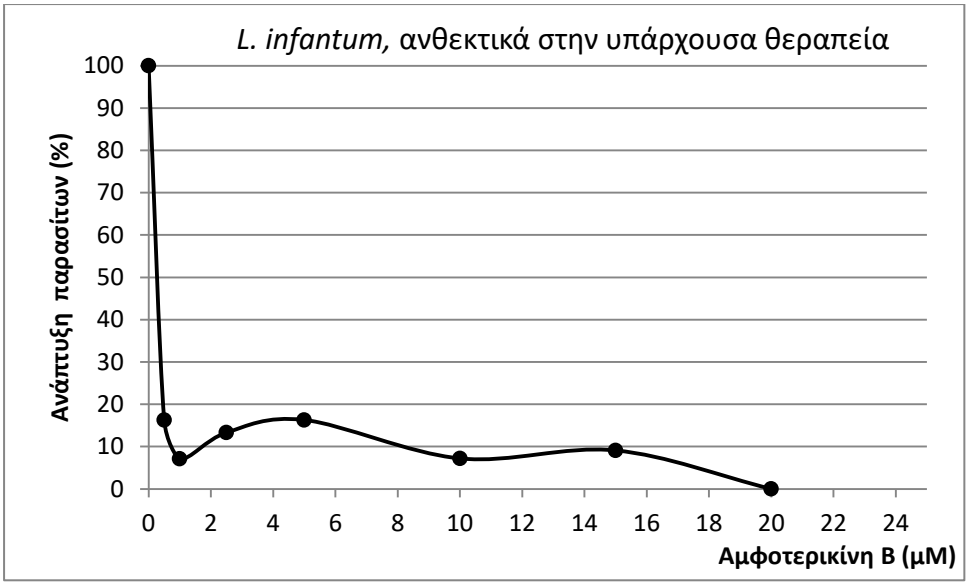
Γράφημα 40: Ανάπτυξη (%) προμαστιγωτών μορφών *L. donovani,* στα οποία προστέθηκε η ουσία αναφοράς αμφοτερικίνη Β σε συγκεντρώσεις: 20 μΜ, 15 μΜ, 10 μΜ, 5, μΜ, 2.5 μΜ, 1 μΜ και 0.5 μΜ. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100 % της ανάπτυξης.

Σε όλες τις συγκεντρώσεις της ουσίας αμφοτερικίνης Β που ελέγχθηκαν, δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη (0 %) που υποδηλώνει πως η ουσία αναφοράς παρουσίασε την αναμενόμενη αντιπαρασιτική δράση.

4.4.2 Ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *Leishmania*

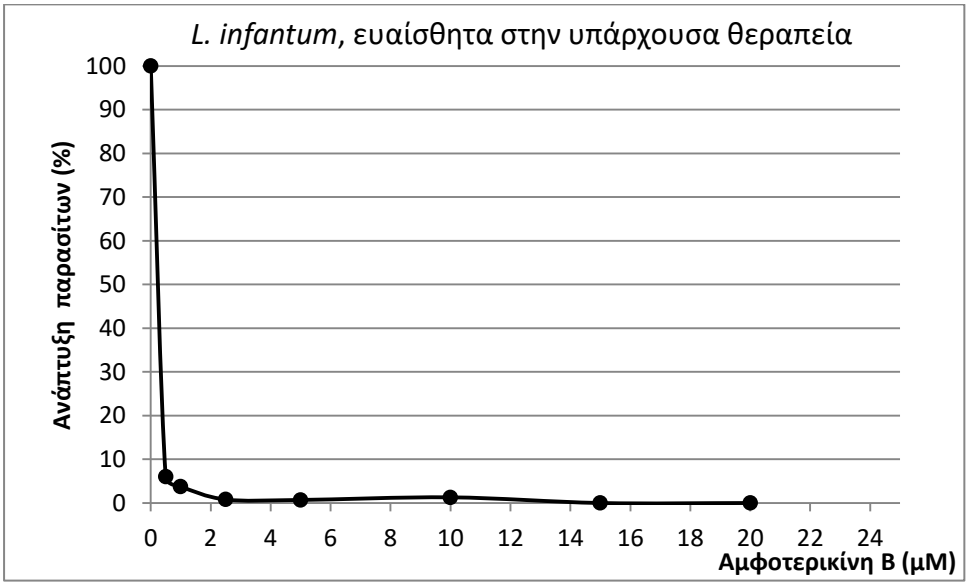
Πίνακας 38: Δράση της αμφοτερικίνης Β σαν ουσία αναφοράς έναντι των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών: *L. infantum*, ευαίσθητες στην υπάρχουσα θεραπεία, *L. amazonensis* και *L. donovani*. Τα παράσιτα αμαστιγωτής μορφής επωάστηκαν παρουσία αμφοτερικίνης Β σε συγκεντρώσεις 20 μΜ, 15 μΜ, 10 μΜ, 5, μΜ, 2.5 μΜ, 1 μΜ και 0.5 μΜ. Η αντιλεϊσμανιακή δράση ελέχθηκε με τη μέθοδο Alamar blue. Τα αποτελέσματα προέρχονται από πραγματοποίηση 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Αμφοτερικίνη Β Συγκέντρωση (μΜ)	**Αναστολή (%)** **Ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές παρασίτων**			
	***L. infantum*, ανθεκτικά**	***L. infantum*, ευαίσθητα**	***L.amazonensis***	***L. donovani***
20 μΜ	100 %	100 **%**	100 **%**	100 **%**
15 μΜ	90.9 %	100 **%**	92.6 **%**	90.2 **%**
10 μΜ	92.8 %	98.7 **%**	95.9 **%**	100 **%**
5 μΜ	83.7 %	99.3 **%**	93 **%**	99.2 **%**
2.5 μΜ	86.7 %	99.2 **%**	95.8 **%**	96.6 **%**
1 μΜ	92.9 %	96.2 **%**	95.3 **%**	91.4 **%**
0.5 μΜ	83.7 %	94 **%**	95.6 **%**	92.8 **%**



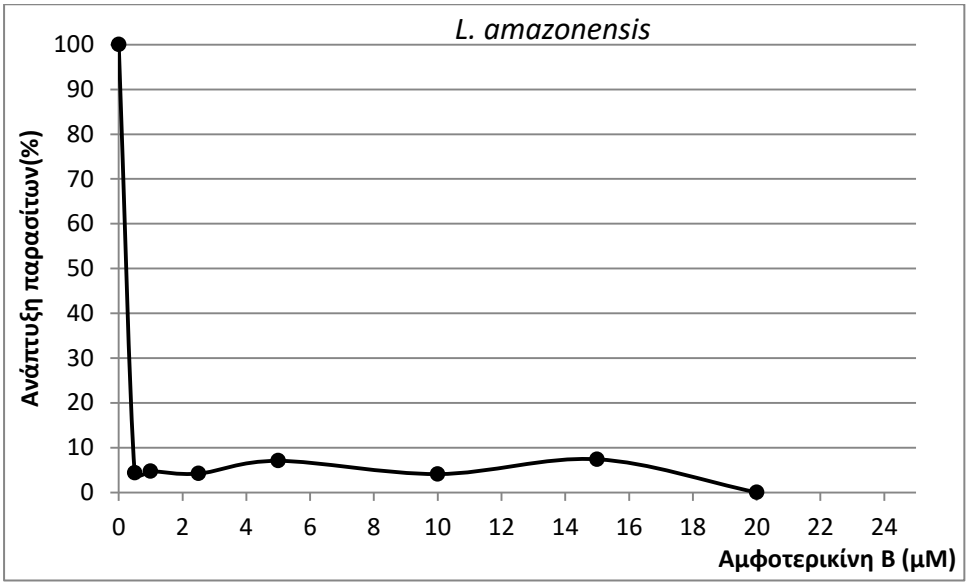
Γράφημα 41: Ανάπτυξη (%) ενδοκυτταρικών μαστιγωτών μορφών *L. infantum* ανθεκτικών στην υπάρχουσα θεραπεία, στα οποία προστέθηκε η ουσία αναφοράς αμφοτερικίνη Β σε συγκεντρώσεις: 20 μΜ, 15 μΜ, 10 μ Μ, 5, μΜ, 2.5 μΜ, 1 μΜ και 0.5 μΜ. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100 % της ανάπτυξης.

Σε όλες τις συγκεντρώσεις της ουσίας αμφοτερικίνης Β που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 0% έως 16.3% που υποδηλώνει την αποτελεσματικότητα της ουσίας αναφοράς έναντι των παρασίτων.



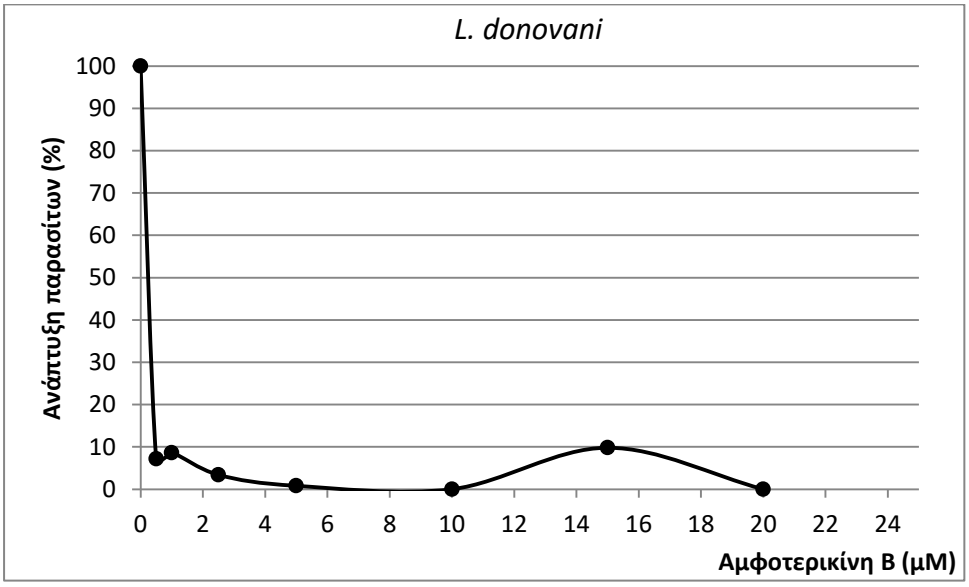
Γράφημα 42: Ανάπτυξη (%) ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. infantum* ευαίσθητων στην υπάρχουσα θεραπεία, στα οποία προστέθηκε η ουσία αναφοράς αμφοτερικίνη Β σε συγκεντρώσεις: 20 μΜ , 15 μΜ, 10 μΜ, 5, μΜ, 2.5 μΜ, 1 μΜ και 0.5 μΜ. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100 % της ανάπτυξης.

Σε όλες τις συγκεντρώσεις της ουσίας αμφοτερικίνης Β που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 0% έως 5.6% που υποδηλώνει πως η ουσία αναφοράς παρουσίας ε την αναμενόμενη αντιπαρασιτική δράση.



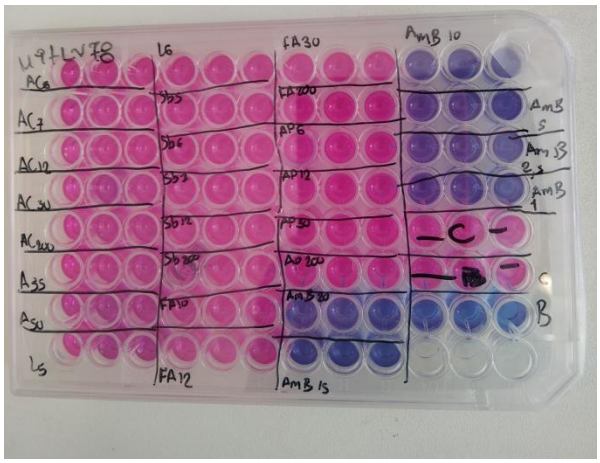
Γράφημα 43: Ανάπτυξη (%) ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. amazonensis* στα οποία προστέθηκε η ουσία αναφοράς αμφοτερικίνης Β σε συγκεντρώσεις: 20 μΜ, 15 μΜ, 10 μΜ, 5, μΜ, 2.5 μΜ, 1 μΜ και 0.5 μΜ. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100 % της ανάπτυξης.

Σε όλες τις συγκεντρώσεις της ουσίας αμφοτερικίνης Β που ελέγχθηκαν, η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 0% έως 7.4% που υποδηλώνει πως η ουσία αναφοράς παρουσίασε την αναμενόμενη αντιπαρασιτική δράση.



Γράφημα 44: Ανάπτυξη (%) ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών *L. donovani,* στα οποία προστέθηκε η ουσία αναφοράς αμφοτερικίνη Β σε συγκεντρώσεις: 20 μΜ, 15 μΜ, 10 μΜ, 5, μΜ, 2.5 μΜ, 1 μΜ και 0.5 μΜ. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί στο 100 % της ανάπτυξης.

Σε όλες τις συγκεντρώσεις της ουσίας αμφοτερικίνης Β που ελέγχθηκαν η ανάπτυξη κυμάνθηκε από 0% έως 9.8% που υποδηλώνει πως η ουσία αναφοράς παρουσίασε την αναμενόμενη αντιπαρασιτική δράση.



<u>Εικόνα 19:</u> Πλάκα ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L. donovani* στις οποίες έχουν προστεθεί οι ουσίες σε διαφορετικές δυναμοποιήσεις. Η αντιπαρασιτική δράση των ουσιών αξιολογήθηκε με τη μέθοδο Alamar Blue**.** Όπου: *AC*: *Antimonium crudum I*, *AC Sb*: *Antimonium crudum II*, FA: *Ferrum arsenicum*, AP: *Andrographis paniculata*, C: Αρνητικός μάρτυρας, B: Τυφλό διάλυμα, 35% και 50% : Αλκοόλη 35% και 50% αντίστοιχα. Σε όλα τα φρεάτια παρατηρείται πλήρης μεταβολισμός της δραστικής ουσίας ρεσαζουρίνης του αντιδραστηρίου Alamar Blue από τα παράσιτα (ροζ χρώμα) εκτός από αυτά του τυφλού διαλύματος, στα οποία δε παρατηρείται μεταβολισμός της ουσίας όπως αναμένεται (μπλε χρώμα). Η προσθήκη των ουσιών πραγματοποιήθηκε στις εξής δυναμοποιήσεις*: Antimonium crudum I*: 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH, *Antimonium crudum II* : 5 cH, 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH, *Ferrum arsenicum*: 10 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH και *Andrographis paniculata*: 6 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη σημερινή εποχή, οι ομοιοπαθητικές ουσίες παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον σαν εναλλακτικές θεραπείες σε ένα μεγάλο φάσμα ασθενειών του ανθρώπου. Είναι προφανές πως η περαιτέρω επιστημονική διερεύνηση του μηχανισμού δράσης τους θα αυξήσει τόσο το ενδιαφέρον γι αυτά όσο και την χρησιμοποίηση τους στην θεραπευτική αγωγή νοσημάτων. Η παρούσα εργασία στοχεύει στη διερεύνηση της *in vitro* αντιλεϊσμανιακής δραστικότητας και της κυτταροτοξικής δράσης των εξής ομοιοπαθητικών: *Andrographis paniculata* , *Ferrum arsenicum* ($AsFeH_{13}O_9^+$) και *Antimonium crudum* (Sb_2S_3). Το *Antimonium crudum,* αποτελεί τη δυναμοποιημένη μορφή του τρισθενούς αντιμονίου (Sb_2S_3), το οποίο είναι φυσικής προέλευσης (ορυκτό). Για τη συγκεκριμένη ουσία πραγματοποιήσαμε δύο δοκιμές. Στη μία δοκιμή το *Antimonium crudum* παρελήφθη ήδη δυναμοποιημένο από την ομάδα παραγωγής ομοιοπαθητικών ουσιών Korres και έλαβε την ονομασία *Antimonium crudum I*. Στην άλλη δοκιμή προμηθευτήκαμε την πρώτη ύλη, δηλαδή το *Antimoniate Sulphate* με την ευγενική προσφορά του φαρμακοποιού κ. Φυλιάνου, ώστε να πραγματοποιηθούν οι δυναμοποιήσεις και έλαβε την ονομασία *Antimonium crudum II*. Στόχος μας ήταν να εφαρμόσουμε δύο διαφορετικές προσεγγίσεις που αναφέρονται και από τη βιβλιογραφία. Τα αποτελέσματα για το *Antimonium crudum I, και το Antimonium crudum II* συγκρίθηκαν μεταξύ τους προκειμένου να διαπιστώσουμε αν υπήρχε διαφορά σχετικά με την πρόσφατη παρασκευή του φαρμάκου ή όχι. Η πειραματική δοκιμή σχεδιάστηκε με σκοπό τον προσδιορισμό της αντιλεϊσμανιακής δράσης των τεσσάρων σκευασμάτων, μέσω του προσδιορισμού της δραστικότητάς ενός εύρους δυναμοποιήσεων έναντι των παρασιτικών προμαστιγωτών και των ενδοκυτταρωμένων αμαστιγωτών μορφών των στελεχών που ανήκουν στα είδη: *Leishmania infantum* (στέλεχος ανθεκτικό έναντι του πεντασθενούς αντιμονίου)*, Leishmania infantum* (στέλεχος ευαίσθητο έναντι του πεντασθενούς αντιμονίου), *Leishmania donovani και Leishmania amazonensis*.
Επιπλέον, διερευνήθηκε η ενδεχόμενη κυτταροτοξικότητα των παραπάνω ουσιών σε μακροφάγα ποντικού κυτταρικής σειράς J774.1, τα οποία αποτελούν τα κύτταρα-ξενιστή του παρασίτου στα θηλαστικά.

Σε προηγούμενες εργασίες υπάρχουν αναφορές πως ορισμένες ουσίες φυτικής προέλευσης έχουν παρουσιάσει αντιλεϊσμανιακή δράση (Sen and Chatterjee, 2011). Πιο συγκεκριμένα, η τερπενοειδής λακτόνη *andrographolide* που αποτελεί το κύριο δραστικό συστατικό του φυτού *Anrographis paniculata* έχει χαρακτηριστεί ως αντιλεϊσμανιακός παράγοντας (Roy et al., 2012). Η τοξικότητα που παρουσιάζει το τερπενοειδές *andrographolide* σε υψηλές δόσεις αποτελεί μειονέκτημα, γεγονός που ώθησε τους ερευνητές να αναπτύξουν την κατευθυνόμενη χορήγηση του φαρμάκου μέσω της ενσωμάτωσής του σε νανοσωματίδια, μικροσφαιρίδια και λιποσώματα, προκειμένου να καταστήσουν αυτά τα μόρια κατάλληλα για δοκιμή στον άνθρωπο και να καταστούν μελλοντικά επιτυχείς φαρμακευτικές αγωγές (Kishore et al., 2017).

Ακόμη, έχουν πραγματοποιηθεί πειραματικές δοκιμές συνδυασμού ομοιοπαθητικών ουσιών, όπως το σύμπλεγμα Μ1 (συνδυασμός 15 διαφορετικών σκευασμάτων), το οποίο ελέγχθηκε *in vitro* σε μακροφάγα και *in vivo* σε ποντίκια μολυσμένα με *L. amazonensis.* Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση του εκατοστιαίου ποσοστού των μολυσμένων μακροφάγων και του βαθμού ενδοκυττάρωσης των παρασίτων, αύξηση της Th1 απόκρισης και αύξηση της κυτταροκίνης IL-10. Αντίστοιχα, τα αποτελέσματα *in vivo* έδειξαν βελτίωση στην κλινική εικόνα των αλλοιώσεων των ποντικιών. (Nascimento et al., 2017). Πειραματική δοκιμή του ομοιοπαθητικού *Antimonium crudum* που παρασκευάζεται σύμφωνα με τις αρχές της φαρμακοποιίας από το τρισθενές αντιμόνιο (Antimony Sulfide) δεν παρουσίασε άμεση αντιπαρασιτική δράση, αλλά δυνατότητα ανοσολογικής ρύθμισης μέσω της παραγωγής κυτταροκινών έναντι του παρασίτου *L. amazonensis,* όταν ελέγχθηκε στις δυναμοποιήσεις 30 cH και 200 cH (Rodrigues de Santana et al., 2017).

Στην παρούσα πειραματική δοκιμή, ο έλεγχος της αντιλεϊσμανιακής δράσης και κυτταροτοξικότητας των εξεταζόμενων ουσιών πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου *Alamar blue*, έπειτα από 72h επώασης των προμαστιγωτών και των αμαστιγωτών μορφών με τις εξής ουσίες:

Antimonium crudum I, 5 δυναμοποιήσεις: 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH 200 cH,

Antimonium crudum II, 6 δυναμοποιήσεις: 5 cH, 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 c 200 cH.

Andrographis paniculata, 5 δυναμοποιήσεις : 6 cH, 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH.

Ferrum arsenicum, 5 δυναμοποιήσεις : 7 cH, 10 cH, 12 cH , 30 cH 200 cH.

Όσον αφορά τον έλεγχο τοξικότητας έναντι των μακροφάγων τα παραπάνω ομοιοπαθητικά ελέγχθηκαν σε 4 δυναμοποιήσεις: 7 cH, 12 cH, 30 cH και 200 cH. Όλες οι δοκιμασίες *in vitro* πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον 3 φορές.

Οι τέσσερις περιπτώσεις προμαστιγωτών μορφών και οι τέσσερις περιπτώσεις ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών σε όλες τις εξεταζόμενες δυναμοποιήσεις των υπό δοκιμή ουσιών, παρουσίασαν αναστολή της ανάπτυξης <40% σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες, οι οποίοι δεν εκτέθηκαν στις ελεγχόμενες ουσίες. Ωστόσο υπήρξαν δύο περιπτώσεις στις οποίες η αναστολή της ανάπτυξης ήταν <50%.

Η πρώτη περίπτωση αφορά τις ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *L.infantum*, οι οποίες είναι ευαίσθητες στην τρέχουσα χορηγούμενη θεραπεία για σπλαχνική λεϊσμανίαση με συνθετικά άλατα του πεντασθενούς αντιμονίου. Παρατηρήθηκε η μέγιστη αναστολή της ανάπτυξης των αμαστιγωτών ίση με 47.8 % έπειτα από την επώασή τους με τη δυναμοποίηση 12 cH της ουσίας *Antimonium crudum I*. Η αναστολή της ανάπτυξης των αντίστοιχων ευαίσθητων προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L.infantum*,παρουσία της ίδιας δυναμοποιημένης 12 cH ουσίας *Antimonium crudum I* ήταν ίση με 22.8% . Επόμενως, η ουσία AC I, 12 cH παρουσίασε μεγαλύτερη ανασταλτική δράση στις αμαστιγωτές μορφές σε σύγκριση με τις προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου. Ανάλογα αποτελέσματα μία αυξημένη αναστολή της ανάπτυξης των ενδοκυττάριων αμαστιγωτών σε σύγκριση με τις προμαστιγωτές παρατηρήθηκε στις υπόλοιπες δυναμοποιήσεις 6cH, 7 cH, 30 cH και 200 cH του *Antimonium crudum I* , όπου η αναστολή της ανάπτυξης της 6cH ήταν ίση με 0% στα προμαστιγωτά και 15.5% στα αμαστιγωτά, της

7cH ίση με 9.2% στα προμαστιγωτά και 26.1% στα αμαστιγωτά, της 30 cH ήταν ίση με 10.8% στα προμαστιγωτά και 27.2% στα αμαστιγωτά και της 200 cH ίση με 9.9% στα προμαστιγωτά και 21.9% στα αμαστιγωτά. Παρατηρείται μεγαλύτερη ανασταλτική δράση σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας AC *I* στις ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές, σε σύγκριση με τις προμαστιγωτές. Αντίθετα το σκεύασμα *Antimonium crudum II* παρουσίασε αναστολή ανάπτυξης ανάπτυξη ίση με 10.7% των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών που επωάστηκαν με τη δυναμοποίηση 12 cH της ουσίας *Antimonium crudum II,* παρόλο που προέρχεται από την ίδια ουσία. Αυτή ήταν και η μοναδική αξιοσημείωτη διαφορά των δύο εκδοχών της ουσίας *Antimonium crudum,* καθώς στις υπόλοιπες περιπτώσεις δεν εμφάνισαν διαφορές.

Η δεύτερη περίπτωση αφορά επίσης τις ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *L.infantum*, οι οποίες είναι ευαίσθητες στην τρέχουσα χορηγούμενη θεραπεία με συνθετικά άλατα του πεντασθενούς αντιμονίου , όπου παρατηρήθηκε αναστολή ανάπτυξης ίση με 41.8% έπειτα από την επώασή τους με τη δυναμοποίηση 10 cH της ουσίας *Ferrum arsenicum.* Η αναστολή της ανάπτυξης των αντίστοιχων προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L.infantum*, ευαίσθητες στην τρέχουσα θεραπεία, έπειτα από την επώασή τους με τη δυναμοποίηση 10 cH της ουσίας *Ferrum arsenicum* ήταν ίση με 9.6%. Επόμενως, η ουσία FA 10 cH παρουσίασε μεγαλύτερη ανασταλτική δράση στις αμαστιγωτές μορφές σε σύγκριση με τις προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου. Μεγαλύτερη ανασταλτική δράση των αμαστιγωτών μορφών σε σχέση με τις ενδοκυττάριες αμαστιγωτές μορφές παρατηρήθηκε και στις υπόλοιπες δυναμοποιήσεις 12 cH, 30 cH και 200 cH του *Ferrum arsenicum* όπου η ανάπτυξη της 12 cH ίση με 9.8% στα προμαστιγωτά και 34.9% στα αμαστιγωτά, της 30 cH ήταν ίση με 15.2% στα προμαστιγωτά και 35.9% στα αμαστιγωτά και της 200 cH ίση με 11.9% στα προμαστιγωτά και 15.4% στα αμαστιγωτά. Και σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται μεγαλύτερη ανασταλτική δράση σε όλες τις δυναμοποιήσεις της ουσίας FA στις ενδοκυτταρικές αμαστιγωτές μορφές, σε σύγκριση με τις προμαστιγωτές. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά και καθιστούν απαραίτητες, στο μέλλον, πειραματικές δοκιμές με σκοπό τη διερεύνηση των συνεχόμενων δυναμοποιήσεων των ουσιών αυτών, έτσι ώστε να εντοπιστεί και προσδιοριστεί η ιδανική δυναμοποίηση που κατέχει αντιλεϊσμανιακή δράση.

Παράλληλα, καμία ουσία σε καμία από τις προαναφερθείσες δυναμοποιήσεις δεν παρουσίασε κυτταροτοξικότητα στα μακροφάγα. Αυτό συμπεραίνεται από την παρατηρούμενη ανάπτυξη των μακροφάγων σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες. Το παραπάνω αποτέλεσμα συνολικά είναι ενδεικτικό πως όλες οι δυναμοποιήσεις των σκευασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν δεν εμφανίζουν τοξικότητα και επομένως είναι ασφαλείς για τα μακροφάγα και κατ' επέκταση για τον ξενιστή. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει πως, ενδεχομένως, οι ουσίες θα μπορούσαν να δοκιμαστούν μελλοντικά σε *in vivo* χορήγηση σε πειραματικά μοντέλα λεϊσμανίασης.

Η υπάρχουσα βιβλιογραφία παρέχει περιορισμένα δεδομένα τα οποία έχουν προκύψει την τελευταία εικοσαετία, σχετικά με την δραστικότητα των συγκεκριμένων ομοιοπαθητικών ουσιών έναντι του παρασίτου (Aleixo et al., 2014) και υπό αυτή την έννοια, τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας, που ήταν επαναλήψιμα, αποτελούν μια πρώτη αισιόδοξη πιλοτική ένδειξη για περαιτέρω έρευνες. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επίσης συμφωνούν με μια προηγούμενη μελέτη δράσης του *Antimonium crudum*

σε δυναμοποιήσεις 30 cH και 200 cH *σε L. amazonensis*, σχετικά με την αντιπαρασιτική δράση του συγκεκριμένου σκευάσματος (Rodrigues de Santana et al., 2017).

Η παρατηρούμενη απουσία κυτταροτοξικής δράσης του A*ndrographis paniculata* ως ομοιοπαθητικό παρασκεύασμα σε όλες τις ελεγχόμενες δυναμοποιήσεις, αποτελεί μία θετική ένδειξη σε σύγκριση με την τοξικότητα που εμφανίζει το κύριο συστατικό του, το *andrographolide*. Ενδεχομένως, επιπλέον έρευνες του σκευάσματος *Andrographis paniculata,* θα μπορούσαν να οδηγήσουν στον εντοπισμό της δυναμοποίησης, η οποία θα παρουσιάζει αντιλεϊσμανιακή δράση χωρίς, παράλληλα, να εμφανίζει τοξική δράση και να αποτελέσουν την απάντηση στις προσπάθειες των επιστημόνων να αντιμετωπίσουν την τοξικότητα του συγκεκριμένου συστατικού.

Αναφερόμενοι στο σκεύασμα *Ferrum arsenicum*, η παρούσα πειραματική δοκιμή αποτέλεσε τον πρώτο, έλεγχο της αντιλεϊσμανιακής δράσης της συγκριμένης ουσίας. Τα αποτελέσματα αποτελούν χρήσιμες πληροφορίες που μας φέρνουν ένα βήμα πιο κοντά στη διερεύνηση των κατάλληλων ουσιών και δυναμοποιήσεων που θα μπορούσαν να επιφέρουν ένα θετικό αποτέλεσμα. Καθώς το *Ferrum arsenicum* στη δυναμοποίηση 10 cH παρουσίασε μία ενθαρρυντική ανασταλτική δράση ίση με 41.8% στις αμαστιγωτές μορφές αποτελεί μία αισιόδοξη πρώτη πληροφορία, η οποία μας βοηθά στον προσδιορισμό της κατεύθυνσης που πρέπει να ακολουθηθεί από εδώ και πέρα.

Πρέπει να σημειωθεί, ότι τα αποτελέσματα από τον έλεγχο ανάπτυξης των προμαστιγωτών και των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών των παρασίτων έδειξαν πως η ουσία αναφοράς (θετικός μάρτυρας) αμφοτερικίνη Β παρουσίασε την αναμενόμενη ανασταλτική δράση. Συγκεκριμένα, η ανάπτυξη παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων αμφοτερικίνης Β (20 μΜ, 15 μΜ, 10 μΜ, 5 μΜ, 2.5 μΜ, 1 μΜ και 0.5 μΜ) τόσο των προμαστιγωτών, όσο και των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών ήταν <20%, υποδηλώνοντας την επιτυχή ανασταλτική δράση της συγκεκριμένης ουσίας. Η συγκεκριμένη ουσία έχει αποδεδειγμένη αντιλεϊσμανιακή δράση και αποτελεί θεραπευτική αγωγή δεύτερης γραμμής σε περιστατικά λεϊσμανίασης, ενώ παράλληλα παρουσιάζει μειονεκτήματα λόγω της τοξικότητας που εμφανίζει. Τα παραπάνω αποτελέσματα από τη χρήση της αμφοτερικίνης Β δείχνουν ότι η πειραματική μεθοδολογία ελέγχου της ανάπτυξης ήταν αποτελεσματική, επιβεβαιώνοντας πως η απουσία αναστολής της ανάπτυξης από τις υπόλοιπες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν, οφείλεται σε έλλειψη ικανοποιητικής δραστικότητας στις συγκεκριμένες δυναμοποιήσεις που επιλέχθηκαν για έλεγχο.

Με βάση τη συγκεκριμένη αρχή, αξίζει να αναφερθεί πως η παρατήρηση σχετικά με την αντιλεϊσμανιακή δράση των ουσιών, δεν είναι απαραίτητα ενδεικτική της απουσίας δραστικότητας των ουσιών αυτών στους ξενιστές , καθώς το πειραματικό μοντέλο ήταν *in vitro*. Οι ομοιοπαθητικοί επιστήμονες υποστηρίζουν πως η ομοιοπαθητική θεραπεία πιθανότερα διεγείρει και συγχρόνως παρέχει υποστήριξη του αμυντικού μηχανισμού με σκοπό την απαλλαγή του από τη νόσο. Έχει δειχθεί ότι ομοιοπαθητικές ουσίες επιδεικνύουν ανοσορυθμιστικές ικανότητες μέσω της ρύθμισης της έκκρισης προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών (Nascimento et al., 2017). Επομένως, η παρατηρούμενη ανάπτυξη των μακροφάγων, σε συνδυασμό με την απουσία άμεσης αντιλεϊσμανιακής δράσης έναντι των παρασίτων είναι σύμφωνη με τις αναφορές που εστιάζουν στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος, με σκοπό την αποδρομή της νόσου (Eskinazi, 1999). Για τον πειραματικό έλεγχο αυτής της υπόθεσης χρήσιμα θα ήταν *in vivo* μοντέλα.

Περαιτέρω έρευνα θα αποκαλύψει την κατεύθυνση στην οποία πρέπει να στοχεύσουμε προκειμένου να ανακαλύψουμε τα ομοιοπαθητικά σκευάσματα στα οποία το πλεονέκτημα της απουσίας τοξικότητας θα αξιοποιηθεί με τον καλύτερο τρόπο και θα συνδυαστεί, στις κατάλληλες δυναμοποιήσεις με μία αποτελεσματική αντιλεϊσμανιακή δράση. Απαιτούνται δοκιμές διαδοχικών δυναμοποιήσεων σε σχέση με τις ενδεικτικές δυναμοποιήσεις οι οποίες παρουσίασαν στην συγκεκριμένη μελέτη την μεγαλύτερη πειραματική αναστολή. Σκοπός θα είναι να εντοπισθεί η βέλτιστη δυναμοποίηση που θα επιτύχει την μέγιστη αναστολή της ανάπτυξης των παρασίτων. Επιπλέον απαιτείται ο έλεγχος της οξειδωτικής δραστηριότητας των μακροφάγων, παρουσία των συγκεκριμένων ουσιών και η ανίχνευση των παραγόμενων κυτταροκινών για να προσδιορισθεί η *in vitro* ανοσολογική απάντηση του κυττάρου ξενιστή. Η παρούσα πειραματική δοκιμή αποτελεί το πρώτο βήμα για μία, ευελπιστούμε, μακρά πορεία ανακαλύψεων που θα μας οδηγήσει στον πολυπόθητο τελικό μας στόχο που δεν είναι άλλος από την πλήρως αποτελεσματική αντιμετώπιση της λεϊσμανίασης έως την οριστική απαλλαγή της κοινωνίας από αυτήν.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome	**MHC**	Major Histocompatibility Complex
CL	Cutaneous Leishmaniasis	**NF-κB,**	nuclear *factor*-κB
DAT	Direct Agglutination Test	**NO**	nitric oxide
DCL	Diffuse Cutaneous Leishmaniasis	**NOS**	nitric oxide synthase
DFA	Direct Fluorescence Antibody	**PBS**	Phosphate Buffered Saline
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	**PCR**	Polymerase Chain *Reaction*
FBS	FBS Fetal Bovine Serum	**PGE2**	PGE2
gp63	gp63 major surface 1e glycoprotein	**PKDL**	Post-kala-azar dermal leishmaniasis
HIV	Human Immunodeficiency Virus	**PV**	Parasitophorus Vacuole
IFA	Immunofluorescence Assay	**ROS**	ReactiveOxygen Species
IFAT	Indirect Fluorescent Antibody Test	**RNS**	Reactive Nitrogen Species
IFN-γ	Interferon gamma	**RT-PCR**	Real-time PCR
IL-1	Interleukin 1	**SDS**	Sodium Dodecyl-Sulfate
IL-4	Interleukin 4	**spp.**	species
IL-6	Interleukin 6	**TGF-β**	Transforming growth *factor* beta
IL-10	Interleukin 10	**Th1/ Th2**	Th1/ Th2 T helper cells
IL-12	Interleukin 12	**TNF**	Tumor necrosis *factors*
IL-13	Interleukin 13	**VEGF**	Vascular endothelial growth factor
MAPK	Mitogen activated Protein Kinase	**VL**	Visceral Leishmaniasis
MCL	Mucocutaneous Leishmaniasis	**ΠΟΥ**	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Adhikari, S.R. and Maskay, N.M. , The economic burden of Καλά-αζαρ in households of the Danusha and Mahottari districts of Nepal, (2003), *AC 1*ta Trop. 88, 1–2
2. Ahluwalia S., Lawn SD., Kanagalingam J., Grant H., Lockwood DN., Mucocutaneous *Leishmania*sis: an imported infection among travellers to central and South America,(2004), BMJ ,329 : 842-4.
3. Ahluwalia, I.B. et al., Visceral *Leishmania*sis: consequences of a neglected disease in a Bangladeshi community, (2003), Am. J. Trop. Med. Hyg. 69, 624–628
4. Akhoundi Mohammad, Downing Tim, Votýpka Jan, Kuhls Katrin, Lukeš Julius, Cannet Arnaud, Ravel Christophe, Marty Pierre, Delaunay Pascal, Kasbari Mohamed, Granouill*AC 1* Bruno, Gradoni Luigi, Sereno Denis, *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis, (2016), Molecular Aspects of Medicine.
5. Akhoundi, M., Hajjaran, H., Baghaei, A., Mohebali M., Geographical distribution of *Leishmania* species of human cutaneous *Leishmania*sis in Fars province, southern Iran,(2013), Iran J. Parasitol. 8, 85-91
6. Aleixo C.F. -Brustolin, Ferraz F.N., Massini P.F. et al., Benefcial immunomodulatory and neuro digestive efect in Trypanosoma cruzi infection after Lycopodium clavatum 13c treatment,(2017), Microb Pathog 112:1–4
7. Aleixo D. L., Villano Bonamin L, Nabarro Ferraz F., Karina da Veiga F., Marques de Araújo S., Homeopathy in parasitic diseases , (2014), Int J High Dilution Res ,13(46): 13-
8. Alexander J., Satoskar A. R. and Russell D. G. , *Leishmania* species: models of intr*AC 1*ellular parasitism, (1999), J Cell Sci. 112 Pt 18, 2993-3002
9. Alexander J., Trans*AC 1*tions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, (1978), 72, 645
10. Alexander J. and Bromb*AC 1*her, F., T helper1/t helper2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: is this paradigm still relevant? (2012), Front Immunol. 3, 80
11. Alexander James, Bryson Karen, T helper(h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm,(2005), Immunology Letters, Vol: 99, 17–23
12. Ali A, Ashford RW., Visceral *Leishmania*sis in Ethiopia. IV. Prevalence, incidence and relationship between infection and disease in an endemic area, (1994) Ann Trop Med Parasitol ,88:289±93
13. Almeida, L. A. & R. Araujo, Highlights on molecular identification of closely related species, (2013), Infect Genet Evol 13: 67-75
14. Alten B, Maia C, Afonso MO, Campino L, Jiménez M, González E, Molina R, Bañuls AL, Prudhomme J, Vergnes B, Toty C, Cassan C, Rahola N, Thierry M, Sereno D, Bongiorno G, Bianchi R, Khoury C, Tsirigotakis N, Dokianakis E, Antoniou M, Christodoulou V, Mazeris A, Karakus M, Ozbel Y, Arserim SK, Erisoz Kasap O, Gunay F, Oguz G, Kaynas S, Tsertsvadze N, Tskhvaradze L, Giorgobiani E, Gramiccia M, Volf P, Gradoni L. Seasonal dynamics of phlebotomine sand fly species proven vectors of Mediterranean *Leishmania*sis caused by *Leishmania* infantum, (2016), PLoS Negl Trop Dis.;10:e0004458.

15. Alvar J., Aparicio P., Aseffa A. , Den Boer Margriet, Cañavate Carmen, Dedet Jean-Pierre, Luigi Gradoni, R*AC 1*hel Ter Horst, Rogelio López-Vélez, Javier Moreno, The Relationship between *Leishmania*sis and AIDS: the second 10 years,(2008), Clin Microbiol Rev, 21: 334–359
16. Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B, Jimenez M, Laguna F, LopezVelez R, Molina R, Moreno J. ,*Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years,(1997) Clin. Microbiol. Rev. 10: 298–319.
17. Alvar Jorge, Y*AC 1*tayo Sergio and Bern Caryn, *Leishmania*sis and poverty, (2006),TRENDS in Parasitology Vol.22 No.12, 552-557
18. Amaral V, Pirmez C, Goncalves A, Ferreira V, Grimaldi G Jr. Cell populations in lesions of cutaneous *Leishmania*sis of *Leishmania* (L.) amazonensis- infected rhesus m*AC 1*aques, M*AC 1AC 1*a mulatta, (2000), Mem Inst Oswaldo Cruz, 95 : 209-16.
19. Anstead GM, Chandrasekar B, Zhao W, Yang J, Perez LE, Melby PC. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania* donovani infection (2001),Infect Immun., 69:4709–18
20. Antoine J.C., Prina E., Lang T., Courret N., The biogenesis and properties of the parasitophorous *vacuole*s that harbour *Leishmania* in murine m*AC 1*rophages,(1998), Trends in microbiology, 6 392-401.
21. Ashford, R.W., *Leishmania*sis reservoirs and their significance in αρνητικός μάρτυρας, (1996), Clin. Dermatol. 14, 523–532
22. Ashford, R.W., The *Leishmania*ses as emerging and reemerging zoonoses, (2000), Int. J. Parasitol. 30, 1269–1281
23. Assche T.V., Desch*AC 1*ht M., Luz R.A.I., Maes L., Cos P.,(2011), *Leishmania*-m*AC 1*rophage inter*AC 1*tions: Insights into the redox biology, Free Radical Biol. Med. 51 ,337 –351
24. Barral-Netto, M.; Barral, A.; Brownell, C.E.; Skeiky, Y.A.W.; Ellingsworth, L.R.; Twardzik, D.R.; Reed, S.G. Transforming growth *factor*-beta in *Leishmania*l infection: a parasite escape mechanism,(1992), Science, 257, 545.
25. Basset D., Faraut F, Marty P., Dereure a J. , Rosenthal E, Mary C. , Pratlong F., L*AC 1*haud L., Bastien P., Dedet J-P., Visceral *Leishmania*sis in organ transplant recipients: 11 new cases and a review of the literature, (2005), Microbes Infect. 7, 1370–1375
26. Basu A, Suresh AK , Kane SG, Bellare JR, A review of m*AC 1*hines and devices to potentize homeopathic medicines,(2017), Homeopathy, 106:240–9
27. Bates PA., Transmission of *Leishmania* met*AC 1*yclic promastigotes by phlebotomine sand flies, (2007), Int. J. Parasitol. 37(10), 1097–1106
28. Beattie L, Kaye PM. *Leishmania*-host inter*AC 1*tions: what has imaging taught us?, (2011),Cell. Microbiol. 13(11), 1659–1667
29. Belen A, Alten B. Variation in life table char*AC 1*teristics among populations of Phlebotomus papatasi at different altitudes,(2005), J Vector Ecol, 31: 35-44.
30. Bellavite P, Ortolani R, Pontarollo F,Piasere V, Benato G, Conforti A, Immunology and homeopathy,(2006), 4. Clinical studies – Part 1. Evid-based Compl Alt, 3, 293–301
31. Bellavite Paolo , Ortolani Riccardo and Conforti Anita, Immunology and Homeopathy. 3. Experimental Studies on Animal Models, (2006), eCAM, 3(2),171–186
32. Berenguer J., Gomez-Camdera F. ,Padilla B., Rodriguez-Ferrero M., Anaya, F., Moreno S., Valderrabano F. , Visceral *Leishmania*sis (Καλά-αζαρ) in transplant recipients: Case report and review,(1998), Transplantation , 65 , 1401.
33. Berman, J.D.,Human *Leishmania*sis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years, (1997), Clin. Infect. Dis. 24, 684–703
34. Bern C, Adler-Moore J, Berenguer J, Marleen Boelaert, Margriet den Boer, Robert N. Davidson, Concepcion Figueras, Luigi Gradoni, Dimitris A. Kafetzis, Koert Ritmeijer, Eric Rosenthal, Catherine Royce, Rosario Russo, Shyam Sundar, Jorge Alvar, Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral *Leishmania*sis,(2006), Clin Infect Dis, 43: 917–924
35. Besteiro S., Williams R. A., Coombs G.H. & Mottram J. C., Protein turnover and differentiation in Leishmania, (2007),*Int J Parasitol* 37: 1063-1075.
36. Boelaert M., Lynen L., Desjeux P. Van der Stuyft. Cost-effectiveness of competing diagnostic-therapeutic strategies for visceral *Leishmania*sis, (1999), Bull World Health Organ , 77:667–74.

37. Boelaert M., Rijal S., Regmi S., et al. Comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral *Leishmania*sis, (2004), Am J Trop Med Hyg 70 : 72-7.
38. Boer M. den, Argaw D., Jannin J. and Alvar J., *Leishmania*sis imp*AC 1*t and treatment *AC 1*cess, (2011), Clinical Microbiology and Infection, Vol: 17, 1471–1477
39. Boericke W., Manual de matéria médica homeopática: Os sintomas-guia e car*AC 1*terísticos dos principais medicamentos, (1997), (Clínico e Patogenéticos)/user homeopathic materia medica: symptoms guide and char*AC 1*teristic of the main products (clinical and pathogenetic). Robe, São Paulo, p 430
40. Bornhoeft G., Wolf U., Ammon K., Righetti M., Maxion-Bergemann S., Baumgartner S., Thurneysen A., Matthiessen P., Effectiveness, safety and cost-effectiveness of homeopathy in general pr*AC 1*tice – summarized health technology assessment, (2006), Forsch Komplementmed, 13 Suppl 2, 19–29
41. Bosetto, M. C. and Giorgio, S. ,*Leishmania* amazonensis: multiple receptorligand inter*AC 1*tions are involved in amastigote infection of human dendritic cells, (2007) ,Exp Parasitol. 116, 306-310
42. Braga CF., Guilherme ALF., Aleixo DL., Falkowski GJS., Gois MB., Moreira NM., Araujo SM: Screening de potências de Bioterápico de Toxoplasma gondii em camundongos tratados pré infecção,(2010), In: Proceedings of I Congresso Sul Americano de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
43. Brasil Farm*AC 1*opeia homeopática Brasileira, (2011), 3rd edn. ANVISA, Brasília
44. Bray R.S, Note on the history of cutaneous *Leishmania*sis in the Mediterranean and Middle East area, (1987), Parassitologia 29, 175–179
45. BRITANNICA https://www.britannica.com/science/homeopathy
46. Bunney T.D. and Katan M., PLC regulation: emerging pictures for molecular mechanisms,(2011), Trends in Biochemical Sciences. 36, 88-96
47. Calabrese EJ, Staudenmayer J, Stanek EJ, Drug development and hormesis. Changing conceptual understanding of the dose response creates new challenges and opportunities for more effective drugs, (2006), Curr Opin Drug Disc Develop 9, 117–123 (2006)
48. Cano M. I., Dungan J. M., Agabian N., and Bl*AC 1*kburn E. H., Telomerase in kinetoplastid parasitic protozoa,(1999),Proc Natl *AC 1*ad Sci U S A. 96, 3616-3621
49. Cardigno P., Homeopathy for the treatment of menstrual irregularities: a case series,(2009), Homeopathy (2009) 98, 97–106
50. Carrera, L.; Gazzinelli, R.T.; Badolato, R.; Hieny, S.; Muller, W.; Kuhn, R.; S*AC 1*ks, Phagocytosis: Microbial Invasion,(1996), D.L. J. Exp. Med.,183,515
51. Cecilio, P., Perez-Cabezas, B., Santarem, N., M*AC 1*iel, J., Rodrigues, V. and Cordeiro da Silva, A. Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite, (2014) , Front Immunol. 5, 480
52. Cerf B.J. , T. C. Jones, R. Badaro, D. Sampaio, R. Teixeira and W. D. Johnson Jr. Malnutrition as a risk *factor* for severe visceral *Leishmania*sis (1987), J. Infect. Dis. 156, 1030–1033
53. CHARALABIDIS (Σ. Θ. ΧΑΡΑΛΛΑΜΠΙΔΗΣ), S., & DIAKOU (A. N. ΔΙΑΚΟΥ), A. Visceral Leishmaniosis and Canine Leishmaniosis in Greece and other mediterranean countries, (2017) ,Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society, 55(3), 247-261
54. Chicharro, C. M. I. Jimenez and J. Alvar ,Iso-enzymatic variability of *Leishmania* infantum in Spain, (2003), Ann. Trop. Med. Parasitol. 97 (Suppl. 1), 57–64
55. Choi, J. and N. M. El-Sayed, Functional genomics of trypanosomatids, (2012), Parasite Immunol 34: 72-79
56. Christodoulou Vasiliki, Antoniou Maria, Ntais Pantelis, Messaritakis Ippokratis, Ivovic Vladimir, Jean-Pierre Dedet, Francine Pratlong, Vıt Dvorak, and Yiannis Tselentis, Re-Emergence of Visceral and Cutaneous *Leishmania*sis in the Greek Island of Crete,(2012), Vector-Borne and Zoonotic Diseases, Vol:12(3), 214-222
57. COMBINED VOLUME - I TO V (Revised & Augmented) 2016 https://abfh.org.br/wp-content/uploads/2017/03/HPI-COMBIND-VOLUME-I-V.pdfWHO. Homeopathy is one of the most commonly used forms of herbal medicines. Traditional medicine strategy 2002–2005. Geneva, World Health Organization, 2002.
58. Courret N., Frehel C., Gouhier N., Pouchelet M., Prina E., Roux P., Antoine J.C., Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous *vacuole*s following phagocytosis of the met*AC 1*yclic

promastigote or amastigote stages of the parasites, (2002), Journal of cell science, 115, 2303-2316.
59. Croft, S. L., Monitoring drug resistance in *Leishmania*sis, (2001),Trop Med Int Health 6: 899-905
60. Croft, S. L., S. Sundar and A. H. Fairlamb, Drug resistance in *Leishmania*sis, (2006),Clin Microbiol Rev 19: 111-126
61. Cruz I., Nieto J. Moreno J. CSIC ,Cañavate C. , Desjeux P., Alvar J. ,*Leishmania*/HIV co-infections in the second decade,(2006) Indian J. Med. Res. 123, 357–388
62. Cruz I, M. A. Morales, I. Noguer, A. Rodríguez, J. Alvar, *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users,(2002), Lancet, 359: 1125–26
63. Cunha, S., Freire, M., Eulalio, C., Cristovao, J., Netto, E., Tohnson. W. D. Reed. S. G. & Badaro. R, Visceral *Leishmania*sis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil,(1995), Trans*AC 1*tions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 89, 155 – 158
64. Cunningham Anna C., Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*, (2002), Experimental and Molecular Pathology 72, 132–141
65. Dantas-Torres, F., Branda˜o-Filho, S.P., 2006. Visceral *Leishmania*sis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and αρνητικός μάρτυρας,(2006), Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 48, 151–156
66. Das VN, Ranjan A, Sinha AN, Verma N, Lal CS, Gupta AK, Siddiqui N A, Kar S K, A randomized clinical trial of low dosage combination of pentamidine and allopurinol in the treatment of antimony unresponsive cases of visceral *Leishmania*sis,(2001), J Assoc Phys India, 49: 605-608.
67. Datar A, Kaur N, Patel S, et al., In vitro effectiveness of samento and banderol herbal extr*AC 1*ts on diffrent morphological forms of Borrelia burgdorferi, Townsend Letter, for Doctors & Patients,(2010), www.townsendletter.com/July2010/sapi0710.html
68. Datar A., Kaur N., Patel S., et al., In vitro effectiveness of samento and banderol herbal extr*AC 1*ts on different morphological forms of Borrelia burgdorferi, Townsend Letter, for Doctors & Patients,(2010), www.townsendletter.com/July2010/sapi0710.html
69. Daulaire, N., Globalization and health, (1999),Development, 4, 22-24.
70. Davidson, R.N. Visceral *Leishmania*sis in clinical pr*AC 1*tice, (1999), J. Infect., 39(2), 112
71. Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe,(2003), Ann Trop Med Parasitol 97(Suppl. 1):3–15
72. Desjeux P., The increase in risk *factors* for *Leishmania*sis worldwide, (2001),TRANS ROY SOC TROP MED HYG,95,239-243
73. DESJEUX Philippe, MD, *Leishmania*sis Public Health Aspects and Αρνητικός μάρτυρας, (1996),Clinics in Dermatology, Vol:14, 417-423
74. Desjeux, P., *Leishmania*sis: current situation and new perspectives, (2004), Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 27, 305–318.
75. Dhiman, RC. Effect of minor engineering intervention in the αρνητικός μάρτυρας of breeding of Phlebotomus papatasi (Scopoli) sandflies,(1995), Southeast Asian J Trop Med Public Health 26: 368–70.
76. Di Giorgio C., Delmas F., Akhmedjanova V., Ollivier E., Bessonova I., Riad E., Timon-David P., In vitro antileishmanial Activity of diphyllin isolated from Haplophyllum bucharicum,(2005), Planta Med. 71, 366–369
77. DISCUSSION PAPER, THE GENDER DIMENSIONS OF NEGLECTED TROPICAL DISEASES HIV, Health and Development Group Bureau for Policy and Programme Support United Nations Development Programme, 2019
78. Dua VK., Verma G., Dash AP., In vitro antiprotozoal *AC 1*tivity of some xanthones isolated from the roots of *Andrographis paniculata*,(2009), Phytother Res.,23:126-128.
79. Dua VK, Ojha VP., Roy R., et al., Anti-malarial *AC 1*tivity of some xanthones isolated from the roots of *Andrographis paniculata*. J Ethnopharm*AC 1*ol, (2004), 95:247-251
80. Dujardin Jean-Claude, Discussion: Structure, dynamics and function of *Leishmania* genome: Resolving the puzzle of infection, genetics and evolution,(2009) Infection, Genetics and Evolution, Vol: 9, Issue: 2, 290–297
81. Dujardin, J.C. , Risk *factors* in the spread of *Leishmania*ses: towards integrated monitoring?(2006), Trends Parasitol. 22, 4–6

82. Dutta A and Sukul NC, Filaricidal properties of a wild herb, *Andrographis paniculata*, (1982), J Helminthol ,56:81–84.
83. Eltoum I.A., Zijlstra E.E., Ali M.S., Ghalib H.W., Satti M.M., Eltoum B., el Hassan A.M., Congenital καλά-αζαρ and *Leishmania*sis in the pl*AC 1*enta ,(1992), Am. J. Trop. Med. Hyg., 46, 57
84. Ernest, M. Callens, F. R. Opperdoes and P. A. Michels, Pyruvate kinase of *Leishmania* mexicana mexicana. Cloning and analysis of the gene, overexpression in Escherichia coli and char*AC 1*terization of the enzyme, (1994), Mol Biochem Parasitol. 64, 43-54
85. Escobar A, Lopez M, Serrano A, Ramirez M, Perez C, Aguirre A, et al. Dendritic cell immunizations alone or combined with low doses of interleukin-2 induce specific immune responses in melanoma patients(2005), Clin Exp Immunol, 142:555–68
86. Eskinazi D., Homeopathy re-revisited – is homeopathy compatible with biomedical observations?, (1999), Arch Int Med 159, 1981–1986
87. Falkowski G.J. -Temporini, Lopes C.R., Massini P.F. et al., Predominance of Th1 response, increase of megakaryocytes and Kupfer cells are related to survival in Trypanosoma cruzi infected mice treated with Lycopodium clavatum, (2016), Cytokine 88:57–6
88. Fernández Guerrero ML, Robles P, Rivas P, Mójer F, Muniz G, Górgolas M. Visceral *Leishmania*sis in immunocompromised patients with and without AIDS: a comparison of clinical features and prognosis, (2004), *AC 1*ta Trop ,90:11–6
89. Ferrante A, Seow WK, Rowen-Kelly B, Thng YH, Tetrandrine, a plant alkaloid, inhibits production of tumor necrosis *factor*-alpha (c*ac*hectin) by human monocytes,(1990), Clin Exp Immunol, 80:232–235.
90. Ferroglio, E. A Romano, S Passera, A D'Angelo, P Guiso, E Ghiggi, C Bolla, A Trisciuoglio, A Biglino, Dogs' parasite and zoonotic risk: from old to new ''emergencies'' in the North-West of Italy,(2006), Parassitologia 48, 115–116
91. Fisher P., What is homeopathy? An introduction.(2012), Front Biosci(Elite Ed), 4:1669–82.
92. Galanti N., Galindo M., Sabaj V., Espinoza I. and Toro G.C., Histone genes in trypanosomatids,(1998), Parasitol Today. 14, 64-70
93. German Homoeopathic Pharmacopoeia (Homoeopathische Arzneibuch), 5th supplement to 1978 Edition, 31–38. English translation London, Britis Homoeopathic Association (1993)
94. Glew Robert H., Saha Asish K., Das Siddhartha, Remaley Alan T., Biochemistry of the *Leishmania* Species, (1988),Microbiology Reviews , Vol: 52, 412-432.
95. Gomes Monique, Tiburcio Salles, Anversa Laís, Kanunfre Kelly Aparecida, Ferreira Antonio Walter, Virmondes Rodrigues Júnior, Luciana de Almeida Silvaa Anti- *Leishmania* infantum
96. Gossage SM, Rogers ME, Bates PA ,Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: Implications for understanding the life cycle, (2003), Int J Parasitol 33: 1027–1034
97. Goyard, S., Segawa H., Gordon J., Showalter M. , R. Duncan, Salvatore J. Turco, Stephen M. Beverley , An in vitro system for developmental and genetic studies of *Leishmania* donovani phosphoglycans , (2003) Mol. Biochem. Parasitol., 130, 31–42.
98. Gradoni Luigi, A Brief Introduction to *Leishmania*sis Epidemiology, The *Leishmania*ses: Old Neglected Tropical Diseases, (2018), Springer International Publishing AG, 1-12
99. Gramiccia M. , L. Gradoni, M. Troiani, Heterogeneity among zymodemes of *Leishmania* infantum from HIV-positive patients with visceral *Leishmania*sis in south Italy, (1995) FEMS Microbiol. Lett. 128, 33–38
100. Gramiccia M., Gradoni, L., The current status of zoonotic *Leishmania*ses and appro*AC 1*hes to disease αρνητικός μάρτυρας, (2005), Int. J. Parasitol. 35, 1169–1180
101. Gregory, D. J. and Olivier, M. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*, (2005), Parasitology, 130 Suppl, S27-35
102. Grzyw*AC 1*z JG, Suerken CK, Quandt SA, Bell RA, Lang W, Arcury TA., Older adults' use of complementary and alternative medicine for mental health: findings from the 2002 National Health Interview Survey,(2006), J Altern Complement Med,12(5):467–73.
103. Gunatilaka A.A.L., Berger J.M., Evans R., Miller J.S, Wisse J.H, Neddermann K.M., Bursuker I., Kingston D.G.I., Isolation, Synthesis, and Structure −*AC 1*tivity Relationships of Bio*AC 1*tive Benzoquinones from Miconia lepidota from the Suriname Rainforest 1,(2001), J. Nat. Prod. 64, 2–5.

104. Gupta P. D. , Birdi T. J., Development of botanicals to combat antibiotic resistance ,(2017), J Ayurveda Integr Med, 1 -10
105. Hahnemann CFS. In: Reves Joseph (ed). Organon of Medicine. 5th and 6th edn. ,(1842), Haifa, Homeopress Ltd (Organon, παρ. 269, 295).
106. Hall, L.R., Titus, R.G. J. Sand fly vector saliva selectively modulates m*AC 1*rophage functions that inhibit killing of *Leishmania* major and nitric oxide production., (1995) Immunol.,155, 3501-3506
107. Harms G, Schonian G, Feldmeier H. *Leishmania*sis in Germany, (2003), Emerg Infect Dis,9: 872-875.
108. Harrison, L.H., Lee H. Harrison, Talapala G. Naidu, Jean S. Drew, Joaquim Eduardo de Alencar, Richard D. Pearson , Reciprocal relationships between undernutrition and the parasitic disease visceral *Leishmania*sis, (1986) ,Rev. Infect. Dis. 8, 447–453
109. Hartley M-A, Drexler S, Ronet C, Beverley SM, Fasel N: Theimmunological, environmental, and phylogenetic perpetrators of metastatic *Leishmania*sis,(2014), Trends Parasitol , 30:412-422.
110. Hegde VR , Pu H, Patel M, et al., Two new b*AC 1*terial DNA primase inhibitors from the plant Polygonum cuspidatum. Bioorg Med Chem Lett (2004), Bioorg Med Chem Lett,14:2275–2277
111. Hegde VR. , Pu H., Patel M., et al., Two new b*AC 1*terial DNA primase inhibitors from the plant Polygonum cuspidatum. Bioorg Med Chem Lett (2004), Bioorg Med Chem Lett,14:2275–2277
112. HERBAL RESOURCE, https://www.herbal-supplement-resource.com
113. Henrique da Silva G, Barros P.P., Silva Gonçalves G.M. et al., Hepatoprotective efect of Lycopodium clavatum 30CH on experimental model of par*AC 1*etamol-induced liver damage in rats, (2015), Homeopathy 104:29–35
114. Hepburn NC, Cutaneous *Leishmania*sis,(2000), Clin Exp Dermatol ,25:363–70.
115. Hlavacova J, Votypka J, Volf P. The effect of temperature on *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) development in sand fles, (2013), J Med Entomol. 2013;50:955–8.
116. Hommel Marcel, Visceral *Leishmania*sis: Biology of the Parasite,(1999),Journal of infection, Vol:39,101-111
117. HOMOEOPATHIC PHARMACOPOEIA OF INDIA (H.P.I.) COMBINED VOLUME - I TO V (Revised & Augmented),2016 https://abfh.org.br/wp-content/uploads/2017/03/HPI-COMBIND-VOLUME-I-V.pdf
118. HOMEOBOOK,https://www.homeobook.com/homoeopathy-medicines-from-ferrum-group/).
119. Ilg Thomas, Stierhof York-Dieter, Craik David, Simpson Richard, Handman Emanuela and B*AC 1*ic Anthony, Purification and structural char*AC 1*terization of a filamentous, mucin-like proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* parasites, (1996), J Biol Chem 271: 21583–2159
120. Isnard, A., Shio, M. T. and Olivier, M., Imp*AC 1*t of *Leishmania* metalloprotease GP63 on m*AC 1*rophage signaling, (2012), Front Cell Infect Microbiol. 2, 72
121. J*AC 1*obs J., Jonas WB., Jimenez-Perez M., Crothers D., Homeopathy for childhood diarrhea: combined results and metaanalysis from three randomized, αρνητικός μάρτυραçled clinical trials, (2003), Pediatr Infect Dis J 22, 229–234
122. Jarvis, J. N. & D. N. Lockwood, Clinical aspects of visceral *Leishmania*sis in HIV infection,(2013), Curr Opin Infect Dis 26: 1-9.
123. Jonas WB, Gaddipati JB, Rajeshkumar NV et al, In vitro and in vivo assessment of homeopathic treatment for prostate cancer (2004) Paper presented at: Society of Integrative Oncology First International Conference; New York, NY.
124. Jones, D., Elloso, M. M., Showe, L., Williams, D., Trinchieri G., and Scott, P., Differential regulation of the interleukin 12 receptor during the innate immune response to *Leishmania* major, (1998),Infect. Immun. 66, 3818–3824
125. Kane M. M., and Mosser D. M., *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt *mac*rophage *act*tivation, (2000), Curr. Opin Hematol. 7, 26–31
126. Karow JH, Abt HP, Frohling M, *Ac*kermann H. Effic*as*y of Arnica montana D4 for healing of wounds after Hallux valgus surgery compared to diclofen*AC 1*.(2008),J Altern Complement Med 14:17-25.

127. Kayser O., Kiderlen AF., Croft SL., Natural products as antiparasitic drugs, (2003a), Parasitol. Res. 90, S55–S62
128. Khan S. J. and Muneeb S., Cutaneous leishmaniasis in Pakistan,(2005),Dermatology Online Journal, 11(1). Retrieved from https://escholarship.org/uc/item/25b5x6b4
129. Killick-Kendrick, R. Phlebotomine vectors of the *Leishmania*ses: a review, (1990) Med. Vet. Entomol., 4(1), 1
130. Kishore K, Kumar V, Kesari S., Vector αρνητικός μάρτυρας in *Leishmania*sis,(2006) Indian J Med Res 2006; 123: 467–72.
131. Kubar J., Quaranta J.F., Aufeuvre J.P., Marty P., Lelièvre A., Le Fichoux Y., Transmission of *L. infantum* by blood donors ,(1997), Nat. Med., 3, 368
132. Kumari Shraddha, Kumar Awanish, Samant Mukesh, Singh Neeloo and Dube Anuradha, Discovery of Novel V*AC 1*cine Candidates and Drug Targets Against Visceral *Leishmania*sis Using Proteomics and Transcriptomics,(2008), Current Drug Targets, 9, 938-947
133. Kushawaha, P. K., Gupta, R., Sundar, S., Sahasrabuddhe, A. A., & Dube, A. ,Elongation *factor*-2, a Th1 stimulatory protein of *Leishmania* donovani, generates strong IFN- γ and IL-12 response in cured *Leishmania*-infected patients/hamsters and protects hamsters against *Leishmania* challenge,(2011), Journal of Immunology, 187, 6417–6427.
134. Larche M, Wraith DC. Peptide-based therapeutic v*AC 1*cines for allergic and autoimmune diseases(2005) Nat Med ,11:S69–76.
135. Le Pont, F. , Report of a mission to the *Leishmania*sis foci of Duzici and Sanliurfa in Turkey, (1994), Paris: Institut pour la Recherche et le Developpement
136. Leishmaniases: the Diseases ,http://www.icp.ucl.*AC 1*.be/~opperd/parasites/leish4.htm,
137. Liao F: "Discovery of Artemisinin (Qinghaosu)", (2009), Editorial in Molecules: 14(12), 5362-5366
138. Liarte DB, Mendonca IL, Luz FC, Abreu EA, Mello GW, Farias TJ, et al. QBC for the diagnosis of human and canine American visceral *Leishmania*sis : preliminary data, (2001),Rev Soc Bras Med Trop 2001; 34 : 577-81.
139. Liebert M. A., INC, Selected Treatment Options for Lyme Disease,(2012), Alternative and Complementary therapies, Vol:18(4) , 220-225
140. Lodge R. and Descoteaux A.: *Leishmania* invasion and phagosome biogenesis(2008), Subcell Biochem 47:174-181
141. Lukes, J., I. L. Mauricio, G. Schonian, J. C. Dujardin, K. Soteriadou, J. P. Dedet, K. Kuhls, K. W. Tintaya, M. Jirku, E. Chocholova, C. Haralambous, F. Pratlong, M. Obornik, A. Horak, F. J. Ayala & M. A. Miles, Evolutionary and geographical history of the *Leishmania* donovani complex with a revision of current taxonomy, (2007), Proc Natl *AC 1*ad Sci U S A 104: 9375-9380
142. Luz K.G., da Silva V.O., Gomes E.M., M*AC 1*hado F.C., Araujo M.A., Fonseca H.E., Freire T.C., d'Almeida J.B., Palatinik M., Palatinik-de-Souza C.B., Prevalence of anti-*Leishmania* donovani antibody among Brazilian blood donors and multiply transfused hemodialysis patients, (1997), Am. J. Trop. Med., Hyg., 57, 168
143. M*ac*edo SB, Ferreira LR, Perazzo FF, Carvalho JC. Anti-inflammatory *AC 1*tivity of Arnica montana 6cH: preclinical study in animals,(2004), Homeopathy 2004; 93: 84-87
144. Magar S., Nayak D., Mahajan U.B., Patil R.K., Shinde S.D., Goyal S.N., Swaminarayan S., Patil C. R., Ojha S., Kundu C. N., Ultra-diluted Toxicodendron pubescens attenuates pro-inflammatory cytokines and ROS- mediated neuropathic pain in rats ,(2018) ,Sci Rep. Sep 10;8(1):13562
145. Maggi P, Gaudiano V, Valente M, Latorr*AC 1*a A, Cavaliere RL, Marroni M, et al. *Leishmania*sis in patients with chronic renal failure: A diagnostic and therapeutic challenge for the clinician,(2004),J Nephrol , 17 : 296-301.
146. Makich L, Hussain R, Humphries JH, Management of depression by homeopathic
147. pr*ac*titioners in Sydney, Australia.,(2007), Complement Ther Med, 15(3):199–206.
148. Malagutti CE, Freire MTA, Salgado WO, Murayama AG, Salgado *AC 1*, Lobão AO ,(2008), Toxoplasmose: Recuperação da visão pela Homeopatia (descrição de dois casos clínicos).
149. Marchettini N. , GE Del GE, Voeikov V., Tiezzi E., Water: a medium where dissipative structures are produced by a coherent dynamics, (2010), J Theor Biol, 265: 511-516.

150. Maroli, M., Pennisi, M.G., Di Muccio, T., Khoury, C., Gradoni, L., Gramiccia, M., Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania* infantum,(2007), Vet. Parasitol. 145, 357–360
151. Martinez P, de la Vega E, Laguna F, Soriano V, Puente S, Moreno V, et al. Diagnosis of visceral *Leishmania*sis in HIV-1 infected individuals using peripheral blood smears, (1993),AIDS ,7 : 227-30.
152. Marzotto M., Bonafini C., Olioso D., Baruzzi A., Bettinetti L., Leva F. Di, Galbiati E., Bellavite P., Arnica montana stimulates extr*ac*ellular matrix gene expression in a m*AC 1*rophage cell line differentiated to wound-healing phenotype,(2016) ,PLoS ONE 11, e0166340
153. Mathie RT., Homeopathy: Opportunities in Healthcare,(2019), Homeopathy, 108(3):149
154. McGwire B.S. and Satoskar A.R., *Leishmania*sis: clinical syndromes and treatment,(2013), Q J Med, 1-8
155. McGwire B.S., Chang K.P., Engman D.M., Migration through the extr*ac*ellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surf*AC 1*e metalloprotease gp63, (2003) Infection and immunity, 71, 1008-1010.
156. Mikus, J. and D. Steverding, A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against Leishmania using the dye Alamar Blue. Parasitol Int, 2000. 48(3): p. 265-9.
157. Mishra K. , Dash A P, Swain B K and Dey N, Anti-malarial *Ac*tivities of *Andrographis paniculata* and Hedyotis corymbosa extr*AC 1*ts and their combination with curcumin,(2009), Malaria Journal , 8:26, p 1-9
158. Misra P, Pal NL, Guru PY, et al. Antimalarial *AC 1*tivity of *Andrographis paniculata* (Kalmegh) against Plasmodium berghei NK 65 in Mastomys natalensis,(1992), Pharm*AC 1*eutical Biology, 30:263–274.
159. Misra S., Verma M., Mishra SK., Srivastava S., Lakshmi V., Bhatt*AC 1*harya SM., Gedunin and photogedunin of Xylocarpus granatum possess antifilarial *AC 1*tivity against human lymphatic filarial parasite Brugia malayi in experimental rodent host,(2011),Parasitol Res , 109(5):1351–60.
160. Molina R, Gradoni L, Alvar J, HIV and the transmission of *Leishmania*,(2002), Ann Trop Med Parasitol ,97(Suppl. 1): S29- S45.
161. Moradin N. and Descoteaux A. , *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages, (2012) ,Front Cell Infect Microbiol. 2, 121
162. Moreno, J., Alvar, J., Canine *Leishmania*sis: epidemiological risk and the experimental model, (2002), Trends Parasitol. 18, 399–405
163. Mubanga Cheuka Peter, Mayoka Godfrey , Mutai Peggoty and Chibale Kelly, The Role of Natural Products in Drug Discovery and Development against Neglected Tropical Diseases, (2017), Molecules, 22-58
164. Müller RH, J*AC 1*obs C, Kayser O, Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy. Rationale for development and what we can expect for the future,(2001), Adv Drug Deliv Rev , 47:3–19
165. Müller, K., van Zandbergen, G., Hansen, B., Laufs, H., Jahnke, N., Solb*AC 1*h, W., Laskay T.,Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course major infection in mice, (2001), Medical Microbiology and Immunology, 190, 73–76.
166. Murray H.W, Berman J.D., Davies C.R., Saravia N.G., Advances in *Leishmania*sis,(2005), Lancet 366, 1561-1577.
167. Myler P. J., Sisk E., McDonagh P. D., Martinez-Calvillo S., Schnaufer A., Sunkin S. M., Yan S., Madhubala R., Ivens A. and Stuart K., Genomic organization and gene function in *Leishmania*, (2000), Biochem Soc Trans. 28, 527-531
168. Najib Nik, N. Rahman ,T. Furuta , S. Kojima ,K. Takane ,M. Mohd Ali, Antimalarial *AC 1*tivity of extr*AC 1*ts of Malaysian medicinal plants,(1999), J Ethnopharm*AC 1*ol.,64:249-254.
169. Nascimento K. F. , Rodrigues Rodrigues de Santana F., Vieira da Costa C. R., Kaplum V., Volpato H., Vaturo Nakamura C., Villano Bonamin L., Freitas Buchi D.de, M1 homeopathic complex trigger effective responses against Leishmania (L) amazonensis in vivo and in vitro ,(2017), Cytokine (99), 80-90
170. Navarro MC, Montilla MP, Cabo MM, et al., Ant*ibacte*rial, antiprotozoal,and antioxidant *ac*tivity of fie plants used in Izabal for infectious diseases,(2003), Phytother Res, 17:325–329.
171. Ndjonka D., Agyare C., Luersen K., Djafsia B., *A*chukwi D., Nukenine E.N., Hensel A., Liebau E., *In vitro AC 1*tivity of Cameroonian and Ghanaian medicinal plants on parasitic

(*Onchocerca ochengi*) and free-living (*Caenorhabditis elegans*) nematodes (2011), . *J. Helminthol. 85*, 304–312
172. Newman D.J. , Cragg G.M. , Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years., (2007), J. Nat. Prod., 70, 461–477.
173. Olioso, M. Marzotto, C. Bonafini, M. Brizzi, P. Bellavite, Arnica Montana effects on gene expression in a human m*AC 1*rophage cell line, evaluation by quantitative Real-Time PCR, (2016), Homeopathy 105, 131–147
174. Oliveira C.C. de, Oliveira S.M., Goes V.M., Probst C.M., Krieger M.A., Buchi D.F., Gene expression profiling of m*AC 1*rophages following mice treatment with immunomodulator medication,(2008), J. Cell. Biochem. 104, 1364–1377.
175. Oliveira CC. de, Abud A. P. R. , Oliveira S. M. de, Guimarães F. de SF. , Andrade L. F. de, Bernardi R. P. Di, Coletto E. L., Kuczera D., Lozzo E. J. Da, Gonçalves J. P., Trindade E. da S. and Buchi, D. de F. Developments on drug discovery and on new therapeutics: highly diluted tinctures *AC 1*t as biological response modifiers,(2011), BMC Complementary and Alternative Medicine , 11:101,1-11
176. Oliveira S.M. de, Oliveira C.C. De, Abud A.P., Guimarães F.S., Bernardi R.P. Di, Coletto E.L., Buchi, Mercurius solubilis: *Act*tions on m*AC 1*rophages, (2011), Homeopathy 100, 228 -236
177. Olivier, M., Atayde, V. D., Isnard, A., Hassani, K. and Shio, M. T., *Leishmania* virulence *factors*: focus on the metalloprotease GP63, (2012) Microbes Infect. 14, 1377-1389
178. Olivier, M., Gregory, D. J. and Forget, G. ,Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view ,(2005), Clin Microbiol Rev. 18, 293-305
179. Oncohema KeyFastest Oncology & Hematology Insight Engine https://oncohemakey.com/leishmania-species/
180. Oryan A, Akbari M, Worldwide risk *factors* in *Leishmania*sis,(2016), Asian P*AC 1*ific Journal of Tropical Medicine, 1-8
181. Otranto and F. Dantas-Torres, The prevention of canine *Leishmania*sis and its imp*AC 1*t on public health, (2013), Trends Parasitol. 29, 339-345
182. Oumeish O. Y., Cutaneous *Leishmania*sis: a historical perspective, (1999) , Clin. Dermatol. 17, 249–254
183. Palatnik-de-Sousa CB., V*AC 1*cines for *Leishmania*sis in the fore coming 25 years. (2008) V*AC 1*cine, 26: 1709-1724.
184. Pan L., Lezama-Davila C.M., Isa*AC 1*-Marquez A.P., Calomeni E.P., Fuchs J.R, Satoskar A.R., Kinghorn A.D., Sterols with antileishmanial *AC 1*tivity isolated from the roots of Pentalinon andrieuxii, (2012),Phytochemistry 82, 128–135.
185. Patil, C. R. et al., Modulation of arthritis in rats by Toxicodendron pubescens and its homeopathic dilutions, (2011), Homeopathy: 100, 131–137
186. Patra, P., S. K. Guha, A. K. Maji, P. Saha, S. Ganguly, A. Chakraborty, P. K. Kundu, S. Sarker & K. Ray, Effic*AC 1*y of oral miltefosine in visceral *Leishmania*sis in rural West Bengal, India, (2012), Indian J Pharm*AC 1*ol 44: 500-503.
187. Pavanelli, Treatment with Lycopodium clavatum 200dH Intensifes Kidney and Liver Injury in Mice Infected with Toxoplasma gondii, (2020), Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 68:3, 1-14
188. Pearson, R.D., Lareau, S.M. and Jeronimo, S.M. *Leishmania*sis at the End of the Millennium, (1999), Curr. Infect. Dis. Rep., 1(5), 448.
189. Pereira A.V., Gois M.B., Lopes Lera K. R. Jennifer, Sapla M. M. Miranda, Falkowski-Temporini G. J., Bezerril J Ea, Zanusso G.-Junior, Ferraz F. N., Santos da Silva S., Aleixo D. L., Conchon I. -Costa, Gonçales Sant'Ana1 D. M., I N da Costa, S M de Araújo, W R
190. Peters NC, S*AC 1*ks DL. The imp*AC 1*t of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous *Leishmania*sis. (2009) Cell. Microbiol., 11(9), 1290–1296
191. Peters, C., Aebischer, T., Stierhof, Y. D., Fuchs, M. and Overath, P, The role of m*AC 1*rophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania* mexicana amastigotes,(1995), J Cell Sci. 108 (Pt 12), 3715-3724
192. Podinovskaia Maria, Descoteaux Albert , *Leishmania* and the m*AC 1*rophage: a multif*AC 1*eted inter*AC 1*tion ,(2015), Future Microbiology, Vol: 10(1), 111–129

193. Prajeeth, C. K., Haeberlein, S., Sebald, H., Schleicher, U., & Bogdan, C., *Leishmania*infected m*AC 1*rophages are targets of NK cell-derived cytokines but not of NK cell cytotoxicity,(2011), Infection and Immunity, 79, 2699–2708.
194. Ranjan Alok, Sur Dipika, Singh Vijay P, Siddique Niyamat A, Manna Byomkesh, Lal Chandra S, Prabhat K Sinha, Kishore Kamal, Bhatt*AC 1*harya Sujit K, Risk *factors* for Indian καλά-αζαρ, (2005), Am. J. Trop. Med. Hyg. 73, 74–78
195. Ravindran R, Anam K, Bairagi BC, Saha B, Pramanik N, Guha SK, Rama P. Goswami, Dwijadas Banerjee, Nahid Ali, Char*AC 1*terization of immunoglobulin G and its subclass response to Indian καλά-αζαρ infection before and after chemotherapy,(2004), Infect Immun , 72 : 863-670.
196. Real F., Florentino P.T., Reis LC ,Ramos-Sanchez E.M., Sampaio P., Veras T., Goto H., RArruda Mortara, Cell-to-cell transfer of *Leishmania* amazonensis amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions,(2014), Cell. Microbiol. 16(10), 1549–1564
197. Reithinger R, Mohsen M, Aadil K, Sidiqi M, Erasmus P, Coleman PG, Anthroponotic cutaneous *Leishmania*sis, Kabul, Afghanista, (2003), Emerg Infect Dis, 9:727–9.
198. Reithinger, R., Social imp*AC 1*t of *Leishmania*sis, Afghanistan (2005),Emerg. Infect. Dis. 11, 634–636
199. Rezai, H. R., Sher, S., & Gettner, S. , *Leishmania* tropica, L. donovani, and L. enriettii: immune rabbit serum inhibitory in vitro, (1969), Experimental Parasitology, 26, 257–263.
200. Ribeiro-Gomes FL, Roma EH, Carneiro MBH, Doria NA, S*AC 1*ks DL, Peters NC: Site dependent recruitment of inflammatory cells determines the effective dose of *Leishmania* major,(2014) Infect Immun 2014, 82:2713-2727.
201. Rijal, S., S. Koirala, P. Van der Stuyft, M. Boelaert , The economic burden of visceral *Leishmania*sis for households in Nepal (2006),Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 100, 838–841
202. Rodrigues Rodrigues de Santana , L.C. Dalboni , K.F. Nascimento , F. T. Konno , A. M. Alvares-Saraiva , M. S.F. Correia , M. D. Correa Bomfim , R. C.V. Casarin , E. C. Perez , M. A. Lallo , G. B. Peres , M. D. Laurenti , N. R. Benites , D.F. Buchi , L. Villano Bonamin,, High dilutions of antimony modulate cytokines production and m*AC 1*rophage – Leishmania (L.) amazonensis inter*AC 1*tion in vitro, (2017), Cytokine (92),33-47
203. Rogers ME, Bates PA, Leishman ia manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission, (2007) PLoS Pathogens, Vol:3,Issue:6 ,e 91,0818-0825
204. Rogers ME, Chance ML, Bates PA , The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania* mexicana in the sand fly Lutzomyia longipalpis, (2002) Parasitol 124: 495–507
205. Rosenthal LA, Sutterwala FS, Kehrli ME, Mosser DM, *Leishmania* major-human m*AC 1*rophage inter*AC 1*tions: cooperation between M*AC 1*-1 CD11b/CD18; and complement receptor type 1 CD35; in promastigote adhesion, (1996), Infection and Immunity, 64:2206–15
206. Roy P., Das S., Auddy R.G. and Mukherjee A., Biological targeting and drug delivery in αρνητικός μάρτυρας of Leishmaniasis, (2012), Journal of Cell and Animal Biology Vol. 6(6), pp. 73-87
207. S. K. Mauryaa, A. K. Singh, A. Seth, Potential Medicinal plants for lymphatic filariasis: A Review,(2015), *J Crit Rev, Vol 2, Issue 1, 1-6*
208. S*AC 1*ks DL, Perkins PV. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. Science ,(1984) 223 : 1417-9.
209. Salem MM., Werbovetz K. A., Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against Leishmaniasis and trypanosomiasis ,(2006), Curr. Med. Chem. 13, 2571–2598.
210. Saliba, E.K., Oumeish, Y.O., Reservoir hosts of cutaneous *Leishmania*sis,(1999), Clin. Dermatol. 17, 275–277
211. Sandri Patrícia Flora, Gislaine Janaina Sanchez Falkowski, Luzmarina Hernandes, Márcia M*AC 1*hado de Oliveira Dalálio, Denise Lessa Aleixo, Mônica Lúcia Gomes, Anélio Dias Nascimento Júnior, Ricardo Alberto Moliterno, Silvana Marques de Araújo,(2011), Int J High Dilution Res,10(36):119-124

212. Santana F.R., Coelho C.P., Cardoso T.N., Benites N.R., Hurtado E.C.P., Laurenti M.D., Bonamin L.V., Modulation of inflammation response to murine cutaneous Leishmaniasis by homeopathic medicines: *Antimonium crudum I*30 cH, (2014), Homeopathy 103 264–274 (a).
213. Santangelo R, Paderu P, Delmas G, Chen Z, Mannino R, Zarif L, D.S. Perlin , Effic*AC 1*y of oral cochleate-amphotericin B in a mouse model of systemic candidiasis,(2000), Antimicrob Agents Chemother ,44:2356–60.
214. Santos, J.B., Lauand L , Souza GS, M*AC 1*êdo VO, Socioeconomic *factors* and attitudes towards household prevention of American cutaneous *Leishmania*sis in an endemic area in Southern Bahia, Brazil, (2000), Cad. Saude Publica 16, 701–708
215. Sarkar A., Datta P., Kumar A., Das and A Gomes, Anti-rheumatoid and anti-oxidant *AC 1*tivity of homeopathic Guai*AC 1*um officinale in an animal model,(2014), Homeopathy 103, 133- 138
216. Schlein Y., *Leishmania* and sandflies: inter*AC 1*tions in the life cycle and transmission (1993), Parasitology Today, 9, 255
217. Schlein, Y., J*AC 1*obson, R.L., and G Messer ,`*Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite,(1992), Proc Natl *AC 1*ad Sci USA 89 (20): 9944-9948
218. Schneider B., Klein P., Weiser M., Treatment of vertigo with a homeopathic complex remedy compared with usual treatments: a meta-analysis of clinical trials, (2005), Arzneimittelforsch 55, 23–29
219. Schonian Gabriele, Mauricio Isabel, Gramiccia Marina, Canavate Carmen , Boelaert Marleen, and Dujardin Jean-Claude, *Leishmania*ses in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology, (2008) Trends in Parasitology Vol :24, Issue: 3, 135-142
220. Seaman J, Mercer AJ, Sondorp HE, Herwaldt B., Epidemic visceral *Leishmania*sis in southern Sudan: treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited ressources, (1996), Ann Int Med;124:664–72.
221. Sen S, Roy K, Mukherjee S, Mukhopadhyay R, Roy S: Restoration of IFN a R subunit assembly, IFN a signaling and parasite clearance in *Leishmania* donovani infected m*AC 1*rophages: role of membrane cholesterol (2011), PLoS Pathog, 7:e1002229.
222. Şenel E, Evolution of homeopathy, A scientometric analysis of global homeopathy literature between 1975 and 2017, (2018), Complementary Therapies in Clinical Pr*AC 1*tice
223. Sharma D Anoopa, Bern C., Varghese B., Chowdhury R. , Haque R., Ali M., Amann J., Ahluwalia I. B., Wagatsuma Y., Breiman R. F., Maguire J. H., McFarland D. A., The economic imp*AC 1*t of visceral *Leishmania*sis on households in Bangladesh, (2006), Trop. Med. Int. Health 11, 757–764
224. Sharma Umakant & Singh Sarman, Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their αρνητικός μάρτυρας,(2008), J Vector Borne Dis, Vol: 45, 255–272
225. Singh Nisha, Manish Kumar, Rakesh Kumar Singh, *Leishmania*sis: Current status of available drugs and new potential drug targets, Asian P*AC 1*ific Journal of Tropical Medicine (2012), 485-497
226. Singh S, Dey A, Sivakumar R. Applications of molecular methods for *Leishmania* αρνητικός μάρτυρας, (2005), Rev Expert Rev Mol Diagn , 5 : 251-65
227. Singh S, Sivakumar R. Recent advances in the diagnosis of *Leishmania*sis (2003), J Postgrad Med 49 : 55-60
228. Singh Sarman, New developments in diagnosis of *Leishmania*sis,(2006), Indian J Med Res 123, 311-330
229. Soejarto D.D, Farnsworth, N.R. Tropical Rain Forests, Potential Source of New Drugs?, (1989), Perspect. Biol. Med. 32, 244–256.
230. Soejarto D.D, Farnsworth, N.R. Tropical Rain Forests: Potential Source of New Drugs?, (1989), Perspect. Biol. Med. 1989, 32, 244–256.
231. SolbachWerner, Röllinghoffl Martin , Kem Peter, Differentialdiagnose: *Leishmania*se (1992), Dt. Ärztebl. 89, 1602-1607
232. Solb*AC 1*h, W. & T. Laskay, The host response to *Leishmania* infection, (2000), Adv Immunol 74: 275-317
233. Spiecker, M., Hai-Bing Peng and James K. Liao, Inhibition of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by nitric oxide involves the induction and nuclear translocation of IκB α. (1997), J. Biol. Chem. 272, 30969–30974

234. Stauch, A., Duerr, H. P., Picado, A., Ostyn, B., Sundar, S., Rijal, S., Boelaert, M., Dujardin, J. C. and Eichner, M., Model-based investigations of different vectorrelated intervention strategies to eliminate visceral *Leishmania*sis on the Indian subcontinent,(2014), PLoS Negl Trop Dis. 8, e2810
235. Sundar S, Chakravarty J, Agarwal D, M.D., Madhukar Rai, M.D., and Henry W. Murray, M.D., Single-dose liposomal amphotericin B for visceral *Leishmania*sis in India,(2010), N Engl J Med , 362: 504–512.
236. Sundar S, Chatterjee M. Visceral *Leishmania*sis – current therapeutic modalities, (2006), Indian J Med Res, 123: 345-352
237. Sundar S., and M. Rai, Laboratory diagnosis of visceral *Leishmania*sis,(2002), Clin Diagn Lab Immunol. 9, 951-958
238. Sundar S., Reed S., Singh V., Kumar P., Murray H., Rapid *AC 1*curate field diagnosis of Indian visceral *Leishmania*sis,(1998),Lancet 351, 563-565.
239. Sundar, S., Pai, Kumar K., Pathak-Tripathi R., Gam K., Ray A.A., M. and Kenney, R.T. Resistance to treatment in Καλά-αζαρ: speciation of isolates from northeast India,(2001) Am. J. Trop. Med. Hyg., 65(3), 193.
240. Suvarna K. and Monteiro J., *Andrographis paniculata* – a rare remedy in Homoeopathy,(2018), Homeo book, Homeopathic Materia Medica, https://www.homeobook.com/andrographis-paniculata-a-rare-remedy-in-homoeopathy/
241. Symmers W., St. C. *Leishmania*sis *AC 1*quired by Contagion. A Case of Marital Infection in Britain (1960), Lancet, 2, 127
242. T. Lieke, S. Nylen, L. Eidsmo, W.R. McMaster, A.M. Mohammadi, A. Khamesipour, L. Berg, H. Akuffo, *Leishmania* surf*AC 1*e protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation, (2008),Clinical and experimental immunology, 153, 221-230.
243. Tasdemir D., Kaiser M, Brun R., Yardley V., Schmidt T.J., Tosun F., Ruedi P., Antitrypanosomal and Antileishmanial *AC 1*tivities of Flavonoids and Their Analogues: In Vitro, In Vivo, Structure-*AC 1*tivity Relationship, and Quantitative Structure-*AC 1*tivity Relationship Studies,(2006), Antimicrob. Agents Chemother 50, 1352–1364.
244. Tatiana S. Tiuman ,Adriana O. Santos b, Taˆnia Ueda-Nakamura , Benedito P. Dias Filho, Celso V. Nakamura , Recent advances in leishmaniasis treatment,(2011), International Journal of Infectious Diseases 15, e525–e532
245. Tavares CAP, Fernandes AP, Melo MN. Molecular diagnosis of *Leishmania*sis,(2003)Expert Rev Mol Diagn 3 : 657-67
246. Thakur BB. Breakthrough in the management of visceral *Leishmania*sis,(2003), J Assoc Physicians India, 51: 649-651.
247. Thakur CP, Kanyok TP, Pandey AK, Sinha GP, Messick C, Olliaro P. Treatment of visceral *Leishmania*sis with injectable paromomycin (aminosidine). An open-label randomized phase-II clinical study, (2000), Trans R Soc Trop Med Hyg 94: 432-443.
248. Thakur, C.P. Socio-economics of visceral *Leishmania*sis in Bihar (India), (2000), Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 94, 156–157
249. Tselentis Y., Gikas A. and Chaniotis B., Καλά-αζαρ in Athens basin, (1994), Lancet 343:1635
250. Tyler V.E., Brady L.R., Robbers J.E. , Pharm*AC 1*ognosy,(1998) , 9th ed., Lea & Febiger: Philadephia, PA, USA
251. Tyler V.E., L.R. Brady, J.E. Robbers, Pharm*AC 1*ognosy, 9th ed.,(1998),Lea & Febiger: Philadephia, PA, USA
252. Ullman D., The Homeopathic Revolution, Famous People and Cultural Heroes Who Chose Homeopathy,(2007), North Atlantic Books, Berkeley CA
253. Ullman D.,The curious case of Charles Darwin,(2010), Evidbased Compl Alt 7, 33-39
254. Vannier-Santos, M.A.,Martiny, A., Lins, U., Urbina, J.A., Borges, V.M.,De Souza, W., Impairment of sterol biosynthesis leads to phosphorus and calcium *AC 1*cumulation in *Leishmania AC 1*idocalcisomes, (1999) Microbiol., 145, 3213.
255. VECTORBASE.ORG https://vectorbase.org/vectorbase/app
256. Velez I.D, Hendrickx E, Robledo SM, S del Pilar Agudelo , Gender and cutaneous *Leishmania*sis in Colombia, (2001), Cad. Saude Publica 17, 171–180
257. Vickers A., Smith C., Homoeopathic Oscillococcinum for preventing and treating influenza and influenza-like syndromes (Cochrane review),(2006),The Cochrane Library, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. CD001957

258. Vijnovsky B., Tratado de matéria médica homeopática, 2nd edn. ,Editora Organon, Rio de Janeiro, (2012)
259. Vithoulkas George, The Science of Homoeopathy, Grove Press, 1980.
260. VL- ETHIOPIA (http://vl-ethiopia.huji.*act*.il) aithipia
261. Vodovotz Y, Bogdan C, Paik J, Xie Q W, Nathan C , Mechanisms of suppression of m*AC 1*rophage nitric oxide release by transforming growth *factor* beta, (1993),.J. Exp. Med., 178, 605.
262. Vouldoukis, I., Becherel, P. A., Riveros-Moreno, V., Arock, M Da Silva, O., Debre, P., Maqier, D., and Mossalayi, M. D., Interleukin-10 and interleukin-4 inhibits intr*AC 1*ellular killing of *Leishmania* infantum and *Leishmania* major by human m*AC 1*ro phages by decreasing nitric oxide generation, (1997), Eur. J. Immunol. 27, 860–865
263. Wagner H, Ulrich-Merzenich G. Synergy research: appro*AC 1*hing a new generation of phytopharm*AC 1*euticals(2009), Phytomedicine, 16:97–110
264. Waitumbi, J., Warburg, A. Phlebotomus papatasi Saliva Inhibits Protein Phosphatase *AC 1*tivity and Nitric Oxide Production by Murine M*AC 1*rophages, (1998),Infect. Immun., 66, 1534.
265. Walker, D. M., Oghumu, S., Gupta, G., McGwire, B. S., Drew, M. E. and Satoskar, A. R. Mechanisms of cellular invasion by intr*AC 1*ellular parasites, (2014),Cell Mol Life Sci. 71, 1245-1263
266. Weigel, M.M. and Armijos, R.X. The traditional and conventional medical treatment of cutaneous *Leishmania*sis in rural Ecuador, (2001),Rev. Panam. Salud Publica 10, 395 404
267. Weigle, K.A., Valderrama, L., Arias, A.L., Santrich, C., Saravia, N.G., Leishmanin skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of *Reaction* and sensitization, (1991), Am. J. Trop. Med. Hyg. 44, 260-71
268. WHO https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1
269. WHO, Αρνητικός μάρτυρας of the *Leishmania*ses. Report of a WHO expert committee,(2010), WHO Technical Report Series 949: 1-186
270. WHO, https://www.who.int/medicines/areas/traditional/Homeopathy.pdf
271. WHO, Manual on visceral *Leishmania*sis αρνητικός μάρτυρας; Geneva, WHO/LEISH/9640. 1996
272. WHOhttps://www.who.int/leishmaniasis/disease/clinical_forms_leishmaniases/en/index2.html
273. Wijerathna T., Gunathilaka N., and Gunawardena K.,The Economic Imp*AC 1*t of Cutaneous Leishmaniasis in SriLanka,(2018), Hindawi BioMed Research International, 1-9
274. WIKIMEDIA,https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Andrographis_paniculata_(Kalpa)_in_Narshapur_forest,_AP_W2_IMG_0867.jpg
275. Wikipedia, M.R Villarreal, *Leishmania*
276. World Health Organization, Safety issues in the preparation of homeopathic medicines. Geneva (2009)
277. Yamey, G. and Torreele, E. The world's most neglected diseases, (2002),Br. Med. J. 325, 176–177
278. Zink A.R. et al., *Leishmania*sis in ancient t Egypt and Upper nubia, (2006), Emerg. Infect. Dis. 12, 1616–1617
279. Χαραλαμπίδης ΣΘ Παρασιτικά νοσήματα των ζώων και του ανθρώπου. Πρωτοζωώσεις. Ελμινθώσεις. Αρθροποδώσεις ,(2003), University Studio Press, Θεσσαλονίκη .