



UPPSALA
UNIVERSITET

Leishmania

Hur reagerar immunförsvaret vid infektion av leishmania och vad händer inom läkemedelsforskningen?

Linda Andersson

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2009
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Sammandrag

Leishmania är en parasit som kan infektera både människor och djur. Den sprids med hjälp av sandmyggan som finns i Afrika, Syd- och Centralamerika, Mellanöstern, Asien, Indien och södra Europa. Leishmania kan ge mycket olika symptom beroende på vilken art av leishmania som infekterar värddjuret. Symtomen kan variera, alltifrån lättare hudåkommor till döden. I dag hotas ungefär 350 miljoner människor i 88 länder att smittas av leishmania. Tolv miljoner människor är smittade av leishmania och ytterligare två miljoner människor smittas varje år.

Parasiten överförs från sandmyggan till människor och djur då myggan suger blod. Parasiterna tar sig in i immunförsvarets makrofager där de förökar sig och slutligen lyserar makrofagen, varpå parasiter sprids i kroppen. En sandmygga som suger blod från en smittad människa eller ett djur får i sig parasiter med blodet, vilka sedan kan spridas vidare till nya individer.

Immunförsvarets celler utsöndrar proteiner som kallas cytokiner. Cytokiner fungerar som signalsubstanser mellan celler och produceras i respons på antigener. Olika cytokiner stimulerar eller inhiberar olika responser i immunförsvaret. T-hjälparcellers respons delas in i Th1- och Th2-responser. Dessa responser eliminerar olika typer av patogener. De vanligaste cytokinerna som utsöndras vid en Th1-respons är IL-2, INF- γ och IL-12 och i en Th2-respons utsöndras IL-4, IL-5 och IL-10 i högst koncentration. Det finns många olika celler som medverkar i immunresponsen mot leishmania. De har alla olika funktioner och samverkar tillsammans för att eliminera parasiten. Immunresponsen mot leishmania är beroende av vilken genotyp den infekterade individen har. En individ med en stark Th1-respons har en bättre motståndskraft mot leishmania än individer som har en starkare Th2-respons.

Olika arter och populationer av leishmania har utvecklat resistens mot läkemedel. Resistensen har skapat stora problem i många länder. I dag finns inte många alternativa läkemedel och därför tvingas patienter som drabbats av resistent parasiter behandlas med toxiska läkemedel som kan ge allvarliga bieffekter. I dag finns inget vaccin mot leishmania, men det sker en hel del forskning på området som förhoppningsvis kommer leda fram till att vaccin utvecklas. Kemoterapi och vektorkontroll är de medel som finns tillgängliga för att bota sjukdomen och minska spridningen i dag. Mekanismerna bakom leishmaniainfektioner är viktiga att studera för att kunna hitta nya målmolekyler för vaccin och läkemedel. Det finns många studier gjorda om leishmania. Arbetet att hitta nya målmolekyler tar tid och kräver mycket resurser. Nya läkemedel skulle kunna minska förekomsten av allvarliga biverkningar och förbättra elimineringen av leishmania och läkemedel tillsammans med ett vaccin skulle kunna förhindra spridning av sjukdomen.

Inledning

Leishmania är den näst vanligaste parasitsjukdomen i världen efter malaria. I dag hotas ungefär 350 miljoner människor i 88 länder att smittas av leishmania. Tolv miljoner människor är smittade av leishmania och ytterligare två miljoner människor smittas varje år. Det finns olika symptom på leishmania beroende på art. En del arter av leishmania ger allvarliga hudåkommor som kan ge stora besvär. Fattiga människor som drabbas av den allvarligaste formen av leishmania dör om de inte har råd med läkemedel. Många människor har till följd av denna sjukdom drabbats av stora ekonomiska problem då de inte kan arbeta. De ekonomiska problemen har blivit så stora i vissa områden att det hotar ekonomin i hela länder. Människor som är HIV-smittade och infekteras av leishmania kan få stora problem med sin hälsa, och tillståndet är mycket svårt att behandla. I dag finns inget effektivt vaccin mot leishmania. Resistensen mot olika läkemedel ökar och många av dagens läkemedel är mycket toxiska (WHO 2009). Med denna bakgrund i huvudet känns det viktigt att hela världen får upp ögonen för leishmania och inser att sjukdomen är ett stort problem i många länder. Att hitta nya mål molekyler för medicinering och att utveckla vaccin är viktigt för att förhindra att resistensen mot läkemedel och spridningen av parasiten ökar. För att kunna göra detta behövs vidare studier för att ta reda på mer om leishmania och hur nya läkemedel och vaccin ska utformas. Det är denna uppsats kommer att behandla.

Symtom vid leishmaniainfektion

Leishmania delas in i tre former beroende på vilka symptom de ger. Den minst allvarliga formen av leishmania är kutan leishmania (KL). Symptomen liknas vid hudsår som förekommer i ansiktet eller på ben och armar. Hudsåren kan bli mycket omfattande och leda till att den drabbade individen också får svåra sociala problem (WHO 2009). Oftast läker såren av sig själva och det tar vanligtvis mellan sex månader och ett år (Nylén 2003). Slemhinneleishmania (SL) kan ge mycket stora skador på slemhinnor i näsa, mun och hals. I vissa fall blir den drabbade vävnaden helt förstörd. Skadorna kan leda till att den drabbade individen helt utesluts från samhället i vissa länder (WHO 2009). SL utvecklas vanligtvis två år efter infektionstillfället men det kan ta upp till 30 år (Nylén 2003). Den mest allvarliga formen är inälvleishmania (IL) som även kallas kala azar. IL ger oregelbundna febertoppar, viktminskning, svullnad av mjälte och lever och anemi. Om IL inte behandlas avlider en smittad individ oftast inom två år (WHO 2009). Inkubationstiden kan variera från månader till år. Efter tillfrisknande från IL kan patienter drabbas av kronisk KL som kräver behandling under lång tid (Figur 1)(Nylén 2003).



Figur 1. Patienter drabbade av reishmania. Till vänster KL , i mitten SL och till höger IL (WHO 2009).

Bakgrundsfakta

Leishmaniaparasiten är en protozo och tillhör familjen *Trypanosomatidae*. Den kan infektera både människor och djur. I dag känner man till 20 arter av leishmania som kan infektera människan. Parasiten överförs med hjälp av sandmyggan, *Phlebotomine*. Det finns 500 kända arter av sandmyggan varav 30 arter kan överföra leishmania. Sandmyggan finns i tropiska och tempererade regioner och behöver organiskt material och värme för att överleva. Sandmyggan lägger sina ägg i växter, bark, sprickor i husväggar och sopor. De 20 arter av leishmania som kan infektera människan ger olika symptom och vissa arter kan även ge symptom från mer än en form av leishmania. De flesta arterna har olika geografisk spridning (Tab. 1) (Goding *et al.* 2008).

Tabell 1. De vanligast förekommande arterna av leishmania (Goding *et al.* 2008).

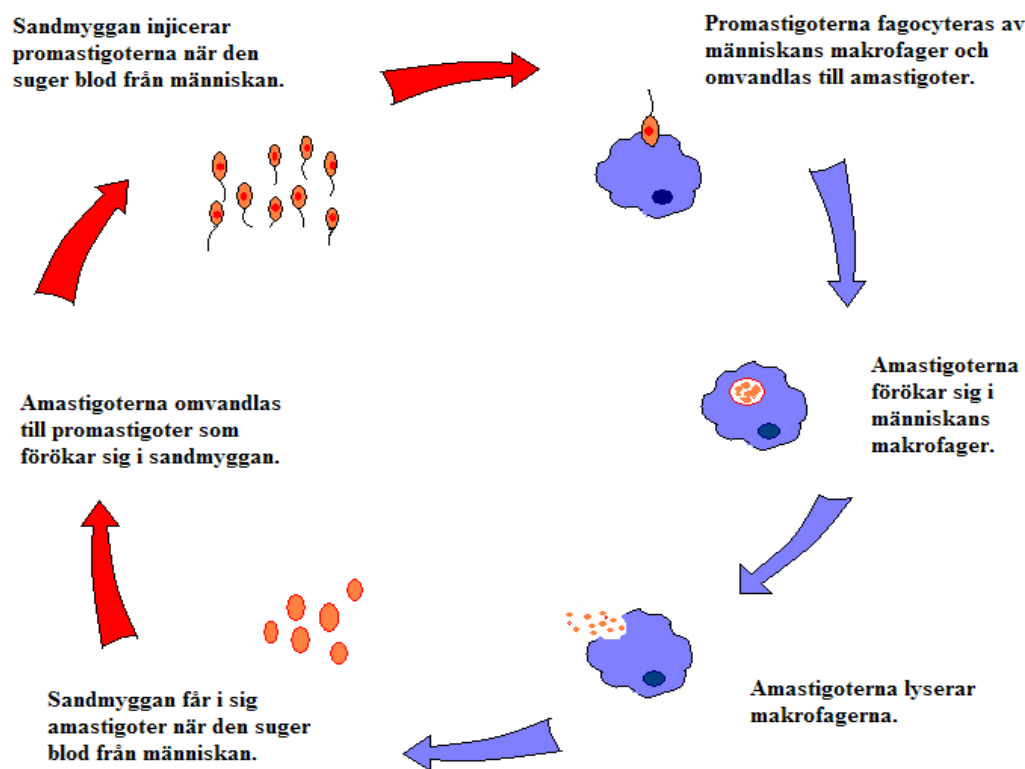
Art	Form av leishmania	Geografisk förekomst
<i>L.mexicana</i>	KL ^a och i ovanliga fall SL ^b	Centrala och norra delarna av Sydamerika, förekommande fall i södra USA
<i>L.braziliensis</i>	KL ^a som kan utvecklas till SL ^b	Centralamerika och Sydamerika
<i>L.major</i>	KL ^a	Mellanöstern, norra och centrala Afrika och södra Asien
<i>L.tropica</i>	KL ^a	Mellanöstern och södra Asien
<i>L.aethiopica</i>	KL ^a	Etiopien
<i>L.donovani</i>	IL ^c	Östra Afrika, Sahara Afrika, södra Asien och Indien
<i>L.infantum</i>	KL ^a eller IL ^c	Södra Europa, Mellanöstern, norra Afrika
<i>L.chagasi</i>	IL ^c och i vissa fall KL ^a	Brazilien, Venezuela och Colombia, Sydamerika och Centralamerika

^a kutan leishmania; ^b slemhinneleishmania; ^c inälvleishmania

Livscykel

Leishmania fortplantar sig inuti makrofager hos människor och djur, och inuti sandmyggan. Parasiten överförs mellan olika djur med hjälp av sandmyggan (Figur 2). Makrofagernas uppgift är att bryta ner det som fagocyterats, men leishmaniaparasiten har i vissa fall ett försvar mot hydrolytiska enzymer och det låga pH som råder i endosomerna och kan därför överleva och fortplanta sig i makrofager. När makrofagerna är fyllda med parasiter lyseras cellen och de frisläppta parasiterna fortsätter att infektera nya makrofager (Beverly *et al.* 1998). Parasiten kan befinna sig i två olika stadier. De kallas amastigoter när de befinner sig inuti makrofager i däggdjur och promastigoter när de befinner sig i sandmyggan. Amastigoter är det stadium där leishmania fortplantar sig inuti makrofagernas vakuoler (Burleigh *et al.* 2008). I detta stadium är de ca 3-7 µm (Awasthi *et al.* 2004). De infekterade makrofagerna följer med det blod som sandmyggan intar. Inuti sandmyggans buk utvecklas amastigoterna till

promastigoter (Burleigh *et al.* 2008). Promastigoterna utvecklar en flagell som gör dem motila och de växer till en längd av 10- 20 μm (Awasthi *et al.* 2004). Promastigoterna fäster vid magsäckens epitelceller för att inte passera genom sandmyggans tarmsystem. I sandmyggans magsäck förökar de sig ytterligare en gång. Nästa gång sandmyggan suger blod från ett däggdjur överförs dessa promastigoter till däggdjuret, vars makrofager blir infekterade av leishmania och livscykeln börjar om på nytt (Burleigh *et al.* 2008).



Figur 2. Leishmanias livscykel.

Effekter av klimatförändring

Olika arter av sandmyggan är anpassade för olika klimat. Det finns arter av sandmyggan vars larver klarar en minimitemperatur på $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ och maximitemperatur på $+35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Den optimala temperaturen för de flesta larver är ca $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Klimatet avgör indirekt spridningen av leishmania eftersom sandmyggan som överför sjukdomen är orsaken till spridning. Global uppvärmning kan öka medeltemperaturen i nordliga länder. Spridningen av sandmyggan kan då göra att leishmania sprids allt längre norrut. Fler och fler hundar smittade med leishmania importeras till länder där leishmania är mycket ovanligt. Dessa smittbärande hundar kan bli ett problem tillsammans med global uppvärmning. Ett för varmt och torrt klimat kan också leda till förhållandena blir för tuffa för sandmyggan och att den försvinner från vissa områden (Ebi *et al.* 2006).

En omfattande studie av sandmyggans temperaturberoende i sydvästra Asien har genomförts. Studien gav forskarna underlag för att uppskatta att en temperaturökning på 3° C kan öka både den geografiska spridningen och spridningen under säsongsb beroende perioder i området (Cross *et al.* 1996). Om en temperaturökning på 3° C kan ge stora effekter på spridningen av sandmyggan i sydvästra Asien skulle samma scenario kunna vara möjligt i Europa. För att med mer säkerhet kunna fastställa konsekvenserna av den globala uppvärmningen behövs ytterliggare studier.

Vektorkontroll

I många fattiga regioner där smittorisken är mycket hög vet inte människorna vad leishmania är. Det är viktigt att ge människor information och utbildning om leishmania och hur de kan skydda sig för att minska spridningen. I många länder är hundar en stor källa till smittspridning och många av dessa är vildhundar. Om möjligheten finns skulle smittspridningen minska om dessa djur avlivades (Desjeux *et al.* 1996).

Enkla metoder som används för att minska spridningen är myggmedel och myggnät som delas ut till människor i fattiga områden. Även hus kan sprayas med insektsmedel för att förhindra att myggan lägger sina larver i hussprickor. Jordbruket kan anpassas så att sandmyggans larver förlorar sina fuktiga kläckningsområden (WHO 2009). DDT är billigt och har använts i vissa områden men vissa populationer av *Phlebotomus argentipes* har utvecklat resistens mot DDT (Bora 1999). DDT bryts ned långsamt och är miljöfarlig, giftigt och cancerframkallande (Chalmers 2007). Myggnät impregnerade med insektsmedel som delats ut till människor har visat sig reducera förekomsten av KL med 50 % i Syrien (WHO 2009).

Immunologisk bakgrund

Immunförsvaret delas in i ett ospecifikt tidigt försvar och ett adaptivt eller anpassningsbart försvar som utvecklas vartefter vi utsätts för olika antigen. Det ospecifika immunförsvaret reagerar ospecifikt på olika antigen och reaktionen sker snabbt. Det adaptiva immunförsvaret är långsammare. Responsen är specifikt utvecklad mot ett antigen och resulterar i minnesceller mot antigenet som sedan kan inleda en snabbare respons nästa gång samma antigen påträffas. De två immunförsvaren är uppbyggda på olika sätt och involverar olika typer av celler. Det ospecifika immunsystemet består till största delen av mördarceller, makrofager och neutrofiler medan det adaptiva immunsystemet innehåller antigenpresenterande celler (APC), T- och B- celler och makrofager. Dendritiska celler (DC) är typiska APC, men även makrofager kan fungera som APC. Det adaptiva immunförsvaret delas in i det cellmedierade immunförsvaret och humoral immunförsvaret. (Abbas *et al.* 2007)

I det cellmedierade immunförsvaret ingår T-hjälparceller (THC) och cytotoxiska T-celler (CTC). APC presenterar antigen för T-cellerna. THC kan i sin tur sedan vidarebefordra antigenet till B-celler, CTC, makrofager eller till andra THC. CTC som aktiveras svarar med att utsöndra toxiska substanser som dödar infekterade celler eller icke kroppsegna celler. Det humoral immunförsvaret består av B-celler som producerar antikroppar mot olika antigen. Antikropparna delas in i fem olika klasser av immunoglobuliner (IgM, IgG, IgA, IgE och IgD) beroende på vilka typer av antigen de binder. Dessa klasser kan sen delas upp i subklasser. (Abbas *et al.* 2007)

T-hjälparcellerna kan ge Th1- och Th2-responser. Th1-celler aktiverar makrofager att fagocytera mikrober, B-celler att producera antikroppar som binder mikrober och bidrar till opsonisering och fagocytos, och neutrofiler som utsöndrar toxiska substanser vilka dödar mikrober. Th2-celler aktiveras vid allergi och parasitinfektioner. I denna respons aktiverar Th2-celler B-lymfocyter att producera antikroppar (IgE och IgG). Opsonisering av IgE aktiverar mastceller att utsöndra innehållet i granulomerna som är vakuoler fyllda med toxiska ämnen och cytokiner. Th2-responsen aktiverar även eosinofiler och makrofager. (Abbas *et al.* 2007)

Komplementsystemet

Komplementsystemet deltar i både det ospecifika immunförsvaret och det adaptiva immunförsvaret. Antikroppar och proteiner på cellers yta interagerar med olika molekyler för att eliminera mikrober. Komplementsystemet kan aktiveras på tre olika sätt. I den klassiska vägen binder ett plasmaprotein C1 till antikropparna IgM, IgG1 och IgG3 som i sin tur är bundna till en struktur hos en mikrob. Den alternativa vägen aktiveras genom hydrolys av komplementprotein C3. Tredje aktiveringsvägen är lektinvägen som aktiveras av plasmaprotein mannosbindande lektin (MBL) som binder till mannosstrukturer på glykoproteiner eller glykolipider. Initieringen resulterar i att ett enzymkomplex bildas som kan klyva komplementprotein C3 till C3a och C3b. C3b binder mikroben och bildar ett proteas som klyver C5. C5 klyvs till C5a och C5b. C5b initierar bildandet av ett komplex som även involverar komplementproteinerna C6, C7, C8 och C9. Detta skapar ett membranattackkomplex (MAC) som bildar en kanal i mikrobens plasmamembran, vilket leder till mikroben lyseras. C3a och C5a bidrar till inflammation. (Abbas *et al.* 2007)

Cytokiners roll i immunresponsen mot Leishmania

Immunresponsen mot leishmania beror på vilken genotyp den infekterade individen har. En stark motståndskraft mot leishmania är vanligare hos däggdjur med en stark Th1 respons medan individer som är känsliga för parasiten ofta har en starkare Th2 respons (Awasthi *et al.* 2004). Immunförsvarets celler utsöndrar proteiner som kallas cytokiner. Cytokiner fungerar som signalsubstanser mellan celler och produceras som svar på antigener. Olika cytokiner stimulerar eller inhiberar olika responser i immunförsvaret (Abbas *et al.* 2007). De vanligaste cytokinerna som utsöndras vid en Th1-respons är IL-2, INF- γ och IL-12, medan det i en Th2-respons utsöndras IL-4, IL-5 och IL-10 i högsta koncentration. Dessa cytokiner är de som förknippas mest med Th1- och Th2-responser, men det finns många fler cytokiner än dessa. Troligtvis finns det också många cytokiner som ännu inte upptäckts (Awasthi *et al.* 2004).

IL-12 fyller en viktig funktion i det tidiga ospecifika immunförsvaret och har även en viktig roll i det cellmedierade och anpassningsbara immunförsvaret. Cytokinet aktiverar cytotoxiska mördarceller, stimulerar IFN- γ -produktion i T-celler och mördarceller, och påverkar differentieringen av naiva TH1 i Th1-responsen. (Abbas *et al.* 2007).

Immunsystemets reaktion på leishmania

Immunsystemet innehåller många olika celler som samarbetar för att skapa en effektiv immunrespons mot leishmania. Nedan följer en genomgång över cellernas funktion i elimineringen av leishmania.

Makrofager

Makrofager har förmågan att eliminera fagocyterade leishmaniparasiter. Parasiten tas in i makrofagen genom fagocytos och hamnar i en vesikel som kallas fagosom. I makrofagen finns också lysosomer som innehåller proteolytiska enzymer, olika former av reaktivt syre (reactive oxygen species, ROS) och kväveoxid (NO). ROS är mycket reaktiva oxiderande ämnen som bryter ner parasiten. Fagocytoxidas är ett enzym som reducerar molekylärt syre till ROS. En produkt som då bildas är superoxidradikaler (O_2^-). Fagocytoxidas induceras av $INF-\gamma$ via signaler från den tollliknande receptorn (TLR). Mikrobiska ytkomponenter som tex lipopolysackarider, peptidoglykan från gramnegativa bakterier, lipoproteiner på bakterier och enkelsträngat RNA stimulerar TLR att initiera en kaskad av intracellulära signaler. De intracellulära signalerna genererar cytokiner som aktiverar celler i den ospecifika immunresponsen. iNOS2 är ett enzym som katalyserar bildningen av NO. NO bildas i makrofager och bryter ned fagocyterade molekyler, i detta fall amastigoter. iNOS finns inte tillgängligt i inaktiva makrofager utan aktiveras via TLR (Abbas *et al.* 2007). $INF-\gamma$ har visat sig aktivera makrofager att bilda mer iNOS2. I en $Th2$ -respons utsöndras IL-10 och IL-4 som har en hämmande effekt på $Th1$ -responsen. Hög produktion av IL-10 och IL-4 resulterar därmed i lägre produktion av $INF-\gamma$ och minskar produktionen av iNOS, vilket leder till att mindre mängd NO bildas och amastigoterna därmed får större möjlighet att överleva inuti makrofager (Awasthi *et al.* 2004).

Makrofager är antigenpresenterande celler (APC). De har en costimulatorisk molekyl, CD40 (CD40) som binder CD40-liganden (CD40L) på T-celler. Dessa costimulatoriska molekyler ökar affiniteten i bindningen mellan två celler. APC kan genom interaktionen CD40L-CD40 aktivera T-cellresponsen. Bindningen mellan CD40L och CD40 har visat sig vara viktig för immunresponsen vid infektion av *L. amazonensis*. Genom att infektera möss där genen som kodar för CD40L inaktiverats har forskare funnit att dessa möss har en högre infektionskänslighet. Infektionskänsligheten kunde kopplas samman med nedsatt aktivering av T-celler och makrofager. Låga nivåer av $INF-\gamma$, lymfotoxin-tumörnekrosfaktor (LT-TNF) och NO-produktion gav en sämre inflammatorisk respons. Mössen med inaktiverad CD40L kunde inte heller utveckla en immunrespons efter immunisering. (Favell *et al.* 1996)

Experiment har gjorts av Pearson och Wilson (1987). för att ta reda på mer om mekanismen i makrofagernas fagocytos av leishmania. I ett experiment användes promastigoter från *L. donovani*. Två av makrofagernas receptorer undersöktes, mannosfruktosreceptor (MFR), som känner igen mannosfruktosstrukturer på leishmanias yta, och komplementreceptor typ 3 (CR3) som ingår i komplementsystemet. Receptorerna studerades för att ta reda på deras roller i bindningen och fagocytosen av *L. donovani*. Genom att använda monoklonala antikroppar som binder till dessa receptorer kan nivån av fagocytoshämning mätas, och receptorernas vikt vid bindning och fagocytos kan bestämmas. Resultaten tyder på att båda receptorerna har stor betydelse vid bindning och fagocytos men att de agerar oberoende av varandra (Pearson *et al.* 1987).

I en annan undersökning av Belocevic (1993) användes amastigoter av *L. major* från olika möss för att infektera makrofager. En av mössen var en SCID-mus som saknar förmågan att producera Ig och amastigoterna från denna mus har inte ytbundna Ig. Detta kunde påvisas med hjälp av ett ELISA test. Jämförelser i användandet av Fc-receptorn (FcR), CR3 och MFR tyder på att FcR är den viktigaste receptorn för fagocytos av amastigoter. (Belocevic *et al.* 1993). FcR är en cellytereceptor som binder till en specifik struktur på Ig-molekyler. Denna receptor medierar fagocytos av antigen bundet till antikroppar och antigen-inducerad aktivering av NK-celler (Abbas *et al.* 2007).

Ytmolekyler hos leishmania känns igen av makrofager

Leishmaniaparasiten har molekyler på sin yta som är viktiga för att på ett effektivt sätt kunna infektera makrofager. Vid en infektion av leishmania ser makrofagerna parasitens ytmolekyler som ett antigen, vilket leder till att parasiten blir fagosyterad (Burleigh *et al.* 2008). Inuti makrofagerna processas och degraderas ytmolekylerna i endosomer. Klass II MHC-molekyler produceras av makrofager i ER och transporteras från ER genom Golgi och slutligen i en vesikel till endosomen där de processade ytmolekylerna befinner sig. I endosomen binder ytmolekylen till klass II MHC-molekylen och förs i vesiklar till makrofagens yta där ytmolekylen fästs och kan signalera till THC vilken typ av antigen som ska bekämpas. (Abbas *et al.* 2007). Hur beroende parasiten är av ytmolekyler för att kunna infektera makrofager varierar mellan olika arter av leishmania.

Lipofosfoglykan (LPG) är en av de vanligaste ytmolekylerna hos leishmaniaparasiter, som kan ha upp till fem miljoner LPG-molekyler på cellytan. Antalet LPG-molekyler är högre hos promastigoter än hos amastigoterna. Forskare har studerat LPG-mutanter hos olika arter av leishmania för att se om LPG påverkar virulensen hos parasiten. Resultaten visade att *L. mexicana* kan infektera makrofager i frånvaro av LPG, medan *L. donovani* och *L. major* inte överlever utan LPG. LPG är alltså inte ett universellt måste för att leishmania ska uppnå virulens, men vissa arter klarar sig inte utan denna ytmolekyl (Burleigh *et al.* 2008).

gp63 är ytterligare en ytmolekyl som tros ha en viktig funktion i många virulensmekanismer hos leishmania. gp63 kan ha olika funktion vid bindning av komplementsystemet hos möss infekterade med *L. amazonensis*. När celler från det mänskliga komplementsystemet används visar det sig att gp63 ökar aktiveringen av komplementsystemet. De aktiverade komplementkomponenterna binder till komplementreceptorn CR1 (Burleigh *et al.* 2008), som finns på flera av immunförsvarets celler och binder komplementproteinet C3. Bindning av C3 till CR1 kan resultera i fagocytos och bindning av cirkulerande immunkomplex, och bidra i klyvningen av C3 (Abbas *et al.* 2007). När kinesiska dvärghamstrar användes istället för möss gavs ett annat resultat. gp63 visade sig minska bindning av komplementsystemets komponenter (C5 och C7) till leishmania och gav också resistens mot lysering orsakad av komplementsystemet (Brittingham *et al.* 1995).

Låga nivåer av gp63 reducerar leishmanias förmåga att infektera celler. Anledningen till de helt olika resultaten kan vara att studierna gjordes på två olika djurarter som kan ha skilda mekanismer. Detta är ofta ett problem inom forskningen eftersom sådana studier inte får utföras på människor. Ytterligare två ytmolekyler som studerats mycket är leishmaniahomologen till receptorer för aktiverat C-kinas (LACK), och cysteinproteas (CpG) som tros ha en betydande roll vid infektion av leishmania (Burleigh *et al.* 2008).

Saliv från sandmyggan påverkar makrofagerna

Möss som injicerats med leishmania tillsammans med saliv från sandmyggan visar en dramastisk ökning av antalet parasiter i makrofagerna i förhållande till möss som injicerats med enbart leishmania. För att förklara fenomenet har saliv från sandmyggan *Phlebotomus papatasi* använts för att undersöka om den påverkar makrofagerna vid infektion av *L. major*. Både amastigoter och promastigoter användes. Makrofager som utsattes för aktiverande signaler, tex INF- γ , påbörjade nedbrytningen av fagocyterade parasiter. Genom in vitro-experiment har Hall och Titus (1995) kunnat påvisas att saliv från sandmyggan hämmar INF- γ . En hämning av INF- γ och därmed parasitdödandet observerades tillsammans med en lägre nivå av kväveoxidproduktion. Detta tyder på att

sandmyggans saliv genom att inhibera INF- γ kan reducera halten av kväveoxid och därmed öka chansen för att leishmania överlever inuti makrofagen. Experimenten som gjordes visade även att saliven inte påverkar makrofagernas förmåga att fagocytera leishmania (Hall *et al.* 1995).

Dendritiska celler

Dendritiska celler (DC) återfinns i huden och fungerar som APC. DC presenterar antigenet för makrofager, T- och B-lymfocyter. Aktiverade DC utsöndrar till största delen IL-12 och INF- γ , som i sin tur kan aktivera makrofagers fagocytos. IL-10 har en hämmande effekt på DC och även på makrofager genom att påverka kostimulatorer och klass II MHC-molekyler. Hämningen av DC resulterar i minskad utsöndring av IL-12 och INF- γ (Abbas *et al.* 2007). DC har föreslagits ha en roll i initieringen av T-cellresponsen vid leishmaniainfektion. När leishmaniapromastigoter och DC inkuberas tillsammans producerar DC tidigt IL-12 som är ett viktigt cytokin vid differentieringen av TH1 i Th1-responsen (Ahuja *et al.* 2000).

Neutrofiler

Vid infektion med promastigoter från *L. major* rekryteras neutrofiler inom några timmar. *L. major* producerar faktorer som är kemotaxiska för mänskliga neutrofiler, vilket leder till att neutrofilerna fagocyterar *L. major* (Hansen *et al.* 2001). Både opsonisering och icke opsonisering förekommer. Opsoniseringen aktiverar neutrofilen att döda parasiten medan frånvaro av opsonisering leder till att leishmania kan överleva inuti neutrofiler upp till några dagar utan att elimineras. Detta talar för att parasiten har möjlighet att fortplanta sig även i neutrofiler (Fleischer *et al.* 2002).

Mördarceller

Mördarceller har granula som innehåller proteiner och inflammatoriska cytokiner, vilka vid exocytos medverkar till att döda infekterade och stressade celler. Till skillnad från CTC behöver mördarcellerna inte aktiveras för att döda målceller. Detta gör att mördarcellerna har en stor betydelse i början av en infektion då de CTC inte hunnit bli aktiva. Mördarcellerna blir rekryterade inom 24 timmar (Hansen *et al.* 2001). Vid exocytos utsöndrar mördarceller stora mängder INF- γ som aktiverar makrofager att fagocytera (Abbas *et al.* 2007). Mördarceller är mycket aktiva i det tidiga ospecifika immunförsvaret och verkar ha en stor betydelse för skyddet mot leishmania. Tidig produktion av IL-12 ökar mördarcellers förmåga att producera INF- γ . Det har tidigare nämnts att INF- γ är viktig för elimineringen av leishmania. Detta gör att IL-12 skulle kunna ses som en adjuvant i vaccin mot leishmania. Levande parasiter ger en starkare respons vad gäller produktion av INF- γ och proliferering av immunförsvarets celler. Det har även påvisats att levande leishmaniapromastigoter av direkt kan aktivera mördarceller att producera INF- γ , medan döda promastigoter huvudsakligen aktiverar TH1. Levande promastigoter är i dag det mest effektiva vaccinet mot KL, men vaccinet har ingen bestående effekt (Akuffo *et al.* 2002).

Mastceller

Mastceller finns i vävnader nära blodkärl och nerver, under epitelcellerna och i lymforganen. Mastceller har Fc-receptorer (FcR) på sin yta som binder till IgE som i sin tur är bundna till ett antigen. Bindningen av IgE triggar utsöndring av bland annat granula, prostaglandin och cytokiner, vilka bidrar till inflammation. Granula innehåller olika aminer och enzymer som tillsammans medverkar till elimineringen av parasiten. Förutom IgE så aktiveras mastceller också av IL-4 som utsöndras av Th2 celler (Abbas *et al.* 2007).

Eosinofiler

Eosinofiler binder immunoglobulinerna IgG och IgA bundna till antigen. Bindning av IgG och IgA aktiverar eosinofilerna att utsöndra ämnen som det dominerande basiska proteinet (major basic protein), negativt laddade proteiner som dödar parasiter och enzymer som peroxidaser vilka bidrar med vävnadsskador. De cytokiner som utsöndras bidrar till aktivering och produktion av fler eosinofiler samt cytokiner som inducerar inflammatoriska responser. De inflammatoriska responserna som induceras av eosinofiler vet vi lite om idag (Abbas *et al.* 2007).

T-celler

Olika studier som utförts tyder på att en leishmaniainfektion leder till en ökad produktion av THC (Choi *et al.* 2009). T-cellerna har visat sig vara mycket viktiga i immunresponserna genom att de producerar höga nivåer av INF- γ som medverkar i Th1-responserna. THC från leishmanieresistent möss som överförs till leishmaniamottagliga möss ger de infektiösa mösserna ett skydd mot parasiten. Detta är ett bevis för att THC har en stor betydelse för elimineringen av leishmania (Cheever *et al.* 1989). En individ med en stark Th1-respons har en bättre motståndskraft mot leishmania än en individ med en starkare Th2-respons (Singh *et al.* 2006).

Utvecklingen av CTC är beroende av IL-12 (Mescher *et al.* 2002). Leishmanieresistent möss har tre gånger mer CTC än leishmaniamottagliga möss, vilket tyder på att även CTC har en viktig roll i elimineringen av leishmania (Cerottini *et al.* 1987). Leishmania har visat sig ge upphov till utveckling av regulatoriska T-celler som dämpar immunresponserna (Abbas *et al.* 2007).

Leishmania hos HIV-smittade människor

Produktion av IL-12 resulterar i ökad cytotoxisk aktivitet hos NK-celler och CTC, produktion av INF- γ , samt differentiering av celler i Th1-responserna som ett resultat av antigen-exponering (Abbas *et al.* 2007). HIV-smittade patienter har problem att producera IL-12 vid infektion av leishmania. Dessa patienter har därför ett mycket svagt immunförsvar mot leishmaniaparasiten. Tillfört exogen IL-12 kan förbättra immunresponserna dramatiskt. Den största orsaken till att IL-12 är så viktig tros vara att kemokinet stimulerar THC, CTC och mördarceller att producera INF- γ , som i sin tur stimulerar Th1-responserna (Frank *et al.* 1995).

Diagnos

Det finns olika diagnosmetoder för leishmania. Den vanligaste metoden är mikroskopering, som används i fattiga länder (Berman *et al.* 2005). Cellodling, PCR och metoder som detekterar antikroppsproduktionen (immunblott och ELISA) är effektivare och används när resurser finns (Alvar *et al.* 2007). Ett annat test som upptäcker förekomsten av antikroppar mot leishmania i urin är direkt agglutinationstest (DAT). Denna metod används ofta med goda resultat för att diagnostisera IL (WHO 2009).

Vaccin

Mekanismerna bakom leishmaniainfektioner är viktiga att studera för att kunna hitta målmolekyler för vaccin. I dag finns det inget vaccin mot leishmania. Kemoterapi och vektorkontroll är de medel som finns tillgängliga för att bota sjukdomen och minska spridningen. Vaccinforskningen är under utveckling. Genetiskt modifierade levande men försvagade parasiter studeras för att kunna utveckla vacciner. Även rekombinanta antigen och DNA som kodar för antigen är målmolekyler som forskare hoppas kunna använda i utvecklingen av vaccin (Handman *et al.* 2001).

Vaccinering med plasmider innehållande DNA som kodar för ett specifikt antigen (cysteinproteinase) från leishmaniaparasiten är effektivare än vaccinering med proteinet tillsammans med IL-12. Injicering av proteinet bör resultera i produktion av INF- γ medan IL-12 används eftersom detta cytokin ger en stark immunrespons i frånvaro av INF- γ . Det finns starka stöd för att vaccinering med DNA som kodar för två olika cysteinproteinaser ger en starkare Th1-respons än vaccinering med DNA som bara kodar för ett antigen (Fasel *et al.* 2001).

Vanliga läkemedel mot leishmania och läkemedelsresistens

Antimon

Det vanligaste läkemedlet mot leishmania är antimon. Antimon är också det läkemedel som ger minst biverkningar. Det finns olika former av läkemedlet—de två vanligaste är natriumstiboglukonat (100 mg antimon/ml) och megluminantimon (85 mg antimon/ml). Den rekommenderade injektionen är 20 mg antimon/kg kroppsvikt en gång om dagen i 30 dagar (Marty *et al.* 2003). Tidigare var mekanismen bakom läkemedlet okänt, men en ny rapport från 2009 avslöjar en möjlig mekanism—TR berör trypanotionreduktas (TR). TR ingår i ett redoxmetabolismssystem som är unikt för leishmania och essentiellt för parasitens överlevnad och virulens. Eftersom TR inte finns i mänskliga celler är detta en lämplig målmolekyl. Mekanismen bakom antimoneffektiviteten är att TR hämmas av läkemedlet (Baiocco *et al.* 2009).

Resistensen mot antimon är utbredd i vissa områden (Hughes *et al.* 1992). En möjlig mekanism bakom resistensen är att parasiten undgår de toxiska effekterna av läkemedlet genom ökat utflöde av antimodium genom transportproteiner i cellmembranet. Även strukturförändringar på cellytan tros ha påträffats hos antimonresistenta populationer (Singh *et al.* 2006).

Patienter med KL som inte svarat på behandling av läkemedlet megluminantimon har i en studie behandlats med en kombination av megluminantimon och imiquimod. Imiquimod är ett läkemedel som påverkar DC och makrofager via TLR-7. Läkemedlet inducerar också proinflammatoriska cytokiner. En kombination av dessa läkemedel botade 90 % av patienterna som ingick i studien (Alvarez *et al.* 2001).

Amphotericin B

Det läkemedel som oftast används vid antimonresistens är amphotericin B. Amphotericin B är ett antibiotikum som produceras av *Streptomyces nodosus* och som binder steroler på leishmanias cellmembran. Bindningen resulterar i läckage av intracellulära ämnen, vilket

leder till att parasiten dör (Hughes *et al.* 1992). Bieffekter av läkemedlet kan vara njurproblem, feber, frossa, lågt blodtryck, dålig aptit, huvudvärk, problem med andningen, allergiska reaktioner, muskelkramp och smärta vid injektionsområdet, trötthet, onormala blödningar eller bristningar och hörselproblem (Department of Health and Human Service. 2008).

Milefosine

Ett vanligt förekommande läkemedel är Milefosine som intas oralt. Resultatet av behandling har visat på goda resultat, men mag- och tarmproblem har uppstått som en bieffekt (Bachmann *et al.* 1999). I Indien 50 % av alla människor smittade av IL. År 2002 introducerades läkemedlet i Indien och upp till 98 % av de smittade människorna blev friska. Läkemedlet används ofta för att behandla antimonresistenta bakterier (WHO 2009).

Övriga läkemedel

Pentamidin är ytterligare ett läkemedel som kan användas vid behandling av leishmania. Läkemedlet är mycket toxiskt och används endast om resistens uppstått mot andra mindre toxiska läkemedel. Mekanismen bakom pentamidin är att topoisomeras I hämmas (Coombs *et al.* 2006).

Trifluralin är ett bekämpningsmedel mot ogräs och insekter som visat sig eliminera leishmaniaparasiter men inte påverka cellerna hos möss eller människor (Chan *et al.* 1990).

HAART är en behandlingsstrategi mot HIV som givit goda resultat vid behandling av patienter drabbade av både HIV och leishmania. Mekanismen bakom verkan mot leishmania är ännu inte känd (de la Rosa *et al.* 2002).

Natriumarsenit är ett läkemedel som binder tubulin (Dormán *et al.* 1995) men resistensen mot läkemedlet är utbredd (WHO 2009).

Värmeterapi tillsammans med läkemedel kan påskynda tillfrisknandet av KL smittade patienter (Bismullah *et al.* 2005).

Läkemedelsresistens

Läkemedelsresistens kan uppstå snabbt. I Indien är 60 % av de leishmaniasmittade patienterna drabbade av parasiter som är resistenta mot de effektiva läkemedlen med minst biverkningar. Dessa människor tvingas använda alternativa läkemedel som är mer toxiska. Alternativa läkemedel vid resistens har visat sig kunna vara dödliga (WHO 2009).

Resistens mot läkemedel kan uppstå genom spontan mutation eller genom förändringar i genuttryck. När leishmaniaparasiten utsätts för läkemedel selekteras de resistenta parasiterna som då ökar i antal. Läkemedelsresistenta parasiter kan genom olika mekanismer kringgå läkemedlets verkan. Dessa mekanismer kan t.ex. vara att ett läkemedel omvandlas till en inaktiv form av ett enzym, cellpermeabilitet för läkemedlet ökar eller minskar, läkemedlet hittar en alternativ väg för att undvika en inhiberande reaktion, produktionen ökar av läkemedelskänsliga enzymer, ökad mängd enzymer som kan konkurrera med läkemedlet, läkemedlets aktivering minskar, eller att en förändring sker i läkemedlets mål molekyler (Singh *et al.* 2006).

Resistens mot arsenit

Arsenit har använts som läkemedel under lång tid för att behandla leishmania. Detta har resulterat i att resistens med okänd mekanism har uppstått mot detta läkemedel (WHO 2009). Det har dokumenterats att arsenitresistent *L. tarentolae* ackumulerar mindre arsenit i cellen än vildtypen, men mängden arsenit i plasmamembranet var densamma hos resistent parasiter och vildtypen. Mekanismen bakom detta fenomen är okänt. En möjlig mekanism skulle kunna vara en ”membranpump” som pumpar ut arsenit från cellen till plasmamembranet (Grondin *et al.* 1997).

Ytterligare en möjlig mekanism bakom resistens mot olika tungmetaller kan vara genen som kodar för P-glykoprotein. När läkemedelsresistens uppstått finns i flera kopior av genen. P-glykoprotein är en ATP-beroende utflödespump som är involverad i multiresistens mot olika läkemedel. Dessa resistent parasiter skulle kunna ha en mekanism som aktivt pumpar ut tungmetaller från cellen (Beverly *et al.* 1991.). Genom att använda mänskliga anti-P-glykoprotein antikroppar i en immunblott har överuttryck av P-glykoproteiner visats ge arsenitresistens. Läkemedlet Verapamil nedreglerar överuttrycket av P-glykoproteiner hos *L. donovani*. Detta är än så länge bara en studie gjord på möss och verapamil används inte i dag vid behandling av leishmania (Dey *et al.* 2000.). Verapamil är ett läkemedel som används mot högt blodtryck, för att förebygga kärlkramp och vid oregelbunden hjärtrytm. Läkemedlet verkar som en kalciumflödeshämmare som vidgar blodkärlen (Jonson 2009).

Nya läkemedel och vaccin

Under de senaste tio åren har spridningen av leishmania ökat och det har aldrig funnits så många rapporterade fall av leishmania som det gör idag. De flesta läkemedel som finns i dag för behandling ges med injektion. Att ge läkemedel i denna form kräver stora resurser eftersom patienterna behöver övervakning på sjukhus i 15 till 30 dagar då behandlingen pågår. Om nya läkemedel som ges oralt utan allvarliga biverkningar kunde utvecklas skulle kostnaderna kunna minska (WHO. 2009).

Ytmolekyler

Det finns en rad vanliga glykokonjugater (ytmolekyler) hos leishmania som är viktiga för parasitens överlevnad och virulens. Dessa glykokonjugater kan vara potentiella mål för läkemedel. Två av dessa är LPG och gp63. Glykokonjugerande proteiner och fetter binder till värdcellen, vilket kan användas för att konstruera molekyler som förhindrar denna bindning (Bandyopadhyay *et al.* 2008).

Ytmolekyler används för utveckling av vaccin

Immunisering med ytmolekylen LACK har en skyddar vid senare infektion av *L. major*. Immunresponserna var desamma vid immunisering med cDNA som kodar för LACK och med rekombinant LACK-protein tillsammans med IL-12. Båda immuniseringarna skyddar mot *L. major* i upp till 20 veckor. Enbart injicering av rekombinant LACK-protein gav en betydligt mindre effekt på immunresponserna. Detta visar att IL-12 skulle kunna fungera som en adjuvant tillsammans med ett vaccin och på så vis bidra till en högre effektivitet av läkemedlet. När CTC togs bort vid immuniseringstillfället försvann immunresponserna som inducerats med cDNA som kodar för LACK. Detta kan tyda på att CTC har en viktig roll i immunresponserna (Brown *et al.* 1997).

Mikrotubulin

Mikrotubuli är ihåliga ”rör” som finns i alla eukaryoters cytoplasma och är uppbyggda av proteinet tubulin. Tubulin är uppbyggt av olika subenheter, α - β - och γ -tubulin (Abbas *et al.* 2007). Det finns tre olika typer av mikrotubuli hos leishmaniaparasiten, vilka kan skiljas åt då de har olika aminosyrasekvenser. Mikrotubuli finns i flageller och i mitosapparaten. Dessa är potentiella molekyllära mål för olika mediciner. Tre olika läkemedel (maytansin, taxol och elektrofil) har visats påverka mikrotubuli i så stor grad att amastigotstadiet inte kunnat utvecklas (Brendle *et al.* 1999).

Arsenitresistent *L. donovani* har visat sig ha ett högre uttryck av γ -tubulin i amastigotstadiet än i vildtypen, men paclitaxel har inte någon effekt på γ -tubulin. Däremot sågs en signifikant högre skillnad i uttrycket av β -tubulin hos arsenitresistent promastigoter än i vildtypen. β -tubulin ökade hos resistent promastigoter som utsattes för paclitaxel. Detta tyder på att β -tubulin och paclitaxelresponsen påverkas av arsenitresistens (Dey *et al.* 2002). DNA-analyser av vildtyp och arsenitresistent *L. donovani* som behandlats med paclitaxel har avslöjat att båda typerna av parasiter genomgått ett apoptosliknande tillstånd. Mekanismen bakom detta är okänd, men resultatet ger värdefull information för ytterligare studier som kan användas vid utvecklingen av läkemedel baserade på mikrotubuli (Dey *et al.* 2005.).

Paclitaxel är ett läkemedel som binder till tubulin och hämmar därmed celldelningen. Effekten av paclitaxel på arsenitresistent *L. donovani* har ännu inte blivit definierad. Alternativ morfologi, polymeriseringen av tubulin, posttranslationala modifieringar och cellulär fördelning av tubulin skulle vara möjliga mål för paclitaxel hos arsenitresistent parasiter (Dey *et al.* 2005).

För att utveckla ett effektivt läkemedel med små bieffekter som kan eliminera trifluralinresistent parasiter kombinerades paclitaxel och läkemedlet trifluralin. I detta kombinerande läkemedel utnyttjas paclitaxel för att utveckla en hypersensitivitet hos de resistent parasiterna, varefter trifluralin dödar vildtypsparasiterna som inte är resistent mot trifluralin. Fördelen med det kombinerade läkemedlet är att paclitaxel är mycket toxisk för människan och en kombination med ett annat läkemedel skulle kunna reducera dosen, men ändå hämma de resistent parasiterna. Resultatet blev att ca 55 % av parasiterna eliminerades. Vidare studier krävs för att kunna använda denna kombination av läkemedel (Dormán *et al.* 1995).

DNA topoisomeras

DNA-topoisomeras medverkar i replikationsgaffeln. Det är därför viktigt att förstå komponenterna och de olika stegen som är involverade i denna process för att kunna hitta nya målmolekyler för läkemedel. I DNA tvinnas DNA-trådarna runt varandra och vid replikation då de två trådarna dras isär skapas stress. Topoisomeras befinner sig framför replikationsgaffeln för att minska denna stress. Topoisomeras I klipper en DNA tråd medan topoisomeras II klipper två DNA trådar (Snyder *et al.* 2007).

Novobiocin är ett vanligt antibiotikum som produceras av *Streptomyces niveus*. Detta antibiotikum binder till topoisomeras och blockerar adenosintrifosfatas (ATPas)-aktiviteten och hämmar därmed topoisomeraset (Knox *et al.* 2008).

I arsenitresistenta *L. donovani* har topoisomeras II varit överuttryckt och visat en ökad aktivitet i jämförelse med vildtypen. Detta skulle kunna betyda att DNA topoisomeras II har en roll i resistensen mot arsenit (Dey *et al.* 1995)

Novobiocin har visat sig kunna dämpa uttrycket av topoisomeras II i arsenitresistenta parasiter. Samma antibiotikum har också observerats inducera programmerad celldöd hos både vildtyp- och resistent *L. donovani* (Dey *et al.* 1995). Det finns flera läkemedel i dag som hämmar topoisomeras och dessa inhibitorer används ofta i behandling av cancer (Escargueil *et al.* 2003).

Metaboliska vägar

Mycket forskning läggs ner på att hitta läkemedel riktade mot leishmaniaparasitens metaboliska vägar. Metabolismen skiljer sig på många sätt mellan leishmania och människan. Ett exempel på detta är att leishmania saknar den metaboliska vägen som resulterar i att purin bildas. Parasiten är därför beroende av det purin som värdjuret producerar. Den metaboliska vägen till purin har väckt stort intresse inom läkemedelsforskningen. De mekanismer som idag är mest intressanta är purintransporten, hur den fungerar och hur dess struktur ser ut (Hemanta *et al.* 2008).

Parasiters mitokondrier har många okända funktioner och involverade molekyler som ännu inte är kända. I olika studier har man undersökt olika proteiner involverade i mitokondrie funktionen för att hitta nya målmoekyler för läkemedel. Ett protein som verkar vara essentiellt för leishmania är mitokondriprotein X (MIX). Detta protein uttrycks under hela livscykeln och finns troligen i innermembranet på mitokondrier. Vid eliminering av en allel för detta protein förändrades cellmorfologin och mitokondriernas segregering, och virulensen försvann. Om båda allelerna elimineras dör parasiten. Vidare studier av MIX skulle kunna vara en ny målmolekyl för läkemedel (Barson *et al.* 2006).

Diskussion

Det är viktigt att människor boende i regioner där smittspridningen av leishmania är hög får information om hur de kan skydda sig mot sjukdomen. Många människor har ingen kunskap om hur leishmania sprids och hur viktigt det är att skydda sig mot sandmyggan. Enkla åtgärder som myggnät, insektsmedel och anpassningar i jordbruket kan göra stor skillnad.

Det är intressant att individer med en stark Th1-respons har ett bättre motstånd mot leishmania är individer med en stark Th2-respons (Singh *et al.* 2006). Det betyder att våra gener avgör vår mottaglighet för att smittas och stå emot infektion med leishmania. Denna kunskap kan användas i utvecklingen av nya läkemedel och vacciner. Största delen av dagens forskning är inriktad på att finna ny kunskap om leishmaniaparasitens fysiologiska förutsättningar, som skiljer sig från människans, vilket kan användas för att utveckla nya läkemedel och vacciner. Anledningen till detta är att dödlig respons ska skapas hos leishmania samtidigt som människan inte påverkas negativt. För att alla människor i världen ska kunna ha tillgång till de nya läkemedlen och vacciner som utvecklas är det viktigt att priset tas i beaktande. Många människor som är smittade av leishmania har i dag ingen möjlighet att köpa läkemedel pga sin ekonomi. Det är viktigt att forskningen kring nya läkemedel och vacciner fortsätter eftersom fler och fler populationer av leishmania utvecklar resistens mot de läkemedel som används idag. De människor som drabbas av dessa resistenta parasiter måste behandlas med alternativa läkemedel som ofta har allvarliga biverkningar. Ytterligare en orsak till att nya läkemedel och vaccin behöver utvecklas är att spridningen av leishmania skulle kunna minskas och självklart också det mänskliga lidandet. Många forskningsresultat visar att kombinationer av läkemedel oftast ger bättre effekt än behandling med endast ett läkemedel. Dessa studier bereder en grund för utveckling av mer effektiva läkemedel. Läkemedelskombinationer är i många fall också ett sätt att minska uppkomsten av läkemedelsresistens. Vid läkemedels- och vaccinstudier används ofta försöksdjur. I dessa studier används djurmodeller som så långt det är möjligt har ett immunförsvar som liknar människans. Det är viktigt att immunförsvaren överensstämmer någorlunda för att resultaten ska bli så relevanta som möjligt. Det är dock viktigt att påpeka att denna form av studier kan ge ett annat resultat hos människan än hos djurmodellen.

Epidemiska regioner och antalet smittade människor har ökat under de senaste tio åren. Detta har gjort att fler länder börjat uppmärksammat sjukdomen och många länder som drabbats hårt ekonomiskt har blivit tvungna att ta tag i problemet med leishmania och lägga ner mer resurser för att sätta stopp för sjukdomen (WHO 2009). Om forskarna lyckas utveckla bra läkemedel och vaccin ser framtiden ljus ut, men om inga upptäckter görs på området kan konsekvenserna bli att leishmania fortsätter spridas. Spridningen kan med den globala uppvärmningen även innefatta nordligare länder (Ebi *et al.* 2006).

Tack

Jag vill tacka min handledare Karin Carlsson och mina medstudenter Groom Alemayehu, Bejan Aresh, Elin Carlsson, Jonas Jilmefors för värdefulla kommentarer.

Referenser

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pillai, S. 2007. Cellular and molecular immunology. 6:e upplagan s:25, 36-43, 114, 123-127, 267, 281-282, 287, 338, 368, 370, 446-448, 453, 497, 515. Elsevier Inc. Kina.
- Ahuja, S.K., Ahuja, S.S., Melby, P.C., Pate, L., Quinones, M. & Reddick, R.L. 2000. Performed Membrane-associated Stores of Interleukin (IL)-12 Are a Previously Unrecognized Source of Bioactive IL-12 That is Mobilized within Minutes of Contact with an Intracellular Parasite. *J.Exp. Med.* 192:507-515.
- Akuffo, H., Alexis, A., Edsmo, L., Maasho, K., Nylén, S., Saed, A. 1999. Natural killer cells in cross-regulation by IL-10 in Leishmania antigen-stimulated blood donor cells. *Clin Exp Immunol* 117:529-534.
- Akuffo, H., Ilg, T., Maasho, k., Nulén, S. & Söderström, K. 2002. Live Leishmania promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma. *Clin Exp Immunol* 131:457-467.
- Alvarez, E., Arevalo, I., Llanos-Cuentas, A., Matlashewski, G., Meng, T., Miller, R., Najar, E. & Ward, B. 2001. Successful Treatment of Drug-Resistant Cutaneous Leishmaniasis in Human by Use of Imiquimod, an Immunomodulator. *Clin Inf Diseases* 33:1847-1851.
- Alvar, J., Boelaert, M., Chappuis, F., Ghalib, H., Hailu, A., Peeling, R.W., Rijal, S. & Sundar, S. 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control. *Nat Pub Gr* 5:873-881.
- Arendt, C.S., Boitz, J.M., Carter, N.S. & Ullman, B. 2008. Purine and Pyrimidine Metabolism in Leishmania. *Adv Exp Med Biol.* 625:141-154.
- Awasthi, A, Mathur, R.K. & Saha, B. 2004. Immune response to Leishmania infection. *Indian J Med Res* 119:238-258.
- Bachmann, P., Berman, J., Fischer, C., Karbwang, J., Jha, T.K., Sundar, Thakur, C.P., & Voss, A. 1999. Miltefosine, an Oral Agent, for the Treatment of Indian Visceral Leishmaniasis. *England J Med.* 341:1795-1800.
- Baiocco, P., Colotti, G., Franceschini, S. & Ilari, A. 2009. Molecular Basis of Antimony Treatment in Leishmaniasis. *J. Med. Chem.* 52:2603-2612.
- Bandyopadhyay, S.M. & Mandal, C. 2008. Targeting Glycoproteins or Glycolipids and Their Metabolic Pathways for Antiparasite Therapy. *Adv Exp Med and Biol* 625:87-102.
- Barson, M., Curtis, J., Handman, E., Likic, V.A., Lithgow, T., Leuder, F.B., McFadden, G.I., Perugini, M.A., Spurck, T. & Uboldi, A.D. 2006. A mitochondrial protein affects cell morphology, mitochondrial segregation and virulence in leishmania. *Int J Parasit* 36:1499-1514.
- Belosevic, M. & Guy, R.A. 1993. Comparison of receptors required for entry of leishmania major amastigotes into macrophages. *Inf Immun* 6:1553-1558.
- Berman, J.D., Davies, C., Murray, H.W. & Saravia. 2005. Advances in leishmania. *Lancet* 366:1561-1577.
- Beverly, S.M. & Callahan, H.L. 1991. Heavy Metal Resistance: A New Role for P-glycoproteins I Leishmania. *J Biol Chem* 266:18427-18430.
- Beverly, S.M. & Turco, S.J. 1998. Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite Leishmania. *Trends in microbiology* 6: 35-40.
- Bismullah, M., David, J.R., Davies, R., Kolaczinski, J., Mohsen, M., Reithinger, R. & Wahid, M. 2005. Efficacy of Thermotherapy to treat Cutaneous leishmaniasis Caused by Leishmania tropica in Kabul, Afghanistan: A Randomized, Controlled Trial. *Cli Inf Diseases* 40:1148-1155.
- Bora, D. 1999. Epidemiology of visceral leishmaniasis in India. *Natl Med J India* 12: 62-68.

- Brendle, J.J., Sackett, D.L. & Werbovetz, K.A. 1999. Purification, characterization, and drug susceptibility of tubulin from *Leishmania*. *Mol and Biochem Parasitology* 98:53-65.
- Brittingham, A. Chang, K. McGwire, B.S., McMaster, W.R., Morrison, C.J. & Mosser, D.M. 1995. Role of *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion and resistance to complement-mediated lysis. *Journal of Immunol* 155:3102-3111.
- Brown, D.R., Charest, H., Glaichenhaus, N., Gurunathan, S., Reiner, S.L., Sacks, D.L. & Seder, R.A. 1997. Vaccination with DNA Encoding the Immunodominant LACK Parasite Antigen Protective Immunity to Mice Infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* 186:1137-1147.
- Burleigh, B.A. & Soldati-Favre D. 2008. *Molecular Mechanisms of Parasite Invasion*. 1:a upplagan s.174-181. Springer. New York.
- Cerottini, J., Louis, J., Marchal, G., Milon, G., Titus, R. & Vassalli, P. 1987. Involvement of specific Lyt-2+ T cells in the immunological control of experimentally induced murine cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol* 17:1429-1433.
- Chan, M.M. & Fong, D. 1990. Inhibition of leishmanias but not host macrophages by the antitubulin herbicide trifluralin. *Science* 249:924-926.
- Chang, K.P., Dtke, S. & Katakura, K. 1989. DNA Amplification in Arsenite-Resistant *Leishmania*. *Exp Cell Res* 180:161-170.
- Cheever, A.W., Coffman, R.L., Pearce, E., Scott, P. & Sher, A. 1989. Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunol Rev* 112:161-182.
- Cheng, J., Melby, P.C., Perez, L., Yang, J. & Zhao, W. 2001. *Leishmania donovani* p36 (LACK) DNA Vaccine Is Highly Immunogenic but Not protective against Experimental Visceral Leishmaniasis. *Infect and Immun.* 69:1419-1425.
- Choi, B.S. & Kropf, P. 2009. Evaluation of T cell responses in healing and nonhealing leishmaniasis reveals differences in T helper cell polarization ex vivo and in vitro. *Parasite Immunol* 31:199-209.
- Coombs, G.H., Goyeneche, D., Jean-Moreno, V., Rojas, R. & Walker J. 2006. *Leishmania donovani*: Differential activities of classical topoisomerase inhibitors and antileishmanials against parasite and host cells at the level of DNA topoisomerase I and in cytotoxicity assays. *Exp Parasitology* 112:21-30.
- Cross, E.R. & Hyams, K.C. 1996. The potential effect of global warming on the geographic and seasonal distribution of *Phlebotomus papatasi* in Southwest Asia. *Environmental Health Perspectives* 104:724-727.
- de Carvalho, O.M.V., de la Gl'oria Orge Orge, M., de Oliveira Mac'edo, V., Paes, G.M.G. & Romero, G.A.S. 2005. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. *Acta Trop* 93:49-56.
- de la Rosa, R., Delgado, J., Leal, M., Lissen, E., Macías, J., Mira, J.A., Morillas, F., Pineda, J.A. & Sánchez-Quijano, A. 2002. Incidence of and Risk Factors for Symptomatic Visceral Leishmaniasis among Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patients from Spain in the Era of Highly Active Antiretroviral Therapy. *J Clin Microbiol.* 40:762-767.
- Department of Health and Human Service. 2008. Amphotericin B. 2008-03-20. http://aidsinfo.nih.gov/DrugsNew/DrugDetailT.aspx?MenuItem=Drugs&int_id=6&Search=Off&ClassID=0&TypeID=0. Hämtad 2009-04-23.
- Desjeux, P. 1996. Leishmaniasis : Public health aspects and control. *Clin in Derm* 14:417-423.
- Dey, C.S. & Jayanarayan, K.G. 2005. Altered tubulin dynamics, localization and post-translational modifications in sodium arsenite resistant *Leishmania donovani* in response to

- paclitaxel, trifluralin and a combination of both and induction of apoptosis-like cell death. *Parasitology* 131:215-230.
- Dey, C.S. & Jayanarayan, K.G. 2002. Resistance to arsenite modulated expression of β - and γ -tubulin and sensitivity to paclitaxel during differentiation of *Leishmania donovani*. *Parasitol Res* 88:754-759.
- Dey, C.S., Jayanarayan, K.G. & Singh, G. 1995. Novobiocin induces apoptosis-like cell death in topoisomerase II over-expressing arsenite resistant *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 141:57-69.
- Dey, C.S. & Kaur, J. 2000. Putative P-Glykoprotein Expression in Arsenite-Resistant *Leishmania donovani* Down-Regulated by Verapamil. *Biochem and Biophys Res Communic* 271:615-619.
- Dormán, G., Duclos, O., Ojima, I., Prestwich, G.D. & Simonot, B. 1995. A new Paclitaxel Photoaffinity Analog with a 3-(4-Benzoylphenyl)propanoyl Probe for Characterization of Drug-Binding Sites on Tubulin and P-Glycoprotein. *J Med Chem* 38:3891-3894.
- Ebi, K.L. & Menne, B. 2006. Climate change and adaptation strategies for human health. 1:a upplagan s.141-144. Springer. Darmstadt.
- Escargueil, A.E., Larsen, A.K. & Skladanowski, A. 2003. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics* 99:167-181.
- Fasel, N., Rafati, S., Salmanian, Taheri, T. & Vafa, M. 2001. A protective cocktail vaccine against murine cutaneous leishmaniasis with DNA encoding cysteine proteinases of *leishmania major*. *Vaccine J.* 19:3369-3375.
- Favell, R.A., Grewal, I.S., Kima, P., Longley, B.J., McMahon-Pratt, D., Ruddle, N.H., Soong, L., Sun, J. & Xu, J.C. 1996. Disruption of CD40-CD40 ligand interactions results in an enhanced susceptibility to *leishmania amazonensis* infection. *Immunity* 4:263-273.
- Fleischer, J., Reiling, N., Jahnke, N., Jensenius, J.C., Laskay, T., Laufs, H., Müller, K. & Solbach, W. 2002. Intracellular Survival of *Leishmania major* in Neutrophil Granulocytes after Uptake in the Absence of Heat-Labile Serum Factors. *Infect Immun.* 70:826-835.
- Frank, I., Paganin, C. & Trinchieri, G. 1995. Priming for High Interferon- γ Production Induced by Interleukin-12 in Both CD4+ and CD8+ T Cell Clones from HIV-infected Patients. *J. Clin. Invest.* 96:1677-1682.
- Goding, J.W., Handman, E., Kedzierski, L. & Uboldi, A.D. 2008. Fishing for Anti-*Leishmania* Drugs: Principles and Problems. *Adv Exp Med and Biol* 625:48-60.
- Grondin, K., Haimour, A. & Mukhopadhyay, R. 1997. Coamplification of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene *gsh 1* and the ABC transporter gene *pgpA* in arsenite-resistant *Leishmania tarentolae*. *EMBO J* 6:3057-3065.
- Hall, L.R. & Titus, R.G. 1995. Sand fly vector saliva selectively modulated macrophage functions that inhibit killing of *leishmania major* and nitric oxide produktion. *J of immunol* 155:3501-3506.
- Handman, E. 2001. Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. *Clin Microb Rev.* 14:229-243.
- Hansen, B., Jahnke, N., Laskay, T., Laufs, H., Muller, K., Solbach, W. & van Zandbergen, G. 2001. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in. *Med Microbiol Immunol.* 190:73-76.
- Hemanta, K.M. 2008. Drug Targets in Kinetoplastid Parasites. 1:a uppl. s.141-154. Springer. New York.
- Hughes, C.E. & Terrell, C. L. 1992. Antifungal agents used for deep-seated mycotic infections. *Mayo Clin Proc.* 67:69-91.
- Jonson, M. 2009. Verapamil Mylan/ Läkemedels-information. 2009-03-02
<http://vard.vgregion.se/sv/Undersokningarbehandlingar/Lakemedel/Sjukvardsradgivning/n/?CatId=30372&ChapId=30373>. Hämtad: 2009-04-15.

- Knox, C. & Wishart, D. 2008. Showing drug card for Novobiocin (DB01051). <http://www.drugbank.ca/>. Hämtad 2008-04-23.
- Marty, P. & Rosenthal, E. 2003. Recent Understanding in the Treatment of Visceral leishmaniasis. *Journal of postgraduate Medicine* 49:61-69.
- Mescher, M., Schmidt, C. & Valenzuela, J. 2002. The Roles of IL-12 in Providing a Third Signal for Clonal Expansion of Naive CD8 T Cells. *J Immunol* 169: 6842-6849.
- Murray, H.W. & Taylor, A.P. 1997. Intracellular antimicrobial activity in the absence of interferon- γ : Effect of interleukin-12 in experimental Visceral leishmaniasis in interferon – γ gene-disrupted mice. *J.Exp. Med.* 185:1231-1239.
- Nylén, S. 2003. A role for NK cells in innate immunity against human leishmaniasis. Karolinska University Press. Stockholm.
- Pearson, R.D. & Wilson, M.E. 1987. Roles of CR3 and Mannose Receptors in the Attachment and Ingestion of *Leishmania donovani* by Human Mononuclear Phagocytes. *Infect and Immun* 56:363-369.
- Singh, N. 2006. Drug resistance mechanisms in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Indian J Med Res* 123:411-422.
- Snyder, L. & Champness, W. 2007. *Molecular genetics of bacteria*. 3:e uppl. s.23, 51. ASM Press. Washington D.C.
- WHO. 2009. Leishmaniasis: background information. <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Hämtad 2009-05-19.
- Chalmers Göteborgs Universitet. 2007. Miljöportalen. 2007-06-19. <http://www.miljoportalen.se/ordlista/ploneglossary.2006-04-12.1575314775/ploneglossarydefinition.2007-06-19.2314266512>. Hämtad: 2009-05-30.