

## Ανθελνοσιακά φάρμακα

Σύμφωνα με αναφορές του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, η ελονοσία κατατάσσεται πέμπτη σε σειρά αιτία θανάτου μεταξύ των λοιμώξεων. Στην παρούσα ανασκόπηση, μετά από μια σύντομη αναφορά στην επιδημιολογία και την παθογένεια της νόσου, εξετάζονται τρεις βασικές ομάδες ανθελνοσιακών φαρμάκων, που χρησιμοποιούνται σήμερα: Τα παράγωγα των κινολινών, οι αναστολείς της σύνθεσης του φυλλικού οξέος και τα παράγωγα της αρτεμισινίνης. Με βάση τα πρόσφατα δεδομένα, αναλύεται ο τρόπος δράσης κάθε ομάδας φαρμάκων και οι μηχανισμοί αντοχής του πλάσμοδιού, κυρίως του *P. falciparum*, στα φάρμακα αυτά. Γίνεται επίσης σύντομη αναφορά στη μεθοδολογία της διερεύνησης της αντοχής του πλάσμοδιού και σε νεότερα ανθελνοσιακά φάρμακα, που χρησιμοποιούνται ήδη ή πιθανόν να είναι διαθέσιμα στο μέλλον.

### 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σε πρόσφατη αναφορά του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας,<sup>1</sup> οι λοιμώδεις νόσοι χαρακτηρίστηκαν ως η σημαντικότερη αιτία θανάτου στις αναπτυσσόμενες χώρες, ιδίως στις μικρές ηλικίες. Η ελονοσία κατατάσσεται 5η σε σειρά αιτία θανάτου από λοιμώδεις νόσους, ως υπεύθυνη για περισσότερους από ένα εκατομμύριο θανάτους ετησίως, με την πλειονότητα των οποίων να αφορά σε μικρά παιδιά που ζουν στην Αφρική. Επιπλέον, η προκαλούμενη από την ελονοσία νοσηρότητα και η επακόλουθη μείωση της παραγωγικότητας συμβάλλει σημαντικά στην καθυστέρηση της ανάπτυξης των περιοχών όπου ενδημεί η νόσος. Αυτή τη στιγμή εκτιμάται ότι απειλούνται από τη νόσο δύο δισεκατομμύρια άνθρωποι, ενώ εκφράζονται ανησυχίες ότι ο αριθμός αυτός πιθανόν να αυξηθεί τα επόμενα χρόνια λόγω των συνεχιζόμενων κλιματολογικών αλλαγών, που απορρέουν από το φαινόμενο του θερμοκηπίου και οι οποίες πιθανόν να επιτρέψουν την εξάπλωση της νόσου σε περιοχές όπου δεν ενδημεί σήμερα.<sup>1</sup>

Η ελονοσία δεν ενδημεί πλέον στην Ελλάδα, αλλά εμφανίζεται με τη μορφή σποραδικών κρουσμάτων, που αφορούν είτε σε μετανάστες προερχόμενους από ενδημικές περιοχές, είτε σε Έλληνες τουρίστες, που επιστρέφουν από ταξίδια στις χώρες αυτές. Πιο συγκεκριμένα, από το 1998 έως και το 2001 στη χώρα μας δηλώθηκαν 15, 25, 23 και 23 κρούσματα ελονοσίας, αντίστοιχα, τα περισσότερα εισαγόμενα, τα οποία προκλήθηκαν στην πλειοψηφία τους από το *P. falciparum* (Γραφείο

Ε.Θ. Πιπεράκη, Ν.Ι. Λεγάκης

Εργαστήριο Μικροβιολογίας,  
Πανεπιστήμιο Αθηνών

### Antimalarial drugs

Abstract at the end of the article

#### Λέξεις ευρετηρίου

Ανθελνοσιακά φάρμακα  
Αντοχή  
Ελονοσία

Υποβλήθηκε 29.5.2002

Εγκρίθηκε 5.12.2002

Επιδημιολογικής Καταγραφής και Παρέμβασης, Κέντρο Ελέγχου Ειδικών Λοιμώξεων, προσωπική επικοινωνία).

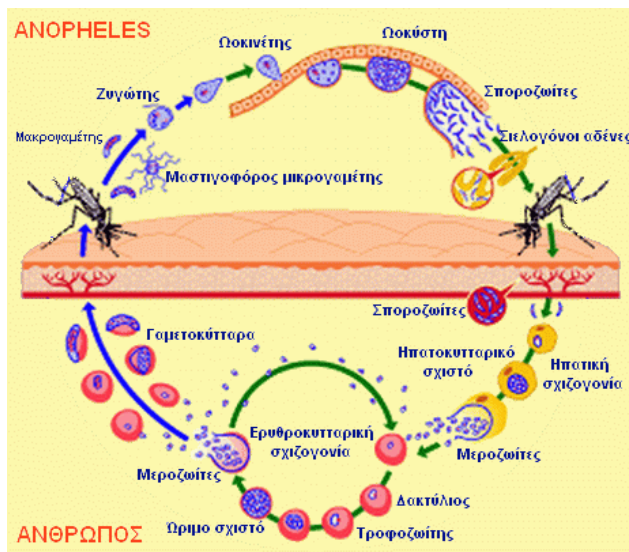
Η ελονοσία προκαλείται από τα ενδοερυθροκυτταρικά παράσιτα του γένους *Plasmodium*, από τα οποία τέσσερα είδη, τα *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* και *P. malariae*, προκαλούν ελονοσία στον άνθρωπο.

Ο φορέας της ελονοσίας είναι το θηλυκό κουνούπι του γένους *Anopheles*. Όταν ένα μολυσμένο θηλυκό κουνούπι τσιμπήσει τον άνθρωπο για να τραφεί με το αίμα του, οι σποροζωίτες, οι μολυσματικές για τον άνθρωπο μορφές του παρασίτου, που περιέχονται στους σιελογόνους αδένες του, ενίενται μαζί με το σίελο του κουνουπιού στη θέση του δήγματος. Μέσα σε μία ώρα, οι μολυσματικές αυτές μορφές μεταφέρονται με την κυκλοφορία του αίματος στο ήπαρ και εισέρχονται στα ηπατοκύτταρα για να αρχίσει η προερυθροκυτταρική σχιζογονία, διαδικασία κατά την οποία οι σποροζωίτες πολλαπλασιάζονται και ωριμάζουν προς εξωερυθροκυτταρικά σχιστά. Από τη στιγμή του αρχικού δήγματος μέχρι περίπου μία εβδομάδα αργότερα, όσο διαρκεί ο πολλαπλασιασμός των παρασίτων στο ήπαρ (προερυθροκυτταρική σχιζογονία), ο ασθενής παραμένει ασυμπτωματικός. Όταν το εξωερυθροκυτταρικό σχιστό ωριμάσει, το ηπατοκύτταρο ρήγνυται και απελευθερώνεται στην κυκλοφορία μεγάλος αριθμός από μεροζωίτες, οι οποίοι αποτελούν τη μορφή του παρασίτου που μολύνει τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Οι μεροζωίτες εισβάλλουν στα ερυθρά αιμοσφαίρια, φάση που χαρακτηρίζει τον ερυθροκυτταρικό κύκλο του παρασίτου. Κατά τη διάρκεια του κύκλου

αυτού, οι μεροζωΐτες ωριμάζουν από τις αρχικές δακτυλοειδείς μορφές σε αμοιβαδοειδείς μορφές, τους τροφοζωΐτες, και στη συνέχεια σε ερυθροκυτταρικά σχιστά, τα οποία καταστρέφουν τελικά τα ερυθροκύτταρα που τα εμπεριέχουν και απελευθερώνουν στην κυκλοφορία μεροζωΐτες, οι οποίοι προσβάλλουν με τη σειρά τους υγιή ερυθρά και ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται (εικ. 1).

Κατά τη διάρκεια της ενδοερυθροκυτταρικής του ανάπτυξης, το πλασμάδιο χρησιμοποιεί την αιμοσφαιρίνη του ξενιστή ως τροφή. Η σφαιρίνη της αιμοσφαιρίνης πέπτεται από ειδικά ένζυμα, τις πλασμεψίνες I και II και τη φαλσιπαΐνη, μέσα σε ένα όξινο διαμέρισμα, το φαγόσωμα του πλασμαδίου.<sup>2,3</sup> Η αίμη που απελευθερώνεται, αυτοοξειδώνεται σε αιματίνη [ένυδρος σιδηροπρωτοπορφυρίνη IX, H<sub>2</sub>O-Fe(III)PPIX]. Το δυνητικά τοξικό αυτό παράγωγο, η αιματίνη, η σιδηρούχος πρωτοπορφυρίνη και το περίσσειμα της σφαιρίνης, που δεν καταναλώνεται από το πλασμάδιο, αποτελούν όλα μαζί σε συνδυασμό τη λεγόμενη χρωστική της ελονοσίας (malarial pigment), αλλιώς γνωστή ως αιμοζωΐνη.

Όταν αρχίζει η εισβολή των μεροζωΐτων στα ερυθρά, αναπτύσσονται διάφοροι κλώνοι (broods), τελικά όμως επικρατεί ένας, που καταστέλλει τους υπόλοιπους και ξεκινά μια διαδικασία περιοδικότητας. Όταν ο κύκλος συγχρονιστεί, η ταυτόχρονη λύση μεγάλου αριθμού ερυθροκυττάρων και η συνακόλουθη απελευθέρωση των μεταβολικών προϊόντων στην κυκλοφορία προκαλεί τη χαρακτηριστική κλασική κλινική εικόνα του πυρετικού παροξυσμού της ελονοσίας.



Εικόνα 1. Κύκλος ζωής του πλασμαδίου της ελονοσίας.

Μετά από κάποιον αριθμό κύκλων, μερικά από τα ενδοερυθροκυτταρικά παράσιτα διαφοροποιούνται σε αρσενικά και θηλυκά γαμετοκύτταρα, τα οποία προσλαμβάνονται κατά τη διάρκεια κάποιου γεύματος από το θηλυκό κουνούπι *Anopheles*. Μέσα στο έντερο του κουνουπιού διεξάγεται ο σεξουαλικός κύκλος αναπαραγωγής του παρασίτου. Τα γαμετοκύτταρα ωριμάζουν σε αρσενικούς και θηλυκούς γαμέτες, οι οποίοι συντήκονται και σχηματίζουν το ζυγώτη, που μετατρέπεται στον κινητό ωοκινέτη. Ο ωοκινέτης διεισδύει στο έντερο του κουνουπιού, όπου εξελίσσεται σε ωοκύστη. Η ωοκύστη ωριμάζει σε λίγες ημέρες έως δύο εβδομάδες και παράγει τους σποροζωΐτες, τη μολυσματική για τον άνθρωπο μορφή του παρασίτου. Οι σποροζωΐτες μεταναστεύουν στους σιελογόνους αδένες του κουνουπιού, απ' όπου στο επόμενο γεύμα αίματος ενιένται μαζί με το σίελο στον επόμενο ξενιστή.

Δύο από τα τέσσερα είδη πλασμαδίου που προσβάλλουν τον άνθρωπο, το *P. vivax* και το *P. ovale*, παράγουν λανθάνουσες μορφές, τους υπνοζωΐτες, οι οποίοι παραμένουν σε λανθάνουσα κατάσταση στο ήπαρ και ενεργοποιούνται 6–11 μήνες μετά την αρχική λοίμωξη, προκαλώντας υποτροπή της νόσου.<sup>4</sup>

Η κλινική εικόνα της ελονοσίας χαρακτηρίζεται από υποτροπιάζοντα υψηλό πυρετό συνοδευόμενο από ρίγος, κεφαλαλγία και μυαλγίες. Ο πυρετός εμφανίζεται ανά 48 ώρες για τα *P. vivax* και *P. ovale* και ανά 72 ώρες για το *P. malariae*. Οι ασθενείς με λοίμωξη από *P. falciparum* έχουν συνήθως ακανόνιστο πυρετό, παρά το γεγονός ότι ο κύκλος ζωής του είδους αυτού του πλασμαδίου είναι 48ωρος. Οι επιπλοκές της ελονοσίας παρατηρούνται σχεδόν αποκλειστικά από τη μόλυνση με *P. falciparum*.<sup>5</sup> Μπορεί να παρατηρηθεί οποιοδήποτε από τα παρακάτω:

- Κώμα
- Βαριά νορμοκυτταρική αναιμία
- Οξεία νεφρική ανεπάρκεια
- Πνευμονικό οίδημα
- Υπογλυκαιμία
- Ολιγαμική καταπληξία
- Διάχυτη ενδαγγειακή πήξη
- Διαταραχές της ηλεκτρολυτικής ισορροπίας, οξέωση
- Αιμοσφαιρινουρικός πυρετός (blackwater fever)
- Δυσεντερική μορφή, με βλεννοαιματηρές διάρροιες και βαριά αφυδάτωση
- Οξεία ηπατική ανεπάρκεια
- Υπερπυρεξία
- Παρασαιμία >5%, σε μη άνοσα άτομα.

## 2. ΦΑΡΜΑΚΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΕΛΟΝΟΣΙΑΣ

Όπως συμβαίνει και για άλλα παθογόνα, γίνεται προσπάθεια παρασκευής φαρμάκων εναντίον συγκεκριμένων στόχων του παρασίτου. Οι μεταβολικές οδοί, που αποτελούν ιδανικούς στόχους της αντιπαρασιτικής χημειοθεραπείας, πρέπει αφενός να είναι απολύτως απαραίτητες για την ανάπτυξη του παρασίτου και αφετέρου να απαντώνται μόνο στο πλασμώδιο και όχι στα κύτταρα του ξενιστή. Στα πλασμώδια έχουν αναγνωριστεί διάφορες μεταβολικές οδοί, που αποτελούν ήδη ή μπορεί να αποτελέσουν μελλοντικούς στόχους στη χημειοθεραπεία της ελονοσίας.<sup>5,6</sup>

Κάποιες από αυτές απαντώνται αποκλειστικά στα πλασμώδια λόγω μεταβολικών τους ιδιομορφιών, ενώ κάποιες άλλες είναι κοινές στα πλασμώδια και στα κύτταρα των θηλαστικών. Μερικοί από αυτούς τους στόχους είναι:

- Η οδός του μεταβολισμού της αιμοσφαιρίνης
- Ο μεταβολισμός των φυλλικών
- Η οδός βιοσύνθεσης των πυριμιδινών
- Η οδός διάσωσης των πουρινών
- Η γλυκόλυση
- Ο μεταβολισμός των φωσφολιπιδίων
- Ο μηχανισμός άμυνας στο οξειδωτικό stress.

Τα σημαντικότερα ανθελονοσιακά φάρμακα με τους παραπάνω βιολογικούς στόχους περιλαμβάνονται:

- Στα παράγωγα των κινολινών, όπως η κινίνη, η χλωροκίνη, η μεφλοκίνη και η αλοφαντρίνη
- Στους αναστολείς της σύνθεσης του φυλλικού οξέος, όπως η πυριμεθαμίνη και οι σουλφοναμίδες
- Στην αρτεμισινίνη και τα παράγωγά της.

Επίσης, χρησιμοποιούνται αναστολείς της πρωτεϊνοσύνθεσης, όπως οι τετρακυκλίνες και η κλινδαμυκίνη.

### 2.1. Παράγωγα των κινολινών

Στην ομάδα αυτή περιλαμβάνονται τα ανθελονοσιακά που περιέχουν στο μόριό τους τον ετεροαρωματικό πυρήνα των κινολινών.

*2.1.1. Ομάδες παραγώγων των κινολινών.* Διακρίνονται τρεις ομάδες:

- Οι 4-αμινοκινολίνες και οι συγγενείς τους ακριδίνες, όπου περιλαμβάνονται η χλωροκίνη, η αμοδιακίνη και η κινακρίνη.
- Οι κινολινο-μεθανόλες, όπου περιλαμβάνονται η κινίνη, η κινιδίνη και η μεφλοκίνη.

Σημειώνεται ότι σημαντικές ομοιότητες με τις κινολινομεθανόλες παρουσιάζουν τα συγγενή τους φαινανθρένια, στα οποία ανήκει η αλοφαντρίνη.

- Οι 8-αμινοκινολίνες, όπου περιλαμβάνονται η πριμακίνη και η παμακίνη.

Οι κινολίνες είναι τα σημαντικότερα ανθελονοσιακά φάρμακα. Η κινίνη, τα ισομερή της και τα συγγενή παράγωγα απαντώνται στον κορμό του δέντρου της κίνας, χρησιμοποιείτο δε εμπειρικά από τους ιθαγενείς του Περού για αιώνες πριν να γίνει γνωστή στη δυτική Ιατρική το 1640.<sup>7</sup> Η κινίνη απομονώθηκε από τον κορμό του δένδρου το 1823 και η χημική της δομή αποκαλύφθηκε το 1908. Για 3 περίπου αιώνες, η κινίνη αποτελούσε το μοναδικό ευρέως χρησιμοποιούμενο φάρμακο στην κλινική πράξη.

Ο συμμαχικός αποκλεισμός της Γερμανίας στον Πρώτο Παγκόσμιο Πόλεμο έδωσε το έναυσμα για έρευνα, με στόχο την ανακάλυψη συνθετικών ανθελονοσιακών παραγώγων και οδήγησε στην εισαγωγή στην κλινική πράξη της παμακίνης (1932) και της κινακρίνης (1933). Η περιορισμένη όμως δραστηριότητα και η σημαντική τοξικότητα δεν επέτρεψαν την ευρεία χρήση αυτών των φαρμάκων, αν και η κινακρίνη χρησιμοποιήθηκε, με επιτυχία, από τους συμμάχους στον Ειρηνικό κατά το Δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο.

Στις πρώιμες αυτές έρευνες ανακαλύφθηκε και η χλωροκίνη, αλλά αρχικά θεωρήθηκε πολύ τοξική για κλινική χρήση.<sup>7</sup> Σταθμό στην εξέλιξη της ανθελονοσιακής θεραπείας αποτέλεσε το γεγονός ότι ένα απόθεμα σοντοκίνης, παραγώγου συγγενούς της χλωροκίνης, παραλήφθηκε από Αμερικανούς επιστήμονες το 1941. Ακολούθησαν μελέτες, που κατέληξαν στην εισαγωγή της χλωροκίνης (1945), της αμοδιακίνης (1945) και της πριμακίνης (1950) στην κλινική πράξη.

Και ενώ η σημαντική τοξικότητα της πριμακίνης και της αμοδιακίνης περιόρισαν την εκτεταμένη χρήση τους, η χλωροκίνη, ως γνωστό, εξελίχθηκε σε ένα από τα πλέον επιτυχημένα φάρμακα που κατασκευάστηκαν ποτέ και αποτέλεσε τον ακρογωνιαίο λίθο της ανθελονοσιακής θεραπείας για 50 περίπου χρόνια. Η συνεχιζόμενη έρευνα στο Walter Reed Army Institute of Research των ΗΠΑ απέδωσε μια νέα κινολινομεθανόλη, τη μεφλοκίνη, που εισήχθη στην κλινική πράξη το 1984. Η πυροναριδίνη, που επίσης ανήκει στις κινολίνες και ανακαλύφθηκε στην Κίνα, ερευνάται τώρα από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας.<sup>8-10</sup>

*2.1.2. Οι κινολίνες στην κλινική πράξη.* Στην κλινική πράξη, σήμερα, χρησιμοποιούνται η χλωροκίνη, η με-

φλοκίνη, η κινίνη, η κινιδίνη, η αμοδιακίνη και η πριμακίνη (πίν. 1). Η πυροναριδίνη βρίσκεται στο στάδιο των κλινικών μελετών. Από αυτές, η χλωροκίνη, η μεφλοκίνη, η κινίνη, η κινιδίνη και η αμοδιακίνη είναι δραστικές εναντίον όλων των ειδών του πλασμοδίου που βρίσκονται στο ερυθροκυτταρικό στάδιο, ενώ η πριμακίνη είναι προς το παρόν το μοναδικό διαθέσιμο φάρμακο, το οποίο είναι αποτελεσματικό στην κάθαρση των πλασμοδίων από το ήπαρ και χρησιμοποιείται στη θεραπεία εκρίζωσης των ειδών *P. vivax* και *P. ovale*. Η δραστικότητα της πριμακίνης έναντι των πλασμοδίων που βρίσκονται στο ερυθροκυτταρικό στάδιο είναι μικρή στις συνήθεις θεραπευτικές συγκεντρώσεις και για το λόγο αυτό δεν χρησιμοποιείται στη θεραπεία του *P. falciparum*.<sup>11,12</sup>

Η πυροναριδίνη είναι ένα νεότερο φάρμακο, δραστικό εναντίον των πλασμοδίων που βρίσκονται στο ερυθροκυτταρικό στάδιο. Η αποτελεσματικότητά της στη θεραπεία λοιμώξεων από ανθεκτικά στη χλωροκίνη παράσιτα εκτιμάται σήμερα σε κλινικές μελέτες.<sup>8,9</sup> Η ανάπτυξη ανοχής στο φάρμακο αυτό κατέστη δυνατή στο εργαστήριο, γεγονός που υποδηλώνει ότι η εμφάνιση ανθεκτικών κλινικών στελεχών είναι αναμενόμενη μετά από κάποιο χρόνο.<sup>13</sup> Συνδυασμός της πυροναριδίνης με αρτεμισινίνη ίσως να αναστείλει τη διαδικασία ανάπτυξης ανοχής.<sup>14</sup>

**2.1.3. Μηχανισμός δράσης των κινολινών.** Ο μηχανισμός δράσης δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί για καμιά από τις τρεις ομάδες των αμινοκινολινών. Ωστόσο, πολύ περισσότερα είναι γνωστά για τις 4-αμινοκινολίνες και τις κινολινομεθανόλες απ' ό,τι για τις 8-αμινοκινολίνες. Αυτό συμβαίνει γιατί οι ερυθροκυτταρικές μορφές του πλασμοδίου καλλιεργούνται πολύ πιο εύκολα σε σύγκριση με τα εξωερυθροκυτταρικά σχιστά.<sup>15,16</sup>

Για την ερμηνεία της δράσης της χλωροκίνης έχουν διατυπωθεί δύο ειδών υποθέσεις: εκείνες που προτεί-

νουν ότι τόπος δράσης των αμινοκινολινών είναι το φαγόσωμα του παρασίτου και εκείνες που υποστηρίζουν ότι δρουν στο κυτταρόπλασμα.

Οι αναφερόμενες στο κυτταρόπλασμα υποθέσεις προτείνουν διάφορους μηχανισμούς δράσης, όπως (α) σύνδεση του φαρμάκου με το DNA του παρασίτου,<sup>17</sup> (β) αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης<sup>18</sup> και (γ) αναστολή του μεταβολισμού των πολυαμινών.<sup>19</sup>

Οι παραπάνω μηχανισμοί έχουν διαπιστωθεί *in vitro*, αυτό όμως συμβαίνει μόνο σε συγκεντρώσεις πολύ υψηλότερες από αυτές που παρατηρούνται κατά τη συνήθη θεραπευτική χορήγηση. Οι υποθέσεις αυτές δεν εξηγούν, εξάλλου, την ειδικότητα δράσης των φαρμάκων σε ορισμένα μόνο στάδια της ζωής του παρασίτου.<sup>20</sup>

Θεωρητικά, ως ασθενείς βάσεις (αμίνες), η χλωροκίνη και οι άλλες 4-αμινοκινολίνες αναμένεται να εμφανίζουν μια τάση συγκέντρωσης σ' ένα όξινο διαμέρισμα του κυττάρου, όπως είναι το φαγόσωμα. Η παραπάνω άποψη ενισχύεται από μορφολογικές παρατηρήσεις, που αναφέρονται στη διόγκωση του φαγοσώματος και τη συγκέντρωση της χρωστικής της ελονοσίας (malarial pigment) στο φαγόσωμα μετά από θεραπεία του παρασίτου με τις 4-αμινοκινολίνες.<sup>21,22</sup>

Οι υποθέσεις που θεωρούν το φαγόσωμα ως θέση δράσης των αμινοκινολινών βασίζονται στα ακόλουθα δεδομένα:

- Παρατηρείται αύξηση του pH του φαγοσώματος εξαιτίας της αυξημένης συγκέντρωσης βάσης μέσα σ' αυτό<sup>23</sup>
- Παρατηρείται αναστολή ενζύμων του φαγοσώματος (λιπασών, πρωτεασών)<sup>24,25</sup>
- Έχει διαπιστωθεί αλληλεπίδραση των φαρμάκων με την αιματίνη (προϊόν μεταβολισμού της αιμοσφαιρίνης).

**Πίνακας 1.** Ανθελονοσιακές κινολίνες σε χρήση σήμερα.

Φάρμακο	Δράση έναντι ερυθροκυτταρικών μορφών	Δράση έναντι ηπατοκυτταρικών μορφών	Ανοχή	Σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες
Χλωροκίνη	+	-	+	Όχι
Αμοδιακίνη	+	-	+	Ακοκκιοκυτταραιμία, ηπατοτοξικότητα
Κινίνη	+	-	+	Αιμοσφαινουρικός πυρετός
Κινιδίνη*	+	-	Δεν αναφέρεται	Πιθανή καρδιοτοξικότητα
Μεφλοκίνη	+	-	+	Όχι
Πριμακίνη	-	+	+	Μεθαιμοσφαιραιμία, αιμόλυση

\* Λίγα στοιχεία, λόγω περιορισμένης χρήσης

Σήμερα, η τελευταία άποψη είναι επικρατέστερη όλων. Διατυπώθηκε για πρώτη φορά στη δεκαετία του 1960<sup>26</sup> και αργότερα, στη δεκαετία του 1980,<sup>27</sup> αλλά δεν βρέθηκε τότε ανταπόκριση λόγω έλλειψης ικανών αποδείξεων.

Σήμερα, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η αιματίνη είναι όντως ο στόχος των 4-αμινοκινολινών, αν και ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η σύνδεση χλωροκίνης-αιματίνης εξασκεί ανθελνοσοιακή δράση παραμένει αντικείμενο εντατικής έρευνας και έντονης διαφωνίας.

Τα παράγωγα της 8-αμινοκινολίνης (όπως η πριμακίνη) διαφέρουν ουσιαστικά τόσο από τις 4-αμινοκινολίνες όσο και από τις κινολινομεθανόλες, γιατί είναι δραστικά έναντι των εξωερυθροκυτταρικών μορφών του παρασίτου. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η δράση της πριμακίνης και ίσως και άλλων 8-αμινοκινολινών εξασκείται στο μιτοχόνδριο, όπου πιθανόν να αναστέλλουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων.<sup>28</sup> Εναλλακτικά, προτείνεται ότι η δραστικότητα των ουσιών αυτών μπορεί να οφείλεται στην ισχυρή προοξειδωτική δράση τους.<sup>13</sup>

#### 2.1.4. Μηχανισμοί αντοχής του *P. falciparum* στις κινολίνες

##### α. Χλωροκίνη

Η θεραπευτική ανταπόκριση στη χλωροκίνη *in vivo* χαρακτηρίζεται ως S, RI, RII και RIII, με κριτήριο το εάν οι συνήθεις δόσεις χλωροκίνης, δηλαδή 1,5 g βάση (2,5 g άλας) για 3 ημέρες, οδηγούν σε:

- Θεραπεία (S=susceptible)
- Κάθαρση της παρασιταϊμίας, ακολουθούμενη από υποτροπή εντός 28 ημερών (RI=low level resistance)
- Ελάττωση της παρασιταϊμίας χωρίς κάθαρση των παρασίτων από το αίμα (RII=intermediate level resistance)
- Μη ανιχνεύσιμη ελάττωση ή αύξηση της παρασιταϊμίας (RIII=high level resistance).

Η ονοματολογία αυτή αντανακλά την ύπαρξη ποικίλων επιπέδων αντοχής του *P. falciparum* στη χλωροκίνη.<sup>6</sup> Οι εργαστηριακές μελέτες, όμως, υποδεικνύουν ότι υπάρχει μόνο ένας μηχανισμός αντοχής στη χλωροκίνη. Όλα τα ανθεκτικά στη χλωροκίνη στελέχη αποβάλλουν ενεργητικά το φάρμακο μέσω ενός κοινού ATP-εξαρτώμενου μηχανισμού εκροής (efflux), μέσα σε 1-2 min, ενώ ο αντίστοιχος χρόνος για τα ευαίσθητα στελέχη είναι >55 min. Προς το παρόν, θεωρείται ότι η ποικιλία των απαντήσεων στη θεραπεία με χλωροκίνη οφείλεται σε ταυτόχρονες λοιμώξεις από στελέχη παρασίτων ευαίσθητα και ανθεκτικά στη χλωροκίνη. Με βάση αυτή την

υπόθεση, λοιμώξη από ποικιλία παρασίτων, ευαίσθητων και ανθεκτικών στη χλωροκίνη, μπορεί να παρουσιάζει εικόνα μικρής ή ενδιάμεσης αντοχής RI ή RII, ανάλογα με το εάν υπερτερούν αριθμητικά τα ευαίσθητα ή τα ανθεκτικά στελέχη, ενώ λοιμώξη μόνο από ανθεκτικά στελέχη μπορεί να δίνει εικόνα υψηλού επιπέδου αντοχής RIII.

Όσον αφορά στη γενετική βάση της αντοχής στη χλωροκίνη, πιστευόταν ότι ίσως συνδέεται με κάποιο από τα γονίδια πολλαπλής αντοχής [multidrug resistance (mdr) like genes] του *P. falciparum* (*Pfmdr*). Το γονίδιο αυτό ομοιάζει με το αντίστοιχο γονίδιο, που καθιστά τα καρκινικά κύτταρα των θηλαστικών ανθεκτικά σε πολλαπλά αντικαρκινικά φάρμακα. Το προϊόν του, η πρωτεΐνη Pgh1 (P-glycoprotein homologue 1), είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, που ομοιάζει πολύ με την αντίστοιχη των θηλαστικών. Σημειακές μεταλλαγές του γονιδίου αυτού συνδυάζονται με πολλαπλή διασταυρούμενη αντοχή στις μεφλοκίνη, αρτεμισινίνη, κινίνη και αλοφαντρίνη, όχι όμως με αντοχή στη χλωροκίνη. Η αντοχή στη χλωροκίνη έχει εντοπιστεί σε μια περιοχή του χρωμοσώματος 7 του πλασμοδίου. Υπεύθυνες για την αντοχή στη χλωροκίνη θεωρούνται μεταλλαγές του γονιδίου *pfcr*t (chloroquine resistance transporter). Η πρωτεΐνη PfCRT, που κωδικοποιεί το γονίδιο αυτό, είναι μια πρωτεΐνη της μεμβράνης του κενοτοπίου.

Οι μεταλλαγές που απαντώνται στα στελέχη του δυτικού ημισφαιρίου είναι διαφορετικές απ' αυτές του ανατολικού ημισφαιρίου. Σε όλα όμως τα ανθεκτικά στελέχη βρέθηκαν οι μεταλλαγές K76T (αντικατάσταση της θρεονίνης από λυσίνη στη θέση 76) και A220S (αντικατάσταση της σερίνης από αλανίνη στη θέση 220), καθώς και μεταβολές σε άλλα 2-6 κωδικόνια.<sup>29</sup> Επιμόλυνση (transfection) των ευαίσθητων στη χλωροκίνη στελεχών με τα *pfcr*t αλληλία οδηγεί σε εμφάνιση αντοχής στη χλωροκίνη. Τέλος, στέλεχος που διαθέτει όλες τις μεταλλαγές εκτός της K76T παραμένει ευαίσθητο στη χλωροκίνη.

Εκτός από τον αυξημένο ρυθμό αποβολής του φαρμάκου, η ελαττωμένη κυτταρική διαπερατότητα φαίνεται να συμβάλλει στην έκφραση αντοχής του *P. falciparum* στη χλωροκίνη.<sup>30,31</sup>

##### β. Μεφλοκίνη

Η αντοχή στη μεφλοκίνη συνδυάζεται στενά με αντοχή στην κινίνη και την αλοφαντρίνη και με μειωμένη ευαισθησία στην αρτεμισινίνη. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι πρόκειται για γνήσιο μηχανισμό πολυαντοχής, που αφορά στα φάρμακα αυτά, ο οποίος ίσως σχετίζεται

με την πρωτεΐνη Pgh1. Σημειώνεται όμως ότι η αντοχή στη χλωροκίνη δεν συσχετίζεται με την αντοχή στη μεφλοκίνη, αν και περιγράφεται συνύπαρξή τους σε κλινικά στελέχη.

**2.1.5. Αντοχή του *P. vivax* στη χλωροκίνη.** Παρόλο που σπάνια καταλήγει σε θάνατο, η ελονοσία από *P. vivax* είναι μια σοβαρή νόσος, με τεράστια επίπτωση στην παραγωγικότητα και την ποιότητα ζωής εκατομμυρίων ανθρώπων. Τα κρούσματα κυμαίνονται από 75–90 εκατομμύρια ετησίως και τα περισσότερα απαντώνται εκτός της Αφρικής. Φάρμακο εκλογής για την κάθαρση των παρασίτων από το αίμα αποτελούσε η χλωροκίνη. Η αντοχή του *P. vivax* στη χλωροκίνη αναφέρθηκε για πρώτη φορά στην Παπούα Νέα Γουϊνέα (1989) και στην Ινδονησία (1991) και έκτοτε αποτελεί αυξανόμενο πρόβλημα.<sup>32-34</sup> Πρόσφατες μελέτες στην Παπούα έδειξαν ποσοστό υποτροπής έως και 22% σε ασθενείς με ελονοσία από *P. vivax* μετά από θεραπεία με χλωροκίνη.<sup>35</sup> Η γεωγραφική κατανομή της αντοχής του *P. vivax* στη χλωροκίνη έχει τώρα εξαπλωθεί στην Ινδία, τη Μιανμάρ (πρώην Μπούρμα) και στο δυτικό ημισφαίριο (στη Γουϊάνα και τη Βραζιλία).<sup>36-39</sup>

Παρά το γεγονός ότι η χλωροκίνη χρησιμοποιήθηκε ευρύτατα εξίσου για το *P. vivax* και για το *P. falciparum* στο δεύτερο μισό του 20ού αιώνα, το *P. vivax* εμφάνισε αντοχή στη χλωροκίνη 30 χρόνια αργότερα από το *P. falciparum*. Η εμφάνιση της αντοχής του *P. vivax* στη χλωροκίνη τρεις δεκαετίες μετά από αυτή του *P. falciparum*, καθώς επίσης και η διαφορά στη μορφή που παίρνει η κλινική υποτροπή της ανθεκτικής *P. vivax* ελονοσίας σε σύγκριση με αυτή από *P. falciparum*, υποδηλώνουν την ύπαρξη διαφορετικών μηχανισμών αντοχής στα δύο είδη του πλασμοδίου. Δεν είναι άλλωστε ασυνήθιστο φαινόμενο, στον κόσμο των μικροβίων, διαφορετικοί μοριακοί μηχανισμοί να καταλήγουν σε κοινό φαινότυπο αντοχής.

Όλα τα ανθεκτικά στη χλωροκίνη στελέχη του *P. falciparum*, που έχουν μέχρι στιγμής αναλυθεί, διαθέτουν αλληλία του γονιδίου *pfcr1*, τα οποία διαφέρουν κατά τουλάχιστον 4 μεταλλαγές από τον ευαίσθητο στη χλωροκίνη απλότυπο. Αντίθετα, στο *P. vivax*, τα αλληλία του γονιδίου που αντιστοιχεί στο *pfcr1* του *P. falciparum* δεν διαφέρουν πολύ μεταξύ τους στα ευαίσθητα και τα ανθεκτικά στη χλωροκίνη στελέχη.<sup>40</sup> Το εάν και κατά πόσο η αντοχή στη χλωροκίνη συσχετίζεται με μεταλλαγές του *pfcr1* γονιδίου στο *P. vivax* παραμένει ακόμη άγνωστο. Η μελέτη της αντοχής του *P. vivax* παρουσιάζει επιπρόσθετες δυσκολίες, γιατί η παρατεταμένη *in vitro* καλλιέργεια του παρασίτου δεν είναι δυνατή.<sup>40,41</sup>

## 2.2. Αναστολείς της σύνθεσης του φυλλικού οξέος

**2.2.1. Μηχανισμός δράσης.** Το τετραϋδροφυλλικό οξύ (τετραϋδροπτεροϋλογλουταμικό οξύ), που λειτουργεί ως μεταφορέας ενεργοποιημένων μονοανθρακικών ομάδων, είναι ένα συνένζυμο-κλειδί στο μεταβολισμό αμινοξέων και νουκλεοτιδίων. Στο *P. falciparum* το φυλλικό οξύ συντίθεται κυρίως *de novo*, αλλά μπορεί επίσης να αποκτηθεί και μέσω οδών διάσωσης. Στόχους των ανθελονοσιακών φαρμάκων αποτελούν δύο ενζυμικά συστήματα της μεταβολικής αυτής οδού:

- Η συνθετάση του διυδροπτεροϊκού οξέος (dihydropteroate synthase, DHPS) και η πυροφωσφοκινάση της 2-αμινο-4-υδροξυ-6-υδροξυμεθυλοδιυδρο-πτεριδίνης (2-amino-4-hydroxy-6-hydroxy methyl-dihydropteridine pyrophosphokinase, PPPK)
- Η αναγωγάση του διυδροφυλλικού οξέος (dihydrofolatereductase, DHFR) και η θυμιδική συνθετάση (thymidylate synthase, TS).

Αντίθετα απ' ό,τι συμβαίνει στα κύτταρα των θηλαστικών, στο πλασμοδίο τα ένζυμα αυτά δεν είναι ανεξάρτητα μόρια, αλλά συνυπάρχουν σε ενιαία συμπλέγματα με διπλή λειτουργία. Στον άνθρωπο, μεγάλο μέρος της βιοσυνθετικής αυτής οδού δεν υπάρχει καθόλου.

Οι PPPK και DHPS καταλύουν τις αντιδράσεις της *de novo* σύνθεσης του διυδροφυλλικού οξέος από γουανιδινοτριφωσφορικό οξύ (GTP). Πιο αναλυτικά, η PPPK καταλύει τη φωσφορύλιωση της 2-αμινο-4-υδροξυ-6-υδροξυμεθυλοδιυδροπτεριδίνης, ενώ η DHPS τη συμπύκνωση του παρα-αμινο-βενζοϊκού οξέος (PABA) με την πυροφωσφορική διυδροπτεριδίνη για σχηματισμό του 7,8-διυδροπτεροϊκού οξέος, που μετατρέπεται στη συνέχεια σε φυλλικό οξύ με την προσθήκη L-γλουταμικού οξέος. Οι σουλφοναμίδες αναστέλλουν την DHPS.

Η DHFR καταλύει την αναγωγή του διυδροφυλλικού σε τετραϋδροφυλλικό οξύ, το οποίο είναι απαραίτητο συνένζυμο για τη βιοσύνθεση του θυμιδικού, των πυριμωθιμικών και κάποιων αμινοξέων. Η αντίδραση είναι NADPH-εξαρτώμενη. Το ένζυμο DHFR αναστέλλεται από την πυριμεθαμίνη και τις διγουανίδες. Η συνέργεια της πυριμεθαμίνης με τις σουλφοναμίδες και τις σουλφόνες εξηγείται από το γεγονός ότι αναστέλλουν δύο διαφορετικά στάδια μίας βασικής μεταβολικής οδού. Η δράση των αναστολέων του φυλλικού οξέος εμφανίζεται αργά στον κύκλο ζωής του παρασίτου και εκφράζεται ως ελαττωμένη σύνθεση DNA και αναστολή της πυρηνικής διαίρεσης στη φάση του σχηματισμού των σχιστών στα ερυθροκύτταρα και το ήπαρ.<sup>6,42</sup>

## 2.2.2. Οι αναστολείς σύνθεσης του φυλλικού οξέος στην κλινική πράξη

α. Αναστολείς της αναγωγής του διυδροφυλλικού οξέος (DHFR)

### Προγουανίλη

Η προγουανίλη (Paludrin) είναι παράγωγο των διγουανιδών. Η ανθελονοσιακή δράση της οφείλεται στον κυκλικό της μεταβολίτη (κυκλογουανίλη), που αναστέλλει εκλεκτικά την DHFR του πλασμοδίου.

Παράγωγό της είναι η ακόμη δραστικότερη χλωροπρογουανίλη (Larudrin), που επίσης χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη.

### Πυριμεθαμίνη

Η πυριμεθαμίνη (Daraprim) ανήκει στις διαμινοπυριμιδίνες. Δεν αποτελεί πρώτης γραμμής ανθελονοσιακό και χορηγείται πάντοτε σε συνδυασμό με κάποια σουλφοναμίδη (π.χ. σουλφαδοξίνη) ή σουλφόνη (π.χ. δαψόνη) για ενίσχυση της δράσης της. Δρα αργά σε σχέση με τα παράγωγα των κινολινών και ο μεγάλος χρόνος ημίσειας ζωής της (80–96 ώρες) ευνοεί την επιλογή ανθεκτικών στελεχών.

β. Αναστολείς της συνθετάσης του διυδροπτεροϊκού οξέος (DHPS)

### Σουλφοναμίδες-Σουλφόνες

Οι σουλφοναμίδες και οι σουλφόνες δρουν αργά έναντι των ενδοερυθροκυτταρικών σχιστών. Είναι πιο δραστικές στο *P. falciparum* παρά στο *P. vivax*. Χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με την πυριμεθαμίνη, για ενίσχυση της δράσης της. Πολύ διαδεδομένη είναι η χρήση του συνδυασμού 25 mg πυριμεθαμίνης με 500 mg σουλφαδοξίνης (σκεύασμα Fansidar) για θεραπεία σε περιοχές όπου ενδημεί η νόσος. Η σουλφαδοξίνη έχει χρόνο ημίσειας ζωής 116–184 ώρες.<sup>43</sup>

**2.2.3. Μηχανισμός αντοχής στους αναστολείς σύνθεσης του φυλλικού οξέος.** Η αντοχή στην πυριμεθαμίνη και τις διγουανίδες είναι απόρροια μεταλλαγών του γονιδίου που κωδικοποιεί την DHFR. Μελέτες *in vitro* έχουν αποδείξει ότι η πλέον σημαντική μεταλλαγή για τον καθορισμό της αντοχής στην πυριμεθαμίνη είναι αυτή στη θέση 108 (Ser>Asn). Σημειώνεται δε ότι, μέχρι στιγμής, δεν έχει βρεθεί στέλεχος ανθεκτικό στην πυριμεθαμίνη που να στερείται αυτής της μεταλλαγής.

Περαιτέρω αύξηση του επιπέδου αντοχής επιφέρουν οι μεταλλαγές στις θέσεις 51 (Asn>Ile) και 59 (Cys>Arg), ενώ ακόμα υψηλότερο επίπεδο αντοχής παρατηρείται

παρουσία της μεταλλαγής (Ile>Leu) στο κωδικόνιο 164.<sup>44–47</sup>

Η σουλφαδοξίνη αναστέλλει την DHPS, ανταγωνιζόμενη άμεσα το φυσιολογικό υπόστρωμα (PABA) στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την DHPS στο *P. falciparum* έχει κλωνοποιηθεί και εκφραστεί στην *E. coli*, ενώ έχει αποκωδικοποιηθεί και η αλληλουχία του. Έτσι, βρέθηκε ότι για την αντοχή στις σουλφοναμίδες και τις σουλφόνες ευθύνονται μεταλλαγές στο γονίδιο της DHPS. Οι μεταλλαγές αυτές εντοπίζονται μέσα ή κοντά σε πολύ συντηρημένες μικρές περιοχές του γονιδίου και οι αντίστοιχες μεταβολές, που προκαλούνται στη δομή της πρωτεΐνης, βρίσκονται μέσα ή κοντά στην περιοχή του ενεργού κέντρου του ενζύμου.<sup>48</sup> Η συχνότερα απαντώμενη σημειακή μεταλλαγή στα ανθεκτικά στελέχη στη σουλφαδοξίνη είναι αυτή που μετατρέπει την αλανίνη σε γλυκίνη στο κωδικόνιο 437 (Ala>Gly). Η μεταλλαγή αυτή είναι η σημαντικότερη και μεταβάλλει τη συγγένεια του ενζύμου-στόχου για το φάρμακο. Επιπρόσθετες μεταλλαγές στις θέσεις 436 (Ala>Ser), 450 (Lys>Glu), 581 (Ala>Glu) και 613 (Ala>Ser) προκαλούν υψηλού επιπέδου αντοχή στο φάρμακο.<sup>49</sup>

**2.2.4. Κλινική θεώρηση-Προοπτικές.** Ανθεκτικά στην πυριμεθαμίνη στελέχη απαντώνται σε διάφορες περιοχές του κόσμου όπου ενδημεί η ελονοσία. Μελέτες πληθυσμών στην Αφρική και την Ασία αναφέρουν ότι πολλά από τα στελέχη που απομονώθηκαν περιελάμβαναν μεταλλαγμένους, ανθεκτικούς γονότυπους. Στις περιοχές αυτές, η ανθελονοσιακή χημειοθεραπεία ασκεί αποτελεσματική πίεση επιλογής των ανθεκτικών στελεχών, ιδιαίτερα όταν γίνεται με ελαττωμένες δόσεις ή χορηγείται για μικρότερο από το απαιτούμενο χρονικό διάστημα.<sup>49,50</sup>

Όσον αφορά στη σουλφαδοξίνη, η συχνότητα απομόνωσης ανθεκτικών στελεχών ποικίλλει στις διάφορες περιοχές του κόσμου και κυμαίνεται από καθόλου (Μέση Ανατολή) έως 30% (Τανζανία), ακόμη έως και περίπου 100% (Βιετνάμ, Μάλι). Επιλογή των ανθεκτικών στελεχών μετά τη χημειοθεραπεία με χαμηλές δόσεις παρατηρείται και με τη σουλφαδοξίνη.<sup>50,51</sup> Η χορήγηση μειωμένων δόσεων και η μειωμένη διάρκεια εφαρμογής της θεραπείας, με σκοπό την εξοικονόμηση χρημάτων, καταλήγουν στην προσωρινή καταστολή και όχι στο θάνατο των παρασίτων. Τα ανθεκτικά στελέχη, που μπορεί να υπάρχουν σε τόσο μικρούς αριθμούς και τα οποία δεν είναι καν ανιχνεύσιμα πριν από τη θεραπεία, αναδύονται μετά την καταστροφή του ευαίσθητου πληθυσμού και προκαλούν υποτροπή της νόσου.

Ο συνδυασμός σουλφαδοξίνης-πυριμεθαμίνης έχει ακόμη υψηλά ποσοστά επιτυχίας στην Αφρική. Σε περιοχές όμως της Νοτιοανατολικής Ασίας και της Νότιας Αμερικής τα ποσοστά της θεραπευτικής αποτυχίας αυξάνονται σημαντικά. Η ανάπτυξη αντοχής στο συνδυασμό σουλφαδοξίνης-πυριμεθαμίνης συνιστά ιδιαίτερο πρόβλημα για τις χώρες της Αφρικής, γιατί ο συνδυασμός αυτός αποτελεί το τελευταίο διαθέσιμο οικονομικά προσιτό ανθελονοσιακό φάρμακο.

Ένας εναλλακτικός συνδυασμός αναστολέων του φυλλικού οξέος, αυτός της χλωροπρογουανίλης με τη διαφόνη, δοκιμάζεται τώρα στην κλινική πράξη. Ο συνδυασμός αυτός είναι προς το παρόν δραστικός έναντι των ανθεκτικών στο συνδυασμό πυριμεθαμίνης-σουλφαδοξίνης στελεχών, είναι όμως άγνωστη η πιθανή επίδραση που θα έχει στη δραστηριότητά του μελλοντικά η συνεχιζόμενη συσσώρευση μεταλλαγών στα γονίδια των DHFR και DHPS.<sup>51,52</sup>

### 2.3. Αρτεμισινίνη και παράγωγα

**2.3.1. Κλινική εφαρμογή.** Η αρτεμισινίνη απομονώθηκε από την *Artemisia annua* (Qinghaosu), ένα βότανο που χρησιμοποιείται στην αρχαία κινεζική Ιατρική. Αποτελεί, μαζί με τα παράγωγά της, τη διυδροαρτεμισινίνη (DHA), εστέρες και αιθέρες (artesunate, artemether και arteether), μια νέα τάξη ανθελονοσιακών φαρμάκων, με ισχυρή δραστηριότητα έναντι του *P. falciparum* και αποτελεσματικότητα στη θεραπεία της μη επιπλεγμένης αλλά και της βαριάς ελονοσίας. Χαρακτηριστικό των φαρμάκων αυτών είναι η ταχεία καταστροφή των παρασίτων και η συνεπακόλουθη γρήγορη μείωση της παρασιταϊμίας. Επιπλέον, δρουν έναντι των γαμετοκυττάρων του πλασμοδίου, μειώνοντας έτσι τη μεταδοτικότητα της νόσου. Έχουν μικρό χρόνο ημίσειας ζωής. Στη μη επιπλεγμένη ελονοσία χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με ένα ανθελονοσιακό μακράς δράσης, όπως π.χ. ο συνδυασμός σουλφαδοξίνης-πυριμεθαμίνης. Στη βαριά ελονοσία, τα παράγωγα της αρτεμισινίνης, χορηγούμενα παρεντερικά, έχουν την ίδια αποτελεσματικότητα με την κινίνη και, επιπλέον, είναι απλούστερα στη χρήση. Είναι καλά ανεκτά από ενήλικες και παιδιά και προς το παρόν δεν υπάρχουν στην κλινική πράξη στοιχεία για σοβαρή τοξικότητα. Ένα ακόμη πλεονέκτημα της χρησιμοποίησης συνδυασμών φαρμάκων που περιλαμβάνουν τα παράγωγα της αρτεμισινίνης φαίνεται να είναι η ελάττωση του αριθμού των γαμετοκυττάρων στην κυκλοφορία των υπό θεραπεία ασθενών.<sup>53,54</sup>

**2.3.2. Μηχανισμός δράσης.** Η αρτεμισινίνη και τα παράγωγά της περιέχουν σταθερές γέφυρες ενδοϋπεροξει-

δίου. Ένας πιθανός μηχανισμός δράσης, σε δύο φάσεις, προτάθηκε πρόσφατα από τους Meshnick et al.<sup>55</sup> Υποτίθεται ότι σε πρώτη φάση η γέφυρα ενδοϋπεροξειδίου του φαρμάκου διασπάται από την ελεύθερη αίμη ή το σίδηρο, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ασταθούς ελεύθερης ρίζας. Η ρίζα αυτή, στη συνέχεια, αλκυλιώνει εκλεκτικά βασικές πρωτεΐνες του παρασίτου, με αποτέλεσμα απόλεια της λειτουργίας τους και θάνατο του παρασίτου.<sup>56</sup>

Τα φάρμακα αυτής της κατηγορίας εξασκούν ταχέως την ανθελονοσιακή τους δράση (εντός μίας ώρας από τη χορήγησή τους) και στρέφονται κυρίως εναντίον των ώριμων μορφών ζωής του παρασίτου (ώριμοι τροφοζώιτες και σχιστά), που εμπεριέχουν μεγάλες ποσότητες αιμοζώνης.

Βάσει των υπάρχοντων δεδομένων, για την αρτεμισινίνη προτείνεται πολλαπλός μηχανισμός δράσης, που περιλαμβάνει:

- Την γενικά αποδεκτή αλκυλιωτική δράση
- Την αναστολή της διάσπασης της αιμοσφαιρίνης, αλλά και αναστολή του πολυμερισμού της αίμης
- Την αλληλεπίδραση της αρτεμισινίνης με την αιμοζώνη, που ήδη υπάρχει στο φαγόσωμα του πλασμοδίου, η οποία οδηγεί σε απελευθέρωση αίμης και δημιουργία μιας δεξαμενής ελεύθερης αίμης.<sup>57</sup>

Ο μηχανισμός δράσης της αρτεμισινίνης και των παραγώγων της δεν έχει ακόμη πλήρως αποσαφηνιστεί. Προς το παρόν, υπάρχει γενική συμφωνία για τη συμμετοχή ελευθέρων ριζών, ο σχηματισμός των οποίων σχετίζεται με αλληλεπίδραση των φαρμάκων με το μόριο της αίμης. Ο μηχανισμός με τον οποίο οι ελεύθερες ρίζες οδηγούν το παράσιτο στο θάνατο, αποτελεί ένα άλλο αντικείμενο διαφωνίας. Μεταξύ των παρασιτικών πρωτεϊνών-στόχων, που αλκυλιώνονται από την αρτεμισινίνη, απομονώθηκε η πρωτεΐνη TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein homolog). Προς το παρόν, δεν είναι γνωστό εάν η αλκυλίωση της TCTP σχετίζεται με το θάνατο του παρασίτου ούτε ποια μπορεί να είναι η σχέση της με τον πραγματικό στόχο του φαρμάκου σε περίπτωση που η TCTP δεν αποτελεί η ίδια το στόχο της αρτεμισινίνης.<sup>58</sup>

**2.3.3. Μηχανισμός αντοχής στα παράγωγα της αρτεμισινίνης.** Δεν έχει αναφερθεί ακόμα αντοχή του πλασμοδίου στα παράγωγα της αρτεμισινίνης, παρόλο που η ευαισθησία στελεχών του *P. falciparum* στα φάρμακα αυτά ποικίλλει *in vitro*.<sup>59</sup> Λόγω της εκτεταμένης χρήσης τους, πιστεύεται ότι η ανάπτυξη αντοχής στα φάρμακα αυτά είναι θέμα χρόνου. Με βάση μελέτες σε ανθεκτικά πλασμοδία ελονοσίας ζώων (*Plasmodium yoelii*), ως πι-



θανοί μηχανισμοί αντοχής προτείνονται η ελαττωμένη πρόσληψη του φαρμάκου και η μεταβολή στην έκφραση της πρωτεΐνης TCTP.

**2.3.4. Κλινική θεώρηση.** Η αρτεμισινίνη και τα παράγωγά της έχουν μικρό χρόνο ημίσειας ζωής, με αποτέλεσμα να εκθέτουν τα παράσιτα σε υποθεραπευτικές δόσεις και, συνεπώς, σε πίεση επιλογής για χρονικό διάστημα της τάξης των λίγων ωρών. Στη θεραπεία της ελονοσίας, η αρτεμισινίνη και τα παράγωγά της χρησιμοποιούνται συνήθως σε συνδυασμό με άλλα ανθελονοσιακά φάρμακα. Στην κλινική πράξη έχουν εφαρμοστεί διάφοροι συνδυασμοί, απομένει όμως ακόμη να αποφασιστεί ποιο είναι το καταλληλότερο φάρμακο για συνδυασμό με τα παράγωγα της αρτεμισινίνης. Πρόσφατες *in vitro* μελέτες υποστηρίζουν ότι ο συνδυασμός μεφλοκίνης-αρτεμισινίνης έχει συνεργική δράση, ο συνδυασμός πυριμεθαμίνης-αρτεμισινίνης εμφανίζει ήπιο ανταγωνισμό, ενώ ο συνδυασμός χλωροκίνης-αρτεμισινίνης μπορεί να είναι συνεργικός ή ανταγωνιστικός, ανάλογα με το μελετώμενο στέλεχος.<sup>60</sup> Υπάρχουν, εξάλλου, στοιχεία για πιθανή διασταυρούμενη αντοχή μεταξύ μεφλοκίνης και παραγώγων της αρτεμισινίνης.<sup>61</sup>

### 3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΩΔΙΟΥ

Για το *P. falciparum*, έχει επιτευχθεί *in vitro* καλλιέργεια.<sup>15</sup> Συνεπώς, ο έλεγχος της ευαισθησίας μπορεί να γίνει *in vitro*, χρησιμοποιώντας συγχρονισμένες καλλιέργειες του παρασίτου, που αναπτύσσονται σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του φαρμάκου. Η επιβίωση των παρασίτων ελέγχεται με την παρακολούθηση της ενσωμάτωσης στα κύτταρά τους κάποιου ραδιοσημασμένου μεταβολίτη.<sup>62,63</sup>

Πρόσφατα, διαπιστώθηκε ότι η μεταλλαγή του *pfcr1* γονιδίου, που οδηγεί σε αντικατάσταση της θρεονίνης από λυσίνη στη θέση 76 (K76T), σχετίζεται με την ανάπτυξη αντοχής στη χλωροκίνη μετά τη θεραπεία. Για την ανίχνευση και μελέτη αυτής και άλλων μεταλλαγών του *pfcr1*, αλλά και του *pfmdr1* γονιδίου, χρησιμοποιούνται η PCR ακολουθούμενη από περιοριστική πέψη του DNA, ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων του DNA, η microsatellite analysis, ο υβριδισμός με DNA ανιχνευτές και άλλες μοριακές τεχνικές. Η K76T μεταλλαγή του *pfcr1* γονιδίου μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την παρακολούθηση της ανθεκτικής στη χλωροκίνη ελονοσίας από *P. falciparum*. Προκειμένου όμως να καταστεί δυνατή η πρόβλεψη της *in vivo* αντοχής στους ημίανοσους πληθυσμούς των ενδημικών περιοχών, απαιτείται καλύτερη κατανόηση εκείνων των ανοσοολογικών

παραγόντων του ξενιστή, που βοηθούν στην κάθαρση ακόμη και ανθεκτικών παρασίτων.<sup>63</sup>

Το *P. vivax* δεν καλλιεργείται *in vitro*. Έτσι, η μελέτη της αντοχής του στη χλωροκίνη γίνεται με βάση κλινικές παρατηρήσεις και μελέτες της ελονοσίας των ζώων, που προκαλούνται από συγγενή του *P. vivax* πλασμώδια.<sup>40</sup>

### 4. ΝΕΟΤΕΡΑ ΦΑΡΜΑΚΑ ΓΙΑ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΛΗΨΗ ΤΗΣ ΕΛΟΝΟΣΙΑΣ

#### 4.1. Ατοβακόνη-Προγουανίλη (Malarone)

Η ατοβακόνη (atovaquone) είναι μια υδροξυναφθοκινόνη, που δρα αναστέλλοντας τη μεταφορά των ηλεκτρονίων στο μιτοχόνδριο του πλασμωδίου. Αν το φάρμακο χρησιμοποιηθεί ως μονοθεραπεία, αναπτύσσεται ταχύτητα σε αυτό αντοχή. Παρατηρήθηκε ότι η ατοβακόνη *in vitro* εμφανίζει ανταγωνισμό με τα παράγωγα των κινολινών και της αρτεμισινίνης, ενώ δρα συνεργικά με την προγουανίλη. Ο συνδυασμός ατοβακόνης-προγουανίλης παραμένει δραστικός, ακόμη και εάν υπάρχει αντοχή του πλασμωδίου στην προγουανίλη. Το Malarone® είναι συνδυασμός 250 mg ατοβακόνης με 100 mg προγουανίλη.

Αποτελεί πλέον μια από τις συνιστώμενες από το CDC επιλογές για τη θεραπεία της μη επιπλεγμένης ελονοσίας από *P. falciparum* ανθεκτικό στη χλωροκίνη. Την άλλη επιλογή αποτελεί η κίνινη σε συνδυασμό με τετρακυκλίνη, δοξυκυκλίνη ή σουλφαδοξίνη-πυριμεθαμίνη.

Αποτελεί επίσης θεραπεία εκλογής για ταξιδιώτες σε περιοχές με αντοχή του *P. falciparum* στη σουλφαδοξίνη-πυριμεθαμίνη, όπως:

- Τη λεκάνη του Αμαζονίου στη Ν. Αμερική
- Τη ΝΑ Ασία
- Τις χώρες της Ανατολικής και Νότιας Αφρικής (Κένυα, Μαλάουι, Μοζαμβίκη, Τανζανία, Ουγκάντα, Ν. Αφρική).

Τέλος, το Malarone® αποτελεί μια από τις τρεις συνιστώμενες επιλογές για προφύλαξη σε περιοχές όπου ενδημεί η ελονοσία από *P. falciparum* ανθεκτικό στη χλωροκίνη. Οι άλλες δύο επιλογές είναι η μεφλοκίνη και η δοξυκυκλίνη.

Δεν υπάρχουν αρκετά στοιχεία για την αποτελεσματικότητα του Malarone® στη θεραπεία των άλλων ειδών του πλασμωδίου.<sup>64</sup>

#### 4.2. Παράγωγα πριμακίνης (ταφενοκίνη)

Η ταφενοκίνη είναι ανάλογο της πριμακίνης με μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής (2–3 εβδομάδες). Είναι δραστική έναντι των ηπατοκυτταρικών και των ερυθροκυτταρι-

κών μορφών του παρασίτου και σε μελέτες χημειοπροφύλαξης σε πειραματόζωα αποδείχθηκε 10 φορές περίπου δραστικότερη της πριμακίνης. Λόγω του μεγάλου χρόνου ημίσειας ζωής της, η ταφενοκίνη μπορεί να παρέχει αποτελεσματική προφύλαξη για περίπου ένα μήνα μετά από 3 δόσεις, που χορηγούνται μέσα σε 3 ημέρες. Η κινητική της ίσως δώσει λύση στο μεγαλύτερο πρόβλημα της χημειοπροφύλαξης της ελονοσίας, εκείνο της συμμόρφωσης στη φαρμακευτική αγωγή. Όπως και η πριμακίνη, αντενδείκνυται σε άτομα με έλλειψη G-6-PD. Προς το παρόν, δεν χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη.<sup>65</sup>

### 4.3. Αζιθρομυκίνη

Το αντιβιοτικό αζιθρομυκίνη προφυλάσσει αποτελεσματικά από το *P. vivax* (>90%). Ωστόσο, η αποτελεσμα-

τικότητα της έναντι του *P. falciparum* (70–83%) θεωρείται περιορισμένη. Συνεπώς, δεν συνιστάται η χρήση της ως μοναδικού φαρμάκου για τη χημειοπροφύλαξη έναντι της ελονοσίας από *P. falciparum*.<sup>66</sup> Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι συνδυασμοί της αζιθρομυκίνης με άλλα ανθελονοσιακά φάρμακα, όπως η κλωροκίνη και η κινίνη, έχουν συνεργική δράση και ίσως θα έπρεπε να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητά τους στη θεραπεία και τη χημειοπροφύλαξη της ελονοσίας.<sup>67</sup>

### ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

*Ευχαριστούμε το Γραφείο Επιδημιολογικής Καταγραφής και Παρέμβασης του Κέντρου Ελέγχου Ειδικών Λοιμώξεων για τα επιδημιολογικά στοιχεία.*

### ABSTRACT

#### Antimalarial drugs

E.T. PIPERAKI, N.I. LEGAKIS

*Department of Microbiology, University of Athens, Athens, Greece*

*Archives of Hellenic Medicine 2003, 20(4):344–355*

In a recent World Health Organization report, malaria ranks fifth in terms of numbers of deaths due to infectious diseases, with almost one million deaths annually, mainly in Africa. Following a brief overview of the biology and epidemiology of malaria, three main groups of antimalarial drugs in current use are reviewed: quinoline antimalarials, folate synthesis inhibitors and artemisinin derivatives. Based on recent bibliography on antimalarial chemotherapy, an analysis is made of current opinions on mechanisms of action and of *P. falciparum* resistance to these drug groups. Reference is made to the methods used to assess *Plasmodium* drug resistance and to the antimalarial drugs which are currently used or which may be available in the future.

**Key words:** Antimalarial drugs, Malaria, Resistance

### Βιβλιογραφία

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Health Organization report on infectious diseases, removing obstacles to healthy development. WHO, Geneva, 1999
2. FRANCIS SE, SULLIVAN DJ, GOLDBERG GE. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol* 1997, 51:97–123
3. TYAS L, MOON RP, LOETSCHER H. Plasmepsins I and II from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Adv Exp Med Biol* 1998, 436:407–411
4. WERNSDORFER WH, MCGREGOR I. *Malaria: principles and practice of malariology*. Churchill-Livingstone, Edinburgh, 1998
5. MANDEL GL, BENNETT JE, DOUGLAS G, DOLIN R (eds). *Principles and practice of infectious diseases*. 4th ed. Churchill-Livingstone, 1995
6. OLLIARO PL, YUTHAVONG Y. An overview of chemotherapeutic targets for antimalarial drug discovery. *Pharmacol Ther* 1999, 81:91–110
7. BLACK RH, CANFIELD CJ, CLYDE DF, PETERS W, WERNSDORFER WH. In: Bruce-Chewatt LJ (ed) *Chemotherapy of malaria*. WHO, Geneva, 1981
8. FU S, XIAO SX. Pyronaridone: a new antimalarial drug. *Parasitol Today* 1991, 7:310–313
9. RINGWALD P, BICKH J, BASCO L. Randomised trial of pyronaridine versus chloroquine for acute uncomplicated falciparum malaria in Africa. *Lancet* 1996, 347:24–28
10. RINGWALD P, BICKH J, BASCO L. Efficacy of oral pyronaridine for the treatment of acute uncomplicated falciparum malaria in African children. *Clin Infect Dis* 1998, 26:946–953

11. WINSTANLEY PA, BRECKENRIDGE AM. Currently important anti-malarial drugs. *Ann Trop Med Parasitol* 1987, 81:619–627
12. VENNERSTROM JL, NUZUM EO, MILLER RE, DORN A, GERENA L, DANDE PA ET AL. 8-aminoquinolines active against blood stage *Plasmodium falciparum* *in vitro* inhibit haematin polymerization. *Antimicrob Agents Chemother* 1999, 43:598–602
13. PETERS W, ROBINSON BL. The chemotherapy of rodent malaria LVIII. Drug combinations to impede the selection of drug resistance, part 2: the new generation artemisinin or artesunate with long-acting blood schizontocides. *Ann Trop Med Parasitol* 2000, 94:23–35
14. EGAN TJ. Quinoline antimalarials. *Expert Opin Ther Targets* 2001, 11:185–209
15. TRAGER W, JENSEN JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976, 193:673–675
16. AIKAWA M, SCHWARTZ A, UNI S, NUSSENZWEIG R, HOLLINGDALE M. Ultrastructure of *in vitro* cultured exoerythrocytic stage of *Plasmodium berghei* in a hepatoma cell line. *Am J Trop Med Hyg* 1984, 33:792–799
17. PARKER PS, IRVIN JL. The interaction of chloroquine with nucleic acids and nucleoproteins. *J Biol Chem* 1952, 199:897–909
18. SURIOLA N, PADMANABAN G. Chloroquine inhibits hemodependent protein synthesis in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88:4786–4790
19. KONIGK E, MIRTSCH S, PUTFARKEN B, ABDEL-RASOUL S. *Plasmodium chabaudi* infection in mice: effects of chloroquine and mefloquine. Inhibition of ornithine decarboxylase activity. *Trop Parasitol* 1981, 32:73–76
20. SLATER AFG. Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol Ther* 1993, 57:203–235
21. JACOBS GH, AIKAWA M, MILHOUS WK, RABBEGE JR. An ultrastructural study of the effects of mefloquine on malaria parasites. *Am J Trop Med Hyg* 1987, 36:9–14
22. OLLIARO P, CASTELLI F, CALIGARIS S, DRUIHE P, CAROSI G. Ultrastructure of *Plasmodium falciparum* *in vitro*. II. Morphological patterns of different quinolines' effects. *Microbiologia* 1989, 12:15–18
23. HOMEGOOD CA, WARHURST DC, PETERS W, BAGGALEY VC. Lysosomes, pH, and the antimalarial action of chloroquine. *Nature* 1972, 235:50–52
24. GINSBURG H, KRUGLIAK M. Quinoline-containing antimalarials – mode of action, drug resistance and its reversal. *Biochem Pharmacol* 1992, 43:63–70
25. GYANG FN, POOLE B, TRAGER W. Peptidases from *Plasmodium falciparum* cultured *in vitro*. *Mol Biochem Parasitol* 1982, 5:263–273
26. COHEN SN, PHIFER KO, YIELDING KL. Complex formation between chloroquine and ferrihaemic acid *in vitro* and its effects on the antimalarial action of chloroquine. *Nature* 1964, 202:805–806
27. CHOU AC, CHEVLI R, FITCH CD. Ferriprotoporphyrin IX fulfills the criteria for identification as the chloroquine receptor of malaria parasites. *Biochemistry* 1980, 19:1543–1549
28. RIDLEY RG, HUDSON AT. Quinoline antimalarials. *Expert Opin Ther Targets* 1998, 8:121–136
29. FIDOCK DA, NOMURA T, TALLEY AK, COOPER RA, DZEKUNOV SM, FERDING MT ET AL. Mutations in the *Plasmodium falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* 2000, 6:861–871
30. BRAY PG, MUNGTIN M, RIDLEY RG, WARD SA. Access to heme: the basis of chloroquine resistance. *Mol Pharmacol* 1998, 54:170–179
31. BRAY PG, JANNEH O, RAYNES K, MUNGTIN M, GINSBURG H, WARD SA. Cellular uptake of chloroquine is dependent on binding to ferriprotoporphyrin IX and is independent of NHE activity in *Plasmodium falciparum*. *J Cell Biol* 1999, 145:363–376
32. RIECKMAN KH, DAVIS DR, HUTTON DC. *P. vivax* resistant to chloroquine? *Lancet* 1989, ii:1183–1184
33. BAIRD JK, BASRI H, PURNOMO, BANGS MJ, SUBIANTO B, PATCHEN LC ET AL. Resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax* in Irian Jaya, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* 1991, 44:547–552
34. SCHWARTZ IK, LACKRITZ EM, PATCHEN LC. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* in Indonesia (letter). *N Engl J Med* 1991, 324:927
35. MURPHY GS, BASRI H, PURNOMO, ANDERSEN EM, BANGS MJ, MOUNT DL ET AL. Vivax malaria resistant to treatment and prophylaxis with chloroquine. *Lancet* 1993, 341:96–100
36. DUA VK, KAR PK, SHARMA VP. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* malaria in India. *Trop Med Int Health* 1996, 1:816–819
37. MARLAR T, MYAT PK, AYE YS, KHAING KG, MA S, MYINT O. Development of resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax* in Myanmar. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995, 89:307–308
38. PHILLIPS EJ, KEYSTONE JS, KAIN KC. Failure of combined chloroquine and high-dose primaquine therapy for *Plasmodium vivax* malaria acquired in Guyana, South America. *Clin Infect Dis* 1996, 23:1171–1173
39. ALECRIM MG, ALECRIM W, MACEDO V. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999, 32:67–68
40. TAKASHI N, CARLTON JMR, BAIRD JK, DEL PORTILLO HA, FRYAUFF DJ, FIDOCK DA ET AL. Evidence for different mechanisms of chloroquine resistance in 2 *Plasmodium* species that cause human malaria. *J Infect Dis* 2001, 183:1653–1661
41. GOLEND A CF, LI J, ROSENBERG R. Continuous *in vitro* propagation of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:6786–6791
42. HARDMAN JG, LIMBIRD LE, MOLINOFF PB, RUDDON RW, GOODMAN-GILMAN (eds). *The pharmacological basis of therapeutics* (CD-ROM). 9th ed. McGraw Hill, Ryerson Ltd, Whiby, Ontario, 1996
43. WATKINS WM, MOSOBO M. Treatment of *Plasmodium falciparum* malaria with pyrimethamine-sulfadoxine: selective pressure for resistance is a function of long elimination life. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993, 87:75–78
44. BASCO LK, ELDIN DE PECOULAS P, WILSON CM, LE BRAS J, MAZABRAUD A. Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidilate synthase gene and pyrimethamine and cycloguanil resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1995, 69:135–138
45. COWMAN AF, MORRY MJ, BIGGS BA, CROSS GA, FOOTE SJ. Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidilate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85:9109–9113

46. KHAN B, OMAR S, KANYARA JN, WARREN-PERRY M, NYALWIDHE J, PETERSON DS ET AL. Antifolate drug resistance and point mutations in *Plasmodium falciparum* in Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997, 91:456–460
47. SNEWIN VA, ENGLAND SM, SIMS PF, HYDE JE. Characterization of the dihydrofolate reductase-thymidilate synthase gene from human malaria parasites highly resistant to pyrimethamine. *Gene* 1989, 76:41–52
48. TRIGLIA T, MENTING JG, WILSON C, COWMAN AF. Mutations in dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:13944–13949
49. KUN J, LEHMAN L, LELL B, SCHMIDT-OTT R, KREMSNER P. Low dose treatment with sulfadoxine-pyrimethamine combinations selects for drug-resistant *Plasmodium falciparum* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1999, 43:2205–2208
50. WANG P, LEE CS, BAYOUMI R, DJIMDE A, DOUMBO O, SWEDBERG G ET AL. Resistance to antifolates in *Plasmodium falciparum* monitored by sequence analysis of dihydropteroate synthetase and dihydrofolate reductase alleles in a large number of field samples from diverse origins. *Mol Biochem Parasitol* 1997, 89:161–177
51. CURTIS J, DURAISINGH MT, WALHURST DC. *In vivo* selection for a specific genotype of dihydropteroate synthetase of *Plasmodium falciparum* by pyrimethamine-sulfadoxine but not chlorproguanil-dapsone treatment. *J Infect Dis* 1998, 177:1429–1433
52. NZILA AM, MBERU EK, SULO J, DAYO PA, WINSTANLEY PA, SIBLEY CH ET AL. Towards an understanding of the mechanism of pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: Genotyping of dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of Kenyan parasites. *Antimicrob Agents Chemother* 2000, 44:991–996
53. PRICE RN. Artemisinin drugs: novel antimalarial agents. *Expert Opin Invest Drugs* 2000, 9:1815–1827
54. BLOLAND P, ETTLLING M, MEEK S. Combination therapy for malaria in Africa: hype or hope? *Bull World Health Organ* 2000, 78:1378–1388
55. MESHNICK SR, TAYLOR TE, KAMCHONWONGPAISAN P. Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. *Microbiol Rev* 1996, 60:301–315
56. YANG YZ, ASAWAMAHASAKDA W, MESHNICK SR. Alkylation of human albumin by the antimalarial artemisinin. *Biochem Pharmacol* 1993, 46:336–339
57. HONG YL, YANG YZ, MESHNICK SR. The interaction of artemisinin with malarial hemozoin. *Mol Biochem Parasitol* 1994, 63:121–128
58. BHISUTTHIBHAN J, PAN XQ, HOSSLER PA, WALKER DJ, YOWELL CA, CARLTON J ET AL. The *Plasmodium falciparum* translationally controlled tumor protein homolog and its reaction with the antimalarial drug artemisinin. *J Biol Chem* 1998, 273:16192–16198
59. WONGSRICHANALAI C, NGUYEN TD, TRIEU NT, WIMONWATTRA-WATEE T, SOOKTO P, HEPPNER DG ET AL. *In vitro* susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates in Vietnam to artemisinin derivatives and other antimalarials. *Acta Trop* 1997, 63:151–158
60. FIVELMAN QL, WALDEN JC, SMITH PJ, FOLB PI, BARNES KL. The effect of artesunate combined with standard antimalarials against chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant strains of *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999, 93:429–432
61. WONGSRICHANALAI C, WIMONWATTRA-WATEE T, SOOKTO P, LAO-BOONCHAI A, HEPPNER DG, KYLE DE ET AL. *In vitro* sensitivity of *Plasmodium falciparum* to artesunate in Thailand. *Bull World Health Organ* 1999, 77:392–398
62. DESJARDINS RE, CANFIELD CJ, HAYNES JD, CHULAY JD. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother* 1979, 16:710–718
63. ABDOULAYE D, PHARM D, OGOBARA K, CORTESE JF, KASSOUM KAYENTAO, SAFI DOUMBO ET AL. A molecular marker for chloroquine resistant falciparum malaria. *N Engl J Med* 2001, 344:257–226
64. <http://www.cdc.gov/travel/diseases/malaria>
65. SHANKS GD, KAIN K, KEYSTONE J. Malaria chemoprophylaxis in the age of drug resistance. II. Drugs that may be available in the future. *Clin Infect Dis* 2001, 33:381–385
66. SHANKS GD, KAIN K, KEYSTONE J. Malaria chemoprophylaxis in the age of drug resistance. I. Currently recommended drug. *Infect Dis Clin North Am* 2001, 33:226–234
67. OHRT C, WILLINGMYRE GD, LEE P, KNIRSCH C, MILHOUS W. Assessment of azithromycin in combination with other antimalarial drugs against *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002, 46:2518–2524

*Corresponding author:*

E.T. Piperaki, 84 Ag. Ioannou Theologou street, GR-157 73 Athens, Greece  
e-mail: vagge71@yahoo.com