



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
ΜΠΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση

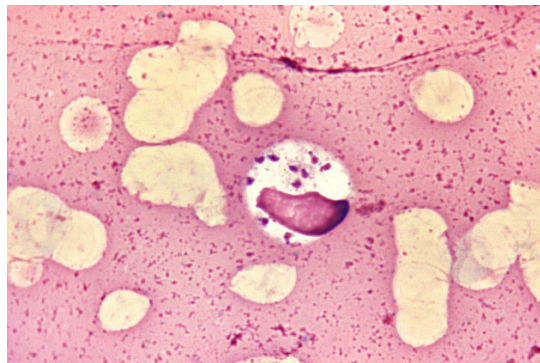


ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη μοριακών φαρμακευτικών στόχων του μακροφά-
γου για τη θεραπεία της λείσμανιάσης**

POST GRADUATE THESIS

**Study of molecular drug targets of the macrophage for the treatment of
leishmaniasis**



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΠΙΤΣΙΑΣ

KONSTANTINOS PITSIAS

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Χρυσάνθη Βογιατζάκη

Chrysanthi Vogiatzaki

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2024



Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences
Postgraduate program:
Biomedical methods and technology in diagnosis



POST GRADUATE THESIS

Study of molecular drug targets of the macrophage for the treatment of leishmaniasis

PITSIAS KONSTANTINOS

dml20047

dml2004@uniwa.gr

pitsiaskonstantinos@yahoo.gr

FIRST SUPERVISOR

Chrysanthi Vogiatzaki

SECOND SUPERVISOR

Despina Smyrli

AIGALEO 2024

Επιτροπή εξέτασης

Ημερομηνία εξέτασης: 10 Φεβρουαρίου 2024

	Ονόματα εξεταστών	Υπογραφή
1 ^{ος} Εξεταστής	Χρυσάνθη Βογιατζάκη	
2 ^{ος} Εξεταστής	Δέσποινα Σμυρλή	

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Πίτσιας Κωνσταντίνος του Γεωργίου, με αριθμό μητρώου dml20047 φοιτητής του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βοϊατρικές μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο Δηλών

Πίτσιας Κωνσταντίνος



Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την αγαπημένη μου οικογένεια και τους φίλους μου που με στηρίξαν στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά τις επιβλέπουσες κα. Σμυρλή Δέσποινα, Κύρια Ερευνήτρια Μοριακής Παρασιτολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ και την κτηνίατρο κα. Βογιατζάκη Χρύσα, Επίκουρο Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, καθώς και τον υποψήφιο διδάκτορα του πανεπιστημίου Alcala de Henares της Ισπανίας κ. Daniel Carrasco Navarro. Η διδασκαλία τους, η καθοδήγηση, οι πολύτιμες συμβουλές τους και η ειλικρινής τους υποστήριξη υπήρξε πολύτιμη.

Αφιέρωσεις

«Η σκέψη ενώνει, η χωρίζει η απόσταση»

Περίληψη

Εισαγωγή: Η λεισμανίαση περιλαμβάνει μια ομάδα νοσημάτων που προκαλούνται από το πρωτόζωο παράσιτο του γένους *Leishmania* και μεταδίδεται με το νύγμα μολυσμένων θηλυκών φλεβοτόμων. Οι κλινικές εκδηλώσεις της λεισμανίασης, οι οποίες σχετίζονται άμεσα με το είδος του παρασίτου, κυμαίνονται από απειλητικές για τη ζωή σπλαχνικές μορφές έως αυτοθεραπευόμενες δερματικές βλάβες. Το παράσιτο μέσα στον τελικό ξενιστή θηλαστικό ζει και πολλαπλασιάζεται στο φαγολυσόσωμα των μακροφάγων. Τα μακροφάγα αποτελούν σημαντικά κύτταρα της έμφυτης ανοσίας τα οποία συμβάλλουν σημαντικά στην επίκτητη ανοσία. Ο τρόπος της ενεργοποίησής τους από το παράσιτο, καθορίζει το αποτέλεσμα της νόσου. Σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση παρασίτου - μακροφάγου εκτελούν πρωτεϊνικές κινάσες, οι οποίες ελέγχουν μονοπάτια φωσφορυλίωσης. Προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο Μοριακής Παρασιτολογίας, έδειξαν ότι τα επίπεδα των κινασών DYRK1A και DYRK1B, αυξάνονται σε μακροφάγα που μολύνονται με το πρωτόζωο *Leishmania*. Στους ανθρώπους οι κινάσες DYRK1A και DYRK1B δρουν «πλειοτροπικά» και λαμβάνουν μέρος σε πολλά κυτταρικά μονοπάτια, φωσφορυλιώνοντας ένα ευρύ σύνολο πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε πολλές διαφορετικές κυτταρικές διεργασίες όπως στον κυτταρικό κύκλο, στο μάτισμα του RNA, στον έλεγχο μεταγραφικών παραγόντων, στη ρύθμιση της διαδικασίας προσθήκης ουβικουιτίνης σε μια πρωτεΐνη. Παρά όλα αυτά, ο ρόλος αυτών των κινασών στο ανοσοποιητικό σύστημα και στη λειτουργία των μακροφάγων δεν είναι ιδιαίτερα γνωστός.

Σκοπός: Η εργασία αυτή είχε ως σκοπό τη διερεύνηση της συσχέτισης της λειτουργίας των μακροφάγων με τα επίπεδα έκφρασης των κινασών DYRK1A και DYRK1B καθώς και τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μακροφάγων, μολυσμένων με *Leishmania*, στα οποία έχει ανασταλεί η λειτουργία των DYRK1 κινασών. Η συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Παρασιτολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ.

Μέθοδος: Μακροφάγα J774, τα οποία είχαν προεπαστεί με χαρμίνη, αναστολέα των κινασών DYRK1A και DYRK1B, μολύνθηκαν *in vitro* με προμαστιγωτές μορφές *Leishmania donovani complex* και ακολούθως εξετάστηκαν με κυτταρομετρία ροής (FACS), συνεστιακή μικροσκοπία και μέθοδο μελέτης βιωσιμότητας (Alamar blue). Εφαρμόστηκε η ανάλυση με FACS και η ανάλυση qPCR σε πραγματικό χρόνο με σκοπό τη διερεύνηση της έκφρασης συγκεκριμένων δεικτών πόλωσης των μολυσμένων με *Leishmania* μακροφάγων, με προσθήκη του αναστολέα των κινασών DYRK1 χαρμίνης.

Αποτελέσματα: Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα παράσιτα *Leishmania* εισέρχονται καλύτερα στα μακροφάγα J774.1 μετά τη προσθήκη της χαρμίνης. Φαίνεται ότι η χαρμίνη, εν μέρει αναστέλλει την ενεργοποίηση των μολυσμένων με το πρωτόζωο *Leishmania*, μακροφάγων.

Συμπεράσματα: Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι οι κινάσες DYRK1A ή και DYRK1B, μπορεί να εμπλέκονται ενεργά στον έλεγχο της φαγοκυττάρωσης του παρασίτου και στην ενεργοποίηση των

μακροφάγων. Περισσότερα πειράματα χρειάζονται με ειδικούς αναστολείς των DYRK1A και DYRK1B καθώς και γενετική αποσιώπησή τους, για να διερευνηθεί σε βάθος ο ρόλος των κινασών DYRK στη λειτουργία των μακροφάγων και στην αλληλεπίδρασή τους με τα παράσιτα *Leishmania*.

Λέξεις κλειδιά: Σύμπλεγμα *Leishmania donovani*, DYRK, χαρμίνη, μακροφάγο.

Abstract

Introduction: Leishmaniasis comprises a group of diseases caused by protozoan parasites belonging to the genus *Leishmania* and transmitted by the bite of female sandflies. These diseases range from life-threatening (visceral forms) to self-healing (skin lesions) and any manifestation of the disease can develop into complications and spread of the parasites to the skin or mucosal tissue. The parasite within the xenograft lives and multiplies in the endosome of macrophages. Macrophages are important cells of innate immunity and contribute significantly to acquired immunity. The way they are activated by the parasite determines the outcome of the disease. Protein kinases that control phosphorylation pathways play an important role in the interaction between the parasite and the macrophage. Previous studies in the Molecular Parasitology Laboratory have shown that the levels of DYRK1A and DYRK1B kinases increase when macrophages are infected with *Leishmania*. In humans, these kinases act "pleiotropically" and take part in many cellular pathways by phosphorylating a wide set of proteins involved in many different cellular processes such as the cell cycle, RNA splicing, transcription factor control, regulation of ubiquitination. Nevertheless, the role of these kinases in the immune system and in macrophage function is not well understood.

Purpose: The aim of this work is to correlate macrophage function with DYRK1A and DYRK1B kinases and the interaction of macrophages with inhibited DYRK1 kinase function with *Leishmania* parasites. This specific work was carried out at the Hellenic Pasteur Institute.

Method: *In vitro* infections of J774.1 macrophages pretreated with harmine analysed by flow cytometry (FACS), confocal microscopy and viability studies (alamar blue). FACS analysis and real time qPCR analysis was used to investigate the expression of specific markers of macrophage polarization.

Results: Our results show that the *Leishmania* parasites are phagocytosed better after the administration of the harmine. Our results also show that macrophage pretreatment with harmine partially inhibits the alternative activation of macrophages by *Leishmania* promastigote infection.

Discussion: Our conclusions are indicative that the DYRK1A or DYRK1B kinases may be actively involved in the control of the phagocytosis of the parasite, and in the activation of macrophages. More experiments are needed with specific inhibitors of DYRK1A and DYRK1B as well as its genetic silencing, to investigate in depth the role of DYRK kinases in macrophage function and in their interaction with *Leishmania* parasites.

Key words: *Leishmania donovani* complex, DYRK, harmine, macrophages

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<i>Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας</i>	<i>iii</i>
<i>Αφιερώσεις</i>	<i>v</i>
<i>Περίληψη</i>	<i>vi</i>
<i>Abstract</i>	<i>viii</i>
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	<i>ix</i>
<i>Συνομογραφίες</i>	<i>xii</i>
<i>Πρόλογος</i>	<i>1</i>
<i>Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή</i>	<i>2</i>
<i>1.1. Λείσμανίαση</i>	<i>2</i>
<i>1.2. Μορφές του πρωτοζώου <i>Leishmania</i></i>	<i>2</i>
<i>1.3. Κύκλος ζωής της <i>Leishmania</i></i>	<i>3</i>
<i>1.4. Ενδιάμεσοι ξενιστές (διαβιβαστές) του παρασίτου</i>	<i>4</i>
<i>1.5. Τελικοί ξενιστές του παρασίτου</i>	<i>4</i>
<i>1.6.1. Κυριότερες μορφές λείσμανίασης και γεωγραφική κατανομή τους</i>	<i>5</i>
<i>1.6.2. Κλινική εικόνα, συμπτωματολογία</i>	<i>6</i>
<i>1.7. Ανοσολογική απόκριση του τελικού ξενιστή εναντι του παρασίτου <i>Leishmania</i></i>	<i>8</i>
<i>Κεφάλαιο 2</i>	<i>9</i>
<i>2.1. Μακροφάγα</i>	<i>9</i>
<i>2.2. Ανάπτυξη μακροφάγων</i>	<i>9</i>
<i>2.3. Μηχανισμός Μακροφάγων</i>	<i>10</i>
<i>2.3.1. Αναγνώριση Αντιγόνου</i>	<i>10</i>
<i>2.3.2. Αντιμικροβιακή δράση μακροφάγων</i>	<i>10</i>
<i>2.3.3. Αντιμικροβιακή δράση μακροφάγων ανεξάρτητη από το οξυγόνο</i>	<i>11</i>
<i>2.3.4 Οξυγονοεξαρτώμενη αντιμικροβιακή δράση μακροφάγων</i>	<i>11</i>
<i>2.4. Τύποι μακροφάγων με βάση την ανατομική τους θέση</i>	<i>12</i>
<i>2.5. Λειτουργία και ενεργοποίηση μακροφάγων</i>	<i>12</i>
<i>2.5.1. Κλασικά ενεργοποιημένα μακροφάγα (M1 μακροφάγα)</i>	<i>12</i>
<i>2.5.2. Εναλλακτικά ενεργοποιημένα μακροφάγα (M2 μακροφάγα)</i>	<i>13</i>
<i>Κεφαλαίο 3</i>	<i>13</i>
<i>3.1. Μακροφάγα – παράσιτα <i>Leishmania</i> μια μακροχρόνια αλληλεπίδραση</i>	<i>13</i>

3.2. M1 και M2 υπότυποι μακροφάγων ύστερα από μόλυνση με <i>Leishmania</i>	15
3.3. Πόλωση μακροφάγων στη δερματική λείσμανίαση	15
3.4. Πόλωση μακροφάγων στη σπλαχνική λείσμανίαση	18
Κεφάλαιο 4	20
4.1. Η Επαγωγή κινασών DYRK1A και DYRK1B σε πρωτογενή μακροφάγα ποντικού επιμολυσμένα με προμαστιγωτές μορφές <i>L. donovani</i>	20
Κεφάλαιο 5	20
5.1. Κινάσες ρυθμιζόμενες από φωσφορυλίωση τυροσίνης διπλής εξειδίκευσης (DYRKs) και <i>cdc2-Like Kinases (CLKs)</i> στις ανθρώπινες ασθένειες.....	20
Κεφάλαιο 6	21
6.1. Σκοπός.....	21
6.2. Υλικά - Μέθοδοι.....	21
6.2.1. Αντιδραστήρια	21
6.2.2. Αναλώσιμα υλικά.....	21
6.3. Καλλιέργειες παρασίτων <i>Leishmania</i>	22
6.4. Κυτταροκαλλιέργειες Μακροφάγων J774.1.....	22
6.5. Χρήση του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) για την επαγωγή της κλασσικής ενεργοποίησης των μακροφάγων (M1).....	23
6.6. Έλεγχος <i>in vitro</i> κυτταρικής επιβίωσης-πολλαπλασιασμού και εφαρμογή της μεθόδου Alamar blue σε παράσιτα <i>Leishmania</i>	23
6.7. Εφαρμογή της μεθόδου Alamar blue σε ενδοκυτταρικά αμαστιγωτά <i>L. donovani</i>	23
6.8. Εφαρμογή της μεθόδου Alamar blue σε μακροφάγα J774.1.....	24
6.9. Έλεγχος του αριθμού των ενδοκυττάρων παρασίτων με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού.....	25
6.10. Κυτταρομετρία ροής (FACS-Fluorescence-activated cell sorting).....	25
6.11. Απομόνωση κυτταρικού RNA και σύνδεση cDNA	26
6.12. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης-αντίστροφης μεταγραφάσης σε πραγματικό χρόνο	27
Κεφαλαίο 7	28
7. Αποτελέσματα.....	28
7.1. Έλεγχος συγκέντρωσης της χαρμίνης στη βιωσιμότητα των μακροφάγων J774.1..	28
7.2. Ανάπτυξη παρασίτων μορφών <i>L. infantum</i> στην κυτταροκαλλιέργεια.....	28
7.3. Έλεγχος συγκέντρωσης της χαρμίνης στη βιωσιμότητα των προμαστιγωτών μορφών <i>L. infantum</i>	29

7.4. Έλεγχος του παρασιτικού φορτίου σε μακροφάγα που έχουν επωαστεί με χαρμίνη	30
7.5. Πειράματα ελέγχου κυτταρικού θανάτου J774.1 μακροφάγων ενεργοποιημένων με LPS και προσθήκη χαρμίνης	31
7.6. Έλεγχος της εισόδου προμαστιγωτών μορφών <i>L. infantum</i> σε μακροφάγα J774.1, προεπεξεργασμένα με χαρμίνη	32
7.7. Έλεγχος πόλωσης μακροφάγων επιμολυσμένων με <i>L. infantum</i>, που έχουν επωαστεί με χαρμίνη: έκφραση της ιντερλευκίνης IL-12	35
7.8. Έλεγχος πόλωσης μακροφάγων μολυσμένων με <i>L. infantum</i>, που έχουν επωαστεί με χαρμίνη	37
Συζήτηση	38
Συμπέρασμα	40
Βιβλιογραφικές Αναφορές	41
ΠΗΓΕΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	45

Συντομογραφίες

Συντομογραφία	Αγγλική Ορολογία	Ελληνική Ορολογία
Arg-1	Arginase I	Αργινάση 1
CD	Cluster of differentiation	Σύμπλεγμα διαφοροποίησης
CCL	Chemokine (C-C motif) ligand	Συνδέτης χημειοκίνης μοτίβου C-C
CCR2	C-C chemokine receptor type 2	Υποδοχέας χημειοκίνης C-C τύπου 2
Cdc	Cell division control	Έλεγχος κυτταρικής διαίρεσης
Cxcl	CXC chemokine ligand	Συνδέτης χημειοκίνης μοτίβου CXC
CX3CR1	CX3C motif chemokine receptor 1	Υποδοχέας χημειοκίνης μοτίβου CX3C 1
FLT-3	FMS-like tyrosine kinase 3	Τυροσινική κινάση 3 παρόμοια με FMS
LPS	Lipopolysaccharide	Λιποπολυσακχαρίτης
PBS	Phosphate buffered saline	Φυσιολογικός ορός με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων
FACS	Fluorescence-activated cell sorting	Ταξινόμηση κυττάρων ενεργοποιημένη με φθορισμό
qPCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction	Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής
DYRKs	Dual specificity tyrosine regulated kinases	Κινάσες ρυθμιζόμενες με τυροσίνη διπλής ειδικότητας
IL	Interleukin	Ιντερλευκίνη
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptors	Υποδοχείς που ενεργοποιούνται με πολλαπλασιαστική υπεροξεισωμάτων
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Φωσφορικό δινουκλεοτίδιο νικοτιναμιδίου αδενίνης
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
RNA	Ribonucleic acid	Ριβονουκλεϊνικό οξύ
RPMI-1640	The main nutrient is RPMI-1640 which is rich in amino acids, betamines, salts and the pH index Phenol red.	Βασικό θρεπτικό υλικό το RPMI-1640 που είναι πλούσιο σε αμινοξέα, βιταμίνες, άλατα και ο δείκτης pH σε κόκκινο της φαινόλης
iNOS	Inducible nitric oxide synthase	Επαγωγίμη συνθάση μονοξειδίου του οξειδίου

FADH	Flavin mononucleotide	Μονονουκλεοτίδιο φλαβίνης
INF	Interferon	Ιντερφερόνη
mCSF	Macrophage Colony stimulating factor	Παράγοντας διέγερσης αποικιών μακροφάγων
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor	Παράγοντας διέγερσης αποικιών μακροφάγων κοκκιοκυττάρων
siRNA	Small interfering RNA	Μικρό παρεμβαλλόμενο RNA
FBS	Fetal Bovine Serum	Εμβρυϊκός ορός βοοειδών
DNA	Deoxyribonucleic acid	Δεσοξυριβονουκλεϊνικό οξύ
cDNA	Complementary DNA	Συμπληρωματικό DNA
PKDL	Post-kala-azar dermal leishmaniasis	Μετα-καλά-αζαρική δερματική λεισμανίαση
	Fluorescent protein	
GFP		Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη
ROS	Reactive Oxygen Species	Ενεργές ρίζες οξυγόνου
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α	Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων
MRC-1	Macrophage mannose receptor 1	Υποδοχέας μαννόζης μακροφάγων 1
CL	Cutaneous leishmaniasis	Δερματική λεισμανίαση
VL	Visceral leishmaniasis	Σπλαχνική λεισμανίαση
MCL	Mucocutaneous leishmaniasis	Βλεννοδερματική λεισμανίαση
STAT	Signal transducer and activator of transcription	Μεταγωγέας σήματος και ενεργοποιητής μεταγραφής
IRF	Interferon-regulatory factor	Ρυθμιστικός παράγοντας ιντερφερόνης

Πρόλογος

Η λειψμανίαση είναι μία νόσος που εκδηλώνεται με ευρύ φάσμα συμπτωμάτων. Προκαλείται από πρωτοζωικά παράσιτα που ανήκουν στο γένος *Leishmania* και αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα για την δημόσια υγεία. Η λειψμανίαση θεωρείται ανθρωποζωνόσος. Σήμερα οι θεραπείες της νόσου είναι λιγοστές, λόγω ανθεκτικότητας του παρασίτου, ενώ δεν υπάρχει ανθρώπινο εμβόλιο. Το κυριότερο κύτταρο ξενιστής του παρασίτου το μακροφάγο κατέχει σημαντικό ρόλο στη μη ειδική άμυνα (έμφυτη ανοσία) και συμμετέχει στην έναρξη ειδικών αμυντικών μηχανισμών (επίκτητη ανοσία). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μακροφάγων και των παρασίτων καθορίζουν την έκβαση της λοίμωξης. Για το λόγο αυτό είναι σημαντική στην εγκατάσταση και έκβαση της νόσου η πόλωση των μακροφάγων μεταξύ των κλασικών προφλεγμονωδών μορφών M1 που σκοτώνουν τα παράσιτα, και αντιφλεγμονωδών M2 που επιτρέπουν στα παράσιτα την επιβίωση και τον ενδοκυττάριο πολλαπλασιασμό τους. Σηματοδοτικοί μηχανισμοί συμμετέχουν στην πόλωση αυτή, καθώς και μονοπάτια φωσφορυλίωσης, τα οποία σε αυτήν την πόλωση ελέγχονται από φωσφατάσες και κινάσες. Οι κινάσες των θηλαστικών που ανήκουν στην οικογένεια CMGC παίζουν σημαντικό στον έλεγχο της έμφυτης ανοσίας. Έχει δειχθεί ότι οι κινάσες DYRK (DYRK1A και DYRK1B), κινάσες με διπλή ενεργότητα θρεονίνης/σερίνης και τυροσίνης, σχετίζονται με νοσήματα όπως τον καρκίνο, το σύνδρομο Down, το μεταβολικό σύνδρομο κ.ά, ενώ δεν έχει μελετηθεί ο ρόλος τους σε λοιμώδη νοσήματα. Πρόσφατα έχει δειχθεί από το εργαστήριο Μοριακής Παρασιτολογίας ότι τα επίπεδα των κινασών αυτών αυξάνονται στα μακροφάγα μετά τη λοίμωξη με παράσιτα του γένους *Leishmania*.

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη του αναστολέα των κινασών, χαρμίνη στην αλληλεπίδραση μακροφάγων-*Leishmania*. Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε προεπίπωση των μακροφάγων με χαρμίνη και ακολούθησε η μόλυνση τους με παράσιτα. Διαπιστώθηκαν αλλαγές στην πόλωση των επεξεργασμένων μακροφάγων και αυξημένη είσοδος των παρασίτων εντός αυτών. Συμπερασματικά η μελέτη ανοίγει ένα καινούριο κεφάλαιο προς περαιτέρω διερεύνηση της σχέσης κινασών DYRK - φλεγμονής.

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

Το παράσιτο *Leishmania* είναι ενδοκυτταρικό πρωτόζωο και αποτελεί το αίτιο της λεισμανίασης, η οποία εκδηλώνεται με κλινικές μορφές απειλητικές για τη ζωή (σπλαχνικές μορφές) έως αυτοθεραπευόμενες δερματικές βλάβες. Κάθε κλινική μορφή της νόσου μπορεί να εξελιχθεί με αποτέλεσμα τη διασπορά των παρασίτων σε διάφορους ιστούς, όπως στο δέρμα στον βλεννογόνο ιστο, στη δερματική μορφή και τη βλεννοδερματική μορφή αντίστοιχα, και στο μυελό των οστών, και εσωτερικά όργανα όπως σπλήνα, ήπαρ, στη σπλαχνική μορφή (Burza et al., 2018). Το παράσιτο αλληλεπιδρά με το μακροφάγο μέσω του μαστιγίου της προμαστιγώτης μορφής και ενός αριθμού υποδοχέων μακροφάγων (Podinowskaia & Descoteaux, 2015). Η αλληλεπίδραση μακροφάγου-παρασίτου πυροδοτεί την παρασιτική φαγοκυττάρωση και την ανάπτυξη ποικίλων μηχανισμών διαφυγής, οι οποίοι τροποποιούν τη βιογένεση του φαγοσώματος και αναστέλλουν την επαγωγή προφλεγμονωδών οδών, με αποτέλεσμα την ενδοκυτταρική επιβίωση του παρασίτου (Podinowskaia & Descoteaux, 2015). Με τη χορήγηση στο μακροφάγο διαφόρων φαρμάκων θα μελετηθεί η δυνατότητα επαγωγής της ενεργοποίησης του μακροφάγου και με αυτόν το τρόπο να προκληθεί καταστολή του παρασίτου.

1.1. Λεισμανίαση

Η λεισμανίαση είναι λοιμώδης νοσήμα επικίνδυνο για τη δημόσια υγεία. Ανάλογα με την γεωγραφική της θέση ονομάζεται “φυμα της Ανατολής”, “έλκος της Βαγδάτης”, “Kala Azar”, “πυρετός *Dum Dum*” κ.ά (Κυριαζού, 2009).

Η λεισμανίαση προκαλείται από διάφορα είδη του ενδοκυτταρικού πρωτόζωου *Leishmania* κυριότερα από αυτά ανήκουν στην ομάδα των *L. donovani*, *L. tropica* και *L. braziliensis* και μεταδίδεται σε ζώα και ανθρώπους κυρίως με το νυγμα μολυσμένων ειδών φλεβοτόμων, που αποτελούν τους ενδιάμεσους ξενιστές του παρασίτου (Burza et al., 2018).

1.2. Μορφές του πρωτοζώου *Leishmania*

Το παράσιτο απαντάται με δύο κύριες μορφές. Την προμαστιγώτη μορφή, η οποία όπου απαντάται στο μεσέντερο του ενδιάμεσου ασπόνδυλου ξενιστή (σκνίπα) και την αμαστιγώτη μορφή, η οποία εντοπίζεται εντός των μονοπύρηνων/μακροφάγων του τελικού ξενιστή (θηλαστικά). Η προμαστιγώτη μορφή έχει επιμήκες σχήμα, φέρει ένα μαστίγιο που εκφύεται από το πρόσθιο τμήμα του κυττάρου με τη βοήθεια του οποίου το παράσιτο κινείται και μεταναστεύει στους ιστούς. Η αμαστιγώτη μορφή έχει σχήμα ωοειδές ή σφαιρικό, είναι μικρότερη στο μέγεθος από την προμαστιγώτη, δεν κινείται, στερούμενη εξωκυττάρου μαστιγίου (φέρει ένα ενδοκυττάριο μαστίγιο)

(Teixeira et al., 2013). Ο διαχωρισμός των δύο μορφών του παρασίτου είναι απλουστευμένος διότι θεωρείται ότι απαντώνται διάφορες μορφές του παρασίτου (προκυκλικές, μετακυκλικές κ.ά).

1.3. Κύκλος ζωής της *Leishmania*

Το παράσιτο *Leishmania* μεταδίδεται με νύγμα μολυσμένου θήλεος φλεβοτόμου (σκνίπα) σε σπονδυλωτούς ξενιστές. Στον κύκλο ζωής μεταξύ των δύο ξενιστών, το παράσιτο αλλάζει μορφολογικά χαρακτηριστικά προσαρμοζόμενο στις αλλαγές των περιβαλλοντολογικών συνθηκών (Burza et al., 2018).

Η μόλυνση αρχίζει με τον ενοφθαλμισμό προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου στο δέρμα των ξενιστών-θηλαστικών, που πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια απομύζησης αίματος. Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη για την ωρίμανση των ωών του θήλεος φλεβοτόμου. Τα παράσιτα προσλαμβάνονται από τα μονοπύρηνα/μακροφάγα, ουδετερόφιλα και δενδριτικά κύτταρα του χορίου της επιδερμίδας με φαγοκυττάρωση (Costa-da-Silva et al., 2022). Οι προμαστιγωτές μορφές επιζουν και μετατρέπονται σε αμαστιγωτές μορφές στο εσωτερικό των φαγολυσοσωμάτων, τα οποία σχηματίζονται από την σύντηξη του παρασιτοφόρου φαγοσώματος με το λυσόσωμα. Κατά τη διάρκεια της σύντηξης, οι προμαστιγωτές μορφές μεταμορφώνονται σε αμαστιγωτές μορφές μέσα σε 12-24 ώρες, οι οποίες συνεχίζουν να αναπτύσσονται και να διαιρούνται με διχοτόμηση εντός του φαγολυσοσώματος. Όταν ολοκληρωθεί η πλήρωση του μακροφάγου από παράσιτα, πραγματοποιείται ρήξη του κυττάρου, πραγματοποιείται απελευθέρωση των παρασίτων, και ακολουθεί η φαγοκυττάρωση αυτών από άλλα κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος. Οι αμαστιγωτές μορφές μαζί με κύτταρα αίματος, λαμβάνονται από τις θηλυκές φλεβοτόμους κατά τη διάρκεια απομύζησης αίματος και μετατρέπονται εντός 48ώρου σε προκυκλικές προμαστιγωτές μορφές στο μεσέντερο του εντόμου. Η διαφοροποίηση του παρασίτου οφείλεται στην αλλαγή των συνθηκών διαβίωσης όπως η μείωση της θερμοκρασίας και η άνοδος του pH στο μεσέντερο της σκνίπας (Bates, 2007). Ακολούθως μέσω της μετακυκλογένεσης, οι διαιρούμενες μη μολυσματικές προκυκλικές μορφές αποκτούν μολυσματικές ιδιότητες και διαφοροποιούνται σε μολυσματικά μετακυκλικά προμαστιγωτά, ικανά να μεταναστεύουν στο φάρυγγα και το υποστόμιο του εντόμου, έτσι ώστε να αρχίσει ένας νέος κύκλος μετάδοσης με το επόμενο γεύμα του εντόμου (Wheeler et al., 2011). Ο χρόνος που χρειάζεται να ολοκληρωθεί ο κύκλος του παρασίτου μέσα στο έντομο-είναι κατά μέσο όρο πέντε ημέρες- εξαρτάται από το είδος *Leishmania*, το είδος του εντόμου διαβιβαστή (φλεβοτόμου) και τη θερμοκρασία περιβάλλοντος (Dostálová & Volf, 2012).

1.4. Ενδιάμεσοι ξενιστές (διαβιβαστές) του παρασίτου

Οι αιματοφάγοι θηλυκοί φλεβοτόμοι αποτελούν τους ενδιάμεσους ξενιστές φυσικούς φορείς του παρασίτου *Leishmania* (Killick-Kendrick, 1990). Υπάρχουν πολλά είδη φλεβοτόμων, τα οποία βρίσκονται σε τροπικές, υποτροπικές ζώνες, όπου ένα ποσοστό εξ αυτών είναι ικανό να μεταδώσει το παράσιτο. Στην Ευρώπη, Αφρική και Ασία οι λειψμάνιες μεταδίδονται με είδη του γένους *Phlebotomus* και στην Αμερική με είδη του γένους *Lutzomyia* (Maroli et al., 2013).

Ο βιολογικός κύκλος των εντόμων αυτών περιλαμβάνει δύο διαφορετικά βιολογικά στάδια: α) το στάδιο του ενηλικού και β) το στάδιο της ανάπτυξης.

Οι ενήλικοι φλεβοτόμοι διαβιουν σε ζεστά και ξηρά κλίματα, είναι ανενεργοί και αναπαύονται σε υγρά και σκοτεινά ενδιαιτήματα κατά τη διάρκεια της ημέρας. Δραστηριοποιούνται με την αύξηση της υγρασίας και τη μείωση της θερμοκρασίας, κυρίως από τις απογευματινές ώρες μέχρι το πρωί της επόμενης ημέρας, (Maroli et al., 2013). Οι θηλυκοί φλεβοτόμοι αρχίζουν να αναζητούν ξενιστή για να τραφούν με αίμα και έτσι ταξιδεύουν αρκετά μακριά από το περιβάλλον που ζουν. Οι πιθανοί ξενιστές τους είναι ερπετά, αμφίβια, πουλιά και θηλαστικά. Οι διατροφικές τους συνήθειες εξαρτώνται από το είδος στο οποίο ανήκουν, ενώ το είδος ξενιστή είναι ένα παράγοντας που επηρεάζει τη μετάδοση του παρασίτου (Maroli et al., 2013).

1.5. Τελικοί ξενιστές του παρασίτου

Τα παράσιτα του γένους *Leishmania*, διατηρούνται σε ξενιστές θηλαστικά (σαρκοφάγα, τρωκτικά, άνθρωπος κ.ά), οι οποίοι λειτουργούν ως τελικοί ξενιστές για την έναρξη του κύκλου μετάδοσης του παρασίτου στη φύση. Το είδος του θηλαστικού και το περιβάλλον όπου βρίσκεται καθορίζει τον τρόπο μετάδοσης του παρασίτου στους ανθρώπους. Υπάρχουν τρεις διαφορετικοί οδοί μετάδοσης της λειψμανίασης. Πρώτη είναι η ζωονοτική μετάδοση, όπου τα παράσιτα μεταδίδονται κυρίως μεταξύ άγριων ζώων με ζωόφιλα είδη φλεβοτόμων σε ένα πρωτογενές περιβάλλον, ενώ ο άνθρωπος μολύνεται τυχαία. Δεύτερη είναι η ανθρωποζωονοτική μετάδοση, όπου τα παράσιτα μεταδίδονται μεταξύ ζώων και του ανθρώπου, με ζωοανθρωπόφιλα είδη φλεβοτόμων. Τέλος, υπάρχει η ανθρωπονοτική μετάδοση, όπου τα παράσιτα μεταδίδονται μεταξύ των ανθρώπων με ανθρωπόφιλα είδη φλεβοτόμων σε κατοικημένες περιοχές (*L. donovani* στην Ινδία και στην ανατολική Αφρική). Οι περισσότερες λειψμανιάσεις είναι ζωονόσοι και τα μολυσμένα θηλαστικά ξενιστές (αλεπού, σκύλος, σπερμόφιλος, επίμυς, σκαντζόχοιρος, οπόσουμ, κ.ά, καθώς και ο μολυσμένος άνθρωπος) είναι υπεύθυνα για τη μακρά περίοδο διατήρησης της *Leishmania* στη φύση. Ο σκύλος είναι ο κύριος ξενιστής στην σπλαχνική λειψμανίαση ζωονοτικού τύπου, που προκαλείται από το παράσιτα *L. infantum* και *L. peruviana* και ο άνθρωπος αναγνωρίζεται συνήθως ως ξενιστής των *L. donovani* και *L. tropica* (Tabbabi, 2019).

1.6.1. Κυριότερες μορφές λεισμανίασης και γεωγραφική κατανομή τους

Ανάλογα με τη γεωγραφική κατανομή και το είδος του παρασίτου, η λεισμανίαση απαντάται με διάφορες μορφές: Σπλαχνική λεισμανίαση, η οποία χαρακτηρίζεται από διασπορά του παρασίτου από το δέρμα μέσω του αίματος και της λέμφου στα ζωτικά όργανα του σώματος, ιδιαίτερα στο ήπαρ, το σπλήνα και τον μυελό των οστών (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*), τη δερματική λεισμανίαση, που χαρακτηρίζεται από απλές δερματικές αλλοιώσεις κατά πλείστον αυτο-ιάσιμες, τη διάχυτη δερματική λεισμανίαση, που χαρακτηρίζεται από μεταβλητού μεγέθους δερματικές βλάβες, εντοπιζόμενες σε απομακρυσμένες θέσεις από το σημείο έκθεσης στο έντομο, (Diffused Cutaneous leishmaniasis, DCL), (*L. amazonensis*), την υποτροπιάζουσα λεισμανίαση (Leishmaniasis Recidivans -LR) η οποία χαρακτηρίζεται από υποτροπή της δερματικής νόσου στα σημεία των προηγούμενων επουλωμένων βλαβών της δερματικής λεισμανίασης (*L. tropica*, *L. brasiliensis*), τη δερματική μετα Kala Azar λεισμανίαση (Post-Kala Azar Dermal Leishmaniasis, PKDL), που εμφανίζεται σε έναν υποπληθυσμό ασθενών που υποβλήθηκαν σε επιτυχή αγωγή για σπλαχνική λεισμανίαση και οι οποίοι έμειναν ασυμπτωματικοί για μήνες έως χρόνια και τη βλεννοδερματική μορφή (*L. braziliensis*, *L. guyanensis*) που οφείλεται σε επέκταση ή παρασιτική μετάσταση από τοπική δερματική νόσο στον βλεννογονοδερματικό ιστό.

Η σπλαχνική λεισμανίαση (Visceral Leishmaniasis, VL), είναι θανατηφόρος στο 95% των περιπτώσεων, εάν δεν χορηγηθεί θεραπεία. Τα περισσότερα κρούσματα, εμφανίζονται στη Βραζιλία, την Ανατολική Αφρική και την Ινδία. Εκτιμάται ότι 50. 000 έως 90. 000 νέα περιστατικά VL εκδηλώνονται κάθε χρόνο παγκοσμίως, ενώ μόνον το 25-45% των περιστατικών αναφέρεται στον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας. Στην Ανατολική Αφρική και την Ινδία απαντάται συνήθως το είδος *L. donovani* ενώ στην Ευρώπη, τη Βόρεια Αφρική και τη Λατινική Αμερική απαντάται το είδος *L. infantum*, (*L. chagasi*) (Burza et al., 2018).

Η δερματική λεισμανίαση (CL) είναι η πιο κοινή μορφή λεισμανίασης. Περίπου το 95% των κρουσμάτων εμφανίζονται στην Αμερική, στη λεκάνη της Μεσογείου, στη Μέση Ανατολή και στην Κεντρική Ασία. Η δερματική λεισμανίαση οφείλεται σε παράσιτα που ανήκουν στο *L. tropica complex* (*L. tropica*, *L. major* και *L. aethiopica*) και *L. mexicana complex* (*L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. rifanoi*, *L. venezuelensis*) και παράσιτα του υπογένους *Vianna* (*L. braziliensis* και *L. guyanensis*) που προκαλούν βλεννοδερματική λεισμανίαση. Υπολογίζεται ότι 600.000 έως 1 εκατομμύριο νέα περιστατικά συμβαίνουν παγκοσμίως, αλλά μόνο περίπου 200.000 αναφέρονται στον (www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis).

Πάνω από το 90% των περιστατικών βλεννοδερματικής λεισμανίασης εμφανίζονται στη Βολιβία, τη Βραζιλία και το Περού, και στην Αιθιοπία. Τα πιο κοινά είδη παρασίτων που προκαλούν βλεννοδερματική λεισμανίαση περιλαμβάνουν εκείνα του υπογένους *Leishmania* (π.χ.

Leishmania mexicana, *Leishmania amazonensis*) και του υπογένους *Viannia* (π.χ. *L. [Vianna] braziliensis*, *L. [Vianna] panamensis*, *L. braziliensis*, *L. aethiopica* και *L. panamensis*). Όλα τα είδη που σχετίζονται με τη βλεννοδερματική μορφή της νόσου μπορούν να προκαλέσουν εντοπισμένη δερματική νόσο (απλά έλκη στο δέρμα) αλλά δύναται να παρατηρηθεί, λόγω αιματογενούς ή λεμφικής διασποράς, προσβολή των οργάνων της ανώτερης αναπνευστικής οδού, επιπλοκή απειλητική για τη ζωή (www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis).

Τέλος υπάρχει και μία άλλη κλινική μορφή λεισμανίασης, η λεγόμενη, δερματική λεισμανίαση μετά από το καλα-αζάρ (PKDL). Απαντάται στην ανατολική Αφρική (κυρίως στο Σουδάν) και στην Ινδία, όπου εκδηλώνεται σε 5–10% των ασθενών με καλααζάρ αναφέρεται ότι εμφανίζουν την πάθηση. Η μορφή αυτή είναι πιο σπάνια στη Βραζιλία, όπου εκεί εμφανίζεται σε περιπτώσεις συλλοίμωξης με τον ιό HIV και προκαλείται από το *L. Infantum*. Παρ' όλη τη συσχέτιση ειδών με το είδος της νόσου, η κλινική έκβαση είναι πολυπαραγοντική και εξαρτάται και από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστής (www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis).

1.6.2. Κλινική εικόνα, συμπτωματολογία

Σπλαχνική λεισμανίαση

Στη σπλαχνική λεισμανίαση, ημόλυνση αρχίζει με το νύγμα της μολυσμένης θηλυκής φλεβοτόμου. Η είσοδος στα μακροφάγα των διάφορων οργάνων γίνεται μετά τον τοπικό πολλαπλασιασμό στο δέρμα. Παρατηρείται διόγκωση λεμφαδένων και σπλήνα καθώς και αναιμία, λόγω της προσβολής του μυελού των οστών. Η νόσος μπορεί να παρουσιάσει οξεία, υποξεία ή χρόνια εξέλιξη. Η οξεία λεισμανίαση εμφανίζεται συχνότερα σε παιδιά κάτω των 2 ετών. Εκδηλώνεται με συνεχή υψηλό πυρετό και μέτρια σπληνομεγαλία, που οδηγεί σε θάνατο σε 3-4 μήνες. Η υποξεία λεισμανίαση διαρκεί από 6 έως 18 μήνες. Οι ασθενείς έχουν επίμονο πυρετό, προοδευτική σπληνομεγαλία, αναιμία, καχεξία και μερικές φορές διάρροια και βρογχίτιδα. Η πορεία της σπλαχνικής μπορεί να μεταβληθεί από την εμφάνιση ευκαιριακών λοιμώξεων. Σε άλλους ασθενείς, η πορεία είναι χρόνια, διάρκειας 2 ή περισσότερων ετών, με περιόδους σχεδόν πλήρους ανάρρωσης, αλλά παρά όλα αυτά η σπληνομεγαλία διατηρείται κατά τη διάρκεια αυτών των περιόδων φαινομενικής ίασης (Scarpini et al., 2022). Η κλινική πορεία συνήθως χωρίζεται σε τέσσερις περιόδους: την πρώτη περίοδο (περίοδος επώασης), την περίοδον έναρξης ή εισβολής, την κύρια περίοδο, και την τελική περίοδο. Η περίοδος επώασης είναι δύσκολο να οριστεί, αλλά υπολογίζεται μεταξύ 3 και 6 μηνών. Η περίοδος εισβολής χαρακτηρίζεται από την εξάπλωση του παρασίτου. Οι εκδηλώσεις εμφανίζονται, άλλοτε απότομα, και άλλοτε προοδευτικά. Ο ασθενής εμφανίζει πυρετό, απώλεια όρεξης και βάρους, ωχρότητα, αναιμία και απάθεια. Ο πυρετός είναι συχνά το πρώτο σύμπτωμα. Η σπληνομεγαλία εμφανίζεται νωρίς στην πορεία της νόσου και παρατηρείται αρχόμενη ηπατομεγαλία.

Άλλες εκδηλώσεις μπορεί να κυριαρχούν, όπως διαρροϊκές κρίσεις, αναπνευστική δυσχέρεια και επιληπτικές κρίσεις, ειδικά στα παιδιά. Στην κύρια περίοδο της νόσου, τα συμπτώματα ομοιάζουν με εκείνα της αρχικής περιόδου, αλλά είναι πιο έντονα. Ο πυρετός μπορεί να είναι συνεχής, ανώμαλος αμφημερινός, και κατόπιν διαλείπων (κάθε 3-4 ημέρες). Εμφανίζεται αναιμία, πανκυτταροπενία, σπληνομεγαλία, ηπατομεγαλία (το ήπαρ σχεδόν ποτέ δεν φτάνει το μέγεθος του σπλήνα). Μπορεί επίσης να εμφανιστεί οίδημα των κάτω άκρων και ασκίτης. Η τελευταία περίοδος χαρακτηρίζεται από την όξυνση των αλλαγών της κύριας περιόδου. Ο θάνατος μπορεί να προκληθεί από αλλαγές που οφείλονται στην νόσο ή από ευκαιριακές συλλοιμώσεις (Pedrosa, 2017).

Μετά-Καλαζάρ Δερματική λεισμανίαση (Post-Kala-Azar Dermal leishmaniasis, PKDL)

Η σπλαχνική λεισμανίαση σε ορισμένες περιπτώσεις υποτροπιάζει εκδηλώνοντας μία νέα κλινική μορφή, τη λεγόμενη μετά-καλαζάρ δερματική λεισμανίαση (Post-Kala-Azar Dermal leishmaniasis, PKDL). Η νόσος συνήθως εμφανίζεται μετά από χρονικό διάστημα μηνών έως 20 ετών από την ίαση σπλαχνικής λεισμανίασης, ως ένας μεταβλητός συνδυασμός υπομελάγχρωσης, ερυθρηματώδων υγρωσσοσών βλατίδων και οζωδων βλαβών στο πρόσωπο και στο άνω μέρος του σώματος και σε μικρότερο βαθμό στους βραχίονες, στα αντιβράχια, στον κορμό και στις κνήμες. Στην Αφρικανική παραλλαγή της νόσου παρατηρείται προσβολή των νεύρων. Ιστολογικά παρατηρείται επιθηλοειδές κοκκίωμα και ποικιλία φλεγμονωδών κυττάρων, ανάμεσά τους μακροφάγα, γιγαντοκύτταρα, πλασματοκύτταρα, σιτευτικά κύτταρα και ινοβλάστες. Τις περισσότερες φορές υπεύθυνο για αυτή τη μορφή της νόσου είναι το είδος *L. donovani* (Rafique et al., 2023).

Δερματική λεισμανίαση

Η δερματική λεισμανίαση εμφανίζεται τις περισσότερες φορές στη θέση ενοφθαλμισμού του παρσιτίου από τη μολυσμένη σκνίπα. Στη δερματική λεισμανίαση προσβάλλονται τριεστιβάδες του δέρματος, με πολλαπλασιασμό αμαστιγωτών. Στο σημείο του νύξης του εντόμου αναπτύσσεται ερυθρή υπεγερμένη βλατίδα (συχνά εβδομάδες ή μήνες μετά), η οποία εξελίσσεται σε έλκος, λόγω του έντονου κνησμού και ερεθισμού της δερματικής βλάβης. Σταδιακά η υγρώσσοσα εξέλκωση, κατόπιν χορήγησης συνήθως τοπικής θεραπείας επουλώνεται, εγκαταλείποντας μία ή παραπάνω ατροφικές ουλές. Η θεραπεία της νόσου απαιτεί 3-9 μήνες, ενώ παραμένει πιθανή η επούλωση της βλάβης (*L. major*) άνευ χορηγήσεως θεραπείας (Rafique et al., 2023).

Βλεννοδερματική

Η βλεννοδερματική λεισμανίαση αναπτύσσεται μετά την έναρξη της δερματικής λεισμανίασης και ορίζεται από την προσβολή των μαλακών μορίων του στόματος και των χειλέων και της μύτης και

ακολούθως την εκτεταμένη καταστροφή των χόνδρων του φάρυγγα, του λάρυγγα και του ρινικού διαφράγματος. Ο χρόνος επώασης και τα δερματικά έλκη του *L. braziliensis*, είναι παρόμοια με αυτά των άλλων δερματικών μορφών. Εάν οι δερματικές βλάβες δεν θεραπευθούν, είναι πιθανό να γίνουν βλεννοδερματικές. Ακόμη και μετά από χρόνια ίασης της πρωτογενούς βλάβης, μπορεί να εμφανιστεί δερματική βλάβη στο βλεννογόνο μύτης και στόματος. Οι δευτερογενείς βακτηριακές λοιμώξεις δύναται να προκαλέσουν διάρροια, πνευμονία και φυματίωση και να οδηγήσουν σε θάνατο (Rafique et al., 2023).

1.7. Ανοσολογική απόκριση του τελικού ξενιστή εναντι του παρασίτου *Leishmania*

Η επιτυχής αντιμετώπιση της λοίμωξης με παράσιτα *Leishmania*, στηρίζεται στη συνεργασία ανάμεσα σε κύτταρα τόσο της έμφυτης όσο και της επίκτητης ανοσίας. Στα αρχικά στάδια της λοίμωξης, τα ουδετερόφιλα μεταφέρονται δια μέσου των αιμοφόρων αγγείων στο σημείο της φλεγμονής, ακολουθώντας χημειοτακτικούς παράγοντες, περιορίζοντας τον αριθμό των παρασίτων, μέσω της φαγοκυττάρωσης και της θανάτωσης με έκκριση νιτρικού οξειδίου (NO). Η απόπτωση των προσβεβλημένων ουδετεροφίλων, οδηγεί στην έκκριση χημειοκινών όπως η MIP-1β που προσελκύει μονοκύτταρα και μακροφάγα στο σημείο της φλεγμονής. Έχει δειχθεί πειραματικά, ότι η έκβαση της λοίμωξης με *Leishmania* εξαρτάται από την ενεργοποίηση ή όχι των μακροφάγων από την INF-γ που εκκρίνεται από τα CD4+ T βοηθητικά κύτταρα τύπου 1 (Th1), τα CD8+T κύτταρα και τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα (NK cells). Όταν ενεργοποιηθούν τα μακροφάγα (M1 τύπος), παράγουν επαγωγίμη συνθάση του νιτρικού οξειδίου (iNOS) που μετατρέπει την αργινίνη σε νιτρικό οξύ, στοιχείο απαραίτητο για τη θανάτωση των ενδοκυτταρίων αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου. Σημαντική είναι η συμβολή των υπολοίπων κυττάρων της έμφυτης ανοσίας όπως NK cells που αποτελούν πηγή έκκρισης INF-γ καθώς και τα αντιγοπαρουσιαστικά δενδριτικά κύτταρα που μέσω παραγωγής κυτταροκινών προκαλούν τη διέγερση των κυττάρων της επίκτητης ανοσίας. Η κυτταρομεσολαβητική ανοσία, με κύριο ρόλο την προστασία έναντι του παρασίτου *Leishmania*, έχει αποδειχθεί και πειραματικά σε ποντίκια ανθεκτικά έναντι του παρασίτου, που καθίστανται ευάλωτα με την εξάλειψη των T-κυττάρων, ενώ αποκαθιστάται την αντοχή τους με μεταφορά λειτουργικών T-κυττάρων. Η έκλυση IL-12 από τα δενδριτικά κύτταρα, αλλά και τα μακροφάγα, ευθύνεται για τον Th1 προσανατολισμό των CD4+ T βοηθητικών κυττάρων και τον περιορισμό της λοίμωξης από *Leishmania*. Τα CD4+ T βοηθητικά κύτταρα με Th1 προσανατολισμό, παράγουν μεγάλες ποσότητες INF-γ και ενεργοποιούν τα μακροφάγα (M1 τύπος) τα οποία με τη σειρά τους παράγουν νιτρικό οξύ που οδηγεί στη θανάτωση των, εντός των μακροφάγων, ενδοκυτταρίων παρασίτων. Ο Th2 προσανατολισμός των CD4+ T βοηθητικών κυττάρων εκφράζεται με την παραγωγή κυρίως IL-4 και IL-10, απενεργοποίηση των μακροφάγων και παρεμπόδιση της παραγωγής νιτρικού οξειδίου. Αναφορικά με τον ρόλο που επιτελούν τα Th17 κύτταρα στη λοίμωξη από το

παρασίτο *Leishmania*, αυτός προσδιορίζεται από το είδος του παρασίτου. Συγκεκριμένα ο Th17 προσανατολισμός προσδίδει ευαισθησία σε λοίμωξη με *L. major* και ανθεκτικότητα σε λοίμωξη με *L. donovani* και *L. infantum*. Ρυθμιστικά T κύτταρα επίσης εμφανίζονται στην περιοχή της φλεγμονής και ο ρόλος τους είναι ο περιορισμός των ενεργοποιημένων CD4+ T βοηθητικών κυττάρων μέσω IL-10 εξαρτώμενων συμβάλλοντας στη διατήρηση των παρασίτων και στη χρόνια φλεγμονή (Rafique et al., 2023).

Κεφάλαιο 2

2.1. Μακροφάγα

Το σχήμα των μακροφάγων εξαρτάται από την κυτταρική δραστηριότητα. Τα φλεγμονώδη μακροφάγα παρουσιάζουν συχνά λεπτές κυτταροπλασματικές προεκτάσεις, ενώ τα αντιφλεγμονώδη μακροφάγα είναι στρογγυλά. Ο πυρήνας των μακροφάγων είναι στρόγγυλος, το κυτταρόπλασμα είναι διαφορετικό από αυτό των άλλων κύτταρα, καθώς στερείται δομών όπως εκτεταμένο ενδοπλασματικό δίκτυο και προσαρτημένα ριβοσώματα. Πιο συγκεκριμένα, τα ριβοσώματα βρίσκονται συχνά στην εξωτερική επιφάνεια της πυρηνικής μεμβράνης. Επίσης το κυτταρόπλασμά τους περιέχει κενοτόπια και κοκκία, καθώς και φυσαλιδώδεις δομές που δημιουργούν κυστίδια. Επίσης στο μικροσκόπιο, συχνά τα μιτοχόνδρια εμφανίζονται ως μικροί ράβδοι (Toews, 2009).

2.2. Ανάπτυξη μακροφάγων

Το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα, περιλαμβάνει μονοκύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα, είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών και του οργανισμού, παίζει ρόλο στη φλεγμονή, τον καρκίνο, τα αυτοάνοσα νοσήματα, τις λοιμώξεις και τις ανοσολογικές αποκρίσεις που σχετίζονται με τη μεταμόσχευση οργάνων (Wynn et al., 2013).

Η ωρίμανση και διαφοροποίηση των μακροφάγων περιλαμβάνει μια σειρά από μορφολογικά διακριτά αναπτυξιακά στάδια. Οι κοινοί μυελοειδείς πρόγονοι δημιουργούν μονοβλάστες, προμονοκύτταρα και τελικά μονοκύτταρα, τα οποία μεταναστεύουν σε διάφορους ιστούς. Αυτή η διαφοροποίηση ρυθμίζεται από την ενεργοποίηση συγκεκριμένων προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης που επάγονται από μεταγραφικούς παράγοντες. (Wynn et al., 2013).

Ένας κρίσιμος μεταγραφικός παράγοντας που εμπλέκεται στην ανάπτυξη των μακροφάγων είναι ο PU.1. Η συγκέντρωσή του καθορίζει εάν θα αναπτυχθούν μακροφάγα ή B κύτταρα, καθώς δεσμεύεται σε διαφορετικές θέσεις στο γονιδίωμα (V. Kumar, 2019).

Στα ποντίκια υπάρχουν δύο κύριοι υποτύποι μονοκυττάρων: τα κλασικά μονοκύτταρα και τα μη κλασικά μονοκύτταρα. Τα κλασικά μονοκύτταρα εκφράζουν υψηλά επίπεδα CCR2 αλλά χαμηλά επίπεδα υποδοχέα CX3CR1. Μεταναστεύουν γρήγορα σε σημεία μόλυνσης και φλεγμονής.

Τα μη κλασικά μονοκύτταρα, που χαρακτηρίζονται από υψηλή έκφραση CX3CR1 και χαμηλή CCR2, περιπολούν την αγγείωση, διατηρούν την ακεραιότητα του ενδοθηλίου των αγγείων ενορχηστρώνοντας την κάθαρση των κατεστραμμένων ενδοθηλιακών κυττάρων (V. Kumar, 2019).

Στον άνθρωπο, τα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε κλασικά, ενδιάμεσα και μη κλασικά. Τα μη κλασικά μονοκύτταρα στον άνθρωπο εμφανίζουν ομοιότητες με τα μονοκύτταρα της ίδιας κατηγορίας στα ποντίκια, περιπολούν την αγγείωση, ανιχνεύουν νουκλεϊκά οξέα και ιούς μέσω των υποδοχέων TLR7 και TLR8 και παίζουν ρόλους στην άμυνα του ανοσοποιητικού (V. Kumar, 2019).

Η ανάπτυξη μονοπύρηνων φαγοκυττάρων από προγονικά κύτταρα μονοκυττάρων-μακροφάγων ρυθμίζεται από παράγοντες διέγερσης αποικιών (CSF) όπως M-CSF, GM-CSF και από τον Flt3-συνδέτη. Ο παράγοντας M-CSF ρυθμίζει ειδικά τον αριθμό των μονοκυττάρων/μακροφάγων ιστών και οργάνων χωρίς να επηρεάζει το στάδιο ενεργοποίησής τους, ενώ ο GM-CSF εμπλέκεται τόσο στην ενεργοποίηση όσο και στη διαφοροποίηση σε DCs (V. Kumar, 2019).

Τα μακροφάγα που εντοπίζονται στους ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των ηπατικών κυττάρων Kupffer, των κυψελιδικών μακροφάγων, των μακροφάγων του σπλήνα και των περιτοναϊκών μακροφάγων, εγκαθίστανται στους ιστούς πριν από τη γέννηση και μπορούν να αυτοδιατηρηθούν ανεξάρτητα από την αναπλήρωση των μονοκυττάρων του αίματος στην ενήλικη ζωή. Τα χαρακτηριστικά και οι λειτουργίες των μακροφάγων σε άλλους ιστούς, όπως στα όργανα του ενδοκρινικού και αναπαραγωγικού συστήματος, στο λιπώδη ιστό, στο μυοσκελετικό και συνδετικό ιστό, είναι λιγότερο μελετημένα (V. Kumar, 2019).

2.3. Μηχανισμός Μακροφάγων

2.3.1. Αναγνώριση Αντιγόνου

Τα μακροφάγα αναγνωρίζουν το αντιγόνο όπως τα διάφορα παθογόνα μέσω του συστήματος υποδοχέων τύπου Toll (TLRs). Αυτοί οι υποδοχείς αναγνωρίζουν τα χαρακτηριστικά των παθογόνων, όπως λιποπολυσακχαρίτες, νουκλεϊκά οξέα ή εξωκυτταρικές πρωτεΐνες (μαστίγια, βλεφαρίδες, βακτηριακά ινίδια κ.ά). Η δέσμευση του αντιγόνου στους υποδοχείς TLRs επάγει την παραγωγή κυταροκινών και την ενεργοποίηση άλλων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος για την εξουδετέρωση του αντιγόνου (Supriya, 2020).

2.3.2. Αντιμικροβιακή δράση μακροφάγων

Τα μακροφάγα στην έμφυτη ανοσία αντιδρούν σε μεγάλο βαθμό έναντι παθογόνων όπως βακτηρίων και πρωτοζώων και όχι των ιών. Οι δύο κύριοι τρόποι ενεργοποίησής της αντιμικροβιακής δράσης τους πραγματοποιούνται παρουσία είτε και απουσία οξυγόνου (V. Kumar, 2019).

2.3.3. Αντιμικροβιακή δράση μακροφάγων ανεξάρτητη από το οξυγόνο

Είναι η διαδικασία μέσω της οποίας τα κυστίδια που περιέχουν παθογόνους εισβολείς απορροφώνται στο μακροφάγο. Το λυσόσωμα συντήκεται με το φαγόσωμα που περικλείει τα παθογόνα, με αποτέλεσμα την καταστροφή τους. Πριν τη καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης θα παραχθούν ηλεκτρικά φορτισμένες πρωτεΐνες. Στη συνέχεια ενεργοποιούνται οι λυσοζύμες για την αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος του παθογόνου. Ακολούθως οι λακτοφερρίνες χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή ζωτικού σιδήρου από τα κύτταρα και τέλος τα λυσοσωμικά πρωτεολυτικά και υδρολυτικά ένζυμα αποικοδομούν τις πρωτεΐνες των νεκρών παθογόνων κυττάρων. Επομένως, ο παθογόνος μικροοργανισμός μετατρέπεται σε μικροσκοπικά σωματίδια που αποβάλλονται από το κύτταρο (V. Kumar, 2019).

2.3.4 Οξυγονοεξαρτώμενη αντιμικροβιακή δράση μακροφάγων

Μόλις το μακροφάγο προσλάβει με φαγοκυττάρωση παθογόνους μικροοργανισμούς, αρχίζει να καταναλώνει περισσότερο οξυγόνο και η διαδικασία αυτή οδηγεί στην οξειδωτική αναπνευστική έκρηξη. Ως απάντηση, τα μακροφάγα παράγουν οξειδωτικά μεταβολικά προϊόντα όπως OH^- , H_2O_2 , O_2 , O_2^- . Η δισμουτάση υπεροξειδίου καταλύει τη μετατροπή της ρίζας του υπεροξειδίου σε υπεροξειδίου του υδρογόνου και άτομο οξυγόνου. Επιπλέον παράγονται ρίζες υδροξυλίου, οι οποίες βοηθούν στην καταστροφή του μικροοργανισμού-εισβολέα (V. Kumar, 2019).

Μετά την ενεργοποίηση των μακροφάγων, η επαγωγή της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου αυξάνεται για να ενισχύσει τη δημιουργία ριζών υπεροξυνιτρώδους με την αντίδραση του μονοξειδίου του αζώτου με το υπεροξείδιο του υδρογόνου (V. Kumar, 2019).

Αυτό το σύμπλεγμα ενζύμων ανακαλύφθηκε σε κοκκία ουδετερόφιλων. Όταν τα κοκκία ουδετερόφιλων έρχονται σε επαφή με ένα φαγοκύτταρο, σχηματίζουν ένα φαγολυσόσωμα και αρχίζουν να απελευθερώνουν μυελοϋπεροξειδάση. Χρησιμοποιώντας υπεροξείδιο του υδρογόνου και χλώριο, το ένζυμο παράγει μια εξαιρετικά τοξική αντιμικροβιακή ένωση. Εντός των κυτταρικών διαμερισμάτων, οι ρίζες που παράγονται από τα ενζυμικά συστήματα μπορεί να είναι επιβλαβείς τόσο για το παθογόνο όσο και για το ίδιο το κύτταρο (V. Kumar, 2019).

Εκτός από την απελευθέρωση οξειδωτικών ριζών, τα μακροφάγα απελευθερώνουν ακόμη κυτταροκίνες όπως $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 , IL-8 και IL-12 με αποτέλεσμα την πρόκληση φλεγμονώδους απόκρισης. Ένα μακροφάγο θα εκφράσει τελικά MHC μόριο II και θα συνεργαστεί με τα T λεμφοκύτταρα για την καταπολέμηση του ξένου αντιγόνου (V. Kumar, 2019).

2.4. Τύποι μακροφάγων με βάση την ανατομική τους θέση

Ανάλογα με τη θέση τους απαντώνται πολλοί τύποι μακροφάγων όπως τα κυψελιδικά μακροφάγα τα οποία προσλαμβάνουν πολύ μικρά σωματίδια, νεκρά κύτταρα και μικροοργανισμούς. Στο ήπαρ απαντώνται τα κύτταρα Kupffer, τα οποία πυροδοτούν τις ανοσολογικές αποκρίσεις και την αναδιαμόρφωση του ηπατικού ιστού (V. Kumar, 2019).

Τα μακροφάγα του σπλήνα απαντώνται στον ερυθρό και λευκό πολφό του οργάνου. Τα μακροφάγα του ερυθρού πολφου απομακρύνουν τα μη λειτουργικά και γηρασμένα ερυθροκύτταρα Τελος, τα μακροφάγα που βρίσκονται στη καρδιά εμπλέκονται στην ηλεκτρική αγωγιμότητα και την επικοινωνία των καρδιακών μυικών κυττάρων (V. Kumar, 2019).

2.5. Λειτουργία και ενεργοποίηση μακροφάγων

Με βάση τη λειτουργία και την ενεργοποίησή τους ταξινομούνται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες όπως τα κλασικά ενεργοποιημένα μακροφάγα που έχουν αντιμικροβιακή δράση (M1), και τα εναλλακτικά μακροφάγα (M2), που εμπλέκονται στην επούλωση πληγών και έχουν αντιφλεγμονώδη δράση, και τέλος τα μακροφάγα ρυθμιστές, που ρυθμίζουν τη δράση άλλων κυττάρων του ανοσοποιητικού (Sarkota, 2023).

2.5.1. Κλασικά ενεργοποιημένα μακροφάγα (M1 μακροφάγα)

Τα μακροφάγα M1 χρησιμεύουν στη στρατολόγηση κυττάρων Th1, στην αντίσταση στα παθογόνα και στη διαχείριση ενός πιθανού καρκινικού όγκου. Παθογόνα, LPS, παράγοντας διέγερσης αποϊκίας μακροφάγων κοκκιοκυττάρων, παράγοντας νέκρωσης όγκου άλφα (TNF-α), η κυτταρομεσολαβητική απόκριση Th1, η IFN-γ μπορούν τυπικά να διεγείρουν την πόλωση των μακροφάγων σε κύτταρα M1 (Sarkota, 2023).

Πολυάριθμες οδοί, συμπεριλαμβανομένων των IRF/STAT, LPS/TLR4 και κινάσης NF-κΒ/PI-3, εμπλέκονται στην επαγωγή των μακροφάγων, με πόλωση M1. Η παρουσίαση αντιγόνου και η σύνθεση προφλεγμονωδών κυτοκινών, συμπεριλαμβανομένης της IL-1β, της IL-6 και του TNF-α, καθώς και του μονοξειδίου του αζώτου μέσω της έκφρασης iNOS και των αντιδραστικών μεταβολικών προϊόντων οξυγόνου, είναι χαρακτηριστικά των μακροφάγων M1. Ακόμη, εμφανίζουν υπερέκφραση IL-12 και IL-23 και μείωση της ρύθμισης της IL-10. Η διέγερση των μακροφάγων M1 επάγει σημαντικά επίπεδα παραγωγής IL-1b, TNF-α, IL-12, IL-18 και IL-23 (Sarkota, 2023).

Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι μακροφάγα τύπου M1 εκφράζουν υψηλά επίπεδα μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας κατηγορίας II (MHC II), CD68, CD80 και CD86, καθώς και οι χημειοκίνες που προσελκύνουν κύτταρα Th1 CXCL9 και CXCL12 (Sarkota, 2023).

2.5.2. Εναλλακτικά ενεργοποιημένα μακροφάγα (M2 μακροφάγα)

Τα μακροφάγα M2 μπορούν να ενεργοποιηθούν κατόπιν μόλυνσης από παράσιτα ή μύκητες, με ανοσοσυμπλέγματα, με αποπτωτικά κύτταρα, τον παράγοντα διέγερσης αποικίας μακροφάγων, την IL-13, TGF- β , IL-4, όπως καθώς και από IL-33 και IL-25 μέσω των Th2 κυττάρων. Οι μεταγραφικοί παράγοντες STAT6, IRF4, PPAR δ και PPAR γ εμπλέκονται στη σηματοδότηση που ωθεί τα μακροφάγα στην πόλωση M2 (Sapkota, 2023).

Σε αντίθεση με το συμβατικά ενεργοποιημένο υποτύπο, ο εναλλακτικά ενεργοποιημένος υποτύπος έχει το προφίλ αντίστροφης έκφρασης, με μείωση της ρύθμισης της IL-12 και της IL-23 και υπερέκφραση της IL-10 και της IL-1RA (IL1- receptor antagonist) (Sapkota, 2023).

Επιπλέον, τα μακροφάγα M2 παράγουν χαμηλά επίπεδα των προφλεγμονωδών κυτοκινών IL-1, IL-6 και TNF- α . Εκτός από την κάθαρση του αντιγόνου, την αντιφλεγμονώδη απόκριση και τον μεταβολισμό, τα μακροφάγα M2 εμπλέκονται στην επούλωση πληγών, στην αναπλαση των ιστών, στην ανοσορύθμιση, στην ανάπτυξη όγκου και στις κακοήθειες. Η έκφραση των γονιδίων, CD206, Αργινάσης, CD163, CD209, FIZZ1 και γ m1/2 είναι ενδεικτικές, του φαινοτύπου M2 (Sapkota, 2023).

Κεφάλαιο 3

3.1. Μακροφάγα – παράσιτα *Leishmania* μια μακροχρόνια αλληλεπίδραση

Ο αιτιολογικός παράγοντας της λεισμανίασης, το παράσιτο *Leishmania* έχει αναπτύξει στρατηγικές για την αποτελεσματική πρόσληψή του από τα μακροφάγα και την ωρίμανση του φαγοσώματος προκειμένου το ενδοκυττάριο περιβάλλον του μακροφάγου να γίνει φιλόξενο για την επιβίωση και την ανάπτυξη του παρασίτου. Ως αποτέλεσμα, η άμυνα των μακροφάγων, όπως οι οξειδωτικές βλάβες, η παρουσίαση αντιγόνων, η ανοσολογική ενεργοποίηση και η απόπτωση διακυβεύονται, ενώ η διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών για το παράσιτο αυξάνεται. Πολλοί παράγοντες επιβίωσης της λεισμανίας εμπλέκονται στη διαμόρφωση του φαγοσώματος και τον επαναπρογραμματισμό του μακροφάγου για την προώθηση της μόλυνσης. Παρακάτω παρουσιάζεται η πολυπλοκότητα των αλληλεπιδράσεων ξενιστή-παρασίτου και περιγράφονται τα βασικά γεγονότα που καθιστούν το παράσιτο ένα τόσο επιτυχημένο ενδοκυτταρικό μικροοργανισμό (Podinowskaia & Descoteaux, 2015).

Το παράσιτο προσλαμβάνεται από το μακροφάγο μέσω μιας σειράς υποδοχέων. Η επιλογή του υποδοχέα επηρεάζει τη βιογένεση του φαγοσώματος. Η αλληλεπίδραση του μακροφάγου με το παράσιτο μπορεί να προκαλέσει την τροποποίηση της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας των μακροφάγων βοηθώντας την ενδοκυτταρική επιβίωσή του. Η ωρίμανση του φαγοσώματος της *Leishmania* τροποποιείται από τη δράση του φαγοσώματος με το παράσιτο μέσω της

ενδοσωματικής οδού. Το pH του φαγοσώματος και η διαθεσιμότητα σιδήρου πυροδοτούν τη διαφοροποίηση και την μετατροπή του προμαστιγωτού σε αμαστιγωτό (Flannery et al., 2011).

Η ενδοκυτταρική ανάπτυξη των παρασίτων του γένους *Leishmania*, εξαρτάται από την αλληλεπίδρασή του παρασίτου με τα κυστίδια τα οποία προέρχονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο, εντός των οποίων περικλείονται τα παράσιτα (παρασιτοφόρα κυστίδια). Μετά τη συγχώνευση το παρασιτοφόρου κυστιδίου με κυστίδια λίπους, το παράσιτο αποκτά θρεπτικά συστατικά. Μέσω των μεταφορέων αίμης και σιδήρου η λειψμάνια αποκτά σίδηρο και το παράσιτο ρυθμίζει την πρόσληψη σιδήρου και τη δέσμευσή του από το μακροφάγο για να ενισχύσει τη διαθεσιμότητα του (Voyiatzaki, 1999), (Ibraim et al., 2013).

Στην άμυνα το μακροφάγο προωθεί τη συγκρότηση των συμπλεγμάτων NADPH οξειδάσης και φλεγμονοσωμάτων (inflammasome) Nlr3, τα οποία παράγουν αντιδραστικά παράγωγα οξυγόνου (ROS) και ενδιάμεσα αντιδραστικά αζωτούχα προϊόντα για να βλάψουν το παράσιτο. Το μολυσμένο μακροφάγο προκαλεί φλεγμονή και ενεργοποίηση με τη μεσολάβηση της IFN- γ , που οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή ROS, ωρίμανση των φαγοσωμάτων και την παρουσίαση αντιγόνων. Το μακροφάγο ρυθμίζει τον μεταβολισμό των λιπιδίων για τη δημιουργία λιπιδικών σωμάτων, τα οποία παράγουν αραχιδονικό οξύ και άλλους προφλεγμονώδεις μεσολαβητές (Chowdhury et al., 2015).

Το παράσιτο *Leishmania*, προκειμένου να αποφύγει την άμυνα του κυττάρου ξενιστή επάγει τον μεταγραφικό παράγοντα PPAR γ του ξενιστή και την φωσφατάση της πρωτεϊνικής τυροσίνης (SHP), γεγονός που οδηγεί σε καταστολή της φλεγμονής. Ακόμη παρεμβαίνει στην οδό JAK/STAT, εμποδίζοντας την ενεργοποίηση των μακροφάγων και αναστέλλει τη δημιουργία ROS εμποδίζοντας τη συναρμολόγηση της NADPH οξειδάσης, την έκφραση του MHC τάξης II. Επίσης ρυθμίζει την πρωτεολυτική λειτουργία του φαγοσώματος με την καταστολή του υποστρώματος και την αποτελεσματική παρουσίαση αντιγόνων. Επιπλέον, επάγει την αυτοφαγία στα μακροφάγα, η οποία σχετίζεται με τη μείωση του οξειδίου του αζώτου (Chowdhury et al., 2015).

Τελος παράγοντες ενδοκυτταρικής επιβίωσης της λειψμάνιας, όπως η λιποφωσφογλυκάνη απομακρύνει τις ROS και διαταράσσει τους λιπιδικούς μικροχώρους για να καταστείλει την ωρίμανση των φαγοσωμάτων. Αλληλεπιδρά επίσης με τους TLR2/4 για να παρεμβαίνει στη σηματοδότηση των κυττάρων ξενιστών. Ένας ακόμη ενδοκυτταρικός παράγοντας για την επιβίωση του παρασίτου είναι η μεταλλοπρωτεάση GP63 η οποία απελευθερώνεται μέσω εξωσωμάτων και διασπά πολλαπλές πρωτεΐνες του ξενιστή, συμπεριλαμβανομένων των φωσφατασών της πρωτεϊνικής τυροσίνης, οδηγώντας σε μείωση των προφλεγμονωδών αποκρίσεων και της παρουσίασης αντιγόνων (Flannery et al., 2011).

3.2. M1 και M2 υπότυποι μακροφάγων ύστερα από μόλυνση με *Leishmania*

Ο ρόλος των υποομάδων μακροφάγων στη μόλυνση από *Leishmania* δεν έχει διερευνηθεί διεξοδικά. Ωστόσο, ο θεμελιώδης ρόλος αυτών των κυττάρων στην ανάπτυξη της βλάβης υποστηρίζεται από τους υπότυπους M1(φλεγμονωδών) και M2 (αντιφλεγμονωδών) μακροφάγων, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της λεισμανίασης. Οι μελέτες για την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή και του παρασίτου *Leishmania*, είναι άμεσα συνυφασμένες με την πόλωση των μακροφάγων, ενώ παίζουν σημαντικό ρόλο και στις θεραπευτικές στρατηγικές για τη διαμόρφωση βασικών μορίων που ελέγχουν την επιβίωση και ανάπτυξη των ενδοκυττάρων παρασίτων. Σε γενικές γραμμές οι υπότυποι M2 σχετίζονται με την επιβίωση και την ενδοκυττάρια ανάπτυξη του παρασίτου, ενώ οι υπότυποι M1 με τη καταστροφή του παρασίτου (Tomiotto-Pellissier et al., 2018). Παρακάτω θα αναφερθούμε στους υπότυπους πόλωσης των μακροφάγων που απαντώνται στη σπλαχνική και τις δερματικές μορφές λεισμανίασης (Tomiotto-Pellissier et al., 2018).

3.3. Πόλωση μακροφάγων στη δερματική λεισμανίαση

Οι ασθενείς με δερματική λεισμανίαση εμφανίζουν στο πλάσμα του αίματος αυξημένα επίπεδα Arg-1, TGF-β και PGE2, καθώς και αυξημένη αργινίνη στις βλάβες, γεγονός που υποδηλώνει ότι μακροφάγα τύπου M2, μπορεί να παίζουν ρόλο στην παθογένεια της νόσου. Υπό αυτή την έννοια, μια μελέτη *in vitro* κατέδειξε ότι μόνο τα M2 μακροφάγα επιτρέπουν την επιβίωση *L. major* και *L. amazonensis*. Μελέτες έδειξαν ότι η λιποφωσφογλυκάνη (LPG) και η γλυκοπρωτεΐνη GP63 των παρασίτων δρουν στα M2 μακροφάγα και καταστέλλουν τα μη κωδικοποιημένα RNA, γεγονός που κάνει αυτά τα κύτταρα ευάλωτα στη μόλυνση (Guri et al., 2008). Η Lee et al. κατέδειξε επίσης ότι ένα μη μολυσματικό στέλεχος *L. major* αλληλεπιδρούσε αποτελεσματικά με τα M2 μακροφάγα (CD206hi), τα οποία εκδήλωναν φαγοκυτταρική δραστηριότητα έναντι του παρασίτου *in vitro* και *in vivo*. Ωστόσο, ένα στέλεχος που προκαλούσε αυτοθεραπευόμενες δερματικές αλλοιώσεις, εμφάνιζε μικρότερου βαθμού φαγοκυττάρωση από τα M2 μακροφάγα. Η μελέτη έδειξε ότι η μόλυνση των μακροφάγων M2 έπαιξε καθοριστικό ρόλο στη σοβαρότητα της δερματικής νόσου (Lee et al., 2018).

Ο ρόλος των υποδοχέων που ενεργοποιούνται από τους πολλαπλασιαστές των υπεροξεισωμάτων (PPARs) διερευνήθηκε σε μακροφάγα ποντικού, τα οποία μολύνθηκαν με στελέχη ανθεκτικά και ευαίσθητα στη μόλυνση από *Leishmania*. Οι PPARs είναι παράγοντες μεταγραφής, εκφράζονται στα μακροφάγα και ρυθμίζουν την έκφραση ορισμένων γονιδίων που σχετίζονται με τη φλεγμονώδη απόκριση (Rigamonti et al., 2008). Οι Odegaard et al. έδειξαν ότι η σίγαση PPARγ καθυστερεί στην εξέλιξη της νόσου, μειώνοντας το παρασιτικό φορτίο. Είναι σημαντικό ότι τα γονίδια που εκφράζονται σε εναλλακτικά ενεργοποιημένα μακροφάγα, όπως τα Arg-1, Mgc1 και

Clec7a, σε διακοπή των συνδετών PPAR γ στα ποντίκια είναι μειωμένα στους ιστούς. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν έντονα ότι ο PPAR γ απαιτείται για την απόκτηση και διατήρηση των M2 μακροφάγων στη *L. major* (Odegaard et al., 2007). Εκτός αυτού, οι Gallardo-Soler et al. έδειξαν ότι οι συνδέτες PPAR γ και - δ προάγουν την ενδοκυττάρια ανάπτυξη της αμαστιγωτής μορφής *L. major* σε μολυσμένα μακροφάγα, υποδηλώνοντας ότι οι συνδέτες PPAR προάγουν την ανάπτυξη του αμαστιγωτού στα M2 μακροφάγα με τρόπο εξαρτώμενο από την αργινάση (Gallardo-Soler κ.ά. 2008). Από την άλλη πλευρά, η έκφραση του PPAR προκάλεσε την ενεργοποίηση της κυτταρικής σειράς μακροφάγων του ποντικού J774A.1 μέσω πόλωσης προς ένα προφίλ M1, με υψηλή παραγωγή προφλεγμονωδών μεσολαβητών (TNF- α , IL-1 β , IL-6, TLR4 και ROS) και αύξηση στη μικροβιοκτόνο δράση έναντι της *L. mexicana* (Díaz-Gandarilla et al., 2013).

Ο διαμεμβρανικός ενεργοποιητής και διαμορφωτής ασβεστίου cyclophilin ligand interactor (TACI) είναι ένα βασικό μόριο για την διατήρηση των πλασματοκυττάρων. Ο παράγοντας αυτός ανήκει στην οικογένεια TNF και απαιτείται σε λοιμώξεις όπου η προστασία εξαρτάται από απόκριση των αντισωμάτων. Η ανάλυση του φαινότυπου των μακροφάγων αποκάλυψε ότι τα μακροφάγα προσάρμοσαν τον φαινότυπο M2 απουσία του TACI. Τα επίπεδα των δεικτών M2, δηλ. IL-4R α και CD206, ήταν σημαντικά υψηλότερα στα μακροφάγα με διακοπή του TACI. Τα ποντίκια με αποκλεισμό του TACI δεν μπόρεσαν να ελέγξουν *in vitro* τη μόλυνση από *L. major*, γεγονός που επιβεβαιώνει τον M2 φαινότυπό τους, και ο ενδοδερμικός ενοφθαλμισμός του παρασίτου είχε ως αποτέλεσμα πιο σοβαρή εκδήλωση της νόσου από ό,τι στο ανθεκτικό C57BL/6 στέλεχος. Η μεταφορά μακροφάγων αγρίου τύπου (WT) σε ποντίκια με διακοπή TACI, μείωσε σημαντικά τη σοβαρότητα της νόσου (Allman et al., 2015).

Είναι θεμελιώδης ο ρόλος του TNF στην επαγωγή των M1, στη διαφοροποίηση και τον αποκλεισμό της πόλωσης M2 στο ήπαρ μολυσμένων ποντικών με *L. major*. Οι εν λόγω συγγραφείς περιέγραψαν επίσης τον ρόλο της IL-6, η οποία δεν παρενέβη στον φαινότυπο των μακροφάγων από μόνη της, αλλά εκφράστηκε σε μεγάλο βαθμό στα M2 μακροφάγα. Οι συγγραφείς πρότειναν ότι μια ισορροπία μεταξύ TNF και IL-6 μεσολαβεί την πόλωση των μακροφάγων και στη μόλυνση από τον *L. major* (Hu et al., 2018). Οι Vellozo et al. κατέδειξαν επίσης ότι η αντίσταση των ποντικών C57BL/6 στη μόλυνση από *Leishmania* οφείλεται στην ικανότητά τους να ωριμάζουν στο περιτόνιο του μακροφάγου από M0 σε M1. Τα ευαίσθητα ποντίκια (BALB/c) παρουσιάζουν στο περιτόνιο ανώριμα μακροφάγα και υποκύπτουν στη μόλυνση. Ωστόσο, και τα δύο στελέχη στα ποντίκια είναι ανθεκτικά στη λοίμωξη από *L. braziliensis* επειδή μετατρέπουν τα μακροφάγα M0 σε M1, παρά την ατελή ωρίμανση σε M1 (Vellozo et al., 2017).

Η συγκαλλιέργεια μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων και μολυσμένων μακροφάγων από *L. major* προκάλεσαν επίσης ένα συμβάν που υποδηλώνουν τη πόλωση M1, με την επαγωγή

φλεγμονωδών κυτταροκινών και μείωση των επιπέδων της IL-10. Αυτή η στρατηγική παρέχει νέες ελπίδες για τη θεραπεία με βλαστοκύτταρα στον έλεγχο της *L. major* (Dameshghi et al., 2016).

Ο SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor) είναι ένας ισχυρός αναστολέας πρωτεάσης σερίνης που εμφανίζει αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδεις λειτουργίες. Ο ρόλος του SLPI στο μολυσμένο μακροφάγο διερευνήθηκε και αποδείχθηκε ότι με τη διακοπή του, τα μακροφάγα παράγαν υψηλά επίπεδα iNOS και IFN- γ αλλά απέτυχαν να περιορίσουν τη δερματική λοίμωξη από *L. major*. Η μελέτη αυτή υπογραμμίζει ότι μια πολύ ισχυρή απόκριση M1 είναι επιζήμια σε μοντέλα του *L. major* και προκαλεί τραυματισμό των ιστών λόγω της επιδεινούμενης φλεγμονής. Η μελέτη αυτή υποδηλώνει ότι η ισορροπία των μακροφάγων M1 και M2 επηρεάζει την έκβαση της έμφυτης άμυνας του ξενιστή έναντι των ενδοκυτταρικών παρασίτων και ο SLPI είναι κρίσιμος για το συντονισμό αυτής της ισορροπίας και της αντίστασης στη χρόνια λειψμανίαση (McCartney-Francis et al., 2014).

Μια άλλη μελέτη που αφορά τη Μετά-Καλαζάρ Δερματική λειψμανίαση (PKDL) έδειξε ότι τα μονοκύτταρα ασθενών παρουσίασαν μειωμένη έκφραση του TLR-2/4 και εξασθενημένη παραγωγή αντιδραστικών οξειδωτικών/νιτροζικών ειδών. Οι ασθενείς παρουσίασαν επίσης αυξημένη έκφραση των κλασικών M2 δεικτών (Arg-1, PPAR γ και CD206) στα μονοκύτταρα και στα μακροφάγα της βλάβης, γεγονός που υποδεικνύει την πόλωση M2 των μακροφάγων. Αυτά τα υποσύνολα φάνηκε να συντηρούν τη χρονιότητα της νόσου, η οποία αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της PKDL (Mukhopadhyay et al., 2015).

Δύο μελέτες έδειξαν την ανάπτυξη νέων φαρμάκων που απευθύνονται στην πλαστικότητα μονοκυττάρων M1/M2 (Farias et al., 2017), (de Santana et al., 2017). Η πρώτη μελέτη έδειξε ότι οι υψηλές αραιώσεις αντιμονίου, ένα ομοιοπαθητικό φάρμακο, προκάλεσε από το *L. amazonensis* μείωση της προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-6, IL-12 και IFN- γ) και χημειοκινών (CCL-2 και CCL-4) σε κύτταρα RAW. Η θεραπεία προκάλεσε επίσης αύξηση της εσωτερίκευσης των παρασίτων, αλλά υπήρξε μείωση του όξινου pH των κυστιδίων, η οποία συνεπάγεται μικρότερη εξάλειψη των αμαστιγωτών μορφών. Οι ερευνητές προτείνουν ότι το φαινόμενο αυτό σχετίζεται με την πόλωση M2 και την ρύθμιση των γεγονότων χρόνιας φλεγμονής (de Santana et al., 2017).

Η δεύτερη μελέτη χρησιμοποίησε την κροτοξίνη, η οποία είναι το κύριο συστατικό του δηλητηρίου του *Crotalus durissus terrificus*, για τη θεραπεία περιτοναϊκών μακροφάγων BALB/c ποντικών που μολύνθηκαν με το είδος *L. amazonensis*. Τα κύτταρα του ξενιστή παρουσίασαν αύξηση του μονοξειδίου του αζώτου, της IL-6 και του TNF- α , οι οποίες συγκλίνουν σε ένα προφίλ ενεργοποίησης M1, όπως υποδηλώνεται από τις μορφολογικές τους αλλαγές (μεγαλύτερη εξάπλωση), προκαλώντας παρασιτοκτόνο δράση έναντι των ενδοκυτταρικών παρασίτων, η οποία μπορεί να σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση της δερματικής λειψμανίασης (Farias et al., 2017).

Οι Siewe et al. πρότειναν ένα μαθηματικό μοντέλο που αναφέρει ότι το παράσιτο *Leishmania* εκμεταλλεύεται το ανοσοποιητικό σύστημα και εισβάλλει στα μακροφάγα M1 και M2. Προσομοιώσεις του μοντέλου έδειξαν ότι ο αριθμός των μακροφάγων M2 συνεχώς αυξήθηκαν και τα μακροφάγα M1 μειώθηκαν κατά τη διάρκεια της λοίμωξης, αλλά το άθροισμα του αριθμού των M1 και M2 κυττάρων έφθασε σε σταθερή κατάσταση, η οποία ήταν περίπου η ίδια με εκείνη την υγιή κατάσταση του ξενιστή. Η αναλογία παρασίτων *Leishmania* / μακροφάγων εξαρτάται από την αναλογία τους κατά τη χρονική στιγμή της αρχικής μόλυνσης (Siewe et al., 2016).

3.4. Πόλωση μακροφάγων στη σπλαχνική λεισμανίαση

Η σπλαχνική λεισμανίαση είναι σοβαρή νόσος, με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας (Burza et al., 2018). Η σπλαχνική λεισμανίαση προκαλείται από παράσιτα *L donovani complex* (*L. donovani* και *L. infantum*) εντοπιζόμενα σε εσωτερικά όργανα (σπλήνας, ήπαρ και μυελός των οστών) (de Freitas et al., 2016). Έχει αποδειχθεί ότι τα επίπεδα αργινάσης στο αίμα σε ασθενείς με σπλαχνική λεισμανίαση είναι σημαντικά αυξημένα (Abebe et al., 2013), ενώ τα επίπεδα NO είναι μειωμένα (Sarkar et al., 2011). Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι τα μακροφάγα ασθενών με σπλαχνική λεισμανίαση παρουσιάζουν μειωμένη οξειδωτική έκρηξη και παρουσίαση αντιγόνου, με ρυθμιστικό M2 φαινότυπο που χαρακτηρίζεται από υψηλά CD163, IL-10 και CXCL14 επίπεδα (Roy et al., 2018).

Στην ίδια κατεύθυνση, οι Silva et al. (Silva et al., 2017) απέδειξαν ότι το μόριο CD163s συσχετίστηκε με πόλωση μακροφάγου τύπου M2 και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης της κλινικής βαρύτητας σε ασθενείς με σπλαχνική λεισμανίαση. Το παράσιτο *L. donovani* προάγει την έξοδο των μονοκυττάρων από το μυελό των οστών, με ρυθμιστικό φαινότυπο που λειτουργεί ως ασφαλής στόχος για το παράσιτο (Hammami et al., 2017). Αυτά τα δεδομένα συνάδουν με αναλύσεις μακροφάγων προερχόμενων από σκύλους με σπλαχνική λεισμανίαση όπου παρουσίασαν μεγαλύτερο αριθμό μακροφάγων πολωμένων με M2 σε σύγκριση με υγιείς σκύλους. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η επικράτηση του φαινοτύπου M2 (υψηλή έκφραση CD163) στη σπλαχνική λεισμανίαση, ευνοεί τον πολλαπλασιασμό *L. infantum* στο δέρμα, το σπλήνα και τους λεμφαδένες (Moreira et al., 2016).

Ομοίως, οι Chan et al. έδειξαν ότι η πόλωση τύπου 2 των μακροφάγων, επάγεται από το παράσιτο μέσω της επαγωγής του PPAR γ . Οι συγγραφείς έδειξαν ότι η ενεργοποίηση του PPAR γ με *L. donovani* προάγει την επιβίωση, ενώ η αναστολή του PPAR γ διευκολύνει την απομάκρυνση του παρασίτου. Έτσι, τα παράσιτα *Leishmania* αξιοποιούν τον υποδοχέα αυτό, για να διατηρήσουν το M2 φαινότυπο, αυξάνοντας έτσι τη μολυσματικότητα της νόσου (Chan et al., 2012).

Μια διαφορετική ομάδα έδειξε ότι τα μακροφάγα που καλλιεργήθηκαν από τους λεμφαδένες των σκύλων με σπλαχνική λεισμανίαση εμφάνισαν χαμηλή δραστηριότητα Arg-1 και υψηλή παραγωγή NO και PGE2 σε σύγκριση με μη μολυσμένους σκύλους. Αυτή η μελέτη υποδηλώνει ότι τα

μακροφάγα M1 συμμετείχαν στην ανοσολογική απόκριση στους λεμφαδένες σε αυτά τα ζώα (Venturin et al., 2016). Μία άλλη μελέτη έδειξε ότι μύες BALB/c που μολύνθηκαν με μεταλλαγμένα παράσιτα *L. donovani*, ανέπτυξαν έμφυτη ανοσία μέσω της κλασικής ενεργοποίησης των μακροφάγων (M1) με υπερέκφραση των IL-1β, TNF-α, IL-12 και μείωση των γονιδίων IL-10, YM1, Arg-1 και MRC-1. Άρα η μόλυνση με γενετικά απενεργοποιημένα παράσιτα μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία προστατευτικών αποκρίσεων Th1 σε ποντικούς (Bhattacharya et al., 2015).

Αυτή η αντιπαράθεση μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι διαφορετικά πρότυπα γονιδιακής έκφρασης ανιχνεύονται σε μακροφάγα σε διαφορετικά χρονικά σημεία (Ontoria et al., 2018). Μια πρόσφατη μελέτη απέδειξε ότι η πρώιμη ανταπόκριση έναντι της μόλυνσης από *L. donovani* ήταν διακριτή από την αύξηση των δεικτών που χαρακτηρίζουν την απάντηση Th1 και M1-μόρια ενεργοποίησης μακροφάγων (IFN-γ, Stat1, Cxcl9, Cxcl10, Ccr5, Cxcr3, Xcl1 και Ccl3). Ωστόσο, αυτή η ενεργοποίηση δεν ήταν προστατευτική διότι αυξήθηκε η παρασιτική επιβάρυνση σε συνάρτηση με το χρόνο. Δεν υπήρξε αξιοσημείωτη επικάλυψη φαινοτύπων των μακροφάγων σε ενδιάμεσους χρόνους μόλυνσης και η υπερέκφραση αυτών των δεικτών Th1/M1 αποκαταστάθηκε αργότερα στη χρόνια φάση, υποδηλώνοντας επανεμφάνιση της κλασικής προστατευτικής ανοσολογικής απόκρισης, χωρίς θετική επιδραση στην εξέλιξη της λεισμανίασης, λόγω ύπαρξης υψηλού παρασιτικού φορτίου (Ontoria et al., 2018).

Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι δεν υπάρχουν «καλοί και κακοί τύποι» στην πόλωση των μακροφάγων μετά τη μόλυνση με *Leishmania*. Επομένως, μια ισορροπία μεταξύ της ισχυρής μικροβιοκτόνου απόκρισης των μακροφάγων M1 και η πιθανή ρύθμιση από τα μακροφάγα M2 μπορεί να είναι το κλειδί για την υπερνίκηση της λεισμανίασης.

Υποδεικνύεται από τα παραπάνω ότι απαιτούνται περαιτέρω μελέτες αναφορικά με ισορροπία των δύο κύριων πληθυσμών μακροφάγων στον έλεγχο της λοίμωξης από το παράσιτο *Leishmania* (Tomiotto-Pellissier et al., 2018).

Κεφάλαιο 4

4.1. Η Επαγωγή κινασών DYRK1A και DYRK1B σε πρωτογενή μακροφάγα ποντικού επιμολυσμένα με προμαστιγωτές μορφές *L. donovani*

Μελέτες υψηλής ευκρίνειας, όπως η ποσοτική πρωτεωμική με SILAC (Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, σταθερή επισήμανση ισοτόπων από αμινοξέα σε κυτταροκαλλιέργεια), σε πρωτογενή μακροφάγα ποντικών BALB/c που προέρχονται από το μυελό των οστών μολυσμένα ή μη με προμαστιγωτές μορφές *L. donovani* έχουν αναδείξει καινούργιες βιολογικές διαδικασίες του μακροφάγου που μεταβάλλονται, όπως του πρωτογενούς μεταβολισμού και της καταβολικής διαδικασίας και της λυσοσωμικής οργάνωσης. Ανάμεσα στις πρωτεΐνες που φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη έκφραση στα μολυσμένα με *L. donovani* παράσιτα, ήταν η DYRK1A και DYRK1B (Smirlis et al., 2020).

Κεφάλαιο 5

5.1. Κινάσες ρυθμιζόμενες από φωσφορυλίωση τυροσίνης διπλής εξειδίκευσης (DYRKs) και cdc2-Like Kinases (CLKs) στις ανθρώπινες ασθένειες

Οι ρυθμιζόμενες από φωσφορυλίωση τυροσίνης κινάσες διπλής εξειδίκευσης (DYRK1A, 1B, 2-4) και οι cdc2-like κινάσες (CLK1-4) ανήκουν στην ομάδα CMGC των κινάσων σερίνης/θρεονίνης. Αυτές οι πρωτεϊνικές κινάσες εμπλέκονται σε πολλαπλές κυτταρικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της ενδοκυττάριας σηματοδότησης του mRNA, τη μεταγραφή της χρωματίνης, επιδιόρθωση βλαβών του DNA, κυτταρική επιβίωση, έλεγχος του κυτταρικού κύκλου, διαφοροποίηση ομοκυστεΐνη/μεθειονίνη/φυλλικό οξύ, ρύθμιση της θερμοκρασίας του σώματος, ενδοκυττάρωση, νευρωνική ανάπτυξη κ.λπ. Μη φυσιολογική έκφραση ή και δραστηριότητα ορισμένων από αυτές τις κινάσες, ειδικότερα DYRK1A, παρατηρείται σε πολλά νοσήματα του ανθρώπινου νευρικού συστήματος, όπως γνωστικά ελλείμματα που σχετίζονται με το σύνδρομο Down, νόσος Alzheimer και συναφείς νόσοι, άνοια, νόσος του Pick, νόσος Parkinson και άλλες νευροεκφυλιστικές νόσοι, Rhesus-McDermid σύνδρομο, αυτισμός και διαταραχή ανεπάρκειας CDKL5. Οι DYRKs και CLKs εμπλέκονται επίσης στον μη φυσιολογικό μεταβολισμό φυλλικού οξέος/μεθειονίνης, την οστεοαρθρίτιδα, σε διάφορους συμπαγείς καρκίνους (γλοιοβλάστωμα, του μαστού και του παγκρέατος) και λευχαιμίες (οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, οξεία μεγακαρυοβλαστική λευχαιμία), και ιογενείς λοιμώξεις. Αυτή η ποικιλία παθολογικών επιπτώσεων απαιτεί καλύτερη κατανόηση των ρυθμίσεων και των υποστρωμάτων των DYRKs και των CLKs και την ανάπτυξη ισχυρών και επιλεκτικών αναστολέων αυτών των κινασών και την αξιολόγησή τους ως θεραπευτικά φάρμακα (Lindberg & Meijer, 2021).

Κεφάλαιο 6

6.1. Σκοπός

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η συσχέτιση της λειτουργίας των μακροφάγων με τις κινάσες DYRK1A και DYRK1B και η μελέτη της αλληλεπίδρασης των μακροφάγων που έχουν υποστεί φαρμακολογική αναστολή των κινασών αυτών, με προμαστογωτές μορφές του συμπλέγματος *Leishmania donovani*.

6.2.Υλικά - Μέθοδοι

6.2.1. Αντιδραστήρια

Χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια:

- Θρεπτικά υλικά για τις κυτταροκαλλιέργειες: RPMI-1640 (Life Technologies)
- Χαρμίνη
- PBS
- Schneider's (SIGMA, S-9895) ορός από έμβρυο μόσχου (FBS, Gibco)
- Αντιβιοτικά για τις κυτταροκαλλιέργειες: πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (Gibco),υγρομυκίνη B (Invitrogen), Geneticin (G418) (Applichem), Nourseothricin (Jena Bioscience)
- Άλλα αντιβιοτικά: αμπικιλίνη (Bristol-Myers Squibb)
- Alamar Blue αντιδραστήριο για τα πειράματα κυτταρικής επιβίωσης (Biosource AG).
- Μόρια εκκινητές για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Thermo)

6.2.2. Αναλώσιμα υλικά

- Δοκιμαστικοί σωλήνες 15 και 50ml
- Πλαστικά ακρορύγχια των 20μl και 200μl (tips)
- Αποστειρωμένες πιπέτες 2ml, 5ml και 10ml (Sarstedt)
- Κρυοπροστατευτικοί σωλήνες 1,5ml (Nunc)
- Σωληνάκια "eppendorf" 1,5ml (Greiner)
- Φιάλες καλλιέργειας παρασίτων 25 και 50cm² (Nunc).
- Τρυβλία κυτταροκαλλιεργειών και πλάκες 24 και 96 φρεατίων για κυτταροκαλλιέργειες.
- Αποστειρωμένα πλαστικά ξέστρα κυττάρων.
- Υλικό τοποθέτησης καλυπτρίδας (MOWIOL)(Sigma)
- Αντίσωμα αρουραίου ειδικό για αντιγόνο ποντικού IL-12(p40/70)-PE (BD)

6.3. Καλλιέργειες παρασίτων *Leishmania*

Οι προμαστιγωτές μορφές του συμπλέγματος *L. donovani* ήτοι *L. infantum* αγρίου τύπου (MHOM/GR/2001/GH8) ή *L. donovani* (HUSSEN, MHOM/ET/2000/HUSSEN/Lg13) επιμολυσμένες με επίσωμα rF_xSAT, που εκφράζει τη GFP, καλλιεργήθηκαν τους 25°C απουσία CO₂, σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 εμπλουτισμένο με 10% (v/v) FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco), 10mM HEPES (Gibco) και αντιβιοτικά (πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη 100U/ml, Gibco). Για το είδος *L. donovani* η καλλιέργεια έγινε παρουσία του αντιβιοτικού nourseothrycin (100 μg/ml). Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο ενοφθαλμισμός της καλλιέργειας προμαστιγωτών μορφών χρησιμοποιήθηκαν 10⁶ παράσιτα/ml, τα οποία περισυλλεχθηκαν στην στατική φάση ανάπτυξης (5η/6η ημέρα καλλιέργειας, 2-3x10⁷ παράσιτα/ml). Η περισυλλογή των παρασίτων γίνεται με φυγοκέντρηση (2.300rpm για 10 min στους 4°C). Το ίζημα των παρασίτων αναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS και ακολούθησαν 2-3 εκπλύσεις με φυγοκέντρηση.

Η διατήρηση των διαφόρων στελεχών *Leishmania* για μικρό χρονικό διάστημα (-80°C), πραγματοποιήθηκε σε ειδικούς κρυοπροστατευτικούς σωλήνες 1,5ml με περισυλλογή 10⁷ παρασίτων/στέλεχος τα οποία ελαιωρήθηκαν σε DMEM/ εμπλουτισμένο με 30% FBS/10% DMSO. Η διατήρησή των στελεχών για μεγάλα χρονικά διαστήματα απαιτεί τη μεταφορά τους σε υγρό άζωτο (-170°C).

6.4. Κυτταροκαλλιέργειες Μακροφάγων J774.1

Τα μακροφάγα ποντικού J774.1 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 εμπλουτισμένο με 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco), 10mM HEPES (Gibco) και προσθήκη αντιβιοτικών (πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη 100U/ml) (Gibco). Για τον ενοφθαλμισμό της καλλιέργειας μακροφάγων χρησιμοποιούνται 10⁵ μακροφάγα/ml.

Τα μακροφάγα διατηρήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37°C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ για 7 περίπου ημέρες, μέχρι να καλυφθεί ο πάχητας της φιάλης κατά 80% περίπου. Τα προσκολλημένα μακροφάγα είναι ζωντανά, ενώ όσα αιωρούνται στο υλικό κυτταροκαλλιέργειας είναι νεκρά. Κατά την ανακαλλιέργεια, απορρίφθηκε το υπερκείμενο το οποίο περιείχε τα νεκρά μακροφάγα με προσθήκη υλικού κυτταροκαλλιέργειας, και αποκολλήθηκαν με ξέστρο ζωντανά μακροφάγα, που χρησιμοποιήθηκαν για εμβολιασμό σε νέα κυτταροκαλλιέργεια. Ο χρόνος διπλασιασμού των μακροφάγων J774.1 είναι 24h. Η περισυλλογή των μακροφάγων J774.1 γίνεται με φυγοκέντρηση (1.000rpm) για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η κυτταρική σειρά J774.1 διατηρείται σε RPMI/30% FBS/10% DMSO για μικρό χρονικό διάστημα στους -80°C ή εναλλακτικά για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε υγρό άζωτο.

6.5. Χρήση του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) για την επαγωγή της κλασσικής ενεργοποίησης των μακροφάγων (M1)

Για τη μελέτη δεικτών του μακροφάγου, οι οποίοι ανιχνεύονται στην πόλωση των μακροφάγων παρουσία παρασίτων και χαρμίνης, χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες μακροφάγα στα οποία προστέθηκε 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 24 ώρες.

6.6. Έλεγχος *in vitro* κυτταρικής επιβίωσης-πολλαπλασιασμού και εφαρμογή της μεθόδου Alamar blue σε παράσιτα *Leishmania*

Το *Alamar blue* είναι ένας δείκτης οξειδωσης - αναγωγής, μη τοξικός για τα κύτταρα και χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της ανάπτυξης και της βιωσιμότητας κυττάρων επωασμένων με ουσίες. Το *Alamar blue* μπορεί να αναχθεί από κυτταρικούς μεταβολίτες των ζωντανών κυττάρων, όπως NADH, FADH, NADPH. Η αναγωγή συνοδεύεται από μία μετρήσιμη μετατροπή του χρώματος, από την οξειδωμένη μορφή (μη φθορίζουσα-μπλε) στην αναγόμενη μορφή (φθορίζουσα-κόκκινη).

Για τον *in vitro* έλεγχο της κυτταρικής επιβίωσης χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου στατικής φάσης ($2,5 \times 10^7$ παράσιτα/ml). Επιστρώθηκαν 5×10^5 παράσιτα/200 μl υλικού κυτταροκαλλιέργειας/φρεάτιο ($2,5 \times 10^6$ παράσιτα/ml). Σε κάθε φρεάτιο προστέθηκε χαρμίνη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ή ο ίδιος όγκος του διαλύτη DMSO (φρεάτια-μάρτυρες), ώστε η τελική συγκέντρωση του DMSO στα φρεάτια να είναι <1%. Συγκέντρωση DMSO μεγαλύτερη από 2% μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη των παρασίτων. Κάθε συγκέντρωση χαρμίνης ή DMSO ελέγχθηκε σε τριπλά φρεάτια. Ως αρνητικό μάρτυρα στο πείραμα περιλαμβάνονται και φρεάτια μόνο με υλικό κυτταροκαλλιέργειας. Τα παράσιτα επώαστηκαν για 72h στους 26°C, κατόπιν προστέθηκε 20 μl *Alamar blue*/φρεάτιο, ακολούθησε επώαση για 24h και φωτομέτρηση σε Elisa plate reader στα 550nm, με αναφορικό μήκος κύματος στα 620 nm. Οι τιμές οπτικής πυκνότητας που λαμβάνονται στα φρεάτια-θετικούς μάρτυρες, που έχει προστεθεί DMSO είναι περίπου 0,9-1 και αντιστοιχούν σε 100% ανάπτυξη των παρασίτων. Σύγκριση των τιμών οπτικής πυκνότητας στα φρεάτια με χαρμίνη, σε σχέση με τα φρεάτια-μάρτυρες, επιτρέπει τον υπολογισμό της κατάλληλης συγκέντρωσης χαρμίνης, που μειώνει τον αριθμό των προμαστιγωτών κατά 50%. Έγινε ανάλυση των αποτελεσμάτων, με το πρόγραμμα *graphpad*.

6.7. Εφαρμογή της μεθόδου Alamar blue σε ενδοκυτταρικά αμαστιγωτά *L. donovani*

Για την εφαρμογή της μεθόδου, μακροφάγα J774.1 προεπώαστηκαν με 10 μM χαρμίνης (χρονικό διάστημα 24-76 ώρες). Η χαρμίνη αφαιρέθηκε, πραγματοποιήθηκαν τρεις εκπλύσεις με αποστειρωμένο PBS και τα μακροφάγα μολύνθηκαν με παράσιτα *Leishmania* της στατικής φάσης

ανάπτυξης. Στη συνέχεια ελέγχθηκε η επιβίωση των παρασίτων με λύση των μακροφάγων και έμμεση ποσοτικοποίηση των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών με τη μέθοδο του *Alamar blue*.

Συγκεκριμένα, αρχικά επιστρώθηκαν 4×10^4 μακροφάγα J774.1 σε 200μl υλικού κυτταροκαλλιέργειας RPMI/φρεάτιο (2×10^5 μακροφάγα/ml) σε πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 96 φρεατίων και επώαστηκαν σε θάλαμο θερμοκρασίας 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ για 18h, ώστε να πραγματοποιηθεί η προσκόλληση των κυττάρων. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το υπερκείμενο υλικό και προστέθηκε ποσότητα 8×10^5 μετακυκλικών προμαστιγωτών (4×10^6 παράσιτα/ml) σε 200μl υλικού κυτταροκαλλιέργειας/φρεάτιο. Μετά το τέλος της επώασης των μακροφάγων με τα παράσιτα (24ώρες στους 37°C), απορρίφθηκε το υπερκείμενο και πραγματοποιήθηκαν 3 εκπλύσεις με υλικό RPMI χωρίς ορό ή με αποστειρωμένο PBS, ώστε να απομακρυνθούν τα παράσιτα που δεν έχουν εισέλθει στα μακροφάγα.

Ακολούθησε η προσθήκη 200μl RPMI/φρεάτιο και προσθήκη χαρμίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ή ίσος όγκος του διαλύτη DMSO χωρίς παράσιτα (φρεάτια-control). Τα μολυσμένα μακροφάγα επώαστηκαν παρουσία των φαρμάκων στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ για 72ώρες. Στη συνέχεια έγινε απομάκρυνση του υπερκειμένου και προσθήκη 100μl/φρεάτιο διαλύματος 0,01% SDS σε PBS. Ακολούθησε επώαση στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ για 30 min. Στο διάστημα αυτό λύνονται τα μακροφάγα, ενώ τα αμαστιγωτά που απελευθερώνονται παραμένουν ακέραια. Ακολούθησε προσθήκη υλικού κυτταροκαλλιέργειας Schneider's εμπλουτισμένο με 20% FBS (100μl/φρεάτιο) και επώαση στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ για 48ώρες περίπου. Στο τέλος της επώασης προστέθηκε Alamar blue 20μl /φρεάτιο για 24ώρες και ακολούθησε φωτομέτρηση όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 6.4. Σύγκριση των τιμών οπτικής πυκνότητας στα φρεάτια με χαρμίνη, σε σχέση με τα φρεάτια-μάρτυρες, επιτρέπει τον υπολογισμό της κατάλληλης συγκέντρωσης χαρμίνης, που επιφέρει μείωση του αριθμού των αμαστιγωτών κατά 50%. Έγινε ανάλυση των αποτελεσμάτων, με το πρόγραμμα *graphpad*.

6.8. Εφαρμογή της μεθόδου Alamar blue σε μακροφάγα J774.1

Επιστρώθηκαν 4×10^4 μακροφάγα J774.1 σε 200μl υλικού κυτταροκαλλιέργειας RPMI/φρεάτιο (2×10^5 μακροφάγα/ml) σε πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 96 φρεατίων και επώαστηκαν σε θάλαμο θερμοκρασίας 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ για 18ώρες, για να πραγματοποιηθεί η προσκόλληση των κυττάρων. Ακολούθησε απομάκρυνση του υπερκειμένου υλικού και προσθήκη χαρμίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ή ίσου όγκου διαλύτη DMSO (φρεάτια-control) και επώαση στους 37°C σε ατμοσφαιρα 5% CO₂ για 72h. Στη συνέχεια, έγινε προσθηκη 20μl Alamar blue/φρεάτιο για 12h και φωτομέτρηση όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 6.4. Οι τιμές οπτικής πυκνότητας των φρεατίων με χαρμίνη συγκρίνονται με τις τιμές των φρεατίων-μαρτυρων, έτσι ώστε να υπολογιστεί η κατάλληλη συγκέντρωση χαρμίνης, που αναστέλλει τα μακροφάγα κατά 50%.

6.9. Έλεγχος του αριθμού των ενδοκυττάρων παρασίτων με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού

Για τον έλεγχο του αριθμού των ενδοκυττάρων παρασίτων, επιστρώθηκαν 5×10^5 μακροφάγα σε αποστειρωμένες στρογγυλές καλυπτρίδες επικαλυμμένες με πολυλυσίνη ήδη τοποθετημένες σε πλάκες 24 φρεατίων. Τα μακροφάγα αφέθηκαν 6 ώρες για να προσκολληθούν στις καλυπτρίδες και ακολούθησε η προσθήκη 5×10^6 / φρεάτιο παρασίτων *L. donovani* στατικής φάσης για τουλάχιστον έξι ώρες. Ακολούθως απομακρύνθηκε το υλικό με τα ελεύθερα παράσιτα, έγιναν τρεις έκπλυσεις με αποστειρωμένο PBS, και ακολούθησε προσθήκη υλικού κυτταροκαλλιέργειας από 24ώρες -72ώρες. Πριν την ανάλυση σε συνεστιακό μικροσκόπιο, πραγματοποιήθηκαν τρεις εκπλύσεις με PBS και μονιμοποίηση με 2% (w/v) παραφολμαδεΐδη σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις με PBS, επώαση με 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ιωδιούχο προπίδιο και 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNAase A για πέντε λεπτά της ώρας και μετά το τέλος της επώασης μία έκπλυση με PBS. Χρησιμοποιήθηκαν λίγα μικρόλιτρα MOWIOL για τη τοποθέτηση καλυπτρίδας στην αντικειμενοφόρο.

6.10. Κυτταρομετρία ροής (FACS-Fluorescence-activated cell sorting)

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια μέθοδος η οποία επιτρέπει τον έλεγχο πολλών κυτταρικών δεικτών ταυτόχρονα, μετά από σήμανση των κύτταρων με φθορίζουσες χρωστικές ή αντισώματα συνδεδεμένα με διαφορετικά φθοριοχρώματα. Παράλληλα, προσδιορίζει την πυκνότητα κάθε δείκτη ανά μονάδα κυτταρικής επιφάνειας, με βάση την ένταση του φθορισμού και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων [πρόσθιος σκεδασμός FSC μέγεθος κυττάρων και πλάγιος σκεδασμός SSC-εσωτερική πολυπλοκότητα (κοκκία, οργανίδια) του κυττάρου]. Η κυτταρομετρία ροής εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία:

- για τη μελέτη του κυτταρικού θανάτου των μακροφάγων παρουσία LPS και χαρμίνης,
- για τον έλεγχο παρασιτικού φορτίου μακροφάγων επιμολυσμένων με παράσιτα *L. donovani* GFP
- και για την έκφραση μοριακών δεικτών πόλωσης όπως ιντερλευκίνη IL-12 παρουσία και απουσία χαρμίνης.

Για τον έλεγχο του κυτταρικού θανάτου, τα μακροφάγα αποκολλήθηκαν από τις φιάλες κυτταροκαλλιέργειας με ξέστρο κυττάρων, εκπλύθηκαν με 10 ml αποστειρωμένο PBS και επώαστηκαν με 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ιωδιούχου προπίδιου σε σωληνάρια για FACS. Για την ανάλυση της μόλυνσης χρησιμοποιήθηκαν 5×10^5 μακροφάγα (αναλογία μακροφάγου / παρασίτου *L. donovani* GFP 1:10). Η μόλυνση διήρκεσε 6 ώρες ενώ σε καθορισμένους χρόνους πραγματοποιείτο μονιμοποίηση διαφορετικών πληθυσμών μακροφάγων με 2% παραφολμαδεΐδη (w/v) σε PBS, για 20 λεπτά, σε

θερμοκρασία δωματίου. Η παραφορμαδεΰδη απομακρύνθηκε με τρεις διαδοχικές εκπλύσεις (1 ml PBS, 1000rpm x 10min). και στην τελευταία έκπλυση τα μακροφάγα μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια FACS. Για τον έλεγχο της έκφρασης IL-12, χρησιμοποιήθηκαν $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ μολυσμένα μακροφάγα, τα οποία επωάστηκαν με 10 μg/mL brefeldin A (μακρολίδιο αντιβιοτικό που παράγεται από διάφορα είδη μυκήτων) για 4 ώρες. Ακολούθησε μία έκπλυση με PBS-3% FBS, μονιμοποίηση με 2% παραφορμαδεΰδη για 20 λεπτά σε πάγο και τέλος μία έκπλυση PBS-3% FBS. Για τον έλεγχο της έκφρασης IL-12 προστέθηκε αντίσωμα αρουραίου, έναντι της IL-12 σημασμένο με φυκοερυθρίνη αραιωμένο σε διάλυμα 0,1% (v/v) σαπωνίνης-PBS-3% FBS ενώ ως μάρτυρας του πειράματος προστέθηκε αντίσωμα αρουραίου IgG1 σημασμένο με φυκοερυθρίνη (επώαση 30 λεπτά της ώρας, σε πάγο, στο σκοτάδι). Ακολούθησε μία έκπλυση των κυττάρων με 0,1% (v/v) σαπωνίνη σε PBS-3% FBS και τελική επαναιώρηση των κυττάρων σε 0,5 ml PBS, προκειμένου να πραγματοποιηθεί ανάλυση με FACS. Η δοκιμασία FACS έγινε με κυτταρομετρητή ροής FACS Calibur (BD) και η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τα λογισμικά BD CellQuest και FlowJo.

6.11. Απομόνωση κυτταρικού RNA και σύνθεση cDNA

Για την απομόνωση του RNA χρησιμοποιήθηκαν 10^6 κύτταρα. Χρησιμοποιήθηκε το FastGene RNA premium kit (Nippon Genetics), και ακολουθήθηκαν οι διαδικασίες προτεινόμενες από τον κατασκευαστή. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα λύθηκαν με 350 μl ρυθμιστικό RL με τελική συγκέντρωση 20 mM DTT. Το κυτταρόλυμα μεταφέρθηκε στη στήλη φίλτρου fastgene. Προκειμένου να γίνει βελτιστοποίηση της πρόσδεση RNA στη προστέθηκαν 350μl αιθανόλης (70%) και έγινε επαρκής ανακίνηση. Για τη πρόσδεση του RNA στη στήλη απομόνωσης FastGene RNA προστέθηκαν 700μl δείγματος. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση $\geq 10,000 \times g$ για ένα λεπτό (επαναλαμβάνεται η παραπάνω διαδικασία μέχρι να προστεθεί ολος ο όγκος του δείγματος). Στη συνέχεια για να διαχωριστεί η πρωτεΐνη του δείγματος, προστέθηκαν 600μl ρυθμιστικού διαλύματος RW1, ακολούθησε φυγοκεντρηση $\geq 10,00 \times g$ για 30 δευτερόλεπτα (μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάριο συλλογής δείγματος 2ml). Επιπλέον στη διαδικασία της αφαλάτωσης έγινε προσθήκη 700μl ρυθμιστικού διαλύματος RW2 και φυγοκεντρηση $\geq 10,000 \times g$ για 30 δευτερόλεπτα. Απομακρύνθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα RW2 με φυγοκέντρωση στη μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό (μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάριο δείγματος 1,5ml). Τέλος για την ολοκλήρωση της έκλουσης του RNA, προστέθηκαν 50μl ρυθμιστικού διαλύματος RE στην κεντρική μεμβράνη, έπειτα φυγοκέντρωση $\geq 10,000 \times g$ για 1 λεπτό. Ακολούθησε ποσοτικοποίηση του RNA με nanodrop.

Για την σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκε το Xpert cDNA synthesis kit (grispr) και ακολουθήσαμε τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πιο συγκεκριμένα, αναμείχθηκαν αρχικά σε ένα Eppendorf 1μl 10 mM dNTP, 1 μl oligo(dT)20 εκκινήτης, 1 μg συνολικό RNA, και διπλά απιονισμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 5 μl. Το δείγμα τοποθετήθηκε σε κυκλοποιητή PCR (MJResearch) για 5 λεπτά

στους 65 °C και στη συνέχεια στον πάγο για 2 λεπτά. Ακολούθως προστέθηκαν 4 μl ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης 5X, 0,5 μl RNase inhibitor, 1 μl XPert ανάστροφη μεταγραφάση. Η αντίδραση έλαβε χώρα στους 50 °C για 15 λεπτά και το ένζυμο απενεργοποιήθηκε στους 85 °C για 5 λεπτά.

6.12. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης–αντίστροφης μεταγραφάσης σε πραγματικό χρόνο

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης σε πραγματικό χρόνο (qRT-PCR ή qPCR), επιτρέπει την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, μέσω μέτρησης του φθορισμού σημασμένων προϊόντων της PCR. Για τον έλεγχο της έκφρασης γονιδίων IL1β, CD206, Αργινάσης και β ακτίνης χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές:

Πίνακας 1

CD206	
FCD206mouse	CTA-ACT-GGG-GTG-CTG-ACG-AG
RCD206mouse	GGC-AGT-TGA-GGA-GGT-TCA-GT
Arginase 1 mouse	
FArg1mouse	AAT-GAA-GAG-CTG-GCT-GGT-GT
RArg1mouse	CTG-GTT-GTC-AGG-GGA-GTG-TT
IL1 beta mouse	
F1L1betamouse	TGC-CAC-CTT-TTG-ACA-GTG-ATG
RIL1betamouse	AAG-GTC-CAC-GGG-AAA-GAC-AC
Beta Actin mouse	
Fbetaactinmouse	TGC-TGT-CCC-TGT-ATG-CCT-CTG
Rbetaactinmouse	TGA-TGT-CAC-GCA-CGA-TTT-CC

Για τη πραγματοποίηση της αντίδρασης qPCR, χρησιμοποιήθηκαν 50 ng cDNA. Για τη δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε η χρωστική SYBR® GREEN και το KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) Kit. Πιο συγκεκριμένα, για κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 10 μl KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X), 0.4 μl εμπρόσθιου εκκινητή (10mM, συνολική συγκέντρωση 200 nM), 0.4 μl οπίσθιου εκκινητή (10mM, συνολική συγκέντρωση 200 nM) και δις αποστειρωμένο ddH₂O μέχρι τελικό όγκο αντίδρασης 20 μl. Η αντίδραση έγινε Sacycler-96 (Sacace, Ιταλία) και οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι εξής:

Πίνακας 2

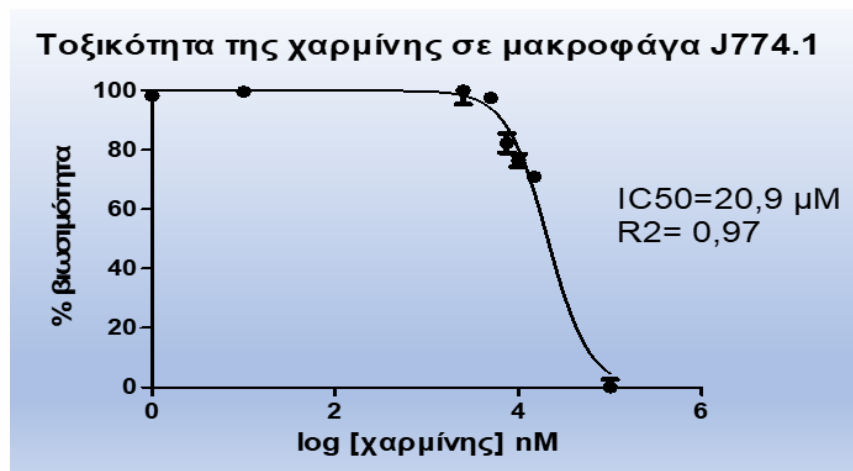
ΣΤΑΔΙΟ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΟΣ
1 x 35 κύκλους	94°C	3 ΛΕΠΤΑ
2	94°C	30 ΔΕΥΤΕΡΟΛΕΠΤΑ
3	54°C	30 ΔΕΥΤΕΡΟΛΕΠΤΑ
4 x 100 κύκλους	72°C	45 ΔΕΥΤΕΡΟΛΕΠΤΑ
5	45 °C	15 ΔΕΥΤΕΡΟΛΕΠΤΑ

Κεφάλαιο 7

7. Αποτελέσματα

7.1. Έλεγχος συγκέντρωσης της χαρμίνης στη βιωσιμότητα των μακροφάγων J774.1

Έγινε δοκιμασία βιωσιμότητας στη σειρά J774.1 για να ελεγχθεί η μέγιστη μη τοξική συγκέντρωση της χαρμίνης (Εικόνα 1). Για τη πραγματοποίηση της μελέτης ελέγχθηκαν εις τριπλούν διαδοχικές συγκεντρώσεις χαρμίνης από 0 έως 50 μM σε πλάκες 96 φρεατίων για 72 ώρες με εφαρμογή της δοκιμασίας *Alamar blue*. Η χαρμίνη είχε επαναδιαλυθεί σε DMSO και χρησιμοποιήθηκε σε κάθε φρεάτιο ποσότητα προστιθέμενου όγκου DMSO < 0.5% (v/v). Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δύο μάρτυρες (υλικό κυτταροκαλλιέργειας με DMSO χωρίς κύτταρα και μακροφάγα παρουσία DMSO). Κατόπιν παρέλευσης 72 ωρών προστέθηκε Alamar blue. Αφαιρέθηκε από την οπτική πυκνότητα των δειγμάτων η οπτική πυκνότητα των φρεατίων που είχαν μονον υλικό κυτταροκαλλιέργειας. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με *graphpad*, το οποίο ανέδειξε ότι στη συγκέντρωση 5 μM και 10 μM δεν υπάρχει αναστολή της ανάπτυξης των μακροφάγων. Χρησιμοποιώντας υψηλές συγκεντρώσεις, μέχρι 50 μM , η μέση συγκέντρωση αναστολής ήταν περίπου 20 μM .

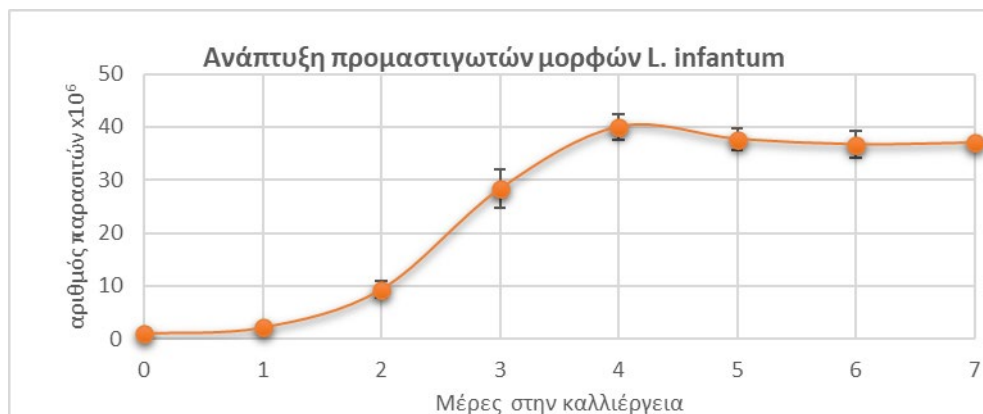


Εικόνα 1. Μελέτη τοξικότητας της χαρμίνης. Γράφημα του ποσοστό βιωσιμότητας των μακροφάγων J774.1 σε συνάρτηση με το λογαριθμικό συγκέντρωσης της χαρμίνης. Οι στήλες σφάλματος δείχνουν τη τυπική απόκλιση.

7.2. Ανάπτυξη παρασίτων μορφών *L. infantum* στην κυτταροκαλλιέργεια

Για να υπολογιστεί η ακριβής φάση κυτταροκαλλιέργειας, έγινε καμπύλη ανάπτυξης των παρασίτων σε υλικό RPMI με 10% ορό, με καθημερινές μετρήσεις (Εικόνα 2). Η μέτρηση έγινε ύστερα από αρχικό ενοφθαλμισμό της καλλιέργειας με πυκνότητα παρασίτων $10^6/\text{ml}$. Τα αποτελέσματα

έδειξαν ότι μετά την 5^η ημέρα καλλιέργειας, με αυτές τις συνθήκες, τα παράσιτα βρίσκονται στη στατική φάση ανάπτυξης. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν στη μελέτη των παρασίτων *L. donovani* (χωρίς καταγραφή δεδομένων). Πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον τρεις ανεξάρτητες μετρήσεις.



Εικόνα 2: Γράφημα προμαστιγωτών μορφών *L. infantum* σε καλλιέργεια. Στο γράφημα φαίνεται η συγκέντρωση των παρασίτων σε μονάδες $10^6/ml$ σε συνάρτηση με τον αριθμό ημερών στην κυτταροκαλλιέργεια.

7.3. Έλεγχος συγκέντρωσης της χαρμίνης στη βιωσιμότητα των προμαστιγωτών μορφών *L. infantum*

Έγινε δοκιμασία βιωσιμότητας σε προμαστιγωτές μορφές *L. infantum*, για να ελεγχθεί η τοξικότητα της χαρμίνης (Εικόνα 3). Ο έλεγχος της τοξικότητας της χαρμίνης πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν σε συγκεντρώσεις χαρμίνης από 0 έως 15 μM με τη δοκιμασία *Alamar blue*. Για το πείραμα αυτό ο ενοφθαλμισμός έγινε με παράσιτα στατικής φάσης. Διάλυμα χαρμίνης σε DMSO χρησιμοποιήθηκε σε κάθε φρεάτιο σε συγκέντρωση τελικού όγκου DMSO, μικρότερου του 0.5% (v/v). Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο μάρτυρες (υλικό κυτταροκαλλιέργειας με DMSO χωρίς κύτταρα και μακροφάγα σε υλικό κυτταροκαλλιέργειας και DMSO). Μετα παρέλευση επώασης 72 ωρών προστέθηκε *Alamar blue*. Υπολογίσθηκαν οι οπτικές πυκνότητες των δειγμάτων με τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις κατόπιν αφαίρεσης της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων των φρεατίων που είχαν μονον υλικό κυτταροκαλλιέργειας. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με graphpad, το οποίο ανέδειξε ότι οι προμαστιγωτές μορφές αναστέλλονται κατά το ήμισυ με την προσθήκη 4,8 μM χαρμίνης. Η συγκέντρωση αυτή είναι πιο χαμηλή από την συγκέντρωση που αναστέλλει τα μακροφάγα.

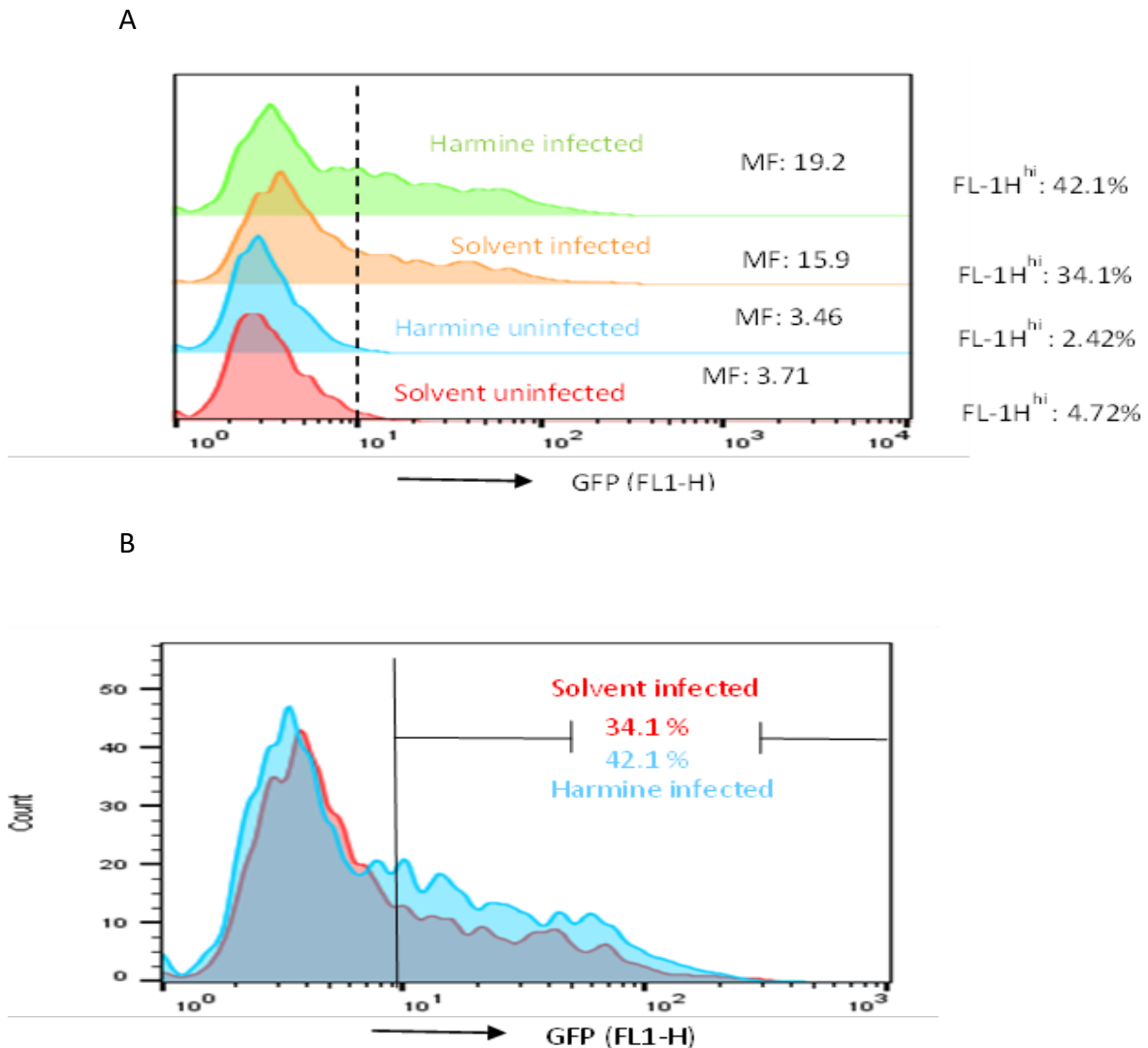


IC50= 20,9μM. R2= 0,97

Εικόνα 3. Γράφημα που δείχνει το ποσοστό βιωσιμότητας προμαστιγωτών *L. infantum* σε συνάρτηση με το λογάριθμο της συγκέντρωσης της χαρμίνης. Οι στήλες σφάλματος δείχνουν τη τυπική απόκλιση.

7.4. Έλεγχος του παρασιτικού φορτίου σε μακροφάγα που έχουν επωαστεί με χαρμίνη

Για να μελετηθεί η επίδραση της χαρμίνης σε μακροφάγα μόλις πριν τη μόλυνση τους με παράσιτα, μακροφάγα J774.1 επωάσθηκαν με 10μM χαρμίνη ή με ίσο όγκο διαλύτη DMSO για τρεις ημέρες. Το υλικό καλλιέργειας αντικαταστάθηκε με υλικό χωρίς χαρμίνη και ακολούθως πραγματοποιήθηκε η μόλυνση των μακροφαγών με παράσιτα *L. donovani* που εκφράζουν τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP (1μακροφάγο/10 παράσιτα) για έξι ώρες. Εφαρμόστηκε κυτταρομετρία ροής για να μετρηθεί η αναλογία των επωασμένων με χαρμίνη μακροφάγων τα οποία είχαν προσλάβει φθορίζοντα παράσιτα. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αμέσως μετά την μόλυνση δείχνουν ότι τα μακροφάγα που έχουν επωασθεί με χαρμίνη προσλαμβάνουν *L. donovani GFP* προμαστιγωτές μορφές σε ποσοστό 25% μεγαλύτερο από τα μακροφάγα χωρίς χαρμίνη (Εικόνα 4).

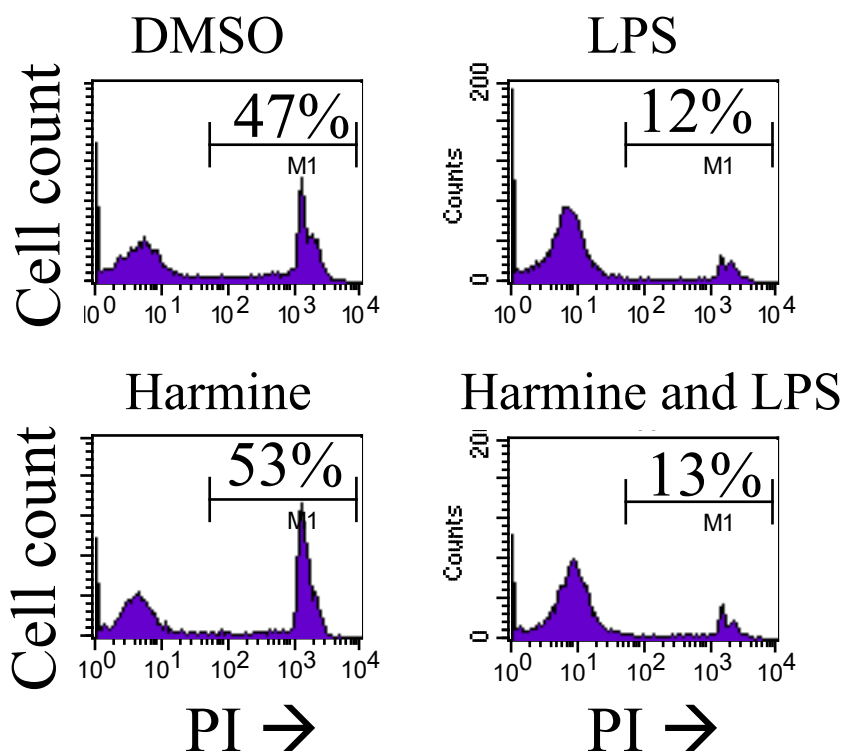


Εικόνα 4. Ιστογράμματα που δείχνουν το ποσοστό μακροφάγων προεξεπεργασμένων με χαρμίνη η χωρίς 24 ώρες μετά τη μόλυνση με προμαστιγωτές μορφές *L. donovani* στατικής φάσης που εκφράζουν GFP. Θετικά παράσιτα θεωρούνται αυτά που έχουν υψηλό φθορισμό FL1-h (FL-1H^{hi}). A) Εναλλασσόμενα ιστογράμματα και B) Αλληλεπικαλυμμένα ιστογράμματα.

7.5. Πειράματα ελέγχου κυτταρικού θανάτου J774.1 μακροφάγων ενεργοποιημένων με LPS και προσθήκη χαρμίνης

Για να αποκλειστεί ότι οποιοσδήποτε φαινότυπος της επαγωγής μακροφάγων με παράλληλη επώαση χαρμίνης οφείλεται στον κυτταρικό θάνατο, μακροφάγα επώαστηκαν με 50 µg/ml ιωδιούχου προπιδίου σε PBS και έγινε ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Τα μακροφάγα είχαν επωαστεί είτε με 1% v/v DMSO, είτε με 1µg/ml LPS (1% DMSO τελικός όγκος), είτε με 10 µM χαρμίνης σε DMSO (1% v/v τελικός όγκος), είτε με χαρμίνη 10 µM και 1µg/ml LPS(1% DMSO τελικός όγκος). Το ιωδιούχο προπίδιο χρωματίζει νεκρά κύτταρα, καθώς μπορεί να εισχωρήσει σε κυτταρικές μεμβράνες που έχουν καταστραφεί. Τα αποτελέσματά έδειξαν ότι το LPS μειώνει τον φυσικό κυτταρικό θάνατο, ενώ η παρουσία της χαρμίνης με το LPS, δεν επέφερε αλλαγές στο ποσοστό των νεκρών

κυττάρων (Εικόνα 5). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι η χαρμίνη δε σκοτώνει μακροφάγα που έχουν ενεργοποιηθεί με τον LPS.

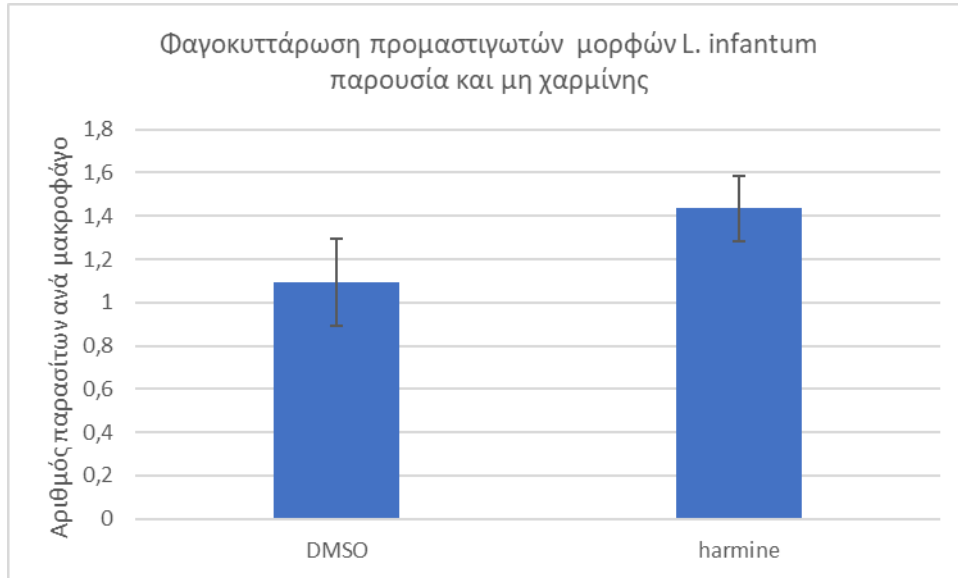


Εικόνα 5. Ιστογράμματα που δείχνουν το ποσοστό του κυτταρικού θανάτου σε μακροφάγα προεπεξεργασμένων με χαρμίνη ή χωρίς, με LPS ή χωρίς και μακροφάγα που έχουν επωαστεί παρουσία LPS και χαρμίνης. Τα ποσοστά κυτταρικού θανάτου αναγράφονται (M1).

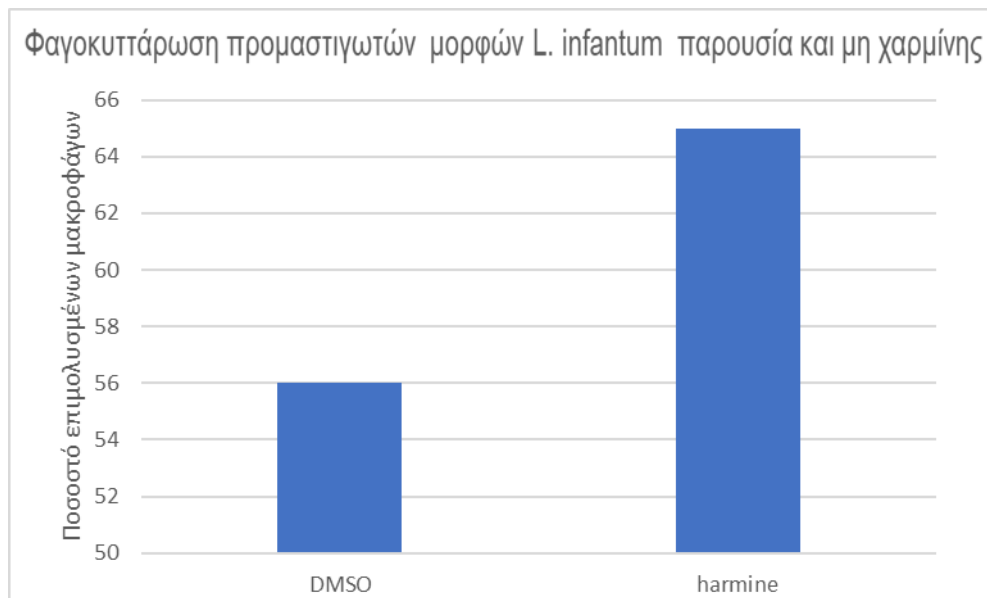
7.6. Έλεγχος της εισόδου προμαστιγωτών μορφών *L. infantum* σε μακροφάγα J774.1, προεπεξεργασμένα με χαρμίνη

Στα πειράματα με κυτταρομετρία ροής δείχθηκε ότι ο φθορισμός που σχετίζεται με GFP παράσιτα είναι πιο υψηλός σε μακροφάγα προεπωασμένα με χαρμίνη 24ωρες μετά τη μόλυνση. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν (εις τριπλούν) σε παράσιτα *L. infantum* αγρίου τύπου και ακολούθησε εφαρμογή της συνεστιακής μικροσκοπία φθορισμού, αμέσως μετά την μόλυνση, η οποία διήρκεσε 6 ώρες. Τα μολυσμένα με παράσιτα μακροφάγα μονιμοποιήθηκαν σε αποστειρωμένες καλυπτρίδες και σημάνθηκαν με τη χρωστική Hoechst 33342 (2.5 μg/ml), που ενσωματώνεται στο δίκλωνο DNA των παρασίτων και των μακροφάγων. Στο πλαίσιο αυτό, μετρήθηκαν τα ενδοκυττάρια παράσιτα α) σε μακροφάγα που είχαν προεπωασθεί με χαρμίνη και β) σε μακροφάγα που δεν είχαν επωασθεί με χαρμίνη. Τα αποτελέσματα της συνεστιακής μικροσκοπίας επιβεβαίωσαν το αποτέλεσμα της κυτταρομετρίας ροής, υποδηλώνοντας ότι αυξάνεται ο αριθμός των εισερχόμενων παρασίτων στα μακροφάγα τα οποία έχουν προεπωασθεί με χαρμίνη. Ενδεικτικά όταν τα μακροφάγα έχουν

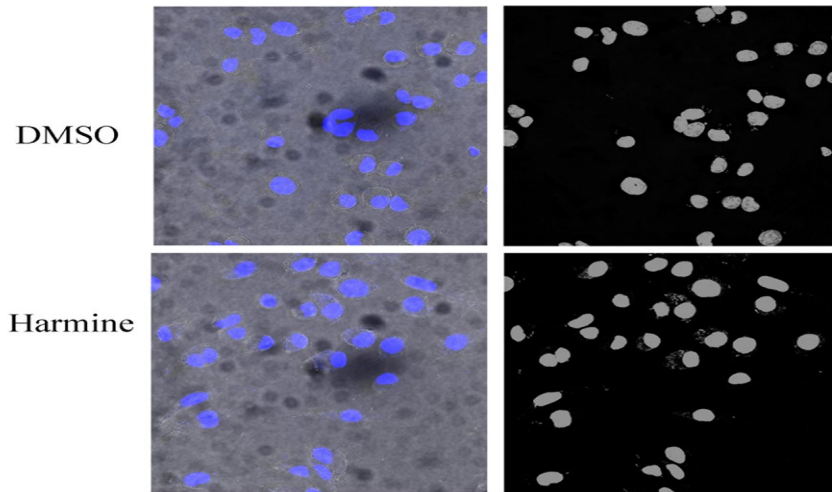
επωαστεί με 10 μ M χαρμίνη, 15% μεγαλύτερος πληθυσμός μακροφάγων φαγοκυτταρώνουν πα-
ράσιτα, ενώ το παρασιτικό φορτίο εντός αυτών είναι 30% υψηλότερο σε σχέση με το παρασιτικό
φορτίο των μακροφάγων που δεν έχουν επωαστεί με χαρμίνη (Εικόνες 6-8). Η ανάλυση των απο-
τελεσμάτων έγινε σε τουλάχιστον 100 μακροφάγα και σε 3 καλυπτρίδες/δείγμα.



Εικόνα 6. Είσοδος προμαστιγωτών μορφών *L. infantum* παρουσία και απουσία χαρμίνης. Ιστογράμματα που δείχνουν τον αριθμό προμαστιγωτών μορφών παρασίτων *L. infantum* / μακροφάγο. Οι στήλες σφάλματος δείχνουν την τυπική απόκλιση.



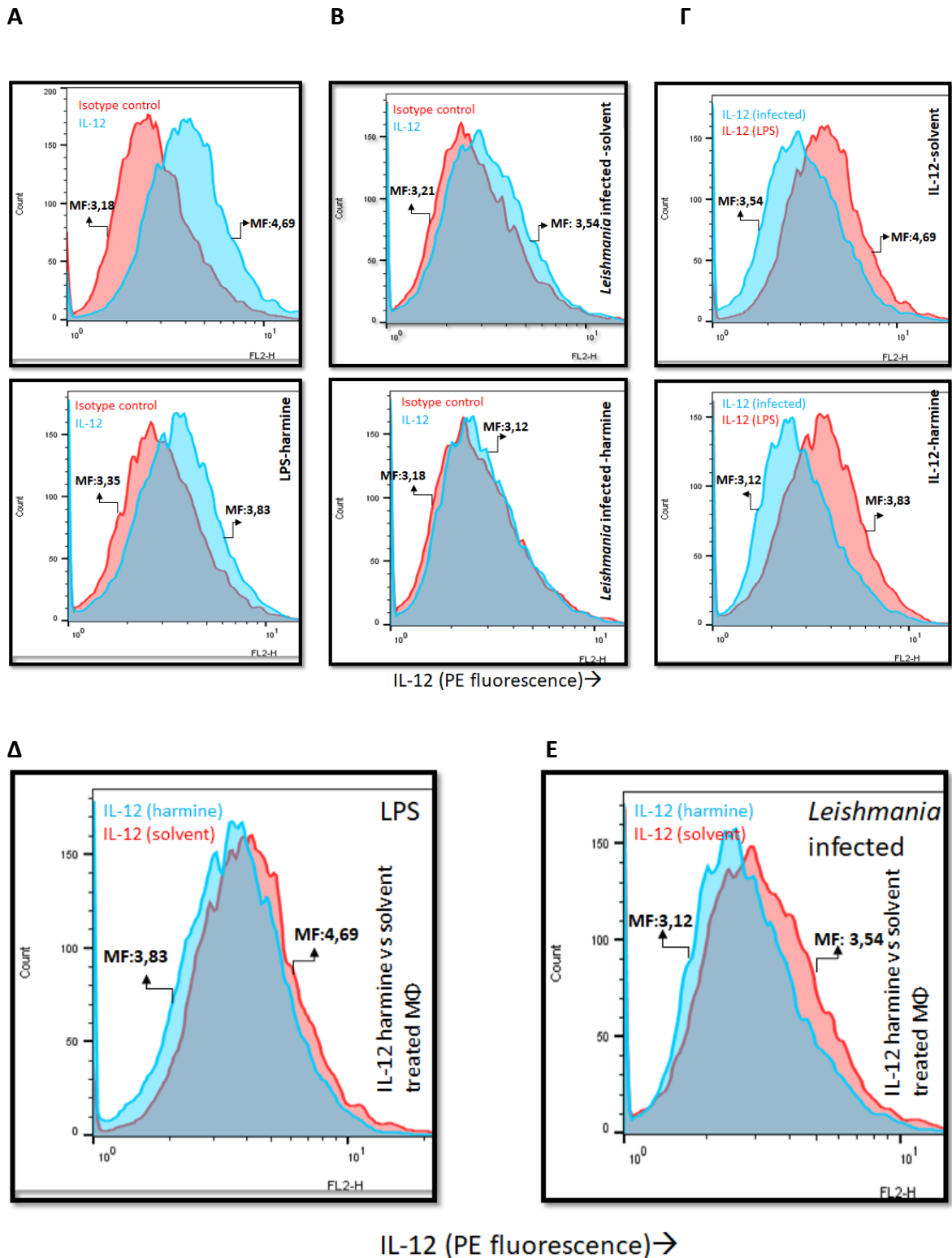
Εικόνα 7. Είσοδος προμαστιγωτών μορφών *L. infantum* παρουσία και απουσία χαρμίνης. Ιστογράμματα που δείχνουν το ποσοστό των μακροφάγων που έχουν προσλάβει προμαστιγωτές μορφές *L. infantum*. Οι στήλες σφάλματος δείχνουν την τυπική απόκλιση.



Εικόνα 8. Συνεστιακή μικροσκοπία που δείχνει τη σήμανση DNA με Hoechst 33342 μακροφάγων J774.1 μολυσμένων με προμαστιγωτές μορφές *L. infantum*, για τη μέτρηση ενδοκυττάρων παρασίτων, παρουσία 10 μΜ χαρμίνης (κάτω σειρά), ή παρουσία διαλύτη (πάνω σειρά). Αριστερά φαίνεται συγχωνευμένη εικόνα που δείχνει τη αντίθεση φάσης (γκρι) και το σημασμένο DNA (μπλε). Δεξιά φαίνεται ο φθορισμός DNA ενδοκυτταρικών παρασίτων και ο πυρήνας των μακροφάγων. Οι οπτικές τομές (1μ) σε κάθε κανάλι συλλέχθηκαν διαδοχικά και η εικόνα δείχνει την μέγιστη προβολή των οπτικών τομών.

7.7. Έλεγχος πόλωσης μακροφάγων επιμολυσμένων με *L. infantum*, που έχουν επωαστεί με χαρμίνη: έκφραση της ιντερλευκίνης IL-12

Η ιντερλευκίνη 12 (IL-12) που παράγεται από μακροφάγα αμέσως μετά τη μόλυνση θεωρείται απαραίτητη για την ενεργοποίηση μιας προστατευτικής ανοσολογικής απόκρισης έναντι ενδοκυτταρικών παθογόνων. Η κυτταροκίνη είναι μια ετεροδιμερής γλυκοπρωτεΐνη δύο διαφορετικών υπομονάδων (P35 και P40). Ενώ η υπομονάδα p35 εκφράζεται σε πολλούς τύπους κυττάρων, απαιτείται συνέκφραση της υποομάδας p40 για τη βιοδραστικότητα της IL-12. Για να ελεγχθεί η έκφραση σε μακροφάγα χρησιμοποιήθηκε ένα αντίσωμα που αναγνωρίζει το σύμπλοκο. Τα μακροφάγα επώαστηκαν για τρεις ημέρες είτε με 10 μM χαρμίνης ή με την ίδια ποσότητα διαλύτη (DMSO, όγκος <1%) είτε με LPS που επάγει IL-12 και M1, είτε με ένα συνδυασμό και των δύο. Επίσης στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν μακροφάγα που είχαν μολυνθεί με παράσιτα *L. infantum*. Στα μολυσμένα κύτταρα είχε αφαιρεθεί η χαρμίνη, ενώ LPS προστέθηκε τη δεύτερη ημέρα από την επώαση της χαρμίνης και αφέθηκε να δράσει 24 ώρες. Η επώαση παρασίτων - μακροφάγων διήρκησε 16 ώρες. Παράλληλα για να ελεγχθεί η ειδικότητα της σύνδεσης του αντισώματος χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας αντισωμικό αντίσωμα (isotype control). Στα κύτταρα που είχαν επωαστεί με LPS, ο μέσος φθορισμός των κυττάρων στο FL2 κανάλι, ήταν υψηλότερος όταν επώασθηκαν με αντίσωμα έναντι της IL-12 (μέσος φθορισμός 4,69) από τον μάρτυρα ισότύπου (μέσος φθορισμός 3,18). Επίσης τα μακροφάγα που είχαν μολυνθεί με παράσιτα και προεπωασμένα με χαρμίνη, δεν παρουσίασαν καθόλου επαγωγή του IL-12 (μέσος φθορισμός 3,12), ενώ χωρίς την παρουσία χαρμίνης παρουσιάστηκε μία μέτρια επαγωγή (μέσος φθορισμός 3,54). Επίσης η παρουσία χαρμίνης όταν τα μακροφάγα είχαν επωαστεί με LPS μετρίασε την επαγωγή IL-12. Συνολικά τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η παρουσία χαρμίνης μετριάζει την επαγωγή IL-12 (Εικόνα 9).

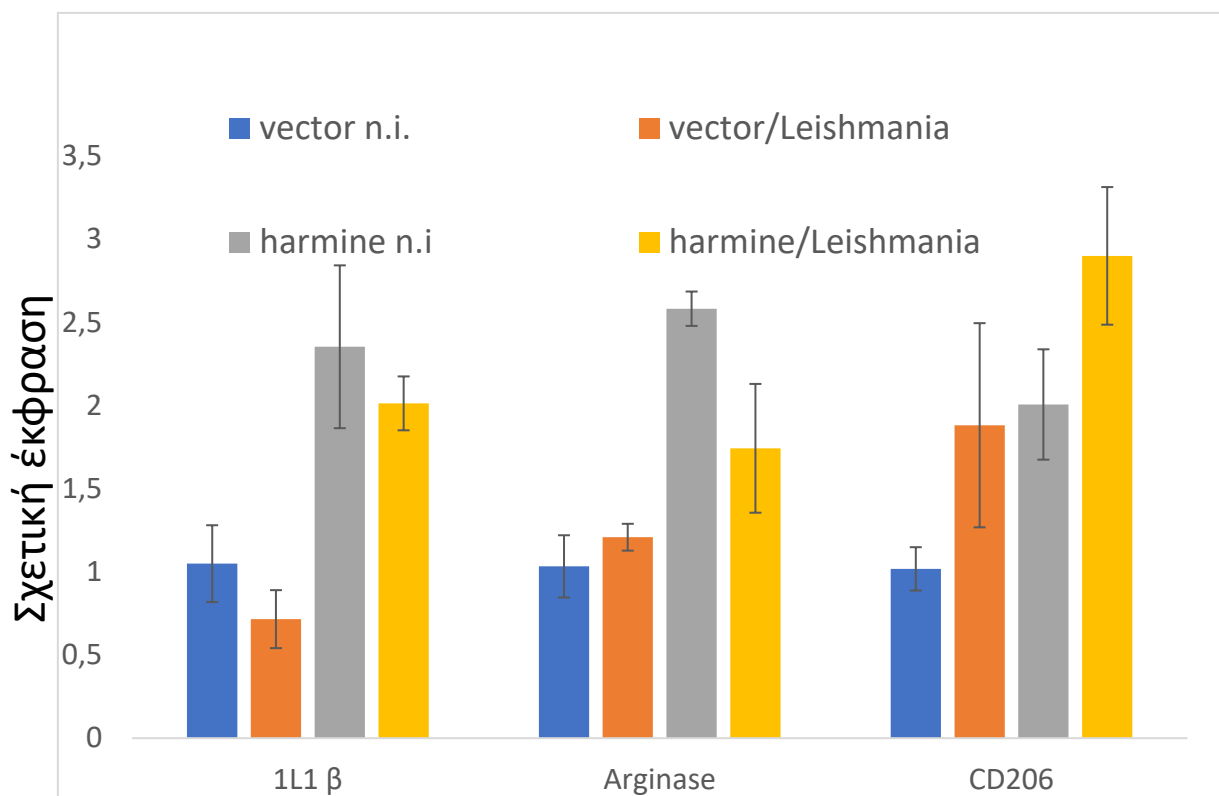


Εικόνα 9. Έκφραση της IL-12 σε μακροφάγα μολυσμένα με παράσιτα *L. infantum*, που είχαν επωαστεί με διαλύτη DMSO (solvent), προεπωασμένα με χαρμίνη. Στη πρώτη σειρά (A): Μακροφάγα που έχουν επωαστεί με LPS και έχουν σημανθεί με μάρτυρα ισοτύπου (κόκκινο) και με αντίσωμα έναντι της IL-12 (μπλε). (B): Μακροφάγα που έχουν μολυνθεί με παράσιτα και έχουν σημανθεί με μάρτυρα ισοτύπου (κόκκινο) και με αντίσωμα έναντι IL-12 (μπλε). (Γ): Έκφραση IL-12 από μολυσμένα μακροφάγα με παράσιτα (μπλε), και μακροφάγα που έχουν επωαστεί με LPS (κόκκινο). Στη δεύτερη σειρά φαίνονται (A): κύτταρα που έχουν επωαστεί με LPS και χαρμίνη, και έχουν σημανθεί με μάρτυρα ισοτύπου (κόκκινο) και με αντίσωμα IL-12 (μπλε), (B): Μακροφάγα σημασμένα με μάρτυρα ισοτύπου (κόκκινο) και με αντίσωμα έναντι της IL-12 (μπλε) που έχουν

επωαστεί με χαρμίνη και έχουν μολυνθεί με παράσιτα. (Γ): Έκφραση IL-12 από μακροφάγα που έχουν επωαστεί με χαρμίνη, μολυσμένα με παράσιτα (μπλε), και μακροφάγα που έχουν επωαστεί με LPS και χαρμίνη (κόκκινο). Στη τρίτη σειρά φαίνονται ιστογράμματα (Δ): Σύγκριση της έκφρασης της IL-12 σε κύτταρα που έχουν επωαστεί με LPS παρουσία και απουσία χαρμίνης. (Ε): Σύγκριση της έκφρασης της IL-12 σε κύτταρα μολυσμένα με παράσιτα που έχουν επωαστεί με χαρμίνη ή DMSO. MF συμβολίζει το μέσο φθορισμό (mean fluorescence) φυκοερυθρίνης (PE).

7.8. Έλεγχος πόλωσης μακροφάγων μολυσμένων με *L. infantum*, που έχουν επωαστεί με χαρμίνη

Επίσης για να μελετηθεί η πόλωση των μακροφάγων είναι σημαντική η διερεύνηση της αναλογίας δεικτών M1 σε σχέση με γνωστούς δείκτες M2 (M1/M2). Για το σκοπό αυτό μακροφάγα που είχαν προεπωασθεί για 24 ώρες με χαρμίνη, μολύνθηκαν με *L. infantum* προμαστιγωτές μορφές στατικής φάσης (10 παράσιτα/1μακροφάγο). Η διάρκεια της μόλυνσης διήρκεσε 16 ώρες και στη φάση αυτή πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του RNA και η σύνθεση του cDNA. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση με RT-qPCR της σχετικής έκφρασης δεικτών που είναι ενδεικτικοί για την κατάσταση πόλωσης των μακροφάγων. Στο παρακάτω σχεδιάγραμμα φαίνεται η σχετική έκφραση του IL-1β που είναι δείκτης απόκρισης M1, της αργινάσης, που είναι δείκτης απόκρισης M2 και του CD206 (υποδοχέας μαννόζης), που αποτελεί δείκτη απόκρισης M2. Ο υπολογισμός της σχετικής έκφρασης έγινε με μάρτυρα το γονίδιο της β ακτίνης. Τα μακροφάγα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν επωαστεί με διαλύτη DMSO ή με χαρμίνη (harmine) και ήταν μολυσμένα με προμαστιγωτές μορφές *L. infantum* (i, infected) ή μη (n.i, non-infected). Τα αποτελέσματά έδειξαν ότι η έκφραση της IL-1β, της ιντερλευκίνης που παράγεται από M1 μακροφάγα μειώνεται κατά τη μόλυνσή με προμαστιγωτές μορφές *L. infantum* (Εικόνα 10). Αντίθετα σε μακροφάγα που είχαν επωαστεί με χαρμίνη, τα επίπεδα της έκφρασης της IL-1β φαίνεται να αυξάνονται, ενώ δεν παρατηρούνται μεγάλες αλλαγές όταν μολύνονται παράλληλα με παράσιτα. Αντίθετα τα επίπεδα της αργινάσης και του CD206 αυξάνονται σε μακροφάγα που έχουν μολυνθεί με παράσιτα όπως αναμένεται, γιατί έχει δειχθεί ότι τα παράσιτα μετατρέπουν τα μακροφάγα σε M2. Η παρουσία χαρμίνης αναστέλλει την μετατροπή των μακροφάγων σε M2. Στην εικόνα 10 φαίνεται ότι η IL-1β επανακάμπτει σημαντικά παρουσία παρασίτων και χαρμίνης, ενώ η αργινάση των επιμολυσμένων μακροφάγων, βρίσκεται στα ίδια περίπου επίπεδα μετά από επώαση με χαρμίνη. Παράλληλα φαίνεται ότι τα επίπεδα του CD206 αυξάνονται αρκετά παρουσία χαρμίνης και παρασίτων, παρόλα αυτά η αναλογία της έκφρασης CD206/IL-1β σε μολυσμένα μακροφάγα παρουσία DMSO είναι 2,6 ενώ η αναλογία έκφρασης μειώνεται στο 1,3 σε μολυσμένα μακροφάγα επεξεργασμένα με χαρμίνη. Επίσης αναλογία της έκφρασης αργινάσης/ IL-1β σε μολυσμένα μακροφάγα παρουσία DMSO είναι 1,7 ενώ με προσθήκη χαρμίνης αυξάνεται σε 0,8. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η παρουσία χαρμίνης, αποτρέπει τα μακροφάγα να ενεργοποιηθούν εναλλακτικά σε M2, όταν επιμολύνονται με παράσιτα.



Εικόνα 10. Ιστόγραμμα της σχετικής έκφρασης IL-1β, Αργινάσης και CD206 σε μακροφάγα που έχουν μολυνθεί με *L. infantum*. Οι στήλες μπλέ χρωματισμού δείχνουν επίπεδα σχετικής έκφρασης σε μακροφάγα που δεν είναι μολυσμένα, παρουσία διαλύτη, οι στήλες πορτοκαλί χρωματισμού δείχνουν μακροφάγα που είναι μολυσμένα με *L. infantum* παρουσία διαλύτη, οι στήλες γκρι χρωματισμού δείχνουν μακροφάγα που δεν είναι μολυσμένα παρουσία χαρμίνης και οι στήλες κίτρινου χρωματισμού δείχνουν μακροφάγα που είναι μολυσμένα, παρουσία χαρμίνης. Τα επίπεδα της έκφρασης έχουν κανονικοποιηθεί με τα επίπεδα έκφρασης β ακτίνης. Στο γράφημα φαίνονται τα τυπικά σφάλματα.

Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο πιθανός ρόλος των κινασών διπλής ενεργότητας (DYRK1A ή /και DYRK1B) στην αλληλεπίδραση μακροφάγων με προμαστιγωτές μορφές *Leishmania*, χρησιμοποιώντας το αλκαλοειδές χαρμίνη, που είναι ειδικός αναστολέας των κινασών αυτών. Προηγούμενες μελέτες από το εργαστήριο Μοριακής Παρασιτολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, που έγιναν με ποσοτική πρωτεωμική σε πρωτογενή μακροφάγα που προέρχονται από τον μυελό των οστών, έδειξαν ότι τα επίπεδα των κινασών DYRK1A- DYRK1B αυξάνονται ύστερα από τη μόλυνσή τους με παράσιτα. Οι κινάσες DYRK1A και DYRK1B έχει δειχτεί ότι εμπλέκονται σε πολλές διαδικασίες και μονοπάτια, ενώ οι σημαντικότερες ασθένειες που συνδέονται με τις πιο πάνω κινάσες είναι νευροεκφυλιστές και το σύνδρομο Down για την DYRK1A, και το μεταβολικό σύνδρομο και ο καρκίνος για την DYRK1B (Aranda et al., 2011). Πρόσφατα έχει αρχίσει να αναδύεται ο ρόλος

τους στη φλεγμονή. Πιο συγκεκριμένα είναι γνωστό ότι η κινάση DYRK1A φωσφορυλιώνει το μεταγραφικό παράγοντα NFATc2, διατηρώντας τον ανενεργό στο κυτταρόπλασμα, ενώ η ίδια κινάση φωσφορυλιώνει και τον NFATc1 ενεργοποιώντας τον, γιατί ανατρέπει τη διαδικασία προσθήκης ουβικουιτίνης (Liu et al., 2017). Οι μεταγραφικοί παράγοντες NFAT, ελέγχουν την έμφυτη ανοσία σε μυελοειδή κύτταρα, και παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίησή τους. Αναστολείς των NFAT δρουν συνήθως ανοσοκατασταλτικά (Granucci et al., 2003). Οι κινάσες DYRK1 και συγκεκριμένα η κινάση DYRK1B έχει δείχτει ότι φωσφορυλιώνει το μεταγραφικό παράγοντα Stat3, ενεργοποιώντας τον (Zhuang et al., 2022). Ο μεταγραφικός παράγοντας Stat3 παίζει σημαντικό ρόλο και στις περισσότερες μελέτες επάγει την εναλλακτική ενεργοποίηση των μακροφάγων σε M2 (Xia et al., 2023).

Η χαρμίνη σε μακροφάγα ποντικού RAW264.7, έχει δείχτει ότι αποτρέπει την επαγωγή κυτοκινών φλεγμονής με LPS. Οι So-Jung Jin et al, έδειξαν ότι αναστέλλει την πολλαπλή φλεγμονώδη έκφραση που προκαλείται από TLR μέσω της ρύθμισης του NF-κB p65, JNK και STAT1. Πιο συγκεκριμένα επώαση μακροφάγων με χαρμίνη και LPS έδειξε ότι η χαρμίνη αναστέλλει την επαγωγή της IL-12 αλλά και άλλων προφλεγμονωδών παραγόντων όπως COX2, IL6, iNOS, IL1β (Jin et al., 2022). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας, στην οποία δείχτηκε ότι η χαρμίνη αναστέλλει την επαγωγή της IL-12, παρουσία LPS.

Η μόλυνση των μακροφάγων με παράσιτα, ανέδειξε ένα πιο πολυσύνθετο φαινότυπο. Τα μακροφάγα που είχαν φαγοκυτταρώσει παράσιτα ανέστειλαν σε μικρότερο βαθμό την προφλεγμονώδη ιντερλευκίνη IL-1β όταν είχαν προεπαστεί με χαρμίνη σε σχέση με αυτά που δεν είχαν. Επίσης και η επαγωγή δεικτών απόκρισης μακροφαγικού τύπου M2 σε σχέση με δείκτες M1 (αναλογία M2/M1), ήταν μικρότερη παρουσία χαρμίνης. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η χαρμίνη μπορεί να αναστείλει είτε την M1 απόκριση παρουσία LPS, είτε την μετάβαση από M0 σε M2 όταν τα μακροφάγα έχουν φαγοκυτταρώσει παράσιτα.

Μετά την επώαση με χαρμίνη τα μακροφάγα προσλαμβάνουν μεγαλύτερο αριθμό παρασίτων. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να υποδεικνύει κάποιο ρόλο των κινασών DYRK1 στη φαγοκυττάρωση. Η κινάση DYRK1A έχει δείχτει ότι παίζει ρόλο στην ενδοκυττάρωση και στην ανακύκλωση κυστιδίων μέσω της φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών που σχετίζονται με κυστίδια επικαλυμμένα με κλαθρίνη (Kim et al., 2010). Τα παράσιτα *Leishmania* όμως δεν φαγοκυτταρώνονται μέσω κυστιδίων κλαθρίνης αλλά μέσω καλβεολινών (G. A. Kumar et al., 2019). Τα αποτελέσματά μας μπορεί να σχετίζονται με άλλο μονοπάτι που να έχει σχέση με την κινάση DYRK1B.

Συμπέρασμα

Συνολικά, τα αποτελέσματά δείχνουν ότι η παρουσία χαρμίνης πιθανόν μέσω της αναστολής των κινασών DYRK1A ή και της DYRK1B, εμποδίζει την επαγωγή απόκρισης M1 παρουσία LPS και παρεμποδίζει την εγκατάσταση της απόκρισης M2, σε μακροφάγα που έχουν φαγοκυτταρώσει παράσιτα. Παράλληλα η παρουσία χαρμίνης, πιθανόν μέσω της αναστολής της DYRK1A ή και της DYRK1B, επάγει τη πρόσληψη μεγαλύτερου αριθμού προμαστιγωτών μορφών *Leishmania* από τα μακροφάγα. Στο μέλλον αξίζει να διερευνηθεί ο ρόλος τους ξεχωριστά σε αυτές τις διαδικασίες με ειδικούς αναστολείς και μέσω της αποσιώπησής τους με siRNA.

Αναφορές

- Abebe, T., Takele, Y., Weldegebreal, T., Cloke, T., Closs, E., Corset, C., Hailu, A., Hailu, W., Sisay, Y., Corware, K., Corset, M., Modolell, M., Munder, M., Tacchini-Cottier, F., Müller, I., & Kropf, P. (2013). Arginase activity—A marker of disease status in patients with visceral leishmaniasis in ethiopia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(3), e2134. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002134>
- Allman, W. R., Dey, R., Liu, L., Siddiqui, S., Coleman, A. S., Bhattacharya, P., Yano, M., Uslu, K., Takeda, K., Nakhasi, H. L., & Akkoyunlu, M. (2015). TAC1 deficiency leads to alternatively activated macrophage phenotype and susceptibility to Leishmania infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(30), E4094-4103. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421580112>
- Aranda, S., Laguna, A., & de la Luna, S. (2011). DYRK family of protein kinases: Evolutionary relationships, biochemical properties, and functional roles. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(2), 449–462. <https://doi.org/10.1096/fj.10-165837>
- Bates, P. A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37(10), 1097–1106. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>
- Bhattacharya, P., Dey, R., Dagur, P. K., Kruhlak, M., Ismail, N., Debrabant, A., Joshi, A. B., Akue, A., Kukuruga, M., Takeda, K., Selvapandiyan, A., McCoy, J. P., & Nakhasi, H. L. (2015). Genetically Modified Live Attenuated *Leishmania donovani* Parasites Induce Innate Immunity through Classical Activation of Macrophages That Direct the Th1 Response in Mice. *Infection and Immunity*, 83(10), 3800–3815. <https://doi.org/10.1128/IAI.00184-15>
- Burza, S., Croft, S. L., & Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *Lancet (London, England)*, 392(10151), 951–970. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)
- Chan, M. M., Adapala, N., & Chen, C. (2012). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ -Mediated Polarization of Macrophages in *Leishmania* Infection. *PPAR Research*, 2012, 796235. <https://doi.org/10.1155/2012/796235>
- Chowdhury, B. P., Bandyopadhyay, S., Das, S., Majumder, S., Jha, M. K., Majumdar, S. B., Saha, B., & Majumdar, S. (2015). The host-protective effect of arabinosylated lipoarabinomannan against *Leishmania donovani* infection is associated with restoration of IFN- γ responsiveness. *PLoS One*, 10(2), e0117247. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117247>
- Costa-da-Silva, A. C., Nascimento, D. de O., Ferreira, J. R. M., Guimarães-Pinto, K., Freire-de-Lima, L., Morrot, A., Decote-Ricardo, D., Filardy, A. A., & Freire-de-Lima, C. G. (2022). Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 7(4), 54. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7040054>
- Dameshghi, S., Zavarán-Hosseini, A., Soudi, S., Shirazi, F. J., Nojehdehi, S., & Hashemi, S. M. (2016). Mesenchymal stem cells alter macrophage immune responses to *Leishmania* major infection in both susceptible and resistance mice. *Immunology Letters*, 170, 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.12.002>
- de Freitas, E. O., Leoratti, F. M. de S., Freire-de-Lima, C. G., Morrot, A., & Feijó, D. F. (2016). The Contribution of Immune Evasive Mechanisms to Parasite Persistence in Visceral Leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 7, 153. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00153>
- de Santana, F. R., Dalboni, L. C., Nascimento, K. F., Konno, F. T., Alvares-Saraiva, A. M., Correia, M. S., Bomfim, M. D. C., Casarin, R. C., Perez, E. C., & Lallo, M. A. (2017). High dilutions of

antimony modulate cytokines production and macrophage–Leishmania (L.) amazonensis interaction in vitro. *Cytokine*, *92*, 33–47.

- Díaz-Gandarilla, J. A., Osorio-Trujillo, C., Hernández-Ramírez, V. I., & Talamás-Rohana, P. (2013). PPAR activation induces M1 macrophage polarization via cPLA₂-COX-2 inhibition, activating ROS production against *Leishmania mexicana*. *BioMed Research International*, *2013*, 215283. <https://doi.org/10.1155/2013/215283>
- Dostálová, A., & Volf, P. (2012). Leishmania development in sand flies: Parasite-vector interactions overview. *Parasites & Vectors*, *5*, 276. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-276>
- Farias, L., Rodrigues, A., Coêlho, E., Santos, M. F. dos, Sampaio, S. C., & Silva, E. (2017). Crotoxin stimulates an M1 activation profile in murine macrophages during *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitology*, *144*(11), 1458–1467.
- Flannery, A. R., Huynh, C., Mitra, B., Mortara, R. A., & Andrews, N. W. (2011). LFR1 ferric iron reductase of *Leishmania amazonensis* is essential for the generation of infective parasite forms. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(26), 23266–23279. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.229674>
- Granucci, F., Feau, S., Angeli, V., Trottein, F., & Ricciardi-Castagnoli, P. (2003). Early IL-2 production by mouse dendritic cells is the result of microbial-induced priming. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *170*(10), 5075–5081. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.10.5075>
- Guri, A. J., Hontecillas, R., Ferrer, G., Casagran, O., Wankhade, U., Noble, A. M., Eizirik, D. L., Ortis, F., Cnop, M., Liu, D., Si, H., & Bassaganya-Riera, J. (2008). Loss of PPAR gamma in immune cells impairs the ability of abscisic acid to improve insulin sensitivity by suppressing monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage infiltration into white adipose tissue. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *19*(4), 216–228. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.02.010>
- Hammami, A., Abidin, B. M., Charpentier, T., Fabié, A., Duguay, A.-P., Heinonen, K. M., & Stäger, S. (2017). HIF-1 α is a key regulator in potentiating suppressor activity and limiting the microbicidal capacity of MDSC-like cells during visceral leishmaniasis. *PLoS Pathogens*, *13*(9), e1006616. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006616>
- Hu, S., Marshall, C., Darby, J., Wei, W., Lyons, A. B., & Körner, H. (2018). Absence of Tumor Necrosis Factor Supports Alternative Activation of Macrophages in the Liver after Infection with *Leishmania major*. *Frontiers in Immunology*, *9*, 1. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00001>
- Ibraim, I. C., de Assis, R. R., Pessoa, N. L., Campos, M. A., Melo, M. N., Turco, S. J., & Soares, R. P. (2013). Two biochemically distinct lipophosphoglycans from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* trigger different innate immune responses in murine macrophages. *Parasites & Vectors*, *6*, 54. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-54>
- Jin, S.-J., Song, Y., Park, H. S., Park, K., Lee, S., & Kang, H. (2022). Harmine Inhibits Multiple TLR-Induced Inflammatory Expression through Modulation of NF- κ B p65, JNK, and STAT1. *Life*, *12*, 2022. <https://doi.org/10.3390/life12122022>
- Killick-Kendrick, R. (1990). Phlebotomine vectors of the leishmaniases: A review. *Medical and Veterinary Entomology*, *4*(1), 1–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1990.tb00255.x>
- Kim, Y., Park, J., Song, W.-J., & Chang, S. (2010). Overexpression of Dyrk1A Causes the Defects in Synaptic Vesicle Endocytosis. *Neurosignals*, *18*(3), 164–172. <https://doi.org/10.1159/000321994>

- Kumar, G. A., Karmakar, J., Mandal, C., & Chattopadhyay, A. (2019). Leishmania donovani Internalizes into Host Cells via Caveolin-mediated Endocytosis. *Scientific Reports*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49007-1>
- Kumar, V. (2019). Macrophages: The Potent Immunoregulatory Innate Immune Cells. In *Macrophage Activation—Biology and Disease*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88013>
- Lee, S. H., Charmoy, M., Romano, A., Paun, A., Chaves, M. M., Cope, F. O., Ralph, D. A., & Sacks, D. L. (2018). Mannose receptor high, M2 dermal macrophages mediate nonhealing Leishmania major infection in a Th1 immune environment. *Journal of Experimental Medicine*, 215(1), 357–375.
- Leishmania donovani*. (2024). In *Wikipedia*. https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Leishmania_donovani&oldid=1193725339
- Lindberg, M. F., & Meijer, L. (2021). Dual-Specificity, Tyrosine Phosphorylation-Regulated Kinases (DYRKs) and cdc2-Like Kinases (CLKs) in Human Disease, an Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/ijms22116047>
- Liu, H., Wang, K., Chen, S., Sun, Q., Zhang, Y., Chen, L., & Sun, X. (2017). NFATc1 phosphorylation by DYRK1A increases its protein stability. *PLOS ONE*, 12(2), e0172985. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172985>
- Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N., & Gradoni, L. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27(2), 123–147. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x>
- McCartney-Francis, N., Jin, W., Belkaid, Y., McGrady, G., & Wahl, S. M. (2014). Aberrant host defense against Leishmania major in the absence of SLPI. *Journal of Leukocyte Biology*, 96(5), 917–929. <https://doi.org/10.1189/jlb.4A0612-295RR>
- Moreira, P. R. R., Fernando, F. S., Montassier, H. J., André, M. R., & de Oliveira Vasconcelos, R. (2016). Polarized M2 macrophages in dogs with visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 226, 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.06.032>
- Mukhopadhyay, D., Mukherjee, S., Roy, S., Dalton, J. E., Kundu, S., Sarkar, A., Das, N. K., Kaye, P. M., & Chatterjee, M. (2015). M2 polarization of monocytes-macrophages is a hallmark of Indian post kala-azar dermal leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(10), e0004145.
- Odegaard, J. I., Ricardo-Gonzalez, R. R., Goforth, M. H., Morel, C. R., Subramanian, V., Mukundan, L., Red Eagle, A., Vats, D., Brombacher, F., Ferrante, A. W., & Chawla, A. (2007). Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature*, 447(7148), 1116–1120. <https://doi.org/10.1038/nature05894>
- Ontoria, E., Hernández-Santana, Y. E., González-García, A. C., López, M. C., Valladares, B., & Carmelo, E. (2018). Transcriptional Profiling of Immune-Related Genes in Leishmania infantum-Infected Mice: Identification of Potential Biomarkers of Infection and Progression of Disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 197. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00197>
- Pedrosa, C. M. S. (2017). Clinical Manifestations of Visceral Leishmaniasis (American Visceral Leishmaniasis). In *The Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/67398>
- Podinovskaia, M., & Descoteaux, A. (2015). Leishmania and the macrophage: A multifaceted interaction. *Future Microbiology*, 10(1), 111–129.

- Rafique, A., Sani, S. S., Sultana, S., Sultana, T., Ashraf, A., Mahmood, M. S., Patil, R. R., & Chatterjee, P. K. (2023). *Cutaneous Leishmaniasis*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.110569>
- Rigamonti, E., Chinetti-Gbaguidi, G., & Staels, B. (2008). Regulation of macrophage functions by PPAR- α , PPAR- γ , and LXRs in mice and men. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(6), 1050–1059.
- Roy, S., Mukhopadhyay, D., Mukherjee, S., Moulik, S., Chatterji, S., Brahme, N., Pramanik, N., Goswami, R. P., Saha, B., & Chatterjee, M. (2018). An IL-10 dominant polarization of monocytes is a feature of Indian Visceral Leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 40(7), e12535. <https://doi.org/10.1111/pim.12535>
- Sapkota, A. (2023, November 12). *Macrophages: Structure, Immunity, Types, Functions*. <https://microbenotes.com/macrophages/>
- Sarkar, A., Saha, P., Mandal, G., Mukhopadhyay, D., Roy, S., Singh, S. K., Das, S., Goswami, R. P., Saha, B., Kumar, D., Das, P., & Chatterjee, M. (2011). Monitoring of intracellular nitric oxide in leishmaniasis: Its applicability in patients with visceral leishmaniasis. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 79(1), 35–45. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.21001>
- Scarpini, S., Dondi, A., Totaro, C., Biagi, C., Melchionda, F., Zama, D., Pierantoni, L., Gennari, M., Campagna, C., Prete, A., & Lanari, M. (2022). Visceral Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment Regimens in Different Geographical Areas with a Focus on Pediatrics. *Microorganisms*, 10(10), 1887. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101887>
- Siewe, N., Yakubu, A.-A., Satoskar, A. R., & Friedman, A. (2016). Immune response to infection by Leishmania: A mathematical model. *Mathematical Biosciences*, 276, 28–43. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2016.02.015>
- Silva, R. L. L., Santos, M. B., Almeida, P. L. S., Barros, T. S., Magalhães, L., Cazzaniga, R. A., Souza, P. R. M., Luz, N. F., França-Costa, J., Borges, V. M., Lima-Junior, D. S., Lipscomb, M. W., Duthie, M. S., Reed, S. G., Almeida, R. P., & Jesus, A. R. (2017). sCD163 levels as a biomarker of disease severity in leprosy and visceral leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(3), e0005486. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005486>
- Smirlis, D., Dingli, F., Pescher, P., Prina, E., Loew, D., Rachidi, N., & Späth, G. F. (2020). SILAC-based quantitative proteomics reveals pleiotropic, phenotypic modulation in primary murine macrophages infected with the protozoan pathogen *Leishmania donovani*. *Journal of Proteomics*, 213, 103617. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103617>
- Supriya, N. (2020, June 16). What are Macrophages? Definition, Types, Mechanism & Functions. *Biology Reader*. <https://biologyreader.com/macrophages.html>
- Tabbabi, A. (2019). Review of Leishmaniasis in the Middle East and North Africa. *African Health Sciences*, 19(1), 1329–1337. <https://doi.org/10.4314/ahs.v19i1.4>
- Teixeira, D. E., Benchimol, M., Rodrigues, J. C., Crepaldi, P. H., Pimenta, P. F., & de Souza, W. (2013). The cell biology of *Leishmania*: How to teach using animations. *PLoS Pathogens*, 9(10), e1003594.
- Toews, G. B. (2009). Chapter 11—Macrophages. In P. J. Barnes, J. M. Drazen, S. I. Rennard, & N. C. Thomson (Eds.), *Asthma and COPD (Second Edition)* (pp. 133–143). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374001-4.00011-0>
- Tomiotto-Pellissier, F., Bortoleti, B. T. da S., Assolini, J. P., Gonçalves, M. D., Carloto, A. C. M., Miranda-Sapla, M. M., Conchon-Costa, I., Bordignon, J., & Pavanelli, W. R. (2018).

- Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02529>
- Vellozo, N. S., Pereira-Marques, S. T., Cabral-Piccin, M. P., Filardy, A. A., Ribeiro-Gomes, F. L., Rigoni, T. S., DosReis, G. A., & Lopes, M. F. (2017). All-Trans Retinoic Acid Promotes an M1- to M2-Phenotype Shift and Inhibits Macrophage-Mediated Immunity to *Leishmania major*. *Frontiers in Immunology*, 8, 1560. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01560>
- Venturin, G. L., Chiku, V. M., Silva, K. L. O., de Almeida, B. F. M., & de Lima, V. M. F. (2016). M1 polarization and the effect of PGE2 on TNF- α production by lymph node cells from dogs with visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 38(11), 698–704. <https://doi.org/10.1111/pim.12353>
- Voyiatzaki, C. (1999). Μελέτη της παθογόνου δράσης των αντιγόνων μεμβράνης του πρωτόζωου *L. donovani*. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ). Σχολή Γεωτεχνικών Επιστημών
- Wheeler, R. J., Gluenz, E., & Gull, K. (2011). The cell cycle of *Leishmania*: Morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Molecular Microbiology*, 79(3), 647–662. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07479.x>
- Wynn, T. A., Chawla, A., & Pollard, J. W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, 496(7446), 445–455. <https://doi.org/10.1038/nature12034>
- Xia, T., Zhang, M., Lei, W., Yang, R., Fu, S., Fan, Z., Yang, Y., & Zhang, T. (2023). Advances in the role of STAT3 in macrophage polarization. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1160719>
- Zhuang, L., Jia, K., Chen, C., Li, Z., Zhao, J., Hu, J., Zhang, H., Fan, Q., Huang, C., Xie, H., Lu, L., Shen, W., Ning, G., Wang, J., Zhang, R., Chen, K., & Yan, X. (2022). DYRK1B-STAT3 Drives Cardiac Hypertrophy and Heart Failure by Impairing Mitochondrial Bioenergetics. *Circulation*, 145(11), 829–846. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.121.055727>
- Κυριαζού, Α. (2009). Μοριακή ανάλυση των απλότυπων του παράσιτου *leishmania* σε ανθρώπινο πληθυσμό της Θεσσαλίας. <https://ir.lib.uth.gr/xmlui/handle/11615/1416>

ΠΗΓΕΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα εξώφυλλου : (“*Leishmania Donovanii*,” 2024)