



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

“ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ ”



**«ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΤΗΣ ΣΠΛΑΓΧΝΙΚΗΣ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ ΣΕ
ΑΝΘΡΩΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥΣ ΠΟΝΤΙΚΟΥΣ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΔΟΓΚΑΣ ΚΩΝ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

Βιολόγος

ΑΘΗΝΑ 2018

Εξεταστική Επιτροπή:

Καθηγήτρια Αικατερίνη Γαϊτανάκη, Επιβλέπουσα
Διευθύντρια Ερευνών Ε. Καραγκούνη, Συνεπιβλέπουσα, Μέλος Τριμελούς Επιτροπής
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παναγιώτα Παπαζαφείρη, Μέλος Τριμελούς Επιτροπής

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Πίνακας συντμήσεων

| | |
|--|----|
| I . ΠΡΟΛΟΓΟΣ..... | 9 |
| II. ΠΕΡΙΛΗΨΗ..... | 10 |
| III. SUMMARY..... | 11 |
| | |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 12 |
| 1.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ..... | 12 |
| 1.2 ΤΟ ΠΑΡΑΣΙΤΟ..... | 14 |
| 1.3 Ο ΦΟΡΕΑΣ..... | 16 |
| 1.4 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ..... | 16 |
| 1.5 ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ..... | 19 |
| 1.6 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ..... | 22 |
| 1.7 ΤΡΟΠΟΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΤΗΣ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ..... | 27 |
| 1.7.1 ΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΤΑ ΤΗΣ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ..... | 28 |
| 1.7.2 ΕΜΒΟΛΙΑ ΚΑΤΑ ΤΗΣ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ..... | 29 |
| 1.7.2.1 Η ανοσολογία των εμβολίων..... | 29 |
| 1.7.2.2 Ανάπτυξη εμβολίων και λεισμανίαση..... | 31 |
| 1.8 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ..... | 39 |
| 1.8.1 ΜΟΝΤΕΛΟ ΧΑΜΣΤΕΡ..... | 39 |
| 1.8.2 ΜΟΝΤΕΛΟ ΣΚΥΛΟΥ..... | 40 |
| 1.8.3 ΜΟΝΤΕΛΟ ΠΡΩΤΕΥΟΝΤΩΝ..... | 41 |
| 1.8.4 Ο ΠΟΝΤΙΚΟΣ ΩΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ..... | 42 |
| | |
| 2. ΣΚΟΠΟΣ..... | 45 |
| | |
| 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 47 |
| 3.1 ΥΛΙΚΑ..... | 47 |

| | |
|--|----|
| 3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 40 |
| 3.2.1 Πειραματόζωα..... | 40 |
| 3.2.2 Παρασκευή δενδριτικών κυττάρων από προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα μυελού των οστών ποντικών της διαγονιδιακής σειράς B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Eng/J..... | 40 |
| 3.2.3 Κυτταρομετρία ροής για τον έλεγχο διατήρησης του διαγονιδίου μέσω της έκφρασης του επιφανειακού μορίου HLA-A2.1 σε δενδριτικά κύτταρα μυελού των οστών..... | 41 |
| 3.2.4 Καλλιέργεια παρασίτων και καμπύλη ανάπτυξης..... | 43 |
| 3.2.5 Παρασκευή διαλυτού αντιγόνου παρασίτων (Soluble Leishmania Antigen, SLA) | 44 |
| 3.2.6 Πρωτεϊνομέτρηση διαλυτού αντιγόνου παρασίτων <i>Leishmania infantum</i> | 44 |
| 3.2.7 Μολύνσεις ποντικών..... | 45 |
| 3.2.8 Ανοσοποιήσεις ποντικών της διαγονιδιακής σειράς B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Eng/J με το πειραματικό εμβόλιο και αξιολόγηση της προφυλακτικής δράσης μετά από πειραματική μόλυνση..... | 46 |
| 3.2.9 Προσδιορισμός παρασιτικού φορτίου με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων..... | 47 |
| 3.2.10 Προσδιορισμός παρασιτικού φορτίου με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) | 47 |
| 3.2.11 Προσδιορισμός αντισωμάτων με ενζυμική μέθοδο ανοσοπροσρόφησης (ELISA) | 49 |
| 3.2.12 Δοκιμασία λεμφοκυτταρικού πολλαπλασιασμού..... | 49 |
| | |
| 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | |
| 4.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΠΛΑΓΧΝΙΚΗΣ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ ΣΕ ΠΟΝΤΙΚΟΥΣ..... | 51 |
| 4.1.1 Φυλές BALB/c και C57BL/6 | 51 |
| 4.1.2 Δημιουργία αποικίας της διαγονιδιακής σειράς ποντικών B6.Cg-Tg(HLA-A/H2 D)2Eng/J και έλεγχος διατήρησης διαγονιδίου..... | 51 |
| | |
| 4.2 ΣΤΕΛΕΧΟΣ ΜΗΟΜ/GR/2001/GH8 ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ <i>L. infantum</i> | 53 |
| 4.2.1 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ..... | 53 |
| 4.2.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΤΟΥ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ – ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ..... | 54 |

| | |
|---|----|
| 4.3 ΜΟΛΥΝΣΗ ΚΑΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΠΑΡΑΣΙΤΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ..... | 66 |
| 4.3.1 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΠΑΡΑΣΙΤΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΣΤΗ ΦΥΛΗ BALB/c..... | 66 |
| 4.3.2 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΠΑΡΑΣΙΤΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΣΤΗ ΦΥΛΗ C57BL/6..... | 67 |
| 4.3.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΠΑΡΑΣΙΤΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΣΤΟΥΣ ΠΟΝΤΙΚΟΥΣ ΤΗΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J..... | 69 |
| 4.4 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΕΜΒΟΛΙΟΥ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΣΠΛΑΓΧΝΙΚΗΣ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ ΣΕ B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J ΠΟΝΤΙΚΟΥΣ..... | 71 |
| 4.4.1 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΠΡΟΦΥΛΑΚΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΕΜΒΟΛΙΟΥ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΠΑΡΑΣΙΤΙΚΟ ΦΟΡΤΙΟ..... | 71 |
| 4.4.2 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΧΥΜΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΣΤΟΥΣ ΜΟΛΥΣΜΕΝΟΥΣ ΠΟΝΤΙΚΟΥΣ ΤΗΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J ΠΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΜΕ ΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΕΜΒΟΛΙΟ..... | 74 |
| 4.4.3 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΣΤΟΥΣ ΜΟΛΥΣΜΕΝΟΥΣ ΠΟΝΤΙΚΟΥΣ ΤΗΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J ΠΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΜΕ ΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΕΜΒΟΛΙΟ..... | 76 |
| 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 79 |

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

| ΣΥΝΤΜΗΣΗ | ΑΓΓΛΙΚΟΣ ΟΡΟΣ | ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ ΟΡΟΣ |
|----------|---|--|
| A | | |
| ACK | Ammonium-Chloride-Potassium Lysing Buffer | Διάλυμα λύσης χλωριούχου αμμωνίου - καλίου |
| Ag | Antigen | Αντιγόνο |
| AIDS | Acquired Immune Deficiency Syndrome | Σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας |
| APC | Antigen Presenting Cell | Αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο |
| B | | |
| BCA | Bicinchoninic Acid | Δικιχονινικό οξύ |
| BCG | Bacillus Calmette-Guérin | Βάκιλος Calmette & Guérin |
| BSA | Bovine Serum Albumin | Αλβουμίνη ορού μόσχου |
| C | | |
| CCL2 | Chemocine C-C motif ligand 2 | Προσδέτης χημειοκίνης 2 μοτίβου C-C |
| CCL3 | Chemocine C-C motif ligand 3 | Προσδέτης χημειοκίνης 3 μοτίβου C-C |
| CXCL10 | C-X-C motif chemokine 10 | Χημειοκίνη 10 μοτίβου C-X-C |
| CCR4 | C-C chemokine receptor type 4 | Υποδοχέας χημειοκίνης C-C τύπου 4 |
| CCR22 | C-C chemokine receptor type 22 | Υποδοχέας χημειοκίνης C-C τύπου 22 |
| CD3 | Cluster of Differentiation 3 | Σύμπλεγμα διαφοροποίησης 3 |
| CD4 | Cluster of Differentiation 4 | Σύμπλεγμα διαφοροποίησης 4 |
| CD8 | Cluster of Differentiation 8 | Σύμπλεγμα διαφοροποίησης 8 |
| CD28 | Cluster of Differentiation 28 | Σύμπλεγμα διαφοροποίησης 28 |
| CD40L | CD40 ligand | Μόριο-προσδέτης του CD40 |
| CDC | Center for Disease Control and Prevention | Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης ασθενειών |
| CL | Cutaneous Leishmaniasis | Δερματική λεισμανίαση |
| CLRs | C-type lectin receptors | Υποδοχείς λεκτινών τύπου C |
| ConA | Concanavalin A | Κονκαναβαλίνη A |
| CPA | Cysteine Peptidase A | Πεπτιδάση Κυστεΐνης A |
| CTL | Cytotoxic T Lymphocyte | Κυτταροτοξικό T λεμφοκύτταρο |

| | | |
|--------------|------------------------------------|---|
| D | | |
| DC | Dendritic Cel | Δενδριτικό κύτταρο |
| DCL | Diffuse Cutaneous Leishmaniasis | Διάχυτη βλενογονοδερματική λεισμανίαση |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide | Διμεθυλοσουλφοξείδιο |
| DNA | Deoxyribonucleic Acid | Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ |
| E | | |
| ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay | Ενζυμική δοκιμασία ανοσοπροσρόφησης |
| F | | |
| FACS | Fluorescence-activated Cell Sorter | Διαλογέας κυττάρων ενεργοποιούμενος με φθορισμό |
| FasL | Fas Ligand | Μόριο-προσδέτης του Fas |
| FBS | Fetal Bovine Serum | Ορός εμβρύου μόσχου |
| FML | Fucose Mannose Ligand | Προσδέτης φουκόζης-μαννόζης |
| FSC | Forward scattered light | Πρόσθια σκεδαζόμενο φως |
| H | | |
| HIV | Human Immunodeficiency Virus | Ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας |
| HLA | Human Leukocyte Antigen | Ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο |
| HSP90 | Heat Shock Protein 90 | Πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90 |
| H1 | Histone 1 | Ιστονή 1 |
| I | | |
| IFN γ | Interferon γ | Ιντερφερόνη γ |
| IgG | Immunoglobulin G | Ανοσοσφαιρίνη γ |
| IL-2 | Interleukin 2 | Ιντερλευκίνη 2 |
| IL-4 | Interleukin 4 | Ιντερλευκίνη 4 |
| IL-5 | Interleukin 5 | Ιντερλευκίνη 5 |
| IL-12 | Interleukin 12 | Ιντερλευκίνη 12 |
| IL-12p40 | Interleukin 12p40 | Ιντερλευκίνη 12p40 |
| IL-13 | Interleukin 13 | Ιντερλευκίνη 13 |
| IL-21 | Interleukin 21 | Ιντερλευκίνη 21 |
| K | | |
| kDNA | kinetoplast Deoxyribonucleic Acid | DNA κινητοπλάστη |
| KMP-11 | Kinetoplastid Membrane Protein-11 | Μεμβρανική πρωτεΐνη κινητοπλάστη-11 |
| L | | |
| LPG | Lipophosphoglycan | Λιποφωσφογλυκάνη |
| LPG3 | Lipophosphoglycan 3 | Λιποφωσφογλυκάνη 3 |
| LPS | Lipopolysaccharide | Λιποπολυσακχαρίτης |
| M | | |

| | | |
|----------|---|---|
| MCL | Mucocutaneous Leishmaniasis | Βλεννογονοδερματική λεισμανίαση |
| MHC | Major Histocompatibility Complex | Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας |
| MLEE | Multilocus Enzyme Electrophoresis | Ισοενζυμική πολυεστιακή ηλεκτροφόρηση |
| MZ | Marginal zone | Οριακή ζώνη |
| N | | |
| NK | Natural Killer | Φυσικός φονέας |
| NLRs | NOD-like receptors | Υποδοχείς τύπου NOD |
| NO | Nitric Oxide | Οξείδιο του αζώτου |
| P | | |
| PALS | Periarteriolar lymphoid sheaths | Περιαρτηριακό λεμφικό έλυτρο |
| PAMPs | Pathogen Associated Molecular Patterns | Εξελικτικά συντηρημένα μόρια παθογόνων |
| PBS | Phosphate-buffered Saline | Διάλυμα φωσφορικών αλάτων |
| PCR | Polymerase Chain Reaction | Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης |
| PKDL | Post Kala azar Dermal Leishmaniasis | Μετά-καλά-αζάρ δερματική λεισμανίαση |
| PLGA | Poly(lactic-co-glycolic)acid | Πολυμερή γαλακτικού-γλυκολικού οξέος |
| PRRs | Pattern Recognition Receptors | Υποδοχείς αναγνώρισης προτύπου |
| PDK1 | phosphoinositide-dependent protein kinase-1 | Εξαρτώμενη από φωσφοινοσιτίδη πρωτεϊνική κινάση 1 |
| S | | |
| SPF | Specific Pathogen Free | Απαλλαγμένος από ειδικά παθογόνα |
| SSC | Side-scattered light | Πλευρικά σκεδαζόμενο φως |
| T | | |
| TCA | Trichloroacetic acid | Τριχλωροξικό οξύ |
| TCR | T Cell Receptor | Υποδοχέας T κυττάρων |
| TH | T helper | T βοηθητικό κύτταρο |
| TH1 | T helper 1 | T βοηθητικό κύτταρο τύπου 1 |
| TH2 | T helper 2 | T βοηθητικό κύτταρο τύπου 2 |
| TLR(s) | Toll-like Receptor(s) | Υποδοχέας(εις) τύπου Toll |
| TMB | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine | 3,3',5,5'-τετραμεθυλοβενζιδίνη |
| TNFα | Tumor Necrosis Factor α | Παράγοντας νέκρωσης |

| | | |
|---------|---|------------------------------|
| | | όγκων α |
| V | | |
| VL | Visceral Leishmaniasis | Σπλαγγχνική λεισμανίαση |
| W | | |
| WHO | World Health Organization | Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας |
| | | |
| ΕΙΠ | Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ | |
| ΚΕΕΛΠΝΟ | Κέντρο Ελέγχου & Πρόληψης Νοσημάτων | |
| ΤΖΠΒΕ | Τμήμα Ζωικών Προτύπων Βιοϊατρικής Έρευνας | |

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία του μεταπτυχιακού προγράμματος «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική» πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας Παρασιτώσεων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, υπό την επίβλεψη της Διευθύντριας Ερευνών κας Ευδοκίας Καραγκούνη.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κα Αικατερίνη Γαϊτανάκη για την ανάθεση του θέματος, καθώς και για τις παρατηρήσεις της κατά τη τελική διαμόρφωση της εργασίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Διευθύντρια Ερευνών Δρ. Ευδοκία Καραγκούνη, για την θερμή υποδοχή που έτυχα στο Εργαστήριο Ανοσολογίας Παρασιτώσεων του ΕΙΠ, καθώς και για την υποστήριξη και την εμπιστοσύνη της, καθ όλη την διάρκεια της διεξαγωγής της συγκεκριμένης μελέτης. Και βέβαια οφείλω πολλές ευχαριστίες στην διδάκτορα Αθανασίου Ευανθία-Βαρβάρα, για την συνεργασία, το ενδιαφέρον που μου έδειξε και για τη συμβολή της, στην εκμάθηση από πλευράς μου των απαραίτητων εργαστηριακών τεχνικών, στην κατανόησης της όλης πειραματικής πορείας και κυρίως για την υπομονή που έδειξε κατά τη συγγραφή του πονήματος.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τη σύζυγό μου Ελισάβετ, η οποία συνεχώς υποστηρίζει την όποια επιθυμία μου, όπως ήταν η συμμετοχή μου στο συγκεκριμένο μεταπτυχιακό πρόγραμμα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η σπλαγχνική λεισμανίαση οφείλεται στα στελέχη *L. donovani* και *L. infantum* και αποτελεί τη σοβαρότερη μορφή λεισμανίασης. Εάν δε χορηγηθεί θεραπεία, οδηγεί σε θάνατο. Η θεραπεία βασίζεται στη χρήση χημειοθεραπευτικών σκευασμάτων, που όμως χαρακτηρίζονται από παρενέργειες και υψηλό κόστος. Για το λόγο αυτό, η ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού εμβολίου κρίνεται επιτακτική τόσο για τον έλεγχο του νοσήματος, όσο και για την προάσπιση της δημόσιας υγείας. Τα ζωικά μοντέλα αποτελούν χρήσιμα εργαλεία για τον έλεγχο και την επιλογή φαρμακευτικών παραγόντων ή υποψήφιων εμβολίων πριν από την κλινική εφαρμογή, αλλά και για την κατανόηση των ανοσολογικών μηχανισμών που ακολουθούν τη μόλυνση.

Στα πλαίσια αυτής της μελέτης που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας Παρασιτώσεων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, έγινε ανάπτυξη του μοντέλου της σπλαγχνικής λεισμανίασης σε τρεις φυλές ποντικών (BALB/c, C57BL/6 διαγονιδιακή σειρά B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J). Επιπρόσθετα, αξιολογήθηκε η προφυλακτική δράση πειραματικού εμβολίου (χημικώς πολυεπιτοπικά πεπτίδια) το οποίο είχε αναπτυχθεί στο εργαστήριο. Τέλος, διερευνήθηκε η επαγωγή χυμικής ανοσίας έναντι του διαλυτού αντιγόνου και των αντιγονικών συστατικών του εμβολίου, καθώς και κυτταρικής ανοσίας ύστερα από διέγερση κυττάρων του σπλήνα με κάθε ένα από τα χημικώς πολυεπιτοπικά πεπτίδια στους εμβολιασμένους και μολυσμένους B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J ποντικούς.

Από την ανάπτυξη του μοντέλου της νόσου, καταδείχθηκε σαφής διατήρηση του παρασίτου στο σπλήνα των ποντικών της φυλής BALB/c, παρόλο που στο ήπαρ, φάνηκε να συμβαίνει εκκαθάριση αυτού. Στους ποντικούς της φυλής C57BL/6, το ήπαρ όπως και ο σπλήνας, έδειξαν επιτυχή αντίδραση έναντι του παρασίτου, οδηγώντας σε έλεγχο της μόλυνσης. Αντίστοιχη εικόνα προέκυψε και στους ποντικούς της διαγονιδιακής σειράς B6.Cg-Tg(HLA/H2-D)2Enge/J.

Για την εκτίμηση της προφυλακτικής δράσης του πειραματικού εμβολίου, τα αποτελέσματα που προέκυψαν, έδειξαν σημαντική μείωση του παρασιτικού φορτίου στο ήπαρ και το σπλήνα των ανοσοποιημένων ποντικών, συγκριτικά με τους ποντικούς που δεν είχαν ανοσοποιηθεί. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι ορισμένα από τα συστατικά του πειραματικού εμβολίου, είναι ικανά να επάγουν χυμική, αλλά και κυτταρική ανοσία.

SUMMARY

Visceral leishmaniasis is the most serious form of leishmaniasis, caused by the strains *L. donovani* and *L. infantum*. If not treated, it leads to death. Treatment is based on the use of chemotherapeutic formulations, which are characterized by side effects and high costs. For this reason, the development of an effective vaccine is imperative, both for the control of the disease and for the protection of public health. Animal models are useful tools for controlling and selecting pharmaceutical agents or candidate vaccines prior to clinical application, but also for understanding the immunological mechanisms that follow the infection.

This study took place at the Laboratory of Parasitic Immunology of the Hellenic Pasteur Institute. The model of visceral leishmaniasis was developed in three breeds of mice (BALB/c, C57BL/6 transgenic B6.Cg-Tg (HLA-A/H2-D)2Enge/J). Additionally, the prophylactic effect of experimental vaccine (chimeric polyepitope peptides) which was developed in the laboratory, was also evaluated. Finally, the induction of humoral immunity against the soluble antigen and the antigenic components of the vaccine, as well as the cellular immunity after stimulation of spleen cells with each of the chimeric polyepitope peptides in the vaccinated and infected B6.Cg-Tg (HLA-A/H2-D) 2Enge/J mice, were estimated.

From the development of the disease model, a clear conservation of the parasite in the spleen of BALB/c mice was demonstrated, although the liver appeared to be cleansing. In mice of the C57BL/6 strain, the liver as well as the spleen, showed a successful response to the parasite, leading to infection control. Corresponding picture was also seen in the mice of the transgenic sequence of B6.Cg-Tg (HLA/H2-D) 2Enge/J.

For the assessment of the prophylactic effect of the experimental vaccine, the results showed a significant reduction in the parasitic load in the liver and spleen of the immunized mice compared to the mice that had not been immunized. It has also been found that some of the components of the experimental vaccine are capable of inducing, both humoral and cellular immunity.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

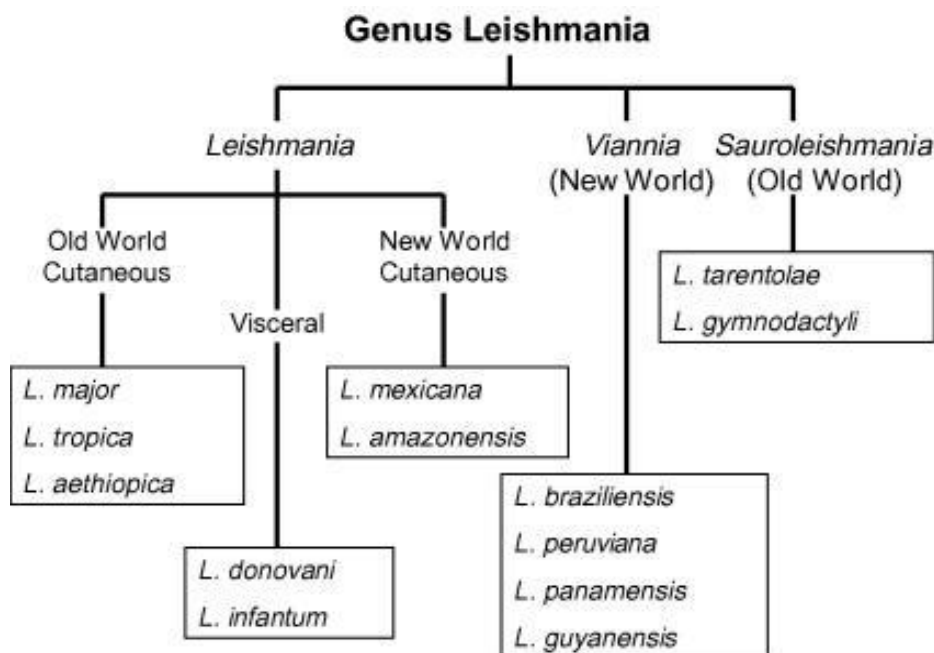
Ο όρος λεισμανίαση αναφέρεται στο σύνολο των παθολογικών καταστάσεων που οφείλονται σε μόλυνση από το πρωτόζωο του γένους *Leishmania* (Van Assche et al, 2011). Από ιστορική άποψη, διάφορες μορφές λεισμανίασης του Παλαιού Κόσμου, περιγράφονται ήδη από τον 7^ο π.Χ. αιώνα, ωστόσο η ανακάλυψη του αιτιολογικού παράγοντα της σπλαγχνικής μορφής της νόσου έγινε από το στρατιωτικό ιατρό William Leishman και τον καθηγητή Φυσιολογίας του Πανεπιστημίου του Madras, Charles Donovan, κατά τη δεκαετία του 1900. Ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο, ανακάλυψαν το παθογόνο παράσιτο στο σπλήνα ασθενών με Καλά-αζάρ. Ακολούθως, το 1921, οι αδερφοί Sergent απέδειξαν πειραματικά τη μετάδοση του παρασίτου μέσω της σκνίπας του γένους *Phlebotomus*, προσδιορίζοντας κατά αυτόν τον τρόπο το φορέα του μολυσματικού παράγοντα. Στο Νέο Κόσμο, η δερματική και η βλεννογονοδερματική μορφή της λεισμανίασης έχουν περιγραφεί ήδη από τον 5^ο μ.Χ. αιώνα και σε γραφές ισπανικών αποστολών του 16^{ου} μ.Χ. αιώνα. Αρχικά, υπήρχε η πεποίθηση ότι η λεισμανίαση του Νέου Κόσμου και αυτή του Παλαιού οφείλονταν στο ίδιο είδος παρασίτου. Ωστόσο, το 1911, ο Gaspar Vianna ανακάλυψε ότι τα παράσιτα της Νότιας Αμερικής διέφεραν από αυτά της Αφρικής και της Ινδίας. Αργότερα, το 1922, ανακαλύφθηκε και ο διαφορετικός φορέας των παρασίτων του Νέου Κόσμου, ο οποίος ανήκει στο γένος *Lutzomyia* (Cox, 2002).

1.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ

Αρχικά, η ταξινόμηση του παρασίτου *Leishmania* έγινε με βάση οικολογικά και βιολογικά κριτήρια, όπως το είδος του φορέα, η γεωγραφική κατανομή, ο τροπισμός, οι αντιγονικές ιδιότητες και οι κλινικές εκδηλώσεις (Banuls et al., 2007). Αργότερα, τα διάφορα είδη του γένους *Leishmania* ταξινομήθηκαν στα τρία υπογένη: *Leishmania*, *Viannia* και *Sauroleishmania* (Εικόνα 1.1). Το υπογένος *Leishmania* περιλαμβάνει είδη του Παλαιού Κόσμου, των οποίων ο δίπτερος φορέας ανήκει στο γένος *Phlebotomus* και είδη του Νέου Κόσμου με φορέα που ανήκει στο γένος *Lutzomyia*. Το υπογένος *Viannia* αφορά σε είδη του Νέου Κόσμου αποκλειστικά, ενώ το υπογένος *Sauroleishmania* σε είδη του Παλαιού Κόσμου με φορέα που ανήκει στο γένος *Sergentomyia*. Τα υπογένη *Leishmania* και *Viannia* περιλαμβάνουν ένα σημαντικό αριθμό ειδών που είναι παθογόνα για αρκετές κατηγορίες θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Αντίθετα, τα είδη του υπογένους *Sauroleishmania* δεν είναι παθογόνα για τον άνθρωπο (Bates, 2007).

Βιοχημικές και μοριακές αναλύσεις έχουν δείξει ότι τα παθολογικά και τα γεωγραφικά στοιχεία είναι συχνά ανεπαρκή και κατά συνέπεια, η ταξινόμηση του παρασίτου βασίζεται σε άλλα κριτήρια, όπως το πρότυπο των πολυμορφισμών στο

κινητοπλαστικό δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (kinetoplastid deoxyribonucleic acid, kDNA), πρωτεΐνες ή αντιγόνα του παρασίτου. Από το 1970, για τη διάκριση των ειδών του γένους *Leishmania*, αξιοποιούνται ως κριτήρια, ανοσολογικά, βιοχημικά και γενετικά δεδομένα του παρασίτου. Η τεχνική της ισοενζυμικής πολυεστιακής ηλεκτροφόρησης (Multilocus Enzyme Electrophoresis, MLEE) αποτελεί τη μέθοδο αναφοράς για την ταξινόμηση, ταυτοποίηση και τυποποίηση στελεχών *Leishmania*. Χιλιάδες στελέχη έχουν τυποποιηθεί με το ισοενζυμικό σύστημα Mοη του Πανεπιστημίου του Montpelier – από το οποίο πήρε και το όνομά του - που βασίζεται στον καθορισμό της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας 15 ισοενζύμων. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των 15 ισοενζύμων συγκρίνεται με την αντίστοιχη ενός στελέχους αναφοράς και καθορίζονται ομάδες στελεχών με το ίδιο ισοενζυμικό προφίλ, γνωστές ως ζυμοδέματα. Πιο συγκεκριμένα, με την τεχνική MLEE, μέσω του διαφορετικού προτύπου ηλεκτροφορητικής κινητικότητας των ενζύμων που κωδικοποιούν, προσδιορίζονται διαφορετικά αλληλόμορφα γονιδίων που εκφράζονται με σταθερό ρυθμό (housekeeping). Διαφορές στην κινητικότητα αντικατοπτρίζουν, συνήθως, διαφορές στο φορτίο (αμινοξική αλληλουχία) των πρωτεϊνών και κατ' επέκταση νουκλεοτιδικές διαφορές στα γονίδια που τις κωδικοποιούν. Κατά την ανάλυση των δεδομένων που προκύπτουν από την εφαρμογή της MLEE, θεωρείται ότι κλάσματα που εμφανίζουν την ίδια κινητικότητα για ένα δεδομένο ένζυμο, περιέχουν το ίδιο αλληλόμορφο του υποκείμενου γονιδίου (Miles et al, 1980; Evans et al, 1984; Rioux et al, 1990).



Εικόνα 1.1 Ταξινόμηση του γένους *Leishmania* (Bates et al., 2007)

Τα τελευταία χρόνια, οι προσπάθειες εστιάζονται στην ανάπτυξη τεχνικών βασιζόμενων στο DNA για την τυποποίηση του παρασίτου. Με την εμφάνιση νέων μοριακών τεχνικών, αναπτύχθηκαν πολλοί δείκτες και πρωτόκολλα PCR για την

ταυτοποίηση των στελεχών σε διαφορετικά ταξινομικά επίπεδα. Μεταξύ των μοριακών τεχνικών που έχουν αναπτυχθεί σημαντική θέση κατέχουν η πολυεστιακή τυποποίηση μικροδορυφορικών αλληλουχιών και η αλληλούχιση. Αν και όλες οι παραπάνω τεχνικές έχουν φανεί χρήσιμες στη διαφοροποίηση στελεχών και έχουν δώσει πολύτιμες πληροφορίες για την ταξινομική κατάταξη, διάφοροι παράγοντες περιορίζουν την εκτεταμένη χρήση των περισσότερων από αυτές στη διάγνωση, αλλά και σε πληθυσμιακές και επιδημιολογικές μελέτες. Επίσης, ελάχιστες έχουν συσχετισθεί με την ισοενζυμική ανάλυση. Νεότερες μέθοδοι ανίχνευσης, απομόνωσης και ταυτοποίησης του παρασίτου είχαν ως αποτέλεσμα τη μαζική αύξηση του αριθμού των ειδών που περιγράφονται. Σήμερα είναι γνωστά 54 είδη *Leishmania* - εκτός από τα συνώνυμα, από τα οποία τουλάχιστον 21 είναι παθογόνα για τον άνθρωπο (Akhoudi et al., 2016).

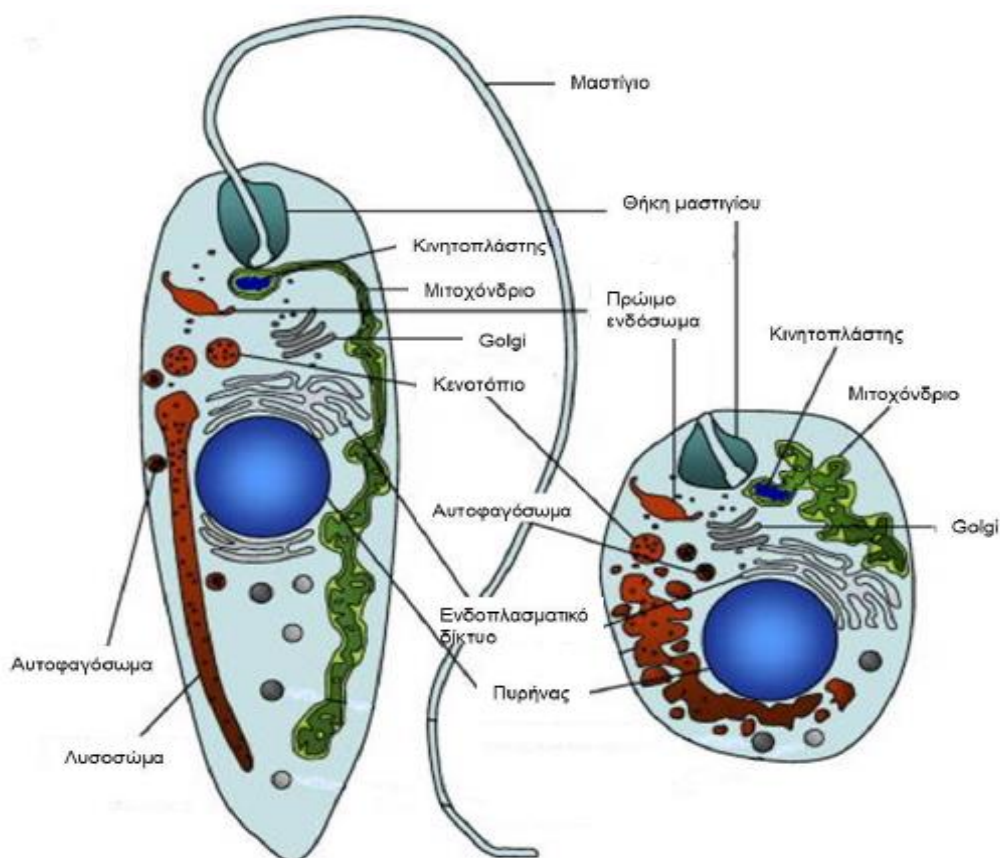
1.2 ΤΟ ΠΑΡΑΣΙΤΟ

Το παράσιτο χαρακτηρίζεται από διμορφικό κύκλο ζωής, ενώ οι κύριες μορφές του είναι η **προμαστιγωτή** και η **αμαστιγωτή** (Εικόνα 1.2).

Η **προμαστιγωτή μορφή** είναι επιμήκης, μεγέθους 5 – 20 μm x 1 – 4 μm ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο, ενώ φέρει μαστίγιο μήκους 22-25 μm, το οποίο χρησιμεύει ως όργανο κίνησης αλλά και προσκόλλησης. Η δομή του αξονήματος του μαστιγίου, είναι χαρακτηριστική στην προμαστιγωτή μορφή του παρασίτου και αποτελείται από 9 ζεύγη περιφερικών μικροσωληνίσκων, τα οποία περιβάλλουν ένα κεντρικό ζεύγος που φύεται από τον πρώτο «βασικό δίσκο» και εντοπίζεται περιφερικά του «βασικού σωματίου». Το περίβλημα που περιβάλλει το μαστίγιο θεωρείται ότι είναι μια διόγκωση της μεμβράνης του οργανισμού. Ο πυρήνας περιλαμβάνει δυο πυρηνίσκους. Το ενδοπλασματικό δίκτυο δεν είναι πολύ ανεπτυγμένο. Το σώμα της προμαστιγωτής μορφής καλύπτεται από λεία μεμβράνη τριών στρωμάτων, πάχους 10-12 nm, αποτελούμενη από 2 οσμιοφιλικά στρώματα πάχους 25 nm το κάθε ένα, τα οποία διαχωρίζονται από ένα άλλο μικρότερο οσμιοφίλο στρώμα, πάχους 5 nm. Πολύ κοντά στην εσωτερική οσμιοφιλή μεμβράνη, βρίσκονται σωληνοειδείς δομές, οι οποίες συνδέονται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη με ινίδια. Οι μικροσωληνίσκοι βρίσκονται σε αυστηρά κανονικές αποστάσεις, ενώ εκτείνονται από το μαστίγιο προς την αντίθετη πλευρά. (Akiyama et al., 1991)

Η **αμαστιγωτή μορφή** είναι ωοειδής, μεγέθους 2x4 μm. Φέρει ενδοπλασματικό μαστίγιο μέσα σε θήκη. Η χαρακτηριστική διάταξη του αξονήματος «9 + 2» διακόπτεται απότομα κοντά στην κορυφή του μαστιγίου (Akiyama et al., 1991). Ένα στρώμα παράλληλων επιμήκων μικροσωληνίσκων που περιβάλλουν σχεδόν ολόκληρο το κύτταρο κάτω από την κυτταροπλασματική μεμβράνη, είναι υπεύθυνο για τη μορφολογία του παρασίτου (De Souza, 1988). Οι μικροσωληνίσκοι καταλήγουν κοντά στη θήκη του μαστιγίου, η οποία αποτελείται από τέσσερις

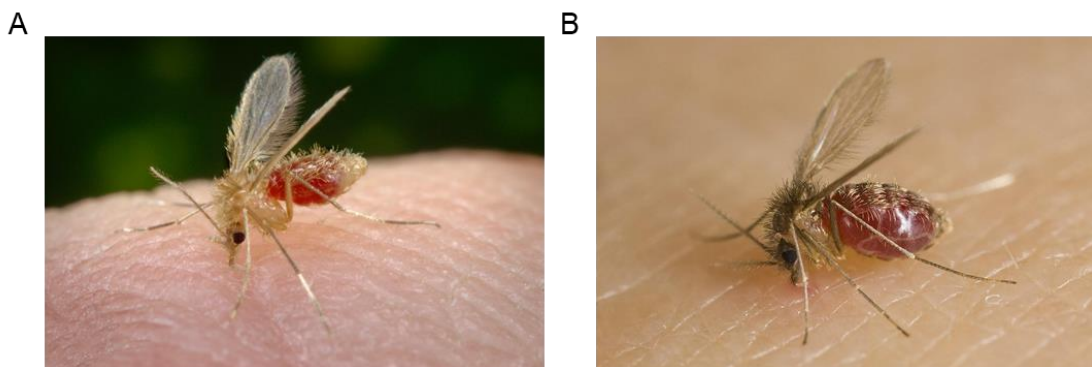
μικροσωληνίσκους, και ο ρόλος τους είναι η μεταφορά διαφόρων σωματιδίων (Campro-Aasen et al, 1973), ενώ στο σημείο εκείνο λαμβάνουν χώρα και οι λειτουργίες της ενδοκυττάρωσης και εξοκυττάρωσης του παρασίτου (Webster & Rusell, 1993). Τα κενοτόπια, γνωστά ως «μεταχρωματικά κοκκία» ή «κενοτόπια έγκλεισης», αποθηκεύουν ή/και ελευθερώνουν Ca^{2+} για τη μεταγωγή μηνυμάτων, τη διατήρηση του pH και τη ρύθμιση της οσμωτικής πίεσης (Vannier-Santos et al, 1995; 1999). Ο κινητοπλάστης, ο οποίος βρίσκεται κοντά στο «βασικό σωματίο», είναι ένα οργανίδιο που εκτελεί λειτουργίες μιτοχονδρίου και περιέχει το 15% του συνολικού DNA του κυττάρου. Σε ένα παράσιτο που δεν υφίσταται κυτταρική διαίρεση, το 90% του kDNA συνίσταται από 5000 – 10000 αλυσιδωτά αντίγραφα μινικύκλων (minicircles) μεγέθους 800 – 1200 bp το καθένα. Το υπόλοιπο kDNA σχηματίζει 25 – 50 αντίγραφα μεγακύκλων (maxicircles) 20 kb το καθένα (Rauch et al, 1993). Ο πυρήνας περιβάλλεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο και είναι διάτρητος από πόρους ανάλογους με εκείνους που υπάρχουν στα άλλα ευκαρυωτικά κύτταρα. Στο κέντρο του πυρήνα εντοπίζεται ο πυρηνίσκος διαμέτρου 0,6 – 1 μm και περιφερικά τοποθετείται η χρωματίνη οργανωμένη σε 16 – 23 χρωμοσώματα (Swindle & Tait, 1996).



Εικόνα 1.2 Σχηματική αναπαράσταση των κύριων οργανιδίων της προμαστιγωτής (αριστερά) και της αμαστιγωτής (δεξιά) μορφής του παρασίτου (τροποποιημένη από Besteiro et al, 2007).

1.3 Ο ΦΟΡΕΑΣ

Η *Leishmania* συνιστά ένα διξενικό παράσιτο, καθώς μπορεί να μολύνει δύο διαφορετικούς ξενιστές (σκνίπα και θηλαστικό), εκτελώντας μέρος του κύκλου ζωής του σε κάθε έναν από αυτούς. Φορείς των παρασίτων του γένους *Leishmania* αποτελούν οι θηλυκές σκνίπες (Εικόνα 1.3) των γενών *Phlebotomus* (Ευρώπη, Ασία, Αφρική) και *Lutzomyia* (Αμερική). Από τα 1000 γνωστά είδη σκνίπας, λιγότερα από 50 παγκοσμίως είναι ικανά να μεταδώσουν το παράσιτο (Killick-Kendrick, 1990). Από αυτά, κάποια μπορούν να υποστηρίξουν την ανάπτυξη μόνο ενός είδους του παρασίτου, ενώ άλλα περισσότερων ειδών (Volf et al., 2008). Αυτή η ιδιαιτερότητα προκύπτει από την ανάγκη για ύπαρξη κατάλληλων θέσεων προσκόλλησης στα κύτταρα του εντέρου της σκνίπας ή ειδικών μορίων-προσδετών που εκφράζονται από τις προμαστιγωτές μορφές, καθώς και από τη δυνατότητα ολοκλήρωσης της ανάπτυξης του παρασίτου με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή μετακυκλικών προμαστιγωτών, που αποτελούν τη μόνη μολυσματική μορφή για τους σπονδυλωτούς ξενιστές. Επιπλέον, το παράσιτο θα πρέπει να είναι σε θέση να επιβιώσει των πεπτικών ενζύμων που παράγονται στο περιβάλλον του εντέρου της σκνίπας (Volf et al., 2008; Dobson et al., 2010).

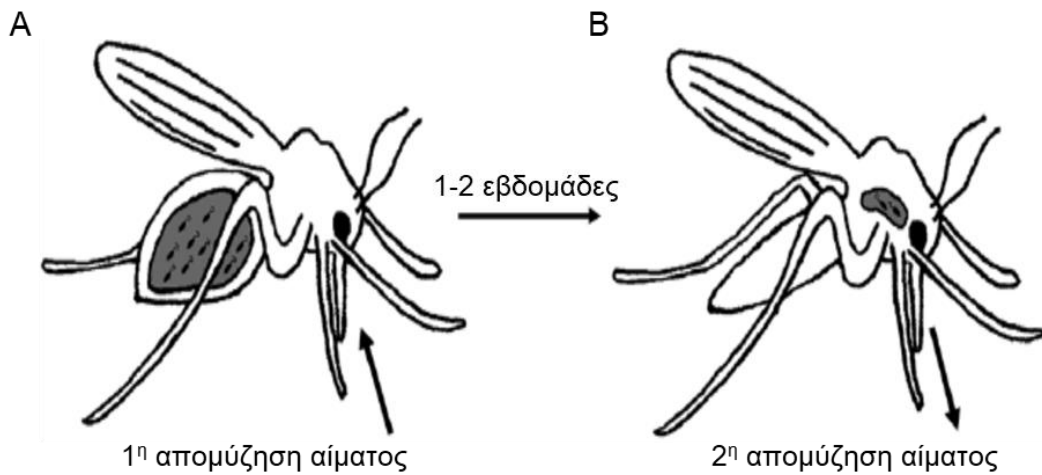


Εικόνα 1.3 Θηλυκή σκνίπα των ειδών *Phlebotomus paratasi* (A) και *Lutzomyia longipalpis* (B) κατά την απομύζηση αίματος από το θηλαστικό-ξενιστή (Πηγή: VectorBase, Bioinformatics Resource for Invertebrate Vectors of Human Pathogens).

1.4 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ

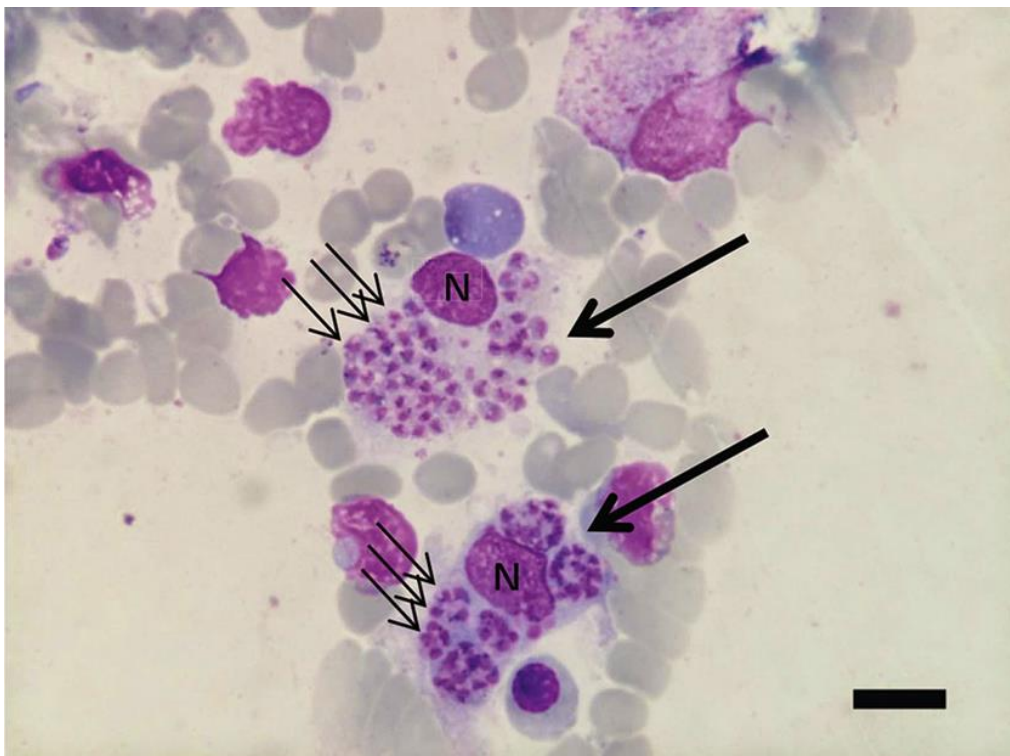
Τα παράσιτα *Leishmania* διαθέτουν ένα σχετικά απλό κύκλο ζωής, ο οποίος συνίσταται από δύο κύρια στάδια: το στάδιο της **κινητής μορφής** του παρασίτου που φέρει μαστίγιο (**προμαστιγωτή μορφή**), όπου το παράσιτο διαβιώνει στο πεπτικό σύστημα της φλεβοτόμου και το στάδιο με τη **μη κινητή (αμαστιγωτή μορφή)**, όπου το παράσιτο εντοπίζεται στο εσωτερικό των φαγολυσοσωμάτων των μακροφάγων των σπονδυλωτών ξενιστών (Van Assche et al., 2011).

Κατά την απομύζηση αίματος από μολυσμένο ξενιστή, οι αμαστιγωτές μορφές εισέρχονται στο έντερο της θηλυκής σκνίπας (Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4 Α) Θηλυκές σκνίπες λαμβάνουν αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου έπειτα από απομύζηση αίματος από μολυσμένο ξενιστή, ενώ Β) σε μια επόμενη αναζήτηση γεύματος, μεταφέρονται μετακυκλικές προμαστιγωτές μορφές (Πηγή: τροποποιημένη από Bates et al., 2007).

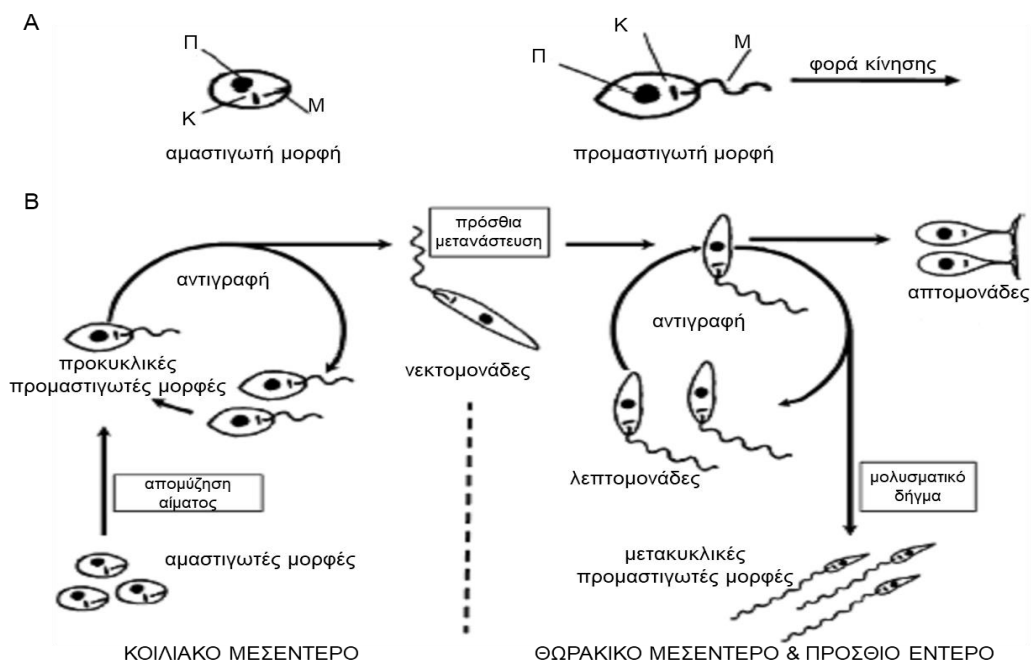
Οι αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου βρίσκονται ενδοκυτταρικά στα φαγολυσσώματα των μακροφάγων (Εικόνα 1.5) και άλλων φαγοκυττάρων. Η πρόσληψή τους από τις σκνίπες γίνεται με τη δράση κοπής των εξαρτημάτων του στόματος (Handman et al., 2002). Έτσι δημιουργούν μια μικρή πληγή όπου το αίμα θα αρχίσει να ρέει από επιφανειακά τριχοειδή αγγεία (Lane et al., 1993).



Εικόνα 1.5 Φωτογραφία φωτονικής μικροσκοπίας αμαστιγωτών μορφών *Leishmania* από επίχρισμα μυελού των οστών. Ύστερα από χρώση Wright, βάφονται οι πυρήνες (N) δύο μολυσμένων μακροφάγων (μεγάλα βέλη) με μεγάλο αριθμό

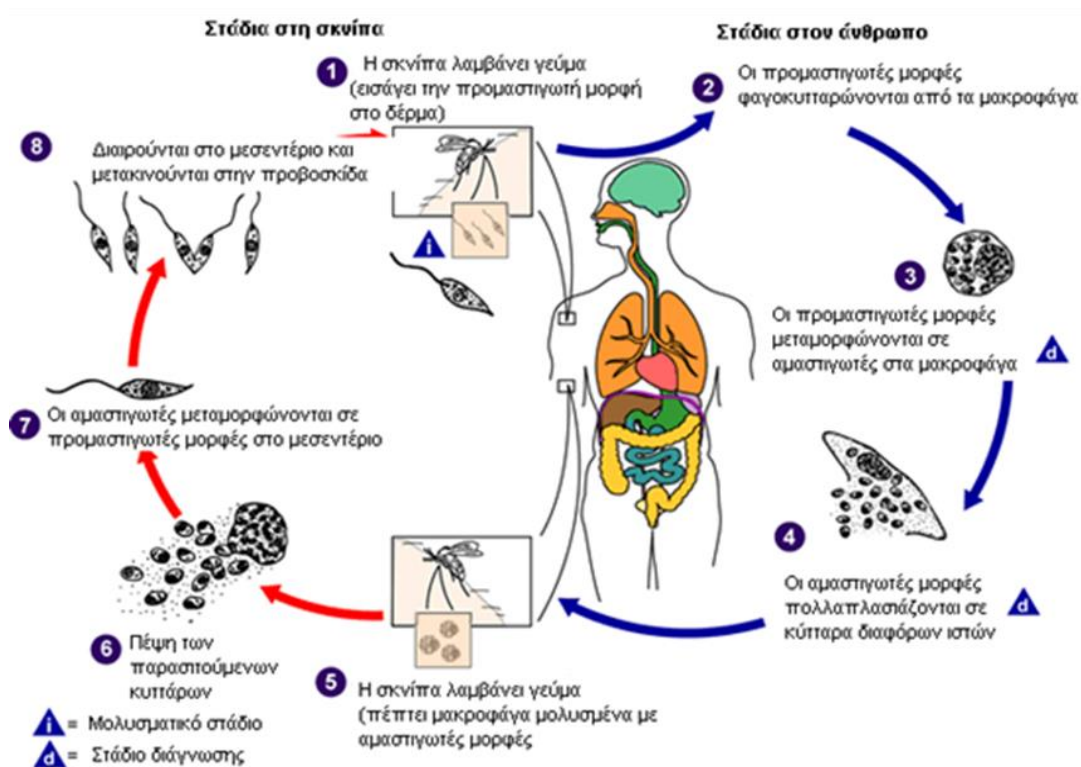
αμαστιγωτών μορφών (μικρά βέλη) στο κυτταρόπλασμά τους. Η μπάρα αντιστοιχεί σε 20 μm (Πηγή: Pothirat et al., 2014).

Η ιστική βλάβη συνδέεται με τη δημιουργία τραύματος που απελευθερώνει μακροφάγα του δέρματος και/ή αμαστιγωτές μορφές στην κυκλοφορία, επιτρέποντας την επακόλουθη πρόσληψη τους από τη σκνίπα. Η μεταβολή των συνθηκών κατά τη μετάβαση από τον ξενιστή-θηλαστικό στο έντερο της σκνίπας (μείωση της θερμοκρασίας, αύξηση του pH) ευνοούν την ανάπτυξη του παρασίτου στο φορέα (Εικόνα 1.6) (Bates et al., 2004). Οι αμαστιγώτες μορφές μετατρέπονται σε κινητές προμαστιγώτες μορφές. Αυτό το πρώτο στάδιο στο φορέα, ονομάζεται προκυκλική προμαστιγωτή μορφή (ασθενώς κινητή μορφή, που πολλαπλασιάζεται κατά την απομύζηση). Μετά από λίγες μέρες, ο ρυθμός αναπαραγωγής των προκυκλικών προμαστιγωτών επιβραδύνεται και τα παράσιτα διαφοροποιούνται σε επιμήκεις, ισχυρά κινητικές νεκτομονάδες. Πρόκειται για μεταναστευτικές μορφές που συσσωρεύονται στο πρόσθιο τμήμα του περιτόναιου και απελευθερώνονται με την απομύζηση. Η διαφυγή τους διευκολύνεται από τη δράση μίας παρασιτικής εκκρινόμενης χιτινάσης και πιθανώς από τη δράση της ενδογενούς χιτινάσης της σκνίπας. Κινούμενες προς το εμπρόσθιο έντερο, μερικές από αυτές συνδέονται με τις μικρολάχνες του επιθηλίου του μεσεντέρου, μέχρι να φτάσουν στην καρδιακή βαλβίδα (Schlein et al., 1991 ; Shakarian & Dwyer, 2000 ; Ramalho-Ortigao et al., 2005).



Εικόνα 1.6 Α. Αμαστιγωτή και προμαστιγωτή μορφή παρασίτου *Leishmania* όπου υποδεικνύεται ο πυρήνας (Π), ο κινητοπλάστης (Κ) και το μαστίγιο (Μ). Β. Σχηματική αναπαράσταση μετατροπής αμαστιγωτών μορφών σε μετακυκλικές προμαστιγωτές μορφές στη σκνίπα (Πηγή: τροποποιημένη από Bates et al., 2007).

Η ικανότητα προσκόλλησης είναι μια σημαντική ιδιότητα των προμαστιγωτών μορφών (Sacks et al., 2001). Η λιποφωσφογλυκάνη (LPG) στην επιφάνεια του παρασίτου είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση σε μια γαλακτίνη στο επιθήλιο του εντέρου της σκνίπας. Μόλις φθάσουν στη βαλβίδα, οι νεκτομονάδες μετασχηματίζονται σε λεπτομονάδες (Gossage et al., 2003). Αυτές είναι υπεύθυνες για την έκκριση του πηκτώματος που παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάδοση. Μερικές από τις νεκτομονάδες/ λεπτομονάδες διαφοροποιούνται σε απτομονάδες, οι οποίες εντοπίζονται στο στομόδοιο της σκνίπας (Killick-Kendrick et al., 1974; Rogers et al., 2002). Τέλος, μερικές από τις απτομονάδες διαφοροποιούνται σε μετακυκλικές προμαστιγωτές μορφές. Αυτές εναποτίθενται στο δέρμα ενός νέου ξενιστή - θηλαστικού όταν η σκνίπα απομυζεί αίμα, οδηγώντας στη μετάδοση της νόσου (Rogers et al., 2002).



Εικόνα 1.7 Στάδια κύκλου ζωής του παρασίτου *Leishmania* μεταξύ σκνίπας και ανθρώπου (Πηγή: Centers for Disease Control and Prevention; CDC).

1.5 ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ

Υπάρχουν διαφορετικές κλινικές μορφές λεισμανίασης με βάση την παρουσία του παρασίτου στους μολυσμένους ιστούς. Ωστόσο, οι πιο συχνά εμφανιζόμενες κλινικές μορφές λεισμανίασης στον άνθρωπο είναι οι ακόλουθες:

A. Δερματική λεισμανίαση (Cutaneous Leishmaniasis, CL)

Προκαλείται συνήθως από τα είδη *Leishmania (L.) tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana* και *L. braziliensis*. Αρχικά εκδηλώνεται με διαμένουσα ερυθρότητα στην περιοχή του δήγματος, η οποία αυξάνει σε μέγεθος με το χρόνο. Η περιοχή του δήγματος σταδιακά απομονώνεται λόγω της μετακίνησης λευκοκυττάρων, νεκρώνεται και δημιουργείται κοκκίωμα, το οποίο ιάται (συνήθως χωρίς να χρειαστεί χορήγηση φαρμακευτικών ουσιών). Αρκετά συχνά τα φύματα εμφανίζονται κατά μήκος των λεμφικών οδών και συνοδεύονται από διόγκωση των επιχώριων λεμφαδένων. Η διάχυτη δερματική λεισμανίαση (Diffuse Cutaneous Leishmaniasis, DCL) προκαλείται από τα είδη *L. aethiopica* (Αιθιοπία και Κένυα) και *L. amazonensis* (Βενεζουέλα και Δομινικανή Δημοκρατία) και αποτελεί μορφή της δερματικής λεισμανίασης, σε περιπτώσεις ανέργιας ή μερικής ανοσοκαταστολής. Το νόσημα χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση διάσπαρτων δερματικών αλλοιώσεων σε ολόκληρο το σώμα ή δερματικών αλλοιώσεων στο όριο του αυτιού (Ashford et al., 2000).



Εικόνα 1.8 Δερματική αλλοίωση ασθενούς με δερματική λεισμανίαση (Πηγή: <http://medicalpicturesinfo.com/leishmaniasis/>).

B. Βλεννογονοδερματική λεισμανίαση (Mucocutaneous Leishmaniasis, MCL)

Εκδηλώνεται μετά τη θεραπεία της δερματικής λεισμανίασης και οφείλεται στο είδος *L. braziliensis*. Περιστασιακά έχουν αναφερθεί μολύνσεις των αμυγδαλών και του στοματικού βλεννογόνου από το είδος *L. infantum*. Στις περισσότερες περιπτώσεις, εμφανίζεται αρκετά χρόνια μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας της βλεννογονοδερματικής λεισμανίασης, αλλά είναι δυνατόν να εμφανισθεί και κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή της δημιουργίας των φυμάτων. Κύριο χαρακτηριστικό της είναι η δημιουργία μεταστατικών φυμάτων στο στοματικό και το ρινικό βλεννογόνο με αποτέλεσμα τη διάβρωση των χόνδρων έως την πλήρη καταστροφή του προσώπου (Ashford et al., 2000).



Εικόνα 1.9 Αλλοιώσεις ρινός και στόματος ασθενούς με βλεννογονοδερματική λεισμανίαση (Πηγή: <http://medicalpicturesinfo.com/leishmaniasis/>).

Γ. Σπλαγγχνική λεισμανίαση (Visceral Leishmaniasis, VL)

Εμφανίζεται συχνότερα σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα και οφείλεται στα είδη *L. infantum* και *L. donovani*. Αρχικά, εκδηλώνεται με μία δερματική αλλοίωση στην περιοχή του δήγματος. Αργότερα, εμφανίζεται συνήθως πυρετός, αναιμία, σπληνομεγαλία, ηπατομεγαλία και καχεξία, σε χρονικό διάστημα λίγων εβδομάδων έως χρόνων μετά τη μόλυνση. Είναι πιθανόν να παρατηρηθεί λεμφαδενοπάθεια, διάρροια, ανεστραμμένος λόγος αλβουμίνης/σφαιρινών και θάνατος λόγω δευτερογενών ευκαιριακών λοιμώξεων. Τέλος, μπορεί να παρατηρηθεί και ασυμπτωματική μορφή του νοσήματος, καθώς και αυτοΐαση μολυσμένων ατόμων χωρίς χορήγηση αντιλεισμανιακών φαρμάκων (Herwaldt, 1999).



Εικόνα 1.10 Παιδί με ηπατοσπληνομεγαλία λόγω σπλαγγχνικής λεισμανίασης (Πηγή: <http://www.emedmd.com/content/leishmaniasis>).

Δ. «Μετά-καλά-αζάρ» δερματική λειψμανίαση (Post-kala azar Dermal Leishmaniasis, PKDL)

Εκδηλώνεται συνήθως δύο χρόνια μετά την πλήρη ίαση της σπλαγχνικής μορφής και προκαλεί τη δημιουργία στιγμάτων στο δέρμα με τη μορφή φακίδων. Επίσης, έχουν καταγραφεί και μεμονωμένες περιπτώσεις, όπου έχει εμφανισθεί σε άτομα χωρίς ιστορικό σπλαγχνικής λειψμανίασης (Ashford et al., 2005).



Εικόνα 1.11 Δερματικές αλλοιώσεις ασθενούς με «Μετά - καλά-αζάρ» δερματική λειψμανίαση (Πηγή: <http://www.emedmd.com/content/leishmaniasis>).

1.6 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Ο όρος λειψμανίαση αναφέρεται σε ένα σύμπλεγμα νοσημάτων που απειλούν τον άνθρωπο, εμφανιζόμενων ή επανεμφανιζόμενων σε διάφορες περιοχές της Γης. Ανάλογα με το είδος του παρασίτου και τη γεωγραφική περιοχή, η μετάδοση στη φύση μπορεί να είναι: ζωνοτική, όπου οι βασικοί υποδοχείς είναι τα ζώα (ο κύκλος μετάδοσης του παρασίτου στη φύση διατηρείται μεταξύ φλεβοτόμων και ζώων - συνήθως σκύλων ή τρωκτικών, και ο άνθρωπος είναι τυχαίος ξενιστής) ή ανθρωποτική, όπου οι βασικοί υποδοχείς είναι οι άνθρωποι (οι φλεβοτόμοι μεταδίδουν τα παράσιτα μεταξύ ανθρώπων). Η ανθρωποτική μετάδοση είναι χαρακτηριστική των ειδών *L. tropica* και *L. donovani*, ενώ τα είδη *L. infantum* και *L. major* σχετίζονται κυρίως με τη ζωνοτική μετάδοση.

Η λειψμανίαση είναι ενδημική σε 98 χώρες και σε επικράτειες των τριών ηπείρων, με εξαίρεση την Αυστραλία και την Ανταρκτική (Pace et al., 2014). Πάνω από ένα δισεκατομμύριο άνθρωποι στις ενδημικές περιοχές βρίσκονται υπό τον κίνδυνο μόλυνσης. Μεταξύ των παρασιτικών ασθενειών, με βάση τη θνησιμότητα, η λειψμανίαση κατατάσσεται δεύτερη μετά την ελονοσία, ενώ αναγνωρίζεται ως η τρίτη αιτία νοσηρότητας - μετά την ελονοσία και τη σχιστοσωμίαση, με τα παιδιά κάτω των 15 ετών να επιβαρύνονται περισσότερο (Pace et al., 2014). Ωστόσο,

θεωρείται ότι απειλεί σε μεγαλύτερο βαθμό «τους φτωχότερους των φτωχών» σε χώρες της Νοτιοανατολικής Ασίας, της Ανατολικής Αφρικής και της Λατινικής Αμερικής. Γι αυτό και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) περιλαμβάνει τη λεισμανίαση στην ομάδα των παραμελημένων τροπικών ασθενειών, των οποίων την εκρίζωση έχει θέσει ως βασική προτεραιότητα (WHO, 2014). Αξιοσημείωτο είναι πως η πραγματική επίπτωση της λεισμανίασης παραμένει άγνωστη, καθώς ένας μεγάλος αριθμός κρουσμάτων δε δηλώνεται εξαιτίας της έλλειψης κατάλληλων συστημάτων επιδημιολογικής επιτήρησης και ευαίσθητων διαγνωστικών μεθόδων.

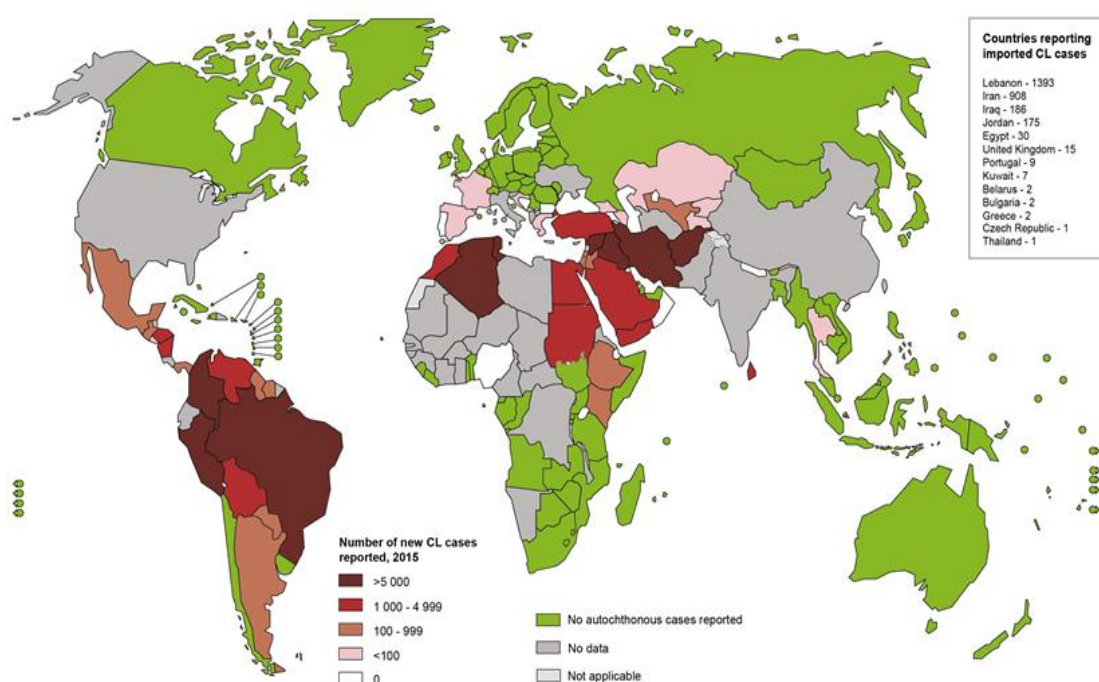
Περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως οι κλιματικές αλλαγές, η αυξημένη αστικοποίηση, η οικονομική ανάπτυξη και οι μετακινήσεις πληθυσμών για οικονομικούς, κοινωνικούς ή πολιτικούς λόγους επηρεάζουν την επιδημιολογία των παρασιτικών ασθενειών, καθώς οδηγούν σε αλλαγές στο εύρος παρουσίας φορέων, υποδόχων και παθογόνων (Moriconi et al., 2017). Η πρόσφατη γεωγραφική εξάπλωση των φλεβοτόμων στην περιοχή της Μεσογείου αποδόθηκε στις κλιματικές αλλαγές και μελέτες πιστοποίησαν ότι η θερμοκρασία είναι καθοριστικός παράγοντας για την εποχική δραστηριότητά τους (Alten et al., 2016). Η αύξηση της θερμοκρασίας του πλανήτη μπορεί να επηρεάσει την κατανομή των σκνιπών και των ασθενειών που μεταδίδουν, όπως έχει διαπιστωθεί από την παρουσία φλεβοτόμων στην ηπειρωτική Ευρώπη συμπεριλαμβανομένης της Γερμανίας, της Αυστρίας, της Ελβετίας και της Σλοβακίας, αλλά και από την εξάπλωση της λεισμανίασης στη Βόρεια Ιταλία (Moriconi et al., 2017). Σε περιοχές της ηπειρωτικής Ευρώπης όπου στο παρελθόν οι κλιματικές συνθήκες ήταν ακατάλληλες για τη διαβίωση των σκνιπών, σήμερα οι κλιματικές αλλαγές επιτρέπουν την επιβίωση και την αναπαραγωγή τους.

Τα διεθνή ταξίδια έχουν οδηγήσει σε αύξηση των κρουσμάτων λεισμανίασης σε μη ενδημικές χώρες, καθιστώντας επιτακτική ανάγκη την αναγνώριση της σπουδαιότητας αυτής της παρασιτικής ασθένειας (Akhoudi et al., 2010). Σε εμπόλεμες ζώνες, παράγοντες όπως η καταστροφή των υγειονομικών υποδομών και ο υποσιτισμός οδηγούν σε εξάπλωση των ασθενειών που μεταδίδονται μέσω φορέα, ενώ οι μετακινήσεις των προσφύγων μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνιση του παθογόνου στις χώρες προορισμού τους, όπου συνυπάρχουν οι φορείς και οι υποδοχοί (Moriconi et al., 2017). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η πρόσφατη κρίση στη Συρία που οδήγησε σε έξαρση της δερματικής λεισμανίασης, με εκατοντάδες χιλιάδες μολυσμένους Σύριους να κατακλύζουν τους χώρους συγκέντρωσης προσφύγων στο Λίβανο ή να βρίσκονται εγκλωβισμένοι στην εμπόλεμη ζώνη (Du et al., 2016). Επίσης, η έξοδος των προσφύγων από τη Συρία οδήγησε σε δραματική αύξηση των κρουσμάτων δερματικής λεισμανίασης στη Νότια Τουρκία και στην εισαγωγή νέων ειδών του παρασίτου, όπως το είδος *L. major* (Koltas et al., 2014). Επιπρόσθετα, η αύξηση του αριθμού των ανοσοκατεσταλμένων ατόμων (ασθενείς με AIDS, άτομα που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση οργάνων ή ασθενείς που υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία) έχει

οδηγήσει σε αύξηση των κρουσμάτων της σπλαγγχνικής λεισμανίασης στην Ευρώπη (Okwor et al., 2013).

Δερματική λεισμανίαση

Η δερματική λεισμανίαση είναι η πιο συχνή μορφή λεισμανίασης με 700.000 – 1.200.000 νέα κρούσματα παγκοσμίως κάθε χρόνο (Alvar et al., 2012). Περίπου 95% των κρουσμάτων σημειώνονται σε τρεις περιοχές: Λατινική Αμερική, λεκάνη της Μεσογείου και Δυτική Ασία, από τη Μέση Ανατολή έως την Κεντρική Ασία (Εικόνα 1.12). Οι δέκα χώρες με τον υψηλότερο αριθμό κρουσμάτων είναι: Αφγανιστάν, Αλγερία, Κολομβία, Βραζιλία, Ιράν, Συρία, Αιθιοπία, Βόρειο Σουδάν, Κόστα Ρίκα και Περού, στις οποίες συνολικά καταγράφεται το 70-75% της παγκόσμιας επίπτωσης του νοσήματος (Alvar et al., 2012).



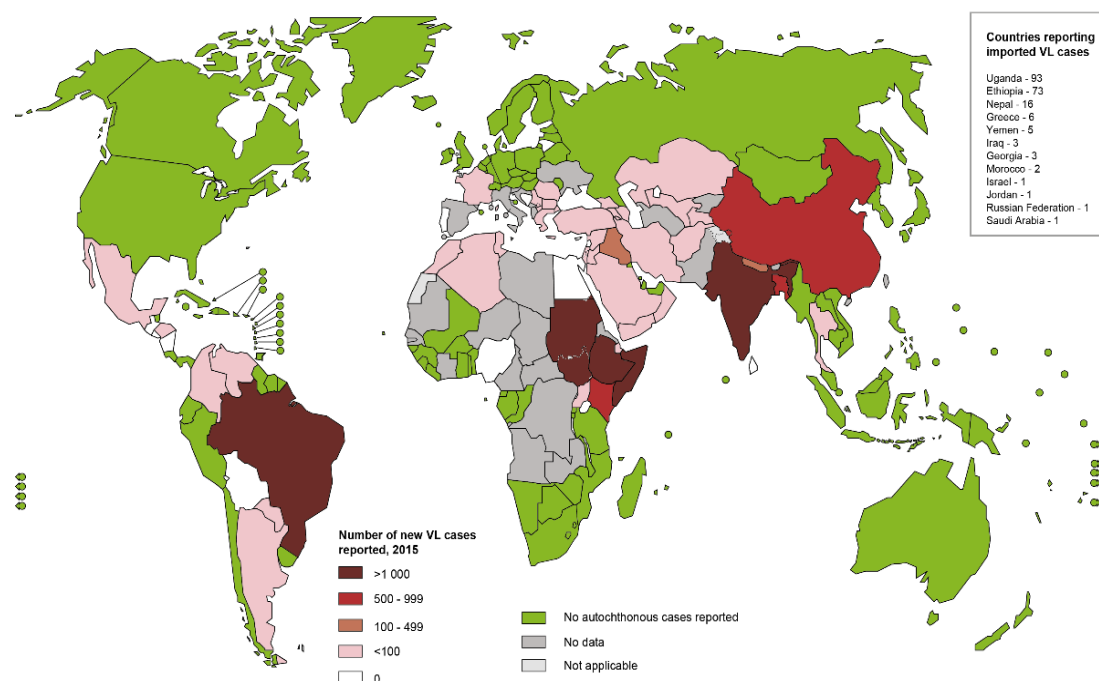
Εικόνα 1.12 Παγκόσμια επιδημιολογικά δεδομένα για τη δερματική λεισμανίαση, 2015 (Πηγή: <http://www.who.int>).

Αιτιολογικός παράγοντας της δερματικής λεισμανίασης είναι το είδος *L. infantum* στην Ισπανία και την Πορτογαλία, τα είδη *L. infantum*, *L. major* και *L. tropica* στην Κύπρο και την Τουρκία, τα είδη *L. major* και *L. tropica* στο Ιράν, την Ινδία και το Πακιστάν και τα είδη *L. aethiopicum*, *L. major* και *L. infantum* στην Αιθιοπία και τη Σαχάρια Αφρική. Τα είδη του υπογένους *Viannia* αποτελούν τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα δερματικής λεισμανίασης στην Κεντρική και Νότια Αμερική (Wall et al., 2012). Η ανθρωπονοτική δερματική λεισμανίαση παρατηρείται κυρίως σε αστικές και περιαστικές περιοχές και χαρακτηρίζεται συνήθως από μεγάλες επιδημίες σε πυκνοκατοικημένες πόλεις, ιδιαίτερα σε εμπόλεμες ζώνες, στρατόπεδα προσφύγων και περιοχές με μεγάλο αριθμό μεταναστών (WHO, 2010). Στο ανατολικό ημισφαίριο, η ζωνοτική δερματική λεισμανίαση με αιτιολογικό

παράγοντα το είδος *L. major* συναντάται σε αγροτικές περιοχές, ενώ στο δυτικό ημισφαίριο το νόσημα συνήθως περιορίζεται σε ανθρώπους που ζουν ή εργάζονται σε δασικές περιοχές (WHO, 2010).

Σπλαγχνική λεισμανίαση

Η σπλαγχνική λεισμανίαση αποτελεί τη σοβαρότερη μορφή λεισμανίασης και είναι θανατηφόρος αν δε χορηγηθεί θεραπεία. Περίπου 200.000 - 400.000 νέα κρούσματα και 20.000 – 40.000 θάνατοι σημειώνονται παγκοσμίως κάθε χρόνο, ενώ πάνω από το 90% των κρουσμάτων καταγράφονται σε έξι χώρες (Εικόνα 1.13): Ινδία (κυρίως στην πόλη Μπιχάρ), Μπαγκλαντές, Σουδάν, Νότιο Σουδάν, Βραζιλία και Αιθιοπία (Alvar et al., 2012). Η μόλυνση με τον ιό HIV επηρέασε την επιδημιολογία της σπλαγχνικής λεισμανίασης. Από τα τέλη της δεκαετίας του '80, είχαν αναφερθεί κρούσματα συν-λοίμωξης HIV-*Leishmania* σε 35 χώρες, με τα περισσότερα να σχετίζονται με τη σπλαγχνική μορφή του νοσήματος (Lindoso et al., 2016). Από το συνολικό αριθμό κρουσμάτων HIV-*Leishmania*, ένα ποσοστό 5-6% καταγράφεται στην περιοχή της Μεσογείου (Monge-Maillo et al., 2014). Σε ορισμένες περιοχές της Αιθιοπίας, 35% των ασθενών με σπλαγχνική λεισμανίαση έχουν συν-λοίμωξη με τον ιό HIV (Diro et al., 2014), ενώ στην Ινδία, ο επιπολασμός της συν-λοίμωξης αυξήθηκε από 0.88% το 2000 σε 2.18% το 2006 (Singh, 2014). Επίσης, στη Λατινική Αμερική, και ιδιαίτερα στη Βραζιλία, σημειώθηκε αύξηση της επίπτωσης της συν-λοίμωξης από 0.7% το 2001 σε 8.5% το 2012 (Lindoso et al., 2014).



Εικόνα 1.13 Παγκόσμια επιδημιολογικά δεδομένα για τη σπλαγχνική λεισμανίαση (Πηγή: <http://www.who.int>).

Στις ενδημικές περιοχές όπου ο αιτιολογικός παράγοντας είναι το είδος *L. infantum*, η κλινική μορφή της σπλαγχνικής λεισμανίασης εμφανίζεται συνήθως σε παιδιά κάτω των 5 ετών, ενώ σε περιοχές που ενδημεί το είδος *L. donovani* η ηλικία εμφάνισης της κλινικής μορφής κυμαίνεται μεταξύ 13^{ου} και 23^{ου} έτους (WHO, 2010). Γενικά, σε πληθυσμούς όπου ο ρυθμός μετάδοσης διατηρείται χαμηλός εδώ και αρκετά χρόνια, ένα μεγάλο μέρος των ενηλίκων έχουν αναπτύξει επίκτητη ανοσία, όπως αποδεικνύεται από τον υψηλό αριθμό θετικών στη δερματική δοκιμασία λεισμανίνης ατόμων (WHO, 2010). Ωστόσο, άτομα ανοσοκατεσταλμένα ή προερχόμενα από μη ενδημικές περιοχές που επισκέπτονται μία ενδημική περιοχή βρίσκονται υπό την απειλή του νοσήματος.

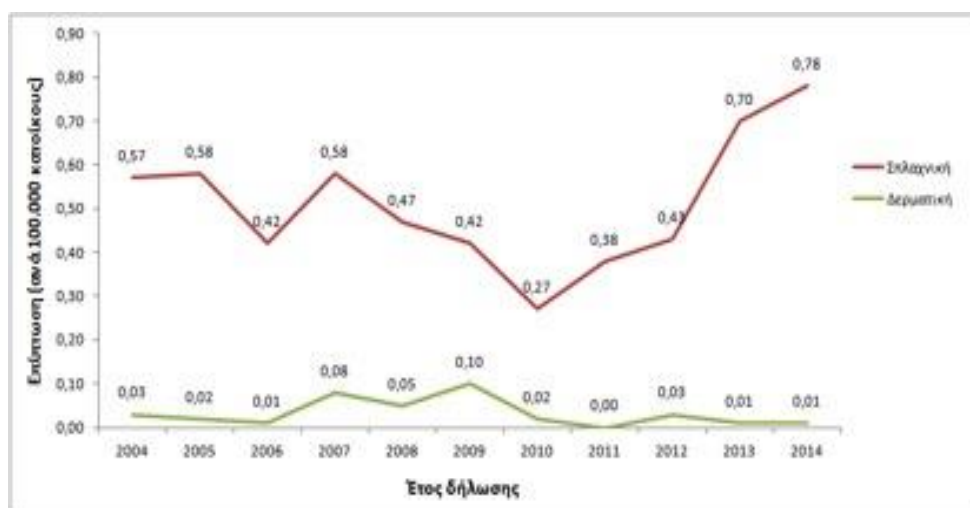
Ανθρωπονοτική μετάδοση έχει καταγραφεί στο Μπαγκλαντές, την Ινδία και το Νεπάλ, κυρίως σε αγροτικές περιοχές (WHO, 2010). Στη λεκάνη της Μεσογείου, η σπλαγχνική λεισμανίαση είναι ζωνοσός που προκαλείται από το είδος *L. infantum* και συναντάται σε αγροτικές και περιαστικές περιοχές, καθώς και σε ορεινά χωριά. Ο οικόσιτος σκύλος αποτελεί την κύρια δεξαμενή του παρασίτου συνιστώντας σημαντικό κτηνιατρικό πρόβλημα με επίπτωση στη δημόσια υγεία. Ζωνοτική μετάδοση του είδους *L. infantum* έχει ακόμα παρατηρηθεί στο Αφγανιστάν, την Ισλαμική Δημοκρατία του Ιράν, το Πακιστάν και την Κεντρική Ασία (WHO, 2010).

Η επιδημιολογία της λεισμανίασης στην Ελλάδα

Η Ελλάδα θεωρείται ενδημική χώρα για τη λεισμανίαση, με τη σπλαγχνική μορφή να αποτελεί την κύρια μορφή, που απαντάται σχεδόν σε όλα τα γεωγραφικά διαμερίσματα της χώρας, και τη δερματική μορφή να απαντάται σποραδικά. Το πρώτο κρούσμα λεισμανίασης αναφέρθηκε στην Κρήτη, το 1907 (Stoney-Archer, 1907). Κατά τη δεκαετία του 1940 καταγράφηκαν 160 κρούσματα σπλαγχνικής λεισμανίασης ετησίως, τη δεκαετία του 1950 32 κρούσματα και την περίοδο 1962-1978 60 κρούσματα ετησίως (WHO/LEISH). Έως το 1992, δηλώθηκαν στο Υπουργείο Υγείας 1.005 κρούσματα σπλαγχνικής λεισμανίασης στην Αττική (Tselentis et al., 1994). Στην Ελλάδα η λεισμανίαση ανήκει στα νοσήματα υποχρεωτικής δήλωσης. Η σπλαγχνική λεισμανίαση αποτελεί τη συχνότερη κλινική μορφή. Συνολικά, τα έτη 2004-2014 δηλώθηκαν 644 κρούσματα λεισμανίασης, εκ των οποίων τα 606 (94%) ήταν κρούσματα σπλαγχνικής και τα 38 (6%) ήταν κρούσματα δερματικής λεισμανίασης. Σύμφωνα με δημοσιευμένα στοιχεία του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕΕΛΠΝΟ), κατά το διάστημα 2004-2014, η ετήσια επίπτωση της σπλαγχνικής λεισμανίασης κυμάνθηκε από 0,27 έως 0,78 κρούσματα ανά 100.000 πληθυσμού, με μέση ετήσια επίπτωση 0,51 κρούσματα ανά 100.000 πληθυσμού (Γράφημα 1.1). Από το 2007 έως το 2010 παρατηρήθηκε μείωση της ετήσιας επίπτωσης, ενώ έκτοτε παρατηρήθηκε αυξητική τάση της επίπτωσης. Ωστόσο, η εκτίμηση της διαχρονικής τάσης του νοσήματος χρήζει ιδιαίτερης προσοχής, καθώς κατά τα έτη 2004-2009 και 2013-2014 εφαρμόστηκε ενισχυμένη εργαστηριακή επιτήρηση της νόσου, ενώ θα πρέπει να συνεκτιμηθεί η πιθανή ενίσχυση της εργαστηριακής διερεύνησης και διάγνωσης σε ορισμένες περιοχές της

χώρας (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2015). Όσον αφορά στα δηλωθέντα κρούσματα δερματικής λειψμανίασης, η ηλικιακή ομάδα 5-14 ετών είχε τη μεγαλύτερη μέση ετήσια επίπτωση για τα έτη 2004-2014 (0,053 κρούσματα/100.000 πληθυσμού, n=6), ακολουθούμενη από την ηλικιακή ομάδα 15-24 ετών (0,046/100.000 πληθυσμού) (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2015).

Συμπερασματικά, στη χώρα μας, καταγράφεται ετησίως μικρός αριθμός κρουσμάτων. Ωστόσο, η ερμηνεία των στοιχείων πρέπει να είναι προσεκτική, λαμβάνοντας υπόψη την ενδεχόμενη υποδήλωση. Επιπλέον, το παθογόνο μπορεί να μολύνει μεγαλύτερο ποσοστό του πληθυσμού, χωρίς όμως να προκαλεί νόσο (λανθάνουσα λοίμωξη). Η παρουσία σκνιπών και αδέσποτων σκύλων παραμένουν οι πιο συχνά αναφερόμενοι παράγοντες κινδύνου, γεγονός που υπογραμμίζει την ανάγκη λήψης σχετικών μέτρων πρόληψης και προστασίας της δημόσιας υγείας.



Γράφημα 1.1 Επίπτωση* λειψμανίασης (αριθμός δηλωθέντων κρουσμάτων ανά 100.000 πληθυσμού) ανά έτος δήλωσης και μορφή (σπλαγγχνική/δερματική), Ελλάδα, 2004-2014. *Υπολογίσθηκε με βάση το μόνιμο πληθυσμό της χώρας από την απογραφή του 2011 (πηγή: ΕΛ.ΣΤΑΤ.) (Πηγή: <http://www.keelpno.gr/>).

Από τη μία πλευρά η εξάπλωση της λειψμανίασης σε μη ενδημικές περιοχές και από την άλλη η αυξανόμενη επίπτωση και ο επιπολασμός του νοσήματος στις ενδημικές περιοχές καθιστούν επιτακτική την ανάγκη εφαρμογής μέτρων για τον έλεγχο του νοσήματος και ανακάλυψης νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων και αποτελεσματικών εμβολίων.

1.7 ΤΡΟΠΟΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΤΗΣ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ

Η πρόληψη και αντιμετώπιση της λειψμανίασης απαιτεί την εφαρμογή μίας σειράς μέτρων που περιλαμβάνουν: την αποτελεσματική επιδημιολογική επιτήρηση της νόσου, την έγκαιρη διάγνωση και αποτελεσματική θεραπεία των μολυσμένων ατόμων, την ατομική προστασία έναντι των σκνιπών, την υλοποίηση προγραμμάτων ελέγχου των σκνιπών και μείωσης των εστιών αναπαραγωγής τους, τη λήψη μέτρων

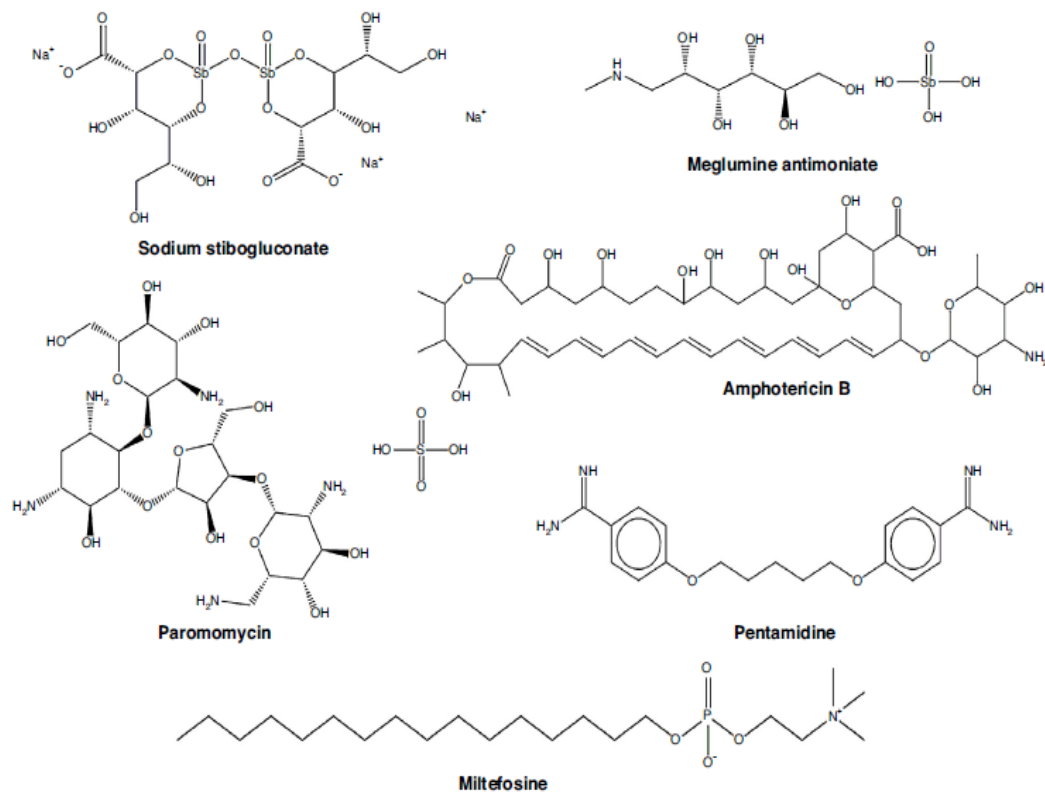
ελέγχου και πρόληψης του νοσήματος στα ζώα-υποδόχους. Εμβόλια ανθρώπινης χρήσης δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής, ενώ εμβόλια έναντι της λείσμανίασης του σκύλου έχουν αναπτυχθεί και δοκιμαστεί στη Βραζιλία και την Ευρώπη με αντικρουόμενα αποτελέσματα.

1.7.1 ΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΤΑ ΤΗΣ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ

Η αντιμετώπιση της λείσμανίασης βασίζεται, κυρίως, στη χημειοθεραπεία. Παρόλο που υπάρχουν διαφορετικές θεραπευτικές επιλογές, η θεραπεία έναντι της λείσμανίασης χαρακτηρίζεται ως προβληματική, κυρίως λόγω της πολυπλοκότητας του νοσήματος (Tiuman et al., 2011). Οι διαθέσιμες θεραπείες για τις διάφορες μορφές λείσμανίασης (Εικόνα 1.14) απέχουν πολύ από το ιδανικό, κυρίως λόγω της εκτεταμένης τοξικότητας, της έλλειψης αποτελεσματικότητας, της παρεντερικής οδού χορήγησης, του υψηλού κόστους, της ανάπτυξης αντοχής και της περιορισμένης πρόσβασης από ασθενείς που ζουν σε απομακρυσμένες περιοχές. Ορισμένες από τις δραστικές ουσίες, έχουν διαφορετική αποτελεσματικότητα ανάλογα με το είδος, τα συμπτώματα και τις γεωγραφικές περιοχές που συναντάται το παράσιτο (Tiuman et al., 2011). Σε πολλές περιπτώσεις, η απόφαση για θεραπεία βασίζεται στη σοβαρότητα της νόσου και το λόγο κινδύνου:οφέλους. Συνολικά, οι τρέχουσες θεραπευτικές επιλογές είναι περιορισμένες και θεωρούνται μη ικανοποιητικές ανεξάρτητα από την κλινική μορφή λείσμανίασης για την οποία προορίζονται.

Από τη δεκαετία του 1940 και για μεγάλο χρονικό διάστημα, οι ενώσεις του πεντασθενούς αντιμονίου (στιβογλυκονικό νάτριο και αντιμονιακή μεγλουμίνη) ήταν η φαρμακευτική αγωγή πρώτης επιλογής και παραμένουν η κύρια θεραπευτική επιλογή σε πολλές ενδημικές τροπικές χώρες (WHO, 2010). Ωστόσο, η ανάπτυξη αντοχής και η υψηλή τοξικότητα έχουν περιορίσει τη χρήση τους. Τις τελευταίες δεκαετίες αναπτύχθηκε μικρός αριθμός εναλλακτικών φαρμάκων (λιποσωμική αμφοτερικίνη Β, αμφοτερικίνη Β, μιλτεφοσίνη, παρομομυκίνη), που αντικαθιστούν σταδιακά τις ενώσεις αντιμονίου. Στις ανεπτυγμένες χώρες, η λιποσωμική αμφοτερικίνη Β χρησιμοποιείται ως κύριο φάρμακο για τη θεραπεία ασθενών με σπλαγχνική λείσμανίαση, ενώ η μιλτεφοσίνη είναι φάρμακο που χορηγείται από το στόμα για τη θεραπεία της σπλαγχνικής λείσμανίασης, χωρίς υψηλή τοξικότητα (WHO, 2010).

Ωστόσο, η αυξητική τάση στην ανάπτυξη αντοχής στα αντιλειτουργικά φάρμακα υποδηλώνει ότι, η τρέχουσα χρήση των μονοθεραπειών πρέπει να αναθεωρηθεί. Η συνδυαστική θεραπεία στοχεύει την πρόληψη του κινδύνου ανάπτυξης ανθεκτικότητας από το παράσιτο, την αύξηση της αποτελεσματικότητας λόγω συνεργιστικής δράσης, μειωμένη απαιτούμενη δόση και μειωμένη διάρκεια θεραπείας, οδηγώντας τελικά σε ελάττωση της τοξικότητας των φαρμάκων (Sundar et al., 2013).



Εικόνα 1.14 Αντιλείσμανιακά φάρμακα (Πηγή: Zulfiqar et al., 2017)

1.7.2 ΕΜΒΟΛΙΑ ΚΑΤΑ ΤΗΣ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ

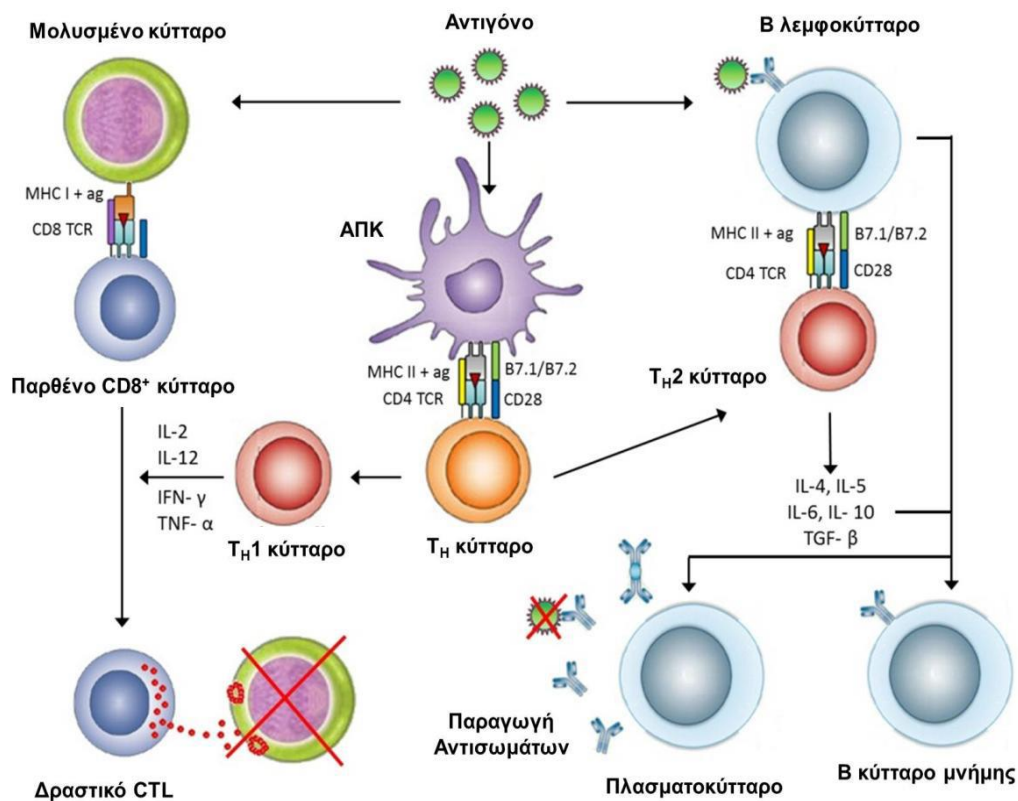
1.7.2.1 Η ανοσολογία των εμβολίων

Στόχος ενός εμβολίου είναι ο έλεγχος ή η εξάλειψη μίας νόσου. Αυτό επιτυγχάνεται με την επαγωγή ανοσίας, που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση Β και Τ κυττάρων και την εγκατάσταση ανοσολογικής μνήμης. Η επαγωγή των Β και Τ κυτταρικών αποκρίσεων προϋποθέτει την ενεργοποίησή τους από εξειδικευμένα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Οι παθογόνοι παράγοντες αναγνωρίζονται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, μέσω των υποδοχέων αναγνώρισης προτύπου (Pattern Recognition Receptors, PRRs). Οι υποδοχείς αυτοί δεσμεύονται σε εξελικτικά συντηρημένα μόρια των παθογόνων (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs) που είναι απαραίτητα για βασικές λειτουργίες τους. Οι PRRs περιλαμβάνουν την οικογένεια των κολλεκτινών, τους CLR (C-type lectin receptors), τους NLRs (NOD-like receptors) και τους TLRs (Toll-like receptors) (Medzhitov et al., 2007). Τα πλέον εξειδικευμένα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα είναι τα δενδριτικά κύτταρα, λόγω της ικανότητάς τους να επάγουν πρωτογενείς ανοσολογικές αποκρίσεις, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την εγκαθίδρυση ανοσολογικής μνήμης.

Τα ενεργοποιημένα δενδριτικά κύτταρα που παρουσιάζουν ξένα αντιγόνα στην επιφάνειά τους, μεταναστεύουν στις περιοχές των Τ κυττάρων στα

δευτερογενή λεμφικά όργανα, προκειμένου να προκαλέσουν την έναρξη των ειδικών Τ κυτταρικών αποκρίσεων. Η ενεργοποίηση των Τ κυττάρων απαιτεί τη συνεχή διέγερσή τους μέσω του Τ κυτταρικού υποδοχέα (T cell Receptor, TCR) με τη δημιουργία της ανοσολογικής σύναψης. Όλοι οι υποπληθυσμοί των Τ κυττάρων εκφράζουν τον TCR, ένα σύμπλεγμα πολυπεπτιδίων που περιλαμβάνει και το μόριο CD3, ενώ η πλειοψηφία τους διακρίνεται από την παρουσία ή του CD4 ή του CD8 επιφανειακού μορίου. Έτσι, τα Τ κύτταρα που εκφράζουν το μεμβρανικό γλυκοπρωτεϊνικό μόριο CD4, περιορίζονται στην αναγνώριση πεπτιδίων που συνδέονται με μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC) τάξης II και χαρακτηρίζονται ως βοηθητικά Τ κύτταρα (T_H), ενώ τα Τ κύτταρα που εκφράζουν το μόριο CD8, ένα διμερές μεμβρανικό γλυκοπρωτεϊνικό μόριο, περιορίζονται στην αναγνώριση πεπτιδίων που συνδέονται με μόρια MHC τάξης I και χαρακτηρίζονται ως κυτταροτοξικά Τ κύτταρα (CTL). Τα παρθένα Τ κύτταρα απαιτούν συνδιεγερτικά σήματα για να ενεργοποιηθούν και στη συνέχεια να διαφοροποιηθούν προς ανοσοδραστικά κύτταρα.

Η ενεργοποίηση των παρθένων CD4⁺ Τ κυττάρων μέσω του TCR προκαλεί τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους σε δραστικά T_H κύτταρα τύπου 1 (T_H1) ή τύπου 2 (T_H2). Τα T_H1 κύτταρα παράγουν IFN γ και προάγουν την κυτταρική ανοσία, η οποία κατέχει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο των μολύνσεων από ενδοκυτταρικά παθογόνα, όπως είναι τα παράσιτα του γένους *Leishmania* (Agnello et al., 2003). Αντίθετα, τα T_H2 κύτταρα παράγουν IL-4, IL-5 και IL-13 και προάγουν τη χυμική ανοσία, τις αλλεργικές αντιδράσεις έναντι αλλεργιογόνων του περιβάλλοντος και την ανθεκτικότητα στις μολύνσεις από εξωκυτταρικά παράσιτα, όπως οι έλμινθες (Agnello et al., 2003).



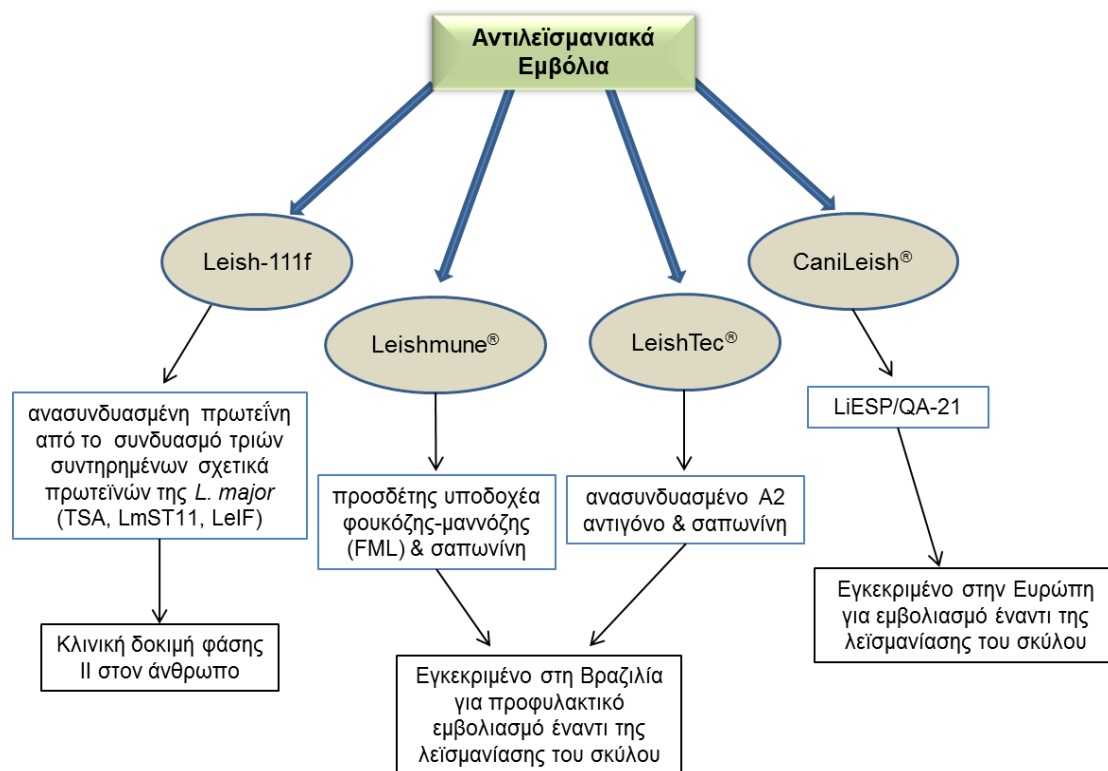
Εικόνα 1.15 Σύνοψη των ανοσολογικών αποκρίσεων που λαμβάνουν χώρα κατά τη μόλυνση από ενδοκυτταρικό παθογόνο (Πηγή: τροποποιημένη από DeHaes et al., 2012).

Η διαφοροποίηση των παρθένων $CD8^+$ T κυττάρων σε δραστικά CTL εξαρτάται από την ύπαρξη τριών διαδοχικών μηνυμάτων. Αρχικά, ο υποδοχέας τους θα πρέπει να αναγνωρίσει ένα σύμπλεγμα μορίου MHC τάξης I - πεπτιδίου. Στη συνέχεια, απαιτείται ένα συνδιεγερτικό σήμα, το οποίο παράγεται από την αλληλεπίδραση των μορίων CD28 και B7 που βρίσκονται στην επιφάνεια του $CD8^+$ T κυττάρου και του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου, αντίστοιχα. Το τρίτο μήνυμα επάγεται από την αλληλεπίδραση της IL-2, που παράγεται κυρίως από τα T_H1 κύτταρα αλλά και σε μικρότερο βαθμό από τα $CD8^+$ T κύτταρα, με τον αντίστοιχο υποδοχέα υψηλής συγγένειας που εκφράζεται στην επιφάνεια του $CD8^+$ T κυττάρου μετά την αναγνώριση του συμπλέγματος μορίου MHC τάξης I - πεπτιδίου από τον TCR. Τα παραπάνω έχουν ως επακόλουθο τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση του παρθένου $CD8^+$ T κυττάρου, που ενεργοποιήθηκε από το συγκεκριμένο αντιγόνο, σε δραστικό CTL. Τα CTL καταστρέφουν κύτταρα-στόχους μέσω δύο βασικών οδών. Η μία οδός περιλαμβάνει την παραγωγή περφορίνης και θρυμματινών (πρωτεασών σερίνης) από τα CTL. Η περφορίνη δημιουργεί πόρους στη μεμβράνη του κυττάρου - στόχου και ρυθμίζει την είσοδο των θρυμματινών στο κυτταρόπλασμα του, οι οποίες πυροδοτούν μία ακολουθία αντιδράσεων με τελικό αποτέλεσμα τον αποπτωτικό θάνατο του κυττάρου - στόχου. Η δεύτερη οδός περιλαμβάνει τις αλληλεπιδράσεις των μορίων Fas και FasL. Το μόριο Fas αποτελεί

μέλος της υπεροικογένειας των υποδοχέων κυτταρικού θανάτου και διαθέτει την ικανότητα επαγωγής μηνυμάτων κυτταρικού θανάτου, μετά από σύνδεση με το φυσικό προσδέτη του FasL. Ο FasL βρίσκεται στην επιφάνεια των CTL και η αλληλεπίδραση του με το μόριο Fas, που βρίσκεται στην επιφάνεια των κυττάρων-στόχων, επάγει τον αποπτωτικό τους θάνατο.

1.7.2.2 Ανάπτυξη εμβολίων και λεισμανίαση

Παρά την πρόοδο που έχει σημειωθεί στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων, η χημειοθεραπεία από μόνη της δε μπορεί να οδηγήσει στην εξάλειψη της λεισμανίασης. Επομένως, επιτακτική είναι η ανάγκη ανάπτυξης ενός αποτελεσματικού εμβολίου για τον έλεγχο και τη ριζική αντιμετώπιση του νοσήματος. Έχει παρατηρηθεί ότι άτομα θεραπευμένα από μολύνσεις με παράσιτα του γένους *Leishmania* αναπτύσσουν μακροχρόνια ανοσία. Κατά συνέπεια, η πρόληψη της λεισμανίασης μέσω προφυλακτικού εμβολιασμού μοιάζει να είναι ένας εφικτός στόχος.



Εικόνα 1.16 Παραδείγματα αντιλεισμανιακών εμβολίων (Πηγή: τροποποιημένη από Jain & Jain, 2015).

Η πρόοδος που έχει σημειωθεί στην κατανόηση της παθογένειας και της ανάπτυξης ανοσίας από τον ξενιστή έναντι της μόλυνσης από παράσιτα του γένους *Leishmania*, σε συνδυασμό με την ολοκλήρωση της αλληλούχισης του γονιδιώματος του παρασίτου, έδωσε νέα προοπτική στην έρευνα για την ανάπτυξη ενός εμβολίου έναντι της λεισμανίασης. Ωστόσο, υπάρχουν θέματα μείζονος σημασίας που

απαιτούν λύση όπως η μεταφορά μιας ιδέας από τα ζωικά μοντέλα στην κλινική πράξη και ενός προϊόντος από το εργαστήριο στο πεδίο εφαρμογής. Παρόλο που διαφορετικά είδη *Leishmania* προκαλούν ένα εύρος κλινικών εκδηλώσεων, γονιδιωματικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι υπάρχει υψηλός βαθμός ομολογίας αλληλουχιών μεταξύ των ειδών, υποδεικνύοντας ότι είναι δυνατό να παραχθούν ευρέως αποτελεσματικά εμβόλια ενάντια στις διαφορετικές κλινικές μορφές του νοσήματος (Kumar & Engwerda, 2014).

Στο παρελθόν, αποτελεσματικό εμβόλιο έναντι της λεισμανίασης αποτέλεσε η χορήγηση ζωντανών, μολυσματικών παρασίτων, μία διαδικασία γνωστή ως «λεισμανιοποίηση» (leishmanization). Ωστόσο, αυτή η πρακτική εγκαταλείφθηκε από τις χώρες που την εφάρμοσαν λόγω των θεμάτων ασφάλειας που προέκυψαν, καθώς ορισμένα άτομα ανέπτυξαν μη θεραπεύσιμα φύματα και ανοσοκαταστολή (Nadim et al., 1983). Σήμερα, τρία εμβόλια - ένα στην Ευρώπη (Canileish®) και δύο στη Βραζιλία (Leishmune® και LeishTec®) – έχουν άδεια χορήγησης στο σκύλο, ενώ ακόμα δεν υπάρχει εμπορικά διαθέσιμο εμβόλιο για τον άνθρωπο (Εικόνα 1.16).

Αντιλεισμανιακά εμβόλια πρώτης γενιάς

Η χορήγηση νεκρών και εξασθενημένων παρασίτων του γένους *Leishmania* αποτέλεσαν τα αντιλεισμανιακά εμβόλια πρώτης γενιάς (Πίνακας 1.2). Το Leishvaccine (αντιγονικό παρασκεύασμα παρασίτων *L. amazonensis* με BCG ως ανοσοενισχυτικό) αποτελεί ένα παράδειγμα εμβολίου πρώτης γενιάς που διερευνήθηκε για προφυλακτική θεραπεία έναντι της λεισμανίασης του σκύλου. Αποδείχθηκε ικανό να πυροδοτεί, αρχικά, την ενεργοποίηση της έμφυτης ανοσίας διαμεσολαβούμενης από ουδετερόφιλα και ηωσινόφιλα, και ακολούθως την ενεργοποίηση μονοκυττάρων, CD4⁺ T, CD8⁺ T και B κυττάρων με επαγωγή ενός μεικτού προφίλ κυτταροκινών συμπεριλαμβανομένων της IFN γ και της IL-4 (Araujo et al., 2008; Araújo et al., 2011).

Ο Jamshidi και οι συνεργάτες του (2011) διερεύνησαν την επίδραση της ανοσοθεραπείας, με χορήγηση θερμικά αδρανοποιημένων στελεχών *L. major* και *Mycobacterium vaccae* σε συνδυασμό με χρήση αντιμονιακής μεγλουμίνης σε σκύλους Mongrel με λεισμανίαση, που είχαν μολυνθεί πειραματικά. Ομάδες που υποβλήθηκαν σε ανοσοθεραπεία με *L. major* και *M. vaccae*, καθώς και σε συνδυασμό ανοσοθεραπείας με χημειοθεραπεία, κατάφεραν να αναστείλουν την ανάπτυξη του παρασίτου, ενώ υποτροπή του νοσήματος παρατηρήθηκε μόνο σε ένα μέλος από κάθε ομάδα (Jamshidi et al, 2011). Από την παραπάνω μελέτη, οι επιστήμονες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι, η ανοσοθεραπεία θα μπορούσε να συμβάλλει στη θεραπεία της σπλαγχνικής λεισμανίασης, με την ενίσχυση του ανοσοποιητικού. Επίσης, ο Datta και οι συνεργάτες του (2012) διερεύνησαν την αποτελεσματικότητα της χορήγησης εξασθενημένων, με γ -ακτινοβολία, παρασίτων *L. donovani* στο πειραματικό μοντέλο σπλαγχνικής λεισμανίασης ποντικών της φυλής Balb/c. Η χορήγηση δύο δόσεων σε χρονικό διάστημα δύο εβδομάδων

οδήγησε στην ανάπτυξη προστασίας έναντι της μόλυνσης με *L. donovani*, όπως επιβεβαιώθηκε από την αυξημένη T_H1 και τη μειωμένη T_H2 κυτταρική απόκριση (Datta et al., 2012). Αργότερα, διαπιστώθηκε ότι οι Balb/c ποντικοί που ανοσοποιήθηκαν ενδομυϊκά με τα εξασθενημένα ακτινοβολημένα παράσιτα *L. donovani*, εκκαθάρισαν τα παράσιτα μέσω ενεργοποίησης των PDK1, PI3K και p38MAPK σηματοδοτικών μονοπατιών που οδηγούν σε αυξημένη απελευθέρωση μονοξειδίου του αζώτου (Datta et al., 2015).

Πίνακας 1.2 Παραδείγματα αντιλειτουργικών εμβολίων πρώτης γενιάς

| Ζωντανά εξασθενημένα παράσιτα <i>Leishmania</i> | | |
|--|--|------------------------|
| Αντιγόνο | Περιγραφή αντιγόνου | Ανοσοενισχυτικό |
| <i>L. donovani</i> | Εξασθενημένα παράσιτα με γ ακτινοβολία | Γενταμικίνη |
| <i>L. infantum</i> | Αμαστιγωτές μορφές με έλλειψη SIR2 | |
| <i>L. donovani</i> | Προμαστιγωτές μορφές σε καλλιέργεια, μετά από πολλές ανακαλλιέργειες | |
| <i>L. donovani</i> | BT1 knock out προμαστιγωτές μορφές | |
| <i>L. tarentolae</i> | Εξασθενημένες, μη παθογόνες προμαστιγωτές μορφές | |
| <i>L. amazonensis</i> | Μεταλλάγματα με δυνατότητα αυτοκαταστροφής | |
| Νεκρά παράσιτα <i>Leishmania</i> | | |
| Αντιγόνο | Περιγραφή αντιγόνου | Ανοσοενισχυτικό |
| <i>L. major</i> | Θανάτωση με κλιβανισμό στο αυτόκαυστο & κατακρήμνιση με αργίλιο | BCG |
| <i>L. donovani</i> | Θανάτωση με κλιβανισμό στο αυτόκαυστο ή θέρμανση | - |
| <i>L. major</i> | Θανάτωση με κλιβανισμό στο αυτόκαυστο | BCG |

Πηγή: Jain & Jain, 2015

Αν και τα εμβόλια πρώτης γενιάς παρείχαν κάποιο επίπεδο προστασίας έναντι της λεισμανίασης, μειονεκτούσαν λόγω μεταβλητής ανοσοαπόκρισης καθώς και τοξικότητας. Προκειμένου να ξεπεραστούν οι παραπάνω περιορισμοί, οι επιστήμονες εστίασαν το ερευνητικό τους ενδιαφέρον σε πρωτεΐνες των παρασίτων του γένους *Leishmania*, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως υποψήφια αντιγόνα.

Αντιλειτουργικά εμβόλια δεύτερης γενιάς

Τα εμβόλια δεύτερης γενιάς περιλαμβάνουν απομονωμένες ή ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες παρασίτων *Leishmania* (Πίνακας 1.3). Το Leishmune® είναι ένα εμβόλιο δεύτερης γενιάς, κτηνιατρικού ενδιαφέροντος, το οποίο έχει λάβει άδεια στη Βραζιλία για την προστασία των σκύλων και για την παρεμπόδιση μετάδοσης της ασθένειας από το σκύλο στον άνθρωπο μέσω δήγματος σκνίπας. Το εμβόλιο Leishmune® αποτελείται από ένα κλάσμα, απομονωμένο από

προμαστιγωτές μορφές *L. donovani*, και σαπωνίνη ως ανοσοενισχυτικό. Το κλάσμα, ένα μόριο προσδέτης μαννόζης-φουκόζης (FML), είναι ένα γλυκοπρωτεϊνικό σύμπλοκο που βρέθηκε πως αναστέλλει την *in vitro* μόλυνση μακροφάγων ποντικού από προμαστιγωτές και αμαστιγωτές μορφές *L. donovani* (Palatnik et al., 1993). Το γλυκοπρωτεϊνικό σύμπλοκο βρίσκεται στην επιφάνεια του παρασίτου καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου ζωής και αποτελεί ισχυρό ανοσογόνο παράγοντα, όπως έχει αποδειχθεί με πειράματα σε κουνέλια και ποντικούς (Santos et al., 2002). Ο εμβολιασμός σκύλων οδήγησε σε ανοσολογικές αποκρίσεις, συμπεριλαμβανομένων φαινοτυπικών μεταβολών σε ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα, καθώς και διέγερσης CD8⁺ T κυττάρων με επαγωγή ειδικής προφλεγμονώδους απόκρισης που προκαλείται από IFN γ και μονοξείδιο του αζώτου (Araújo et al., 2011; Nico et al., 2012).

Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη p45 παρασίτων *L. donovani* (rLDp45), η οποία ανήκει στην οικογένεια των αμινοπεπτιδασών μεθειονίνης, βρέθηκε ικανή να προκαλεί προστατευτική T_H1 κυτταρική απόκριση. Το εύρημα επιβεβαιώθηκε από το αυξημένο επίπεδο έκφρασης mRNA για IFN γ , IL-12 και TNF α με ταυτόχρονη μείωση στην IL-4 και τον TGF β , σε κρικητούς με επαγόμενη σπλαγχνική λεισμανίαση (Gurta et al., 2012).

Το ειδικό αντιγόνο A2 της αμαστιγωτής μορφής παρασίτων *Leishmania* σε ανασυνδυασμένη μορφή (με σαπωνίνη, στυπτηρία και IL-12 εκφραζόμενη από εξασθενημένο αδενοϊό) βρέθηκε ότι είναι αποτελεσματικό ως εμβόλιο σε ζώα για προστασία έναντι της λεισμανίασης. Αυτό το αντιγόνο έχει περιορισμένους επιτόπους για CD4⁺ T και CD8⁺ T κύτταρα (Fernandes et al., 2012).

Επίσης, έχει διερευνηθεί η αποτελεσματικότητα εμβολιασμού με δενδριτικά κύτταρα, τα οποία είχαν πρωτίστως επωαστεί με την ιστόνη H1 παρασίτων *L. infantum*, στο πειραματικό μοντέλο σπλαγχνικής λεισμανίασης ποντικού. Αποδείχτηκαν ικανά να προκαλούν T_H1 ανοσοαπόκριση, κάτι που αποτελεί πρωταρχικό στόχο στην ανάπτυξη ενός εμβολίου έναντι της σπλαγχνικής λεισμανίασης (Chakravarty et al., 2011; Agallou et al., 2012; Singh et al., 2012).

Διάφορες εκκρινόμενες πρωτεΐνες των παρασίτων *Leishmania*, έχουν ταυτοποιηθεί και διερευνηθεί για ανοσογονικό δυναμικό. Αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στη λοιμογόνο δράση του παρασίτου, λόγω της ενεργού συμμετοχής τους στη μόλυνση και της καταστολής του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. Δεδομένου ότι είναι σημαντικές στην παθογένεση της λεισμανίασης, αναμένεται ότι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την επαγωγή ανοσίας (DebRoy et al., 2010; Gour et al., 2012). Ο Gour και οι συνεργάτες του, διερεύνησαν μια σειρά 17 εκκρινόμενων πρωτεϊνών από *in vitro* καλλιέργεια προμαστιγωτών μορφών *L. donovani* ως υποψήφια αντιγόνα. Οι πρωτεΐνες χωρίστηκαν σε πέντε ομάδες διαφορετικών μοριακών βαρών [F1 (11, 13, 16 kDa), F2 (18, 21, 23 kDa), F3 (26, 29, 33 kDa), F4 (35, 42, 51 kDa) και F5 (54, 58, 64, 70, 80 kDa)]. Η αντιγονικότητα των

εκκρινόμενων αντιγόνων προσδιορίστηκε με βάση την παραγωγή κυτταροκινών, την αντίδραση των μακροφάγων και τον λεμφοκυτταρικό πολλαπλασιασμό. Στα κλάσματα F1 και F2 εμφανίστηκε το υψηλότερο ανοσογονικό δυναμικό, κάτι που υποδηλώνει ότι οι λεισμανιακές εκκρινόμενες αντιγονικές πρωτεΐνες αποτελούν πιθανά υποψήφια μόρια στην ανάπτυξη αντιλεισμανιακών εμβολίων (Gour et al., 2012).

Επιπρόσθετα σε άλλη μελέτη, η ανοσοποίηση ποντικών BALB/c με την εκκρινόμενη πρωτεάση σερίνης από *L. donovani* (pSP) μαζί με IL-12 ως ανοσοενισχυτικό, χαρακτηρίστηκε ως προστευτική έναντι της σπλαγχνικής λεισμανίασης (Choudhury et al., 2013).

Τα εμβόλια δεύτερης γενιάς έδειξαν βελτιωμένη ανταπόκριση σε σχέση με τα εμβόλια πρώτης γενιάς. Για να αυξηθεί περαιτέρω η εξειδίκευση και η ισχύς του εμβολιασμού, αναπτύσσονται εμβόλια τρίτης γενιάς, συμπεριλαμβανομένου του DNA που κωδικοποιεί πρωτεΐνες *Leishmania*.

Πίνακας 1.3 Παραδείγματα αντιλεισμανιακών εμβολίων δεύτερης γενιάς

| Αντιγόνο | Περιγραφή | Ανοσοενισχυτικό |
|-------------|--|--|
| PO | Όξινη ριβοσωμική πρωτεΐνη παρασίτων <i>L. infantum</i> | |
| CPI & CPII | Πρωτεάση κυστεΐνης A & B παρασίτων <i>L. infantum</i> | SLN |
| GP63 | Επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη GP63 (λεισμανολυσίνη) | <i>S. typhimurium</i> ή κατιονικά λιποσώματα ή BCG ή MPL-TDM |
| FML | Μόριο πρόσδεσης υποδοχέα φουκόζης-μαννόζης | Σαπωνίνες, IL-12, BCG |
| GP36 | Αντιγόνο του συμπλέγματος FML | Σαπωνίνες |
| LiESAp | Εκκρινόμενα αντιγόνα καθαρισμένα από υπερκείμενα καλλιιεργειών προμαστιγωτών μορφών <i>L. infantum</i> | MDP |
| rLdcccys1 | Ανασυνδυασμένη πρωτεάση κυστεΐνης | BCG/ <i>P. acnes</i> |
| SLA | Διαλυτό αντιγόνο | MPL-TDM |
| rLdp45 | Ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη p45 παρασίτων <i>L. donovani</i> (ανήκει στην οικογένεια αμινοπεπτιδασών μεθειονίνης) | |
| rLeIF-2 | Ανασυνδυασμένος παράγοντας επιμήκυνσης 2 παρασίτων <i>L. donovani</i> | |
| rLdPDI | Ανασυνδυασμένη δισουλφιδική ισομεράση, PDI (τσαπερόνη που σχετίζεται με τη μολυσματικότητα και επιβίωση του παρασίτου) | |
| rA2 | Ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη αμαστιγωτών μορφών <i>L. donovani</i> | <i>P. acnes</i> |
| KMP-11 | Κινητοπλαστική μεμβρανική πρωτεΐνη-11 | CpG-ODN |
| rLeish-111f | Πολυπρωτεΐνη από το συνδυασμό τριών αντιγόνων: TSA (<i>L. major</i>), LmSTI1 (<i>L. major</i>) και LeIF (<i>L. braziliensis</i>) | MPL-SE και/ |
| Ldp27 | Πρωτεΐνη p27 αμαστιγωτών μορφών <i>L. donovani</i> , | |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| | συστατικό ενός ενεργού συμπλέγματος της οξειδάσης του κυτοχρώματος C | |
| pSP | Εκκρινόμενη πρωτεάση σερίνης παρασίτων <i>L. donovani</i> | IL-12 |
| rSMT | Ανασυνδυασμένη μεθυλοτρανσφεράση, ένζυμο που εμπλέκεται στην σύνθεση της εργοστερόλης, η οποία αποτελεί της αμφοτερικίνης B | MPL-SE |
| Histone H1 | Δενδριτικά κύτταρα μυελού των οστών ευαισθητοποιημένα με την ιστόνη H1 παρασίτων <i>L. infantum</i> | CpG ODNs |
| HSP70, HSP83 | Πρωτεΐνες θερμικού σοκ | MPLA, ALD |
| LBSap | Αντιγόνα παρασίτων <i>L. braziliensis</i> | Σαπωνίνες |
| GP63, HSP70 | Μείγμα εμβολίων (GP63+HSP70+MPLA και GP63+HSP70+ALD) | MPLA, ALD |
| rLiHyr1 | Υποθετική πρωτεΐνη αμαστιγωτών μορφών <i>Leishmania</i> | Σαπωνίνες |

Πηγή: Jain & Jain, 2015

Αντιλειτουργικά εμβόλια τρίτης γενιάς

Εμβόλιο βασισμένο στη κινητοπλαστιδιακή μεμβρανική πρωτεΐνη 11 (kinetoplastid membrane protein 11, KMP-11) του παρασίτου *L. donovani* οδήγησε στην ανάπτυξη ανοσίας έναντι της μόλυνσης από παράσιτα του γένους *Leishmania* σε κρικητούς. Στην προσπάθεια διερεύνησης των κατάλληλων επιτόπων για CD8⁺ T κύτταρα, με σάρωση της πλήρους αλληλουχίας της πρωτεΐνης KMP-11 με επικαλυπτόμενα νανοπεπτίδια, παρατηρήθηκε ότι 30 πεπτίδια αυτής της πρωτεΐνης ήταν σε θέση να ενεργοποιήσουν CD8⁺ T κύτταρα με παραγωγή IFN γ . Αυτή η μελέτη επιβεβαίωσε περαιτέρω ότι η KMP-11 θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως υποσχόμενο υποψήφιο μόριο για την ανάπτυξη ενός εμβολίου κατά της λεισμανίασης (Basu et al., 2005; 2007). Επίσης, εμβολιασμός BALB/c ποντικών με δενδριτικά κύτταρα ευαισθητοποιημένα με τμήμα της KMP-11 ήταν ικανός να επάγει προστατευτικές αποκρίσεις σε πειραματική μόλυνση με *L. infantum* (Agallou et al., 2011).

Πλασμιδιακή πρωτεΐνη σιέλου του παρασίτου *L. longipalpis* (LJM19) έχει βρεθεί μερικώς αποτελεσματική στην προστασία των κρικητών από τη σπλαγγνική λεισμανίαση, ακόμη και μετά από διάστημα δύο έως πέντε μηνών από τη μείωση του παρασιτικού φορτίου και την εμφάνιση φυσιολογικού αιματολογικού προφίλ (Gomes et al., 2008). Ακολούθως παρατηρήθηκε ότι, όταν και τα δυο πλασμίδια DNA που κωδικοποιούν τις KMP-11 και LJM19 χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό, η προστασία ήταν σχεδόν ισοδύναμη με την προστασία που παρείχαν και τα δύο πλασμίδια ξεχωριστά (da Silva et al., 2011).

Η όξινη ριβοσωμική πρωτεΐνη Po και οι νουκλεοσωμικές ιστόνες του *L. infantum* διερευνήθηκαν για τον έλεγχο της σπλαγγνικής λεισμανίασης σε κρικητούς. Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε, είτε μόνο με πλασμιδιακό DNA (ομόλογο) ή πλασμιδιακό DNA με ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη και ανοσοενισχυτικό

(ετερόλογη ανοσοποίηση), κάτι που επέδειξε παραγωγή υψηλού επιπέδου αντισωμάτων και κυρίαρχη κυτταρική ανοσοαπόκριση, αντίστοιχα. Τόσο το αντιγόνο LiPO (όξινη ριβοσωμική πρωτεΐνη) όσο και άλλες νουκλεοσωμικές ιστόνες (HIS) βρέθηκαν ανοσογόνες, ενώ μόνη της η LiPO αποδείχθηκε ικανή να προσδώσει σημαντικό βαθμό προστασίας έναντι του *L. infantum* (Pereira et al., 2015).

Επίσης, έγινε προσπάθεια ανάπτυξης εμβολίου DNA για τη σπλαγχνική λεισμανίαση με μοριακή κλωνοποίηση της όξινης ριβοσωματικής πρωτεΐνης P1 του *L. donovani* (LdP1) (Masih et al., 2011). Η προφυλακτική αποτελεσματικότητα του εμβολίου της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης rLdP1 (με ανοσοενισχυτικό Freund), αξιολογήθηκε σε κρικητούς έναντι πειραματικά επαγόμενης σπλαγχνικής λεισμανίασης. Από τα αποτελέσματα, οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι το εμβόλιο DNA σε διπλή δόση, προσφέρει προστασία με μείωση του ποσοστού θνησιμότητας, όπως προσδιορίζεται από την αυξημένη ανοσοαπόκριση T_H1 με μειωμένο φορτίο παρασίτων (έως 75,68%) στο σπλήνα, προτείνοντας έτσι το ριβοσωματικό γονίδιο P1 της *L. donovani*, ως υποψήφιο για εμβόλιο DNA.

Τέλος, οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ αποτελούν από τις πιο διερευνηθείσες επιφανειακές πρωτεΐνες για ανοσοποίηση κατά της λεισμανίασης, ενώ είναι γνωστές και ως φυσικά ανοσοενισχυτικά. Η λιποφωσφογλυκάνη 3 (LPG3) αποτελεί μέλος των πρωτεϊνών HSP90, ομόλογη της GRP94 του ενδοπλασματικού δικτύου των θηλαστικών. Κρίνεται πολύ αποτελεσματική στην διέγερση της ανοσοαπόκρισης έναντι του παρασίτου *Leishmania* σε πειραματικό μοντέλο ποντικών BALB/c, έναντι της λεισμανίασης (Abdian et al., 2011).

Πίνακας 1.4 Παραδείγματα αντιλεισμανιακών εμβολίων τρίτης γενιάς

| Αντιγόνο | Περιγραφή του αντιγόνου | Φορέας έκφρασης |
|--|--|---|
| Εμβόλια με πλασμιδιακό DNA που κωδικοποιεί αντιγόνα | | |
| ORFF | Τμήμα ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης | pcDNA3.1 |
| A2 | Αντιγόνο παρασίτων <i>L. donovani</i> | <i>Lactococcus lactis</i> |
| LACK | Ομόλογο του υποδοχέα της ενεργοποιημένης κινάσης C παρασίτων του γένους <i>Leishmania</i> | pCL-neo |
| KMP-11 | Κινητοπλαστική μεμβρανική πρωτεΐνη | pCMV-LIC |
| NH36 | Νουκλεοτιδική υδρολάση (NH36) παρασίτων <i>L. donovani</i> , που συμμετέχει στην σύνθεση του DNA του παρασίτου | VR1012 |
| Ετερόλογα prime-boost εμβόλια | | |
| LACK | Ομόλογο του υποδοχέα της ενεργοποιημένης κινάσης C παρασίτων του γένους <i>Leishmania</i> | Ανασυνδυασμένος ιός ευλογιάς (rVV)/τροποποιημένος ιός ευλογιάς Ankara (MVA) |
| CPI+CP11 | Πρωτεάση κυστεΐνης τύπου I και II παρασίτων <i>L.</i> | PCB6 |

| | | |
|-------------|---|--|
| | <i>infantum</i> | |
| CPIII | Πρωτεάση κυστεΐνης τύπου III παρασίτων <i>L. infantum</i> | pcDNA |
| KMP-11 | Κινητοπλαστική μεμβρανική πρωτεΐνη-11 | rVV |
| A2+CPI+CPII | A2 αντιγόνο και πρωτεάσες κυστεΐνης τύπου I και II παρασίτων <i>L. donovani</i> | pcDNA |
| rLdP1 | Ανασυνδυασμένο ριβοσωμικό γονίδιο P1 παρασίτων <i>L. donovani</i> | pVAX |
| TRYP | Tryparedoxin peroxidase | Τροποποιημένος ιός ευλογιάς Ankara (MVA) |
| Ldcccys1 | Πρωτεάση κυστεΐνης 30 kDa παρασίτων <i>L. chagasi</i> | pcDNA3 |

Πηγή: Jain & Jain, 2015

1.8 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ

Η αντιμετώπιση της λεισμανίασης είναι πιθανό να βασιστεί σε ένα επιτυχημένο πρόγραμμα εμβολιασμού. Ο σχετικά απλός κύκλος ζωής του παρασίτου και το γεγονός ότι σε περίπτωση αντιμετώπισης της μόλυνσης, ο ξενιστής καθίσταται ανθεκτικός σε μεταγενέστερες λοιμώξεις, δείχνουν το πόσο χρήσιμο μπορεί να είναι ένα εμβόλιο (Evans & Kedzieski, 2012). Πολλές ανοσολογικές πτυχές της ασθένειας, έχουν μελετηθεί σε πειραματικά ζωικά μοντέλα, όπως σε ποντικούς, κρικητούς, σκύλους και πρωτεύοντα. Αν και τα περισσότερα πειραματικά μοντέλα έχουν ως κύριο πλεονέκτημα ότι επιτρέπουν το γενετικό έλεγχο τόσο του παρασίτου όσο και του ξενιστή, κανένα από αυτά δεν αναπαράγει το αποτέλεσμα ανθρώπινης μόλυνσης από *Leishmania spp.*

Μεταξύ των κυριότερων παραγόντων που συμβάλλουν στις διαφορές μεταξύ ανθρώπων και ζωικών μοντέλων είναι το μέγεθος και η φύση του εμβολίου, η οδός μόλυνσης, το είδος του ξενιστή και το στέλεχος του παρασίτου. Χορήγηση μικρού αριθμού μετακυκλικών προμαστιγωτών μορφών από *in vitro* καλλιέργεια σε πειραματικά ζωικά μοντέλα γίνεται για μίμηση των κλινικών και ανοσολογικών χαρακτηριστικών που απαντώνται στην ανθρώπινη νόσο. Αυτές οι προσεγγίσεις θα μπορούσαν να συμβάλουν στην ανάπτυξη βελτιωμένων πειραματικών μοντέλων για τη μελέτη της λεισμανίασης και τον εντοπισμό πιθανών στόχων για την αξιολόγηση υποψηφίων εμβολίων (Handmann, 2001).

1.8.1 ΜΟΝΤΕΛΟ ΧΑΜΣΤΕΡ

Ο Συριακός κρικητός (*Mesocricetus auratus*) είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στη μόλυνση με σπλαγχνικά είδη *Leishmania* (*L. donovani*, *L. infantum*) και θεωρείται το καλύτερο πειραματικό μοντέλο για τη μελέτη της σπλαγχνικής λεισμανίασης, επειδή αναπαράγει τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά της ανθρώπινης νόσου.

Εντούτοις, η ευρεία χρήση των κρικητών είναι περιορισμένη λόγω της έλλειψης αντιδραστηρίων (π.χ. αντισωμάτων, κυτταρικών δεικτών και κυτταροκινών) για να μελετηθεί ο ρόλος της ανοσοαπόκρισης στην παθολογία των ασθενειών (Melby et al., 2001 ; Gupta et al., 2011).

Κατά την εξέλιξη του νοσήματος στο πειραματικό μοντέλο σπλαγχνικής λεϊσμανίασης σε κρικητούς, παρατηρείται ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός του παρασίτου στο ήπαρ, το σπλήνα και το μυελό των οστών, παρά την ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης και το μικροπεριβάλλον κυτταροκινών τύπου T_H1 . Η αποτυχία στον έλεγχο θα μπορούσε να εξηγηθεί μερικώς λόγω της καταστολής του λεμφοκυτταρικού πολλαπλασιασμού (Goto et al., 2009). Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στην αδυναμία των μολυσμένων αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων να διεγείρουν ειδικά T κύτταρα, την παραγωγή TGFβ που ενεργοποιεί τον αποπτωτικό θάνατο των λεμφοκυττάρων και την καταστολή της δραστηριότητας της πρωτεϊνικής κινάσης C (Fazzani et al., 2011). Επιπλέον, η θανατηφόρος έκβαση της ασθένειας στο μοντέλο του κρικητού σχετίζεται με την απώλεια λειτουργιών των μακροφάγων (Melby et al., 2001).

Το μοντέλο μπορεί να είναι χρήσιμο για την κατανόηση των ανοσολογικών μηχανισμών που εμπλέκονται στην παθογένεση της σπλαγχνικής λεϊσμανίασης. Εντούτοις, είναι απαραίτητο να συνεχιστούν οι προσπάθειες παραγωγής ειδικών αντιδραστηρίων (πχ. μονοκλωνικών αντισωμάτων ειδικών για κυτταροκίνες και μόρια κυτταρικής επιφάνειας) και να αναπτυχθούν πιο ευαίσθητες τεχνικές που να επιτρέπουν τη μελέτη της ανοσοπαθολογίας της νόσου.

1.8.2 ΜΟΝΤΕΛΟ ΣΚΥΛΟΥ

Οι άγριοι και οι οικόσιτοι σκύλοι αποτελούν τις δεξαμενές της ζωνοτικής σπλαγχνικής λεϊσμανίασης, που προκαλείται από *L. infantum* στη Μεσόγειο, τη Μέση Ανατολή, τις ασιατικές χώρες και τη Λατινική Αμερική. Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει σε αυξημένο ενδιαφέρον για τη μελέτη της ανοσολογικής απόκρισης και την εύρεση αντιγόνων που εμπλέκονται στην προστατευτική κυτταρική ανοσία έναντι της λεϊσμανίασης σκύλου. Πρόσφατες έρευνες έχουν προσφέρει νέες γνώσεις σχετικά με την επιδημιολογία, την παθολογία και την ανοσολογία της λεϊσμανίασης του σκύλου, καθώς και τη γενετική της βάση. Αυτά τα νέα ευρήματα έχουν οδηγήσει σε καλύτερη κατανόηση του νοσήματος και έχουν βοηθήσει στην ανάπτυξη νέων διαγνωστικών μεθόδων και μέτρων ελέγχου της μόλυνσης, όπως κολάρα εμποτισμένα με εντομοκτόνα, νέα φάρμακα και εμβόλια δεύτερης γενιάς (Alvar et al., 2004; Baneth et al., 2008).

Ο κύριος μηχανισμός που εμπλέκεται στην προστατευτική ανοσολογική απόκριση σκύλων μολυσμένων με *L. infantum*, είναι η ενεργοποίηση μακροφάγων από IFNγ και TNFα για την καταστροφή των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών

μέσω της οδού του μονοξειδίου του αζώτου της L-αργινίνης (Vouldoukis et al., 1996). Λίγες μελέτες έχουν καταδείξει την εμπλοκή των CD8⁺ T κυττάρων σε αντοχή έναντι της λεισμανιάσης του σκύλου. Αυτά τα λεμφοκύτταρα ανιχνεύθηκαν σε ασυμπτωματικούς σκύλους ύστερα από πειραματική μόλυνση με *L. infantum*, αλλά όχι σε συμπτωματικά ζώα (Pinelli et al., 1999).

Η χρήση σκύλων ως πειραματικών μοντέλων οδήγησε στην αποσαφήνιση του ρόλου των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και των κύριων προϊόντων τους, για την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην ανοσολογική απόκριση κατά τη μόλυνση από *Leishmania*, γεγονός που μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη εμβολίων ή ανοσοθεραπείας.

1.8.3 ΜΟΝΤΕΛΟ ΠΡΩΤΕΥΟΝΤΩΝ

Τα πρωτεύοντα αποτελούν πολύτιμα μοντέλα βιοϊατρικής έρευνας, λόγω των ομοιοτήτων τους με τον άνθρωπο στην ανατομία, την ανοσολογία και τη φυσιολογία. Ωστόσο, είναι ακριβά εργαστηριακά ζώα που είναι δύσκολο να αποκτηθούν και να χειραγωγηθούν. Η διαθεσιμότητα ενός μοντέλου λεισμανιάσης από μη ανθρώπινο πρωτεύον θα διευκόλυνε τη μελέτη των διαφόρων πτυχών αυτής της ασθένειας και θα επιταχύνε την ανάπτυξη εμβολίων και τη δοκιμή νέων υποψήφιων φαρμάκων.

Οι ασιατικοί μακάκοι (*Macaca mulatta*) είναι αρκετά ευαίσθητοι στη μόλυνση από *Leishmania*. Αναπτύσσουν μια μορφή του νοσήματος που προσομοιάζει την ανθρώπινη: παράγουν αντισώματα και εκδηλώνουν ανοσολογικές αποκρίσεις μεσολαβούμενες από T κύτταρα τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, ενώ μπορούν να προστατευθούν αποτελεσματικά έπειτα από εμβολιασμό (Grimaldi et al., 2008). Ύστερα από μόλυνση με τα είδη *L. amazonensis* ή *L. braziliensis*, η εξέλιξη των δερματικών βλαβών είναι παρόμοια με εκείνη που παρατηρείται στους ανθρώπους, επιβεβαιώνοντας το δυναμικό αυτού του πιθήκου ως κατάλληλο μοντέλο για τη μελέτη της ανοσολογικής απόκρισης στην ανθρώπινη δερματική λεισμανιάση (Amaral et al., 2000). Μακάκοι μολυσμένοι με *L. major* εμφανίζουν κλινικά και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά κοινά με εκείνα που εκδηλώνονται σε ανθρώπους μολυσμένους με *L. major*, καθώς και αντοχή σε επόμενη μόλυνση που υποδεικνύει την ανάπτυξη επίκτητης ανοσίας (Amaral et al., 2001).

Επίσης, πίθηκοι του Νέου Κόσμου θεωρούνται κατάλληλοι ξενιστές και για τη μελέτη της σπλαγχνικής λεισμανιάσης. Αν και λίγα είναι γνωστά για την ανοσολογική απόκριση στη μόλυνση από *Leishmania*, οι πίθηκοι χρησιμοποιούνται συχνά σε προκλινικές δοκιμές εμβολίων.

Η ανάπτυξη μοντέλου λεισμανιάσης σε κάποιο πρωτεύον που μιμείται σε μεγάλο βαθμό την κατάσταση του ανθρώπου, περιγράφεται σε διάφορες μελέτες, οι οποίες δε θα ήταν δυνατόν να εφαρμοστούν στον άνθρωπο για ηθικούς λόγους. Ωστόσο, για οικονομικούς και δεοντολογικούς λόγους, η χρήση πρωτευόντων στη

βιοϊατρική έρευνα είναι περιορισμένη. Επομένως, μελέτες που αφορούν αυτά τα ζώα έχουν σχεδιαστεί για την επίλυση ερωτήσεων που δε μπορούν να απαντηθούν σε άλλα ζώα. Οι πύθηκοι είναι συνήθως τα τελικά πειραματόζωα που πρέπει να χρησιμοποιηθούν σε μελέτες σχετικά με την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα εμβολίων και φαρμάκων που αναπτύχθηκαν σε άλλα πειραματόζωα.

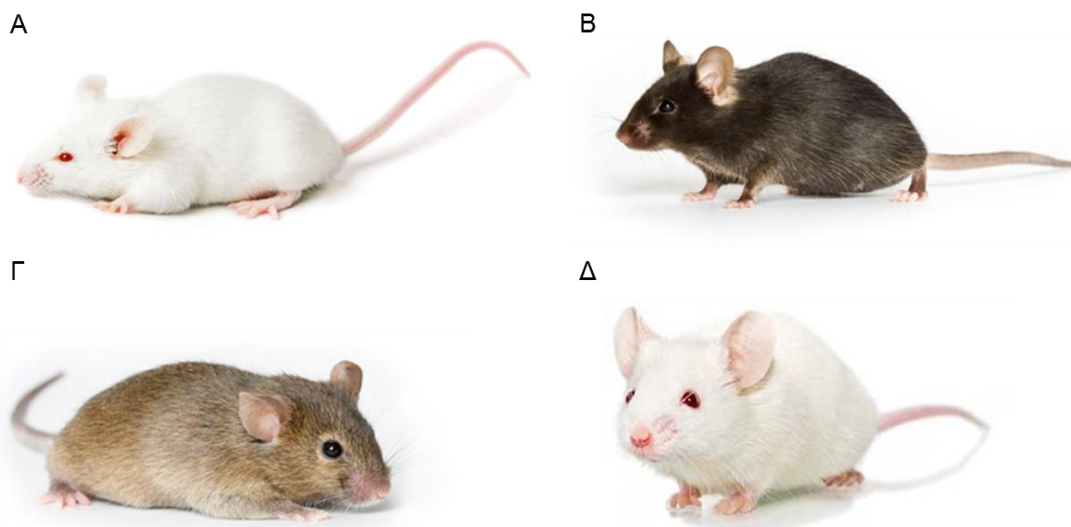
1.8.4 Ο ΠΟΝΤΙΚΟΣ ΩΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ

Στη βιοϊατρική έρευνα, ο ποντικός οφείλει μεγάλο μέρος της δημοτικότητάς του ως πειραματικό μοντέλο στη δυνατότητα που παρέχει για διατήρηση στελεχών με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά έπειτα από επαναλαμβανόμενα ζευγαρώματα. Δίνεται έτσι η δυνατότητα συλλογής και συνδυασμού βιολογικών δεδομένων με την πάροδο του χρόνου, οδηγώντας σε χαρακτηρισμούς φαινοτύπων, κάτι που σπάνια επιτυγχάνεται σε άλλα θηλαστικά. Η ύπαρξη ενός συνόλου γενετικών διαφορών μεταξύ των ενδογενών στελεχών επιτρέπει στους επιστήμονες να διερευνήσουν την επίδραση της γενετικής ποικιλομορφίας σε σχεδόν οποιοδήποτε ενδιαφέρον φαινότυπο (Szatkiewicz et al., 2008). Η ευκολία διατήρησης και αναπαραγωγής αποτελούν επιπλέον πλεονεκτήματα (Guénet & Bonhomme, 2003). Πέρα όμως από τους πρακτικούς λόγους, οι ποντικοί είναι ανώτερα θηλαστικά με μεγάλο ποσοστό των γονιδίων τους κοινό με αυτό των ανθρώπων. Έτσι, η γενετική του ποντικού αποτελεί το ιδανικότερο σύστημα για την προτυποποίηση των ανθρώπινων ασθενειών.

Η πειραματική μόλυνση ποντικών με τα είδη που προκαλούν ανθρώπινη σπλαγχνική λεισμανίαση, έχει ως αποτέλεσμα την εγκατάσταση της μόλυνσης στο ήπαρ, το σπλήνα και το μυελό των οστών. Στα περισσότερα στελέχη ποντικών, τα παράσιτα τελικά εκκαθαρίζονται από το ήπαρ και η ηπατική αντοχή στη λοίμωξη προκύπτει από ένα ευρύ φάσμα τελεστικών και ρυθμιστικών οδών, από πλευράς του ξενιστή. Αντίθετα, τα παράσιτα παραμένουν στον σπλήνα και στο μυελό των οστών με μηχανισμούς που είναι λιγότερο κατανοητοί. Η μη εκκαθάριση των παρασίτων συνοδεύεται από την αποτυχία σχηματισμού κοκκιωμάτων και από μια ποικιλία παθολογικών αλλαγών, συμπεριλαμβανομένης της σπληνομεγαλίας, της διαταραχής της μικροαρχιτεκτονικής του λεμφικού ιστού και της αυξημένης αιμοποιητικής δραστηριότητας.

Το γενετικό υπόβαθρο μπορεί να επηρεάσει τα κλινικά συμπτώματα και την έκβαση του νοσήματος. Ως προς τη μόλυνση με παράσιτα του γένους *Leishmania*, οι ποντικοί μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις φαινοτυπικές κατηγορίες: ανθεκτικοί στη μόλυνση, ευαίσθητοι στη μόλυνση με θεραπευμένο φαινότυπο και ευαίσθητοι στη μόλυνση με μη θεραπευμένο φαινότυπο. Ευαίσθητοι μη θεραπευμένοι ποντικοί, όπως το στέλεχος BALB/c, προχωρούν σε χρόνια φάση του νοσήματος, χωρίς πλήρη εκκαθάριση παρασίτων. Αντιθέτως, ευαίσθητοι θεραπευμένοι

ποντικοί, όπως το στέλεχος NMRI, παρουσιάζουν χαμηλό παρασιτικό φορτίο και τα παράσιτα εξαλείφονται πλήρως σε ορισμένες περιπτώσεις.



Εικόνα 1.17 Φυλές ποντικών που έχουν χρησιμοποιηθεί ως πειραματικά μοντέλα στη μελέτη της λεισμανίασης. (Α) ποντικός της φυλής BALB/c (Πηγή: <https://www.jax.org/strain/000651>), (Β) ποντικός της φυλής C57BL/6 (Πηγή: <https://www.jax.org/strain/000664>), (Γ) ποντικός της φυλής CBA (Πηγή: <https://www.jax.org/search?q=CBA>), (Δ) ποντικός της φυλής NMRI (Πηγή: <https://www.taconic.com/mouse-model/nmri>).

Διαγονιδιακοί ποντικοί ως πειραματικά μοντέλα στη βιοϊατρική έρευνα

Διαγονιδιακοί ονομάζονται οι οργανισμοί στο γονιδίωμα των οποίων έχει ενσωματωθεί μη ενδογενές DNA ή το γονιδίωμα των οποίων έχει υποστεί κάποια τροποποίηση με την τεχνολογία της γενετικής μηχανικής. Ένας βασικός τομέας της βιοϊατρικής έρευνας στον οποίο βρίσκουν εφαρμογή τα διαγονιδιακά ζώα είναι εκείνος της δημιουργίας μοντέλων για τη μελέτη παθήσεων του ανθρώπου. Με την επιλεκτική εισαγωγή, αφαίρεση ή τροποποίηση συγκεκριμένων γονιδίων από το γονιδίωμα των ζώων εργαστηρίου δημιουργούνται φυλές ιδανικές για τη μελέτη ανθρώπινων νοσημάτων. Διαγονιδιακά πειραματικά μοντέλα χρησιμοποιούνται για τη μελέτη και την κατανόηση των μοριακών και κυτταρικών μηχανισμών που εμπλέκονται στην παθογένεση ασθενειών, καθώς και για προκλινικές δοκιμές φαρμακευτικών ουσιών ή την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας υποψήφιων εμβολίων (Douni et al., 2003).

Η μεγαλύτερη πρόοδος στην ανάπτυξη διαγονιδιακών οργανισμών έχει σημειωθεί στους ποντικούς. Το 1974 ο Rudolf Jaenisch δημιούργησε το πρώτο γενετικά τροποποιημένο ζώο εισάγοντας ένα DNA ιό σε έμβρυο ποντικού πρώιμου σταδίου και αποδεικνύοντας ότι τα εισαγόμενα γονίδια ήταν παρόντα σε κάθε κύτταρο (Jaenisch & Mintz, 1974). Ωστόσο, οι ποντικοί δε μεταβίβασαν το διαγονίδιο στους απογόνους τους. Το πρώτο διαγονιδιακό ζώο με λειτουργικό

γονίδιο φτιάχτηκε το 1982. Το γονίδιο της αυξητικής ορμόνης του αρουραίου υπό τον έλεγχο του εκκινήτη της μεταλλοθειονίνης μεταφέρθηκε σε ζυγωτά ποντικού και δημιουργήθηκαν τα πρώτα ποντίκια με μεγαλύτερο από το φυσιολογικό μέγεθος (Palmiter et al., 1982).

Σήμερα, διαγονιδιακοί ποντικοί χρησιμοποιούνται ως μοντέλα για τη μελέτη των καρδιακών παθήσεων, του διαβήτη, της αρθρίτιδας, της παχυσαρκίας, της κατάχρησης ουσιών, του άγχους, της γήρανσης, της νόσου Πάρκινσον και της νόσου Alzheimer, αλλά και του καρκίνου. Οι ανθρωποποιημένοι διαγονιδιακοί ποντικοί αποτελούν χρήσιμο προκλινικό μοντέλο για το σχεδιασμό και τον έλεγχο εμβολίων έναντι λοιμωδών νοσημάτων ή του καρκίνου. Έτσι, διαγονιδιακοί ποντικοί που εκφράζουν ανθρώπινα γονίδια έχουν χρησιμοποιηθεί στην έρευνα για το σχεδιασμό εμβολίων έναντι πολλών μολυσματικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων του ιού της ηπατίτιδας Β (Guan et al., 2017), του ιού των ανθρώπινων κονδυλωμάτων (Marcuzzi et al., 2014) και των παρασίτων του γένους *Leishmania* (Seyed et al., 2014).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Η σπλαγχνική λεισμανίαση οφείλεται στα στελέχη *L. donovani* και *L. infantum* και αποτελεί τη σοβαρότερη μορφή λεισμανίασης. Εάν δε χορηγηθεί θεραπεία, οδηγεί σε θάνατο. Η θεραπεία βασίζεται στη χρήση χημειοθεραπευτικών σκευασμάτων, που όμως χαρακτηρίζονται από παρενέργειες και υψηλό κόστος. Για το λόγο αυτό, η ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού εμβολίου κρίνεται επιτακτική τόσο για τον έλεγχο του νοσήματος, όσο και για την προάσπιση της δημόσιας υγείας. Τα ζωικά μοντέλα αποτελούν χρήσιμα εργαλεία για τον έλεγχο και την επιλογή φαρμακευτικών παραγόντων ή υποψήφιων εμβολίων πριν από την κλινική εφαρμογή, αλλά και για την κατανόηση των ανοσολογικών μηχανισμών που ακολουθούν τη μόλυνση. Εμβόλια ανθρώπινης χρήσης δεν υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα μέχρι στιγμής, ενώ εμβόλια έναντι της λεισμανίασης του σκύλου έχουν αναπτυχθεί και δοκιμαστεί στη Βραζιλία και την Ευρώπη με αντικρουόμενα αποτελέσματα.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη του πειραματικού μοντέλου σπλαγχνικής λεισμανίασης στη διαγονιδιακή σειρά ποντικών B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση ενός πειραματικού εμβολίου έναντι της συγκεκριμένης μορφής λεισμανίασης που στοχεύει κυρίως στην επαγωγή CD8⁺ T κυτταρικών αποκρίσεων. Η επιλογή της συγκεκριμένης διαγονιδιακής σειράς έγινε καθώς οι B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J ποντικοί εκθέτουν στα κύτταρα τους το υβριδικό μόριο MHC τάξης I με $\alpha 1$ και $\alpha 2$ επικράτειες όμοιες του ανθρώπινου μορίου HLA-A2.1 που απαντάται στο 72,2% του πληθυσμού της Καυκάσιας φυλής. Ως ομάδες ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ποντικοί των φυλών BALB/c και C57BL/6.

Πιο συγκεκριμένα, στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας εφαρμόστηκε:

- Διατήρηση και αναπαραγωγή της διαγονιδιακής σειράς B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J στις εγκαταστάσεις του Τμήματος Ζωικών Προτύπων Βιοϊατρικής Έρευνας (ΤΖΠΒΕ) του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί ο επιθυμητός αριθμός ζώων εργαστηρίου για τις πειραματικές ανάγκες.
- Έλεγχος της διατήρησης του διαγονιδίου μέσω διερεύνησης της έκφρασης του υβριδικού μορίου MHC τάξης I στην επιφάνεια δενδριτικών κυττάρων μυελού των οστών της διαγονιδιακής σειράς ποντικών με κυτταρομετρία ροής.
- Ανάκτηση και καλλιέργεια του στελέχους MHOM/GR/2001/GH8 για τη μελέτη της ανάπτυξης του παρασίτου, την παραγωγή προμαστιγωτών μορφών για τις μολύνσεις και την παρασκευή διαλυτού αντιγόνου.
- Πειραματικές μολύνσεις ποντικών της κάθε φυλής με προμαστιγωτές μορφές του στελέχους MHOM/GR/2001/GH8, προκειμένου να μελετηθεί η πορεία της μόλυνσης σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Ιδιαίτερα για τη διαγονιδιακή σειρά, η εκτίμηση του παρασιτικού

φορτίου έγινε και με τη χρήση ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR).

- Εμβολιασμός των B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J ποντικών με πειραματικό εμβόλιο που είχε αναπτυχθεί στο Εργαστήριο Ανοσολογίας Παρασιτώσεων και αξιολόγηση της προφυλακτικής δράσης του εμβολιασμού ύστερα από πειραματική μόλυνση, με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων.
- Διερεύνηση της επαγωγής χυμικής ανοσίας με ELISA για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του διαλυτού αντιγόνου και των αντιγονικών συστατικών του εμβολίου (χιμαιρικά πολυεπιτοπικά πεπτίδια) ή της κυτταρικής ανοσίας με τη μελέτη του λεμφοκυτταρικού πολλαπλασιασμού ύστερα από διέγερση κυττάρων του σπλήνα με κάθε ένα από τα χιμαιρικά πολυεπιτοπικά πεπτίδια στους εμβολιασμένους και μολυσμένους B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J ποντικούς.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΥΛΙΚΑ

Για τη διεξαγωγή των πειραματικών διαδικασιών χρησιμοποιήθηκαν τεχνολογικός εξοπλισμός, αναλώσιμα υλικά, ειδικά αντιδραστήρια και διαλύματα, όπως παρατίθενται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 3.1 Τεχνολογικός εξοπλισμός

| ΕΙΔΟΣ | ΤΥΠΟΣ | ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΗΣ |
|--|------------------------|------------------------|
| Απαγωγός πτητικών ουσιών | | |
| Θερμαινόμενη μαγνητική πλάκα | ARE | Velp Scientifica |
| Αναλυτικός ζυγός | Mettler PM4600 | DeltaRange |
| Αναλυτικός ζυγός ακριβείας | ACJ 220-4M | Kern |
| Πεχάμετρο | Orion 3-Star | Thermo Scientific |
| Συσκευή ανάδευσης (vortex) | Heidolph Top-mix 94323 | Bioblock Scientific |
| Υδατόλουτρο 37 °C | 5015WB | BioLine Scientific |
| Υδατόλουτρο ρύθμισης θερμοκρασίας | LSB 0155 | Daihan Labtech |
| Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής | TelSTAR Bio-II-A | Telstar Life Sciences |
| Κλίβανος 60 °C | | Binder |
| Κλίβανος 26 °C | MIR-253 | Sanyo |
| Κλίβανος 37 °C σταθερής παροχής CO ₂ | Galaxy 170S | New Brunswick |
| Επιτραπέζια ψυχόμενη φυγόκεντρος | PrO-Research | Centurion Scientific |
| Μικροφυγόκεντρος | Biofuge 13 | Heraeus |
| Ψυχόμενη μικροφυγόκεντρος | 5417R | Eppendorf |
| Φωτονικό μικροσκόπιο | OLYMPUS BH | Olympus |
| Ανάστροφο φωτονικό μικροσκόπιο | OLYMPUS | Olympus |
| Αιμοκυτταρόμετρο Malassez | 06 406 10 | Marienfeld |
| Πιπέττες μεταβλητού όγκου | Transferpette S | Brand |
| Πιπέττα χειρισμού μεγάλου όγκου | Accu-jet pro | Brand |
| Συσκευή υπερήχων | UP100H | Hielscher |
| Φασματοφωτόμετρο για πλάκες μικροτιτλοποίησης | MRX | Dynatech Laboratories |
| Κυτταρομετρητής ροής | FACS CALIBUR | Becton-Dickinson |
| Θάλαμος με λάμπες UV για το χειρισμό δειγμάτων που προορίζονται για ανάλυση με μοριακές τεχνικές | AURA | Bioair |
| Συσκευή Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου | SaCycler-96 RUO cycler | Sacace Biotechnologies |
| Φασματοφωτόμετρο δειγμάτων DNA | Nanodrop | Thermo Scientific |
| Συσκευή συλλογής κυττάρων | COMBI 12 | Skatron |

| | | |
|-------------------------|----------------|--------|
| Μετρητής β ακτινοβολίας | Microbeta 1450 | Wallac |
|-------------------------|----------------|--------|

Πίνακας 3.2 Αναλώσιμα υλικά

| ΕΙΔΟΣ | ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΗΣ | ΧΩΡΑ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ |
|--|-----------------|-----------------|
| Βακτηριολογικά τρυβλία | Greiner bio-one | Germany |
| Πλαστικές ορολογικές πιπέτες (2 ml, 5ml, 10 ml) | Greiner bio-one | Germany |
| Σωλήνες φυγοκέντρησης PP (1,5 ml, 2,0 ml, 15 ml, 50 ml) | Greiner bio-one | Germany |
| Σωλήνες κυτταρομετρίας ροής 5 ml | BD Biosciences | USA |
| Σωληνάκια 0.2 ml & καπάκια σε οκτάδες για Real Time PCR | Nippon Genetics | Germany |
| Πλαστικά ακρορύγχια χωρίς φίλτρο (0,5-20 μl, 10-200 μl, 200-1000 μl) | Greiner bio-one | Germany |
| Πλαστικά ακρορύγχια με φίλτρο (0,5-10 μl, 5-100 μl, 5-200 μl) | Brand | Germany |
| Ταινία στεγανοποίησης (Parafilm) | Omnilab | Germany |
| Σύριγγες ινσουλίνης 0,5 ml | BD Biosciences | USA |
| Σύριγγες 1 ml με βελόνες 27G | Nipro | USA |
| Σύριγγες 5 ml με βελόνες 21G | Nipro | USA |
| Φίλτρα με διάμετρο πόρων 70 μm | BD Biosciences | USA |
| Φίλτρα με διάμετρο πόρων 20 μm | GE Healthcare | UK |
| Καλυπτρίδες 22x22 mm | Menzel-Gläser | UK |
| Πλάκες καλλιέργειας κυττάρων των 96 φρεατίων με επίπεδο πυθμένα | Greiner bio-one | Germany |
| Πλάκες καλλιέργειας κυττάρων των 96 φρεατίων με κοίλο πυθμένα | Greiner bio-one | Germany |
| Πλάκες μικροτιτλοδότησης ELISA | Greiner bio-one | Germany |
| Φίλμ κάλυψης πλακών 96 φρεατίων | Greiner bio-one | Germany |
| Φιάλες καλλιέργειας κυττάρων 25 cm ² | Greiner bio-one | Germany |
| Διηθητικό χαρτί επικαλυμμένο με πλέγμα από μικροσκοπικές ίνες υάλου | Perkin-Elmer | USA |

Πίνακας 3.3 Ειδικά αντιδραστήρια

| ΕΙΔΟΣ | ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΗΣ | ΧΩΡΑ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ |
|--|---------------|-----------------|
| Κυτταροκαλλιέργειες | | |
| Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI ₁₆₄₀) | Biochrom | Germany |
| Schneider's Drosophila Medium | Biosera | France |

| | | |
|--|-------------------|---------|
| Ορός εμβρίου μόσχου (Fetal Bovine Serum, FBS) | Biochrom | Germany |
| Διάλυμα L-γλουταμίνης 200 mM | Biochrom | Germany |
| Διάλυμα πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης | Biochrom | Germany |
| Ρυθμιστικό διάλυμα HEPES | Biochrom | Germany |
| Ανασυνδυασμένος παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων και μακροφάγων του ποντικού (rGM-CSF) | Peprotech | UK |
| Κονκαβαλίνη A (Con A) | Sigma-aldrich | USA |
| Λιποπολυσακχαρίτης (LPS) | Sigma-aldrich | USA |
| Μπλε του τρυπανίου (Trypan blue) | BDH Chemicals | USA |
| Κυτταρομετρία ροής | | |
| Αντίσωμα σημασμένο με φυκοερυθρίνη (PE) έναντι του επιφανειακού μορίου CD11c του ποντικού απομονωμένο από κρικητό (κλώνος HL3) | BD Pharmingen | USA |
| Αντίσωμα σημασμένο με φυκοερυθρίνη (PE) έναντι του επιφανειακού μορίου HLA-ABC του ανθρώπου απομονωμένο από ποντικό (κλώνος G46.2.6) | BD Biosciences | USA |
| Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) | | |
| Nucleospin™ Tissue kit | Macherey-Nagel | Germany |
| Εκκινητές | VBC Biotech | Austria |
| Taqman ανιχνευτής | VBC Biotech | Austria |
| KAPA Probe Fast Universal qPCR master mix | KAPA Biosystems | USA |
| Ενζυμική δοκιμασία ανοσοπροσρόφησης (ELISA) | | |
| Micro BCA Protein Assay kit | Thermo Scientific | USA |
| Πολυσορβικό 20 (Tween 20) | Merck | USA |
| Αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση (HRP) έναντι των IgG του ποντικού | Thermo Scientific | USA |
| Βιοτινυλιωμένο αντίσωμα έναντι του IgG1 ισότυπου του ποντικού | AbD Serotec | UK |
| Βιοτινυλιωμένο αντίσωμα έναντι του IgG2 ισότυπου του ποντικού | AbD Serotec | UK |
| Στρεπταβιδίνη συζευγμένη με HRP | AbD Serotec | UK |
| TMB substrate kit | Thermo Scientific | USA |
| Θειικό οξύ (H ₂ SO ₄) | Carlo Erba | Spain |
| Δοκιμασία λεμφοκυτταρικού πολλαπλασιασμού | | |
| Τριτιωμένη θυμιδίνη 5 mCi/ml | Perkin-Elmer | USA |
| Υγρό σπινθηρισμού | Wallac | Finland |

Για την παρασκευή των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν μεταλλικές σπάτουλες, ποτήρια ζέσεως, κωνικές φιάλες, ογκομετρικοί κύλινδροι, ογκομετρικές φιάλες, χωνιά και μαγνήτες ανάδευσης.

Πίνακας 3.4 Διαλύματα

| ΔΙΑΛΥΜΑ | ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ |
|--|---|
| Θρεπτικό υλικό RPMI ₁₆₄₀ (500 ml, 4 °C) | RPMI ₁₆₄₀ 2 mM L-γλουταμίνη 100 u/ml πενικιλίνη 100 µg/ml στρεπτομυκίνη 10 mM HEPES |
| Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS; 500 ml, 4 °C, pH 7,4) | 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM KH ₂ PO ₄ dH ₂ O |
| Διάλυμα λύσης χλωριούχου αμμωνίου (ACK; 500 ml, 4 °C, pH 7,4) | 0,15 M NH ₄ Cl 1,0 mM KHCO ₃ 0,1 mM Na ₂ EDTA dH ₂ O |
| Ρυθμιστικό διάλυμα κυτταρομετρίας ροής (FACS buffer) | 3% v/v FBS PBS, pH 7,4 |
| Διάλυμα διάκρισης ζωντανών–νεκρών κυττάρων | 0,4% w/v Trypan blue PBS, pH 7,4 |
| Διαλύματα ELISA | |
| Διττανθρακικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M, pH 9,6 | 1,59 gr Na ₂ CO ₃ 2,93 gr NaHCO ₃ dH ₂ O |
| Διάλυμα έκπλυσης | 0,05% v/v Tween-20 PBS, pH 7,4 |
| Διάλυμα δέσμευσης μη ειδικών θέσεων | 2% w/v BSA 0,05% v/v Tween-20 PBS, pH 7,4 |

Εκτός από όσα ήδη αναφέρθηκαν, για τη ανατομία των ποντικών χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένα όργανα ανατομίας (λαβίδες και ψαλίδια; F.S.T, Germany).

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 Πειραματόζωα

Για την ανάπτυξη του πειραματικού μοντέλου σπλαγγνικής λεισμανίασης, χρησιμοποιήθηκε η διαγονιδιακή σειρά ποντικών B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J. Η προμήθεια της διαγονιδιακής σειράς έγινε από την εταιρεία The Jackson Laboratory των ΗΠΑ και η διατήρησή της πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του Τμήματος Ζωικών Προτύπων Βιοϊατρικής Έρευνας (ΤΖΠΒΕ) του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ. Αρσενικοί ή θηλυκοί ποντικοί ήταν τοποθετημένοι ανά δύο ή τρεις σε συμβατικούς κλωβούς επιφάνειας 530 cm² με στρωμνή, τροφή και νερό, σε συνθήκες ελεύθερες ειδικών παθογόνων (Specific Pathogen Free, SPF).

Προκειμένου να εξασφαλιστεί ο επιθυμητός αριθμός ζώων εργαστηρίου για τις πειραματικές ανάγκες, κάθε ενήλικος αρσενικός ποντικός τοποθετήθηκε σε νέο κλωβό επιφάνειας 530 cm² μαζί με στρωμνή από τον παλιό και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στον κλωβό δύο ή τρεις ενήλικοι θηλυκοί ποντικοί, ώριμοι αναπαραγωγικά. Μετά το πέρας 12-16 ωρών, έγινε έλεγχος σύζευξης των θηλυκών για την παρουσία λευκωπού σχηματισμού από τις εκκρίσεις του αρσενικού, που παραμένει στον κόλπο του θηλυκού για κάποιες ώρες μετά το ζευγάρωμα. Οι θηλυκοί ποντικοί στους οποίους παρατηρήθηκε ο λευκωπός σχηματισμός, τοποθετήθηκαν ανά ένα ή δύο σε νέους κλωβούς και εξετάστηκαν για πιθανή κυοφορία 15 μέρες ύστερα από το ζευγάρωμα (ως πρώτη μέρα κυοφορίας θεωρείται η επόμενη μέρα από την παρατήρηση του λευκωπού σχηματισμού, ενώ η περίοδος κυοφορίας στους ποντικούς διαρκεί 20-21 μέρες). Οι υπόλοιποι παρέμειναν με τους αρσενικούς και ελέγχονταν τακτικά για την παρουσία του λευκωπού σχηματισμού. Μετά το πέρας της κυοφορίας, τα νεογνά παρέμειναν με τις μητέρες τους για χρονικό διάστημα 4 εβδομάδων και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ο απογαλακτισμός τους και ο διαχωρισμός τους σε νέους κλωβούς ανά φύλο.

Ως ομάδες ελέγχου για την ανάπτυξη του πειραματικού μοντέλου σπλαγγνικής λεισμανίασης χρησιμοποιήθηκαν θηλυκοί ποντικοί 6-8 εβδομάδων των φυλών BALB/c και C57BL/6 η προμήθεια των οποίων έγινε μετά από παραγγελία από το ΤΖΠΒΕ.

3.2.2 Παρασκευή δενδριτικών κυττάρων από προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα μυελού των οστών ποντικών της διαγονιδιακής σειράς B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J

Η δημιουργία δενδριτικών κυττάρων από προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα μυελού των οστών σε μεγάλο αριθμό αποδείχτηκε σημαντική για τη μελέτη των λειτουργιών τους, καθώς ο αριθμός τους σε όλα τα όργανα του σώματος είναι μικρός. Για την παραγωγή μεγάλου αριθμού δενδριτικών κυττάρων ποντικού με

μικρό ποσοστό προσμείξεων B κυττάρων ή κοκκιοκυττάρων, ακολουθείται η μέθοδος των Lutz και συν. (Lutz et al., 1999) με κάποιες τροποποιήσεις.

Θηλυκοί ποντικοί ηλικίας 6-8 εβδομάδων ευθανατώθηκαν με αυχενική παρεκτόπιση και απομονώθηκαν τα μηριαία και κνημιαία οστά, τα οποία καθαρίστηκαν από τους περιβάλλοντες μύες με τη βοήθεια αποστειρωμένης γάζας. Σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, τα οστά βυθίστηκαν σε υδατικό διάλυμα 70% v/v αιθανόλης για 2-5 λεπτά, προκειμένου να αποστειρωθούν, και πλύθηκαν με θρεπτικό υλικό RPMI. Με τη χρήση λαβίδας και ψαλιδιού κόπηκαν οι επιφύσεις των οστών και απομακρύνθηκε ο μυελός με έκχυση θρεπτικού υλικού RPMI στο εσωτερικό του οστού με τη βοήθεια βελόνας διαμέτρου 27X1/2G. Τα συσσωματώματα διασπάστηκαν με τη χρήση ορολογικής πιπέττας και το εναιώρημα διηθήθηκε από φίλτρο με πόρους διαμέτρου 70 μm. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν (1300 rpm) για 10 λεπτά στους 4 °C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 4 ml ACK για τη λύση των ερυθροκυττάρων. Ύστερα από 5 λεπτά, προστέθηκε ίσος όγκος θρεπτικού υλικού RPMI₁₆₄₀ και το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε (1300 rpm, 10 λεπτά, 4 °C). Ακολούθησαν δύο εκπλύσεις σε θρεπτικό υλικό RPMI₁₆₄₀ με φυγοκέντρηση και το τελικό κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 10 ml θρεπτικού υλικού RPMI₁₆₄₀. Ο αριθμός ζωντανών και νεκρών κυττάρων προσδιορίστηκε ύστερα από μέτρηση σε αιμοκυτταρόμετρο Malassez με χρώση Trypan Blue (Strober, 1997). Από κάθε ζώο συλλέχθηκαν περίπου 3×10^7 κύτταρα. Σε βακτηριολογικό τρυβλίο διαμέτρου 100 mm που περιείχε 10 ml θρεπτικού υλικού RPMI₁₆₄₀ εμπλουτισμένου με 10% v/v FBS και 200 ng GM-CSF (πλήρες καλλιεργητικό μέσο), προστέθηκαν $3,5 \times 10^6$ κύτταρα. Την 3^η μέρα προστέθηκαν στην καλλιέργεια 10 ml πλήρους καλλιεργητικού μέσου. Την 6^η μέρα συλλέχθηκε ο μισός όγκος της καλλιέργειας, φυγοκεντρήθηκε (1300 rpm) για 10 λεπτά στους 4 °C και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 10 ml πλήρους καλλιεργητικού μέσου και επιστράφηκε στο τρυβλίο. Την 7^η μέρα τα αιωρούμενα και τα ημι-προσκολλητικά κύτταρα, τα οποία είναι τα δενδριτικά κύτταρα, συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν όπως τις προηγούμενες ημέρες. Το ίζημα εκπλύθηκε δύο φορές για να απομακρυνθούν ίχνη του rGM-CSF και ακολούθως τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI₁₆₄₀ εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS στην κατάλληλη συγκέντρωση.

3.2.3 Κυτταρομετρία ροής για τον έλεγχο διατήρησης του διαγονιδίου μέσω της έκφρασης του επιφανειακού μορίου HLA-A2.1 σε δενδριτικά κύτταρα μυελού των οστών

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια αυτοματοποιημένη μέθοδο ανάλυσης των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών μεμονωμένων σωματιδίων που βρίσκονται υπό μορφή εναιωρήματος και ρέουν συνεχώς με τη βοήθεια ενός υδροδυναμικού συστήματος (Fulwyler, 1965). Στηρίζεται στα φαινόμενα σκέδασης του φωτός και

φθορισμού. Ο κυτταρομετρητής ροής χρησιμοποιεί μία δέσμη laser και έναν ανιχνευτή φωτός για να μετρά σωματίδια σε εναιώρημα. Κάθε φορά που ένα σωματίδιο (π.χ. ένα κύτταρο) διέρχεται από τη δέσμη laser, το φως ανακλάται από τον ανιχνευτή και αυτή η διακοπή στη δέσμη του laser καταγράφεται από ένα δεύτερο σήμα ανίχνευσης που βρίσκεται σε δεξιά γωνία σε σχέση με τη δέσμη του laser.

Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό διαφόρων κυτταρικών πληθυσμών, με βάση τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους (μέγεθος και κοκκίωση), αλλά και την έκφραση συγκεκριμένων μορίων δεικτών που εκφράζονται τόσο στη μεμβράνη των κυττάρων, όσο και ενδοκυτταρικά. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι αυτών των μορίων που είναι συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες, όπως η φυκοερυθρίνη (PE) και η ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC). Οι ευαίσθητοι φωτοπολλαπλασιαστές του κυτταρομέτρου ανιχνεύουν: (α) τον ευθύγραμμο σκεδασμό του φωτός (forward scatter, FSC) που δίνει πληροφορίες για το μέγεθος (όγκο) του κυττάρου, (β) τον πλάγιο σκεδασμό του φωτός (side scatter, SSC) που δίνει πληροφορίες για το σχήμα και την κοκκίωση του κυττάρου και (γ) τον φθορίζοντα πλάγιο σκεδασμό που δίνει πληροφορίες για μορφολογικά χαρακτηριστικά του κυττάρου που σχετίζονται με την ένταση και τη χρονική διάρκεια του σκεδαστικού σήματος (έκφραση επιφανειακών ή ενδοκυττάρων πρωτεϊνών) (Robinson, 2004).

Προκειμένου να ελεγχθεί η διατήρηση του διαγονιδίου στη θυγατρική γενιά των B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Eng/J ποντικών, δενδριτικά κύτταρα επτά ημερών από προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα μυελού των οστών των B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Eng/J ποντικών (5×10^5 κύτταρα/ml) επώαστηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό RPMI εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS παρουσία 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS, σε κλίβανο θερμοκρασίας 37 °C και σταθερής παροχής CO₂. Κύτταρα σε θρεπτικό υλικό RPMI₁₆₄₀ εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS αποτέλεσαν τον αρνητικό μάρτυρα. Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και μεταφέρθηκαν σε σωλήνες φυγοκέντρησης 1,5 ml. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (4000 rpm) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα υπερκείμενα απορρίφθηκαν και τα ιζήματα επαναιωρήθηκαν σε 100 μl παγωμένο FACS buffer. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (4000 rpm) για 5 λεπτά στους 4 °C. Στη συνέχεια, έγινε μία ακόμα έκπλυση των κυττάρων σε παγωμένο FACS buffer με φυγοκέντρηση (4000 rpm, 5 λεπτά, 4 °C). Έπειτα, τα κύτταρα επώαστηκαν με τα αντισώματα έναντι του μορίου CD11c του ποντικού (αραίωση 1:100) και του μορίου HLA του ανθρώπου (αραίωση 1:10) συζευγμένα με PE για 30 λεπτά στους 4 °C, στο σκοτάδι. Ύστερα από δύο εκπλύσεις σε παγωμένο FACS buffer με φυγοκέντρηση (4000 rpm, 5 λεπτά, 4 °C), τα τελικά ιζήματα επαναιωρήθηκαν σε 500 μl παγωμένο PBS. Η έκφραση του διαγονιδίου επαγόμενη από το LPS έγινε με ανάλυση των κυτταρικών εναιωρημάτων με κυτταρομετρία ροής. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό FlowJo_V10 (TreeStar, Inc., USA).

3.2.4 Καλλιέργεια παρασίτων και καμπύλη ανάπτυξης

Το παράσιτο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το στέλεχος MHOM/GR/2001/GH8 (*L. infantum* zymodeme MON-1) που απομονώθηκε από Έλληνα ασθενή που έπασχε από σπλαγγική λείσμανίαση (Gouzelou et al., 2013). Όλοι οι χειρισμοί έγιναν σύμφωνα με τους Evans και συν. (Evans et al., 1989) με κάποιες τροποποιήσεις.

Η ανάκτηση του παρασίτου έγινε από το υγρό άζωτο σε θρεπτικό υλικό RPMI₁₆₄₀ εμπλουτισμένο με 20% v/v FBS, έτσι ώστε τα παράσιτα να αποκτήσουν ικανότητα πολλαπλασιασμού. Ο σωλήνας με τα παγωμένα παράσιτα μεταφέρθηκε άμεσα από δοχείο υγρού αζώτου σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C. Σκοπός ήταν η γρήγορη απόψυξη ώστε να περιοριστούν οι βλάβες από κρυστάλλους που πιθανώς δημιουργήθηκαν κατά τη ψύξη στα κύτταρα. Ακολούθησε μεταφορά του παρασιτικού εναιωρήματος σε θερμό (37 °C) θρεπτικό υλικό RPMI₁₆₄₀ εμπλουτισμένο με 20% v/v FBS και φυγοκέντρηση (1800 rpm) για 15 λεπτά, για να ελαχιστοποιηθεί η ποσότητα του κρυστοπροστατευτικού DMSO που χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με FBS ως μέσο φύλαξης των κυττάρων στο υγρό άζωτο. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο απορρίφθηκε, το ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε θερμό (37 °C) θρεπτικό υλικό RPMI εμπλουτισμένο με 20% v/v FBS και μεταφέρθηκε σε φιάλη καλλιέργειας των 25 cm², η οποία τοποθετήθηκε σε επωαστικό κλίβανο στους 26 °C. Την επόμενη μέρα έγινε αλλαγή του θρεπτικού υλικού, προκειμένου να απομακρυνθούν και τα τελευταία ίχνη DMSO. Όταν τα παράσιτα άρχισαν να διαιρούνται με φυσιολογικούς ρυθμούς, προσδιορίστηκε ο αριθμός των ζωντανών και νεκρών κυττάρων ύστερα από χρώση με Trypan blue. Σε 175 μl διαλύματος χρωστικής Trypan blue, προστέθηκαν 20 μl από το παρασιτικό εναιώρημα και 5 μl φορμαλίνης (αραίωση 1/20), και ακολούθησε ανάδευση. Η μέτρηση έγινε σε αιμοκυτταρόμετρο Malassez στο οπτικό μικροσκόπιο με τη χρησιμοποίηση του αντικειμενικού φακού 40X. Ακολούθησε ενοφθαλμισμός 10 ml θρεπτικού υλικού RPMI₁₆₄₀ εμπλουτισμένου με 10% v/v FBS με 2x10⁶ παράσιτα/ml για την έναρξη της καλλιέργειας, σε φιάλη καλλιέργειας 25 cm². Η καλλιέργεια διατηρήθηκε σε επωαστικό κλίβανο 26 °C.

Για τη δημιουργία της καμπύλης ανάπτυξης, πραγματοποιήθηκε καθημερινή μέτρηση του αριθμού των παρασίτων για χρονικό διάστημα μίας εβδομάδας και καταγραφή των μετρήσεων σε ημιλογαριθμικό χαρτί. Η τελική καμπύλη ανάπτυξης προέκυψε από το μέσο όρο των μετρήσεων τριών ανεξάρτητων πειραματικών επαναλήψεων. Με βάση την καμπύλη ανάπτυξης, υπολογίστηκε η μέρα κατά την οποία η καλλιέργεια βρίσκεται στο τέλος της λογαριθμικής φάσης, όπου και πρέπει να γίνει ανακαλλιέργεια.

3.2.5 Παρασκευή διαλυτού αντιγόνου παρασίτων (*Soluble Leishmania Antigen, SLA*)

Για την παρασκευή διαλυτού αντιγόνου, προηγήθηκε επέκταση της καλλιέργειας των παρασίτων σε ικανοποιητικό αριθμό φιαλών καλλιέργειας 25 cm². Στην αρχή της στατικής φάσης ανάπτυξης, συλλέχθηκε το παρασιτικό εναιώρημα από τις φιάλες καλλιέργειας (~10¹⁰ προμαστιγωτές μορφές) και φυγοκεντρήθηκε (1800 rpm) για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε αποστειρωμένο ψυχρό (4 °C) PBS. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (1800 rpm) για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε 3-4 φορές. Το τελικό ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε μικρή ποσότητα ψυχρού PBS, έτσι ώστε ο τελικός όγκος να μην υπερβαίνει τα 500 μl, και ακολούθησε θραύση των παρασίτων με 12 κύκλους ψύξης-θέρμανσης στους -80 °C και 37 °C αντίστοιχα, και έπειτα με υπερήχους. Τέλος, το κυτταρικό λύμα φυγοκεντρήθηκε σε ψυχόμενη μικροφυγόκεντρο (13.000 rpm) για 1 ώρα. Το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών και φυλάχθηκε στους -20 °C για μελλοντική χρήση.

3.2.6 Πρωτεϊνομέτρηση διαλυτού αντιγόνου παρασίτων *Leishmania infantum*

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών του διαλυτού αντιγόνου έγινε με τη χρήση του Micro BCA Protein Assay Kit, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, όπως περιγράφονται παρακάτω. Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση του δικιγchonικού οξέος (BCA) ως αντιδραστήριο ανίχνευσης του μονοσθενούς χαλκού (Cu⁺¹), που σχηματίζεται κατά την αναγωγή του δισθενούς χαλκού (Cu⁺²), παρουσία πρωτεΐνης σε αλκαλικό περιβάλλον. Δύο μόρια δικιγchonικού οξέος χηλιώνουν το Cu⁺¹ σχηματίζοντας υδατοδιαλυτό προϊόν ιώδους χρώματος, του οποίου η ένταση είναι γραμμικά ανάλογη της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στο δείγμα και απορροφά στα 562 nm. Η ευαισθησία της μεθόδου κυμαίνεται από 0,5 – 20 μg/ml.

Αρχικά, έγινε η προετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων αλβουμίνης ορού βοός (Bovine Serum Albumin, BSA). Το αρχικό διάλυμα BSA συγκέντρωσης 2 mg/ml χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή ενός διαλύματος BSA συγκέντρωσης 100 μg/ml. Σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 φρεατίων με επίπεδο πυθμένα, εφαρμόστηκε η μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων, προκειμένου να προκύψουν διαλύματα με υποδιπλάσιες συγκεντρώσεις BSA (εύρος συγκεντρώσεων 1,5-100 μg/ml) για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης. Οι διαδοχικές αραιώσεις έγιναν σε dH₂O έτσι ώστε ο τελικός όγκος σε κάθε φρεάτιο να είναι 100 μl.

Στη συνέχεια, ακολούθησε η προετοιμασία των διαλυμάτων SLA άγνωστης συγκέντρωσης. Η αρχική αραιώση του δείγματος SLA που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1:20. Στην ίδια πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 φρεατίων, εφαρμόστηκε η μέθοδος των

διαδοχικών αραιώσεων και για το άγνωστης συγκέντρωσης δείγμα SLA (εύρος αραιώσεων 1:20-1:2560).

Η προετοιμασία του αντιδραστηρίου BCA έγινε με ανάμειξη των παρεχόμενων αντιδραστηρίων MA, MB και MC σε αναλογία 25:24:1, αντίστοιχα. Το αντιδραστήριο MA αποτελεί διάλυμα τρυγικού εστέρα σε ανθρακικό άλας και χρησιμεύει στη δημιουργία αλκαλικού περιβάλλοντος αντίδρασης. Το αντιδραστήριο MB περιέχει το δικιχονικό οξύ (BCA) και το αντιδραστήριο MC αποτελεί διάλυμα ιόντων δισθενούς χαλκού. Προστέθηκαν 100μl BCA σε κάθε φρεάτιο της πλάκας μικροτιτλοποίησης. Ακολούθησε ανάδευση της πλάκας για 30 δευτερόλεπτα και επώαση στους 37 °C για 2 ώρες. Η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε στα 562 nm αφού πρώτα η πλάκα έμεινε για λίγο σε θερμοκρασία δωματίου.

3.2.7 Μολύνσεις ποντικών

Για τις πειραματικές μολύνσεις, χρησιμοποιήθηκαν θηλυκοί ποντικοί ηλικίας 6-8 εβδομάδων της φυλής BALB/c (N=25), της φυλής C57BL/6 (N=25) και της διαγονιδιακής σειράς ποντικών B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J (N=25). Η μόλυνση των ποντικών έγινε με το στέλεχος MHOM/GR/2001/GH8.

Αρχικά, για την παρασκευή του παρασιτικού εναιωρήματος, συλλέχθηκε καλλιέργεια προμαστιγωτών μορφών του στελέχους MHOM/GR/2001/GH8 στο τέλος της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης. Η πυκνότητα της καλλιέργειας προσδιορίστηκε με καταμέτρηση των παρασίτων σε αιμοκυτταρόμετρο Malassez. Ο απαιτούμενος όγκος καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκε σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (1800 rpm για 20 λεπτά). Ακολούθησαν δύο εκπλύσεις με ψυχρό PBS και φυγοκέντρηση (1800 rpm για 20 λεπτά). Το τελικό ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε κατάλληλο όγκο PBS, έτσι ώστε να προκύψει παρασιτικό εναιώρημα με πυκνότητα 10^7 παράσιτα ανά μl PBS.

Όλοι οι χειρισμοί των ζώων εργαστηρίου έγιναν σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο του ΤΖΠΒΕ, σύμφωνα με την Εθνική και Ευρωπαϊκή νομοθεσία και τον κανονισμό του ΕΙΠ που αφορά στην ορθή Διαβίωση και Χρήση Ζωικών Προτύπων. Κάθε ποντικός ακινητοποιήθηκε με τη βοήθεια συσκευής ακινητοποίησης. Ακολούθησε θέρμανση της ουράς με τη χρήση λάμπας, ώστε να προκληθεί διαστολή της κεντρικής ουραίας φλέβας. Στη συνέχεια έγινε ενδοφλέβια χορήγηση 100 μl από το παρασιτικό εναιώρημα, έτσι ώστε κάθε ποντικός να μολυνθεί με 10^7 παράσιτα.

Σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία μετά τη μόλυνση (15 μέρες, 1, 2, 3 και 4 μήνες), πέντε ζώα από κάθε φυλή απομακρύνθηκαν από τις εγκαταστάσεις του ΤΖΠΒΕ. Ύστερα από αναισθητοποίηση με τη χρήση ισοφλουρανίου έγινε λήψη αίματος από τον οφθαλμό κάθε ζώου. Ακολούθησε ευθανασία του ζώου με

αυχενική παρεκτόπιση. Με τη χρήση λαβίδας και ψαλιδιού, έγινε προσεκτική αφαίρεση του δέρματος από το σημείο της βουβωνικής περιοχής μέχρι το θώρακα, τομή στο περιτόναιο και προσεκτική αφαίρεσή του, ώστε να αποκαλυφθούν τα όργανα της κοιλιακής περιοχής. Ακολούθησε αφαίρεση του ήπατος και του σπλήνα, κάθε ένα από τα οποία τοποθετήθηκε σε προζυγισμένο σωλήνα των 15 ml με ψυχρό θρεπτικό υλικό RPMI₁₆₄₀. Τα όργανα ζυγίστηκαν και ακολούθησε λήψη ιστοτεμαχίων σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Κάθε ιστοτεμάχιο τοποθετήθηκε σε προζυγισμένους σωλήνες φυγοκέντρησης 1,5 ml είτε για ταχεία ψύξη σε υγρό άζωτο και φύλαξη στους -80 °C, είτε για τη δοκιμασία των διαδοχικών αραιώσεων.

3.2.8 Ανοσοποιήσεις ποντικών της διαγονιδιακής σειράς B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Eng/J με το πειραματικό εμβόλιο και αξιολόγηση της προφυλακτικής δράσης μετά από πειραματική μόλυνση

Σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο του ΤΖΠΒΕ, θηλυκοί ποντικοί (N=10) ηλικίας 6-8 εβδομάδων της διαγονιδιακής σειράς ποντικών B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Eng/J ανοσοποιήθηκαν υποδόρια στον αυχένα και τη βάση της ουράς με πειραματικό εμβόλιο σε PBS (100 μl). Το πειραματικό εμβόλιο βασίζεται σε χιμαιρικά πεπτίδια τριών πρωτεϊνών του παρασίτου *L. infantum*, γνωστών για την ανοσογονικότητά τους [πρωτεΐνωση κυστεΐνης A (Cysteine Peptidase A, CPA), ιστόνη H1 και κινητοπλαστιδιακή μεμβρανική πρωτεΐνη 11 (Kinetoplastid Membrane Protein 11, KMP-11)] που εμπεριέχουν επίτοπους για στόχευση CD4 αλλά κυρίως CD8⁺ T κυτταρικών αποκρίσεων. Ο σχεδιασμός του πειραματικού εμβολίου έγινε από την ομάδα της Δρ Ευδοκίας Καραγκούνη στο Εργαστήριο Ανοσολογίας Παρασιτώσεων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ. Δύο ακόμα υποδόριες ανοσοποιήσεις ακολούθησαν σε χρονικά διαστήματα δύο εβδομάδων. Ποντικοί (N=10) που έλαβαν μόνο PBS αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Δύο εβδομάδες μετά την τελευταία ανοσοποίηση, εμβολιασμένοι και μη εμβολιασμένοι ποντικοί μολύνθηκαν με ενδοφλέβια χορήγηση 2×10^7 προμαστιγωτών μορφών του στελέχους MHOM/GR/2001/GH8 σε PBS, όπως περιγράφεται παραπάνω.

Σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία μετά τη μόλυνση (1 μήνα και 2 μήνες), τα ζώα αποσύρθηκαν από τις εγκαταστάσεις του ΤΖΠΒΕ (N=5 ανά ομάδα). Ακολούθησε λήψη αίματος από τον οφθαλμό κάθε ζώου και έπειτα ευθανασία με αυχενική παρεκτόπιση. Η εκτίμηση του παρασιτικού φορτίου έγινε με τη δοκιμασία των διαδοχικών αραιώσεων, ενώ κυτταρικό εναιώρημα από το σπλήνα κάθε ζώου χρησιμοποιήθηκε για τη δοκιμασία του λεμφοκυτταρικού πολλαπλασιασμού.

3.2.9 Προσδιορισμός παρασιτικού φορτίου με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων

Η μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων αποτελεί μια ευαίσθητη δοκιμασία, η οποία χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση παρασίτων *Leishmania* σε μολυσμένους ιστούς. Βασίζεται στην εφαρμογή διαδοχικών αραιώσεων του δείγματος και εκτίμηση του τίτλου στον οποίο παρατηρείται έστω και μια κινητή μορφή του παρασίτου (Titus et al., 1985).

Με τη χρήση λαβίδας, κάθε ιστοτεμάχιο ήπατος ή σπλήνα ομογενοποιήθηκε σε 1 ml θρεπτικού υλικού Schneider's εμπλουτισμένου με 100 U/ml πενικιλίνη, 100 µg/ml στρεπτομυκίνη και 20% v/v FBS (πλήρες μέσο καλλιέργειας). Στη συνέχεια, το ομογενοποίημα αραιώθηκε σε πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1 mg/ml.

Χρησιμοποιήθηκαν πλάκες μικροτιτλοδότησης 96 θέσεων με επίπεδο πυθμένα. Σε όλα τα φρεάτια της πλάκας μικροτιτλοδότησης, εκτός της πρώτης στήλης (A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1, H1), προστέθηκαν 100 µl από το πλήρες μέσο καλλιέργειας. Στα φρεάτια της πρώτης στήλης, προστέθηκαν 200 µl από τα ομογενοποιήματα (τέσσερις επαναλήψεις για κάθε ομογενοποίημα). Εφαρμόστηκε η μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων και ακολούθησε επώαση στους 26 °C. Έπειτα από μια εβδομάδα, ακολούθησε παρατήρηση των πλακών μικροτιτλοδότησης σε ανάστροφο μικροσκόπιο και καταγραφή των φρεατίων στα οποία παρατηρήθηκε έστω και μία κινητή μορφή του παρασίτου. Ο αριθμός των παρασίτων προσδιορίστηκε με βάση την αραιώση στην οποία παρατηρήθηκε έστω και ένα παράσιτο (ζωντανή και κινητή προμαστιγωτή μορφή), με βάση τον τίτλο και το συνολικό βάρος του οργάνου.

3.2.10 Προσδιορισμός παρασιτικού φορτίου με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) αποτελεί μία τεχνική της μοριακής βιολογίας, η οποία αναπτύχθηκε από τον Kary Mullis το 1983 (Bartlett & Stirling, 2003; Mullis et al., 1987), ο οποίος μαζί με τον Michael Smith βραβεύτηκε το 1993 με βραβείο Νόμπελ χημείας. Το 1993, τέθηκε η βάση για την ανάπτυξη της PCR Πραγματικού Χρόνου (Real Time PCR) από τους Higuchi και συνεργάτες. Η συγκεκριμένη ομάδα υποστήριξε πως θα μπορούσε να επιτευχθεί παρακολούθηση της διαδικασίας της PCR σε πραγματικό χρόνο, με την προσθήκη ενός φθορίζοντος ιχνηθέτη, ο οποίος θα προσδένεται στο προϊόν της αντίδρασης (Higuchi et al., 1993). Παραλλαγή της μεθόδου αποτελεί η χρήση των Taqman ανιχνευτών για την ανίχνευση του προϊόντος. Οι Taqman ανιχνευτές αποτελούν ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες DNA που στο 5' άκρο φέρουν ένα φθοριόχρωμα και στο 3' άκρο ένα μόριο αποσβέτη, ενώ είναι συμπληρωματικές προς μία περιοχή της αλληλουχίας DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί μετά την αλληλουχία που αναγνωρίζει ο εκκινητής (Holland et al., 1991). Η χημεία

Taqman βασίζεται στην ικανότητα της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης να λειτουργεί και ως 5'-3' εξωνουκλεάση.

Η απομόνωση του DNA από τα ιστοτεμάχια ήπατος και σπλήνα, έγινε με το kit NucleoSpin Tissue της Macherey-Nagel, ακολουθώντας το βασικό πρωτόκολλο. Στη συνέχεια, ακολούθησε φωτομέτρηση και ποσοτικοποίηση των δειγμάτων DNA με τη χρήση φασματοφωτομετρίας (Nanodrop).

Ως μοριακός στόχος επιλέχθηκε το γονίδιο της περμεάσης της αργινίνης *AAP3*, συγκεκριμένα μία περιοχή του γονιδίου μεγέθους 74 bp. Η L-αργινίνη αποτελεί απαραίτητο αμινοξύ για τα παράσιτα του γένους *Leishmania*, καθώς δεν έχει αναφερθεί ενδογενής σύνθεση. Ο μεταφορέας της κωδικοποιείται από το γονίδιο *AAP3*. Η μέθοδος αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου των Tellevik και συνεργατών (Tellevik et al., 2014). Παρέχει εκτός από υψηλή ευαισθησία και τη δυνατότητα απόλυτης ποσοτικοποίησης του παρασιτικού φορτίου με τη χρησιμοποίηση πρότυπης καμπύλης.

Για το λόγο αυτό, δείγματα DNA που αντιστοιχούν σε 100000, 10000, 1000, 100 και 10 παράσιτα χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία πρότυπης καμπύλης μαζί με τα προς ανάλυση δείγματα. Όλες οι δοκιμασίες έγιναν στο θερμικό κυκλοποιητή SaCycler-96 RUO cycler και κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τρεις τεχνικές επαναλήψεις, με τελικό όγκο αντίδρασης 20 μl. Σε κάθε αντίδραση, χρησιμοποιήθηκαν 10 μl KAPA PROBE FAST Universal 2x qPCR master mix, 15 pmol πρόσθιου εκκινητή (*AAP3_f*), 5 pmol ανάστροφου εκκινητή (*AAP3_r*), 25 pmol ανιχνευτή (*AAP3_taq*), 150 ng απομονωμένου DNA και dH₂O υψηλής καθαρότητας. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν: αρχική αποδιάταξη στους 95 °C για 10 λεπτά προκειμένου να γίνει η ενεργοποίηση της Taq πολυμεράσης και εναλλαγή για 40 κύκλους των δύο βημάτων αποδιάταξης στους 95 °C για 15 sec και υβριδοποίησης-επιμήκυνσης στους 62 °C για 60 sec. Ο συνολικός αριθμός των παρασίτων *L. infantum* ανά όργανο, υπολογίστηκε βάση του ακόλουθου τύπου:

Αριθμός παρασίτων ανά όργανο =

$(\text{αριθμός παρασίτων ανά αντίδραση} \times V_{\text{έκλουσης}} \times B_{\text{οργάνου}}) / (V_{\text{στόχου DNA}} \times B_{\text{ιστοτεμαχίου}})$

όπου

$V_{\text{έκλουσης}}$ ο συνολικός όγκος του εκλουόμενου DNA (μl)

$B_{\text{οργάνου}}$ το βάρος του οργάνου (mg)

$V_{\text{στόχου DNA}}$ ο όγκος του DNA που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση (μl)

$B_{\text{ιστοτεμαχίου}}$ το βάρος του ιστοτεμαχίου που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση DNA (mg)

3.2.11 Προσδιορισμός αντισωμάτων με ενζυμική μέθοδο ανοσοπροσρόφησης (ELISA)

Η ενζυμική μέθοδος ανοσοπροσρόφησης (ELISA) αναπτύχθηκε το 1971 από δύο ερευνητικές ομάδες, ανεξάρτητα, των Peter Perlmann και Eva Engvall στη Σουηδία και των Anton Schuurs και Bauke von Weemen στην Ολλανδία (Engvall & Perlmann, 1971; Van Weemen & Schuurs, 1971). Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ανίχνευση του συμπλέγματος αντιγόνου - αντισώματος με τη χρησιμοποίηση ενός συζευγμένου με ένζυμο αντισώματος. Η παραγωγή έγχρωμου προϊόντος μετά την προσθήκη και την οξείδωση κατάλληλου χρωμογόνου υποστρώματος, οδηγεί σε ανίχνευση της ενζυμικής δραστηριότητας. Η ποσότητα του παραγόμενου έγχρωμου προϊόντος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του ενζύμου, η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του ειδικού αντισώματος που συνδέθηκε με το αντιγόνο.

Αρχικά, πλάκες μικροτιτλοδότησης 96-θέσεων καλύφθηκαν με 5 µg/ml διαλυτού αντιγόνου ή χημεικού πολυπεπτιδίου σε διττανθρακικό ρυθμιστικό διάλυμα και επώαστηκαν για 18 ώρες στους 4 °C. Την επόμενη μέρα, οι πλάκες μικροτιτλοδότησης εκπλύθηκαν με το διάλυμα έκπλυσης και επώαστηκαν με το διάλυμα κάλυψης μη ειδικών θέσεων για 2 ώρες στους 37 °C. Ακολούθησε έκπλυση των πλακών μικροτιτλοδότησης με το διάλυμα έκπλυσης. Αραίωση 1:50 των ορών πραγματοποιήθηκε με 1% (w/v) BSA σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS-Tween. Σε όλα τα φρεάτια προστέθηκε ποσότητα 100µl από το παραπάνω διάλυμα. Στην πρώτη στήλη (A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1, H1) προστέθηκαν 100µl από τον αραιωμένο ορό και εφαρμόστηκε η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων. Ακολούθησε επώαση για 2 ώρες στους 37 °C και έκπλυση των πλακών με το διάλυμα έκπλυσης. Για την τιτλοποίηση των IgG αντισωμάτων, ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 37 °C με μονοκλωνικό αντίσωμα συζευγμένο με HRP. Για τους ισότυπους IgG1 και IgG2, αρχικά, έγινε επώαση για 1 ώρα στους 37 °C με το αντίστοιχο βιοτυνωμένο μονοκλωνικό αντίσωμα και έπειτα επώαση στις ίδιες συνθήκες με στρεπταβιδίνη συζευγμένη με HRP. Ακολούθησε έκπλυση των πλακών μικροτιτλοδότησης. Στη συνέχεια, προστέθηκε το υπόστρωμα του ενζύμου TMB (100 µl ανά φρεάτιο) και ο τερματισμός της αντίδρασης έγινε με προσθήκη H₂SO₄ 2M (100 µl ανά φρεάτιο). Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 450 nm με χρήση φασματοφωτομέτρου.

3.2.12 Δοκιμασία λεμφοκυτταρικού πολλαπλασιασμού

Η δοκιμασία λεμφοκυτταρικού πολλαπλασιασμού χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της επαγωγής κλωνικού πολλαπλασιασμού λεμφοκυττάρων σε καλλιέργεια, ύστερα από *in vitro* διέγερση με ένα “ξένο” μόριο, αντιγόνο ή μιτογόνο. Η ειδική έναντι του αντιγόνου απόκριση των λεμφοκυττάρων λαμβάνει χώρα μόνο όταν το άτομο από το οποίο έχουν απομονωθεί τα λεμφοκύτταρα έχει προηγουμένως ανοσοποιηθεί με το συγκεκριμένο αντιγόνο, είτε με φυσική μόλυνση είτε με εμβολιασμό. Ο βαθμός λεμφοκυτταρικού πολλαπλασιασμού προσδιορίζεται από την ενσωμάτωση της τριτιωμένης θυμιδίνης (³[H]-TdR) στο DNA των κυττάρων που διαιρούνται (Cave, 1966), με μέτρηση της ραδιενέργειας σε ειδικό μετρητή β

ακτινοβολίας. Το ποσό της ραδιενέργειας που ενσωματώνεται στο DNA είναι ανάλογο του αριθμού των διαιρούμενων κυττάρων που αντανακλά την απόκριση των λεμφοκυττάρων παρουσία του αντιγόνου.

Οι σπλήνες των ποντικών B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J ομογενοποιήθηκαν με τη βοήθεια εμβόλου σε θρεπτικό υλικό RPMI₁₆₄₀ και το ομογενοποίημα διηθήθηκε από φίλτρο με πόρους διαμέτρου 70 μm. Το διήθημα φυγοκεντρήθηκε (1300 rpm) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 4 ml παγωμένου ACK και επώαστηκε για 3-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να επιτευχθεί λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Εξουδετέρωση του ACK έγινε με την προσθήκη ίσου όγκου θρεπτικού υλικού RPMI και το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε (1300 rpm, 10 λεπτά). Ακολούθησαν δύο εκπλύσεις σε θρεπτικό υλικό RPMI₁₆₄₀ με φυγοκέντρηση και το τελικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε θρεπτικό υλικό RPMI₁₆₄₀ εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS, προκειμένου να προκύψει κυτταρικό εναιώρημα πυκνότητας 1×10^6 κυττάρων/ml. Σε πλάκες καλλιέργειας κυττάρων 96 φρεατίων με κοίλο πυθμένα, τοποθετήθηκαν 200μl/ φρεάτιο από το κυτταρικό εναιώρημα παρουσία 10 μg/ ml του κάθε πολυπεπτιδίου. Κύτταρα σε θρεπτικό υλικό RPMI₁₆₄₀ εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS και κύτταρα παρουσία 6 μg/ml ConA αποτέλεσαν τον αρνητικό και θετικό μάρτυρα ελέγχου της πειραματικής διάταξης, αντίστοιχα. Οι πλάκες διατηρήθηκαν για 96 ώρες σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 37 °C και σταθερής παροχής CO₂, και 18 ώρες πριν από τον τερματισμό της επώασης προστέθηκε στα κύτταρα ³[H]-TdR σε συγκέντρωση 1 μCi/ml. Ακολούθησε λύση των κυττάρων, συλλογή των κυτταρικών λυμάτων σε διηθητικό χαρτί επικαλυμμένο με πλέγμα από μικροσκοπικές ίνες υάλου, ξήρανση των φίλτρων στους 60 °C για 30 λεπτά και τοποθέτησή τους σε ειδικές μεμβράνες, οι οποίες διαποτίστηκαν με υγρό σπινθηρισμού. Ο πολλαπλασιασμός ειδικών κλώνων έναντι των πεπτιδίων προσδιορίστηκε από το βαθμό πρόσληψης της ³[H]-TdR, με μέτρηση της εκπεμπόμενης β-ακτινοβολίας σε ειδικό μετρητή και οι τιμές εκφράστηκαν σε κρούσεις ανά λεπτό (counts per minute, cpm).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΠΛΑΓΧΝΙΚΗΣ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ ΣΕ ΠΟΝΤΙΚΟΥΣ

4.1.1 Φυλές BALB/c και C57BL/6

Για την ανάπτυξη του πειραματικού μοντέλου της σπλαγχνικής λεϊσμανίασης χρησιμοποιήθηκαν θηλυκοί ποντικοί 6-8 εβδομάδων των φυλών BALB/c και C57BL/6 ως ομάδες ελέγχου, η προμήθεια των οποίων έγινε από το ΤΖΠΒΕ του ΕΙΠ. Χαρακτηριστικό και των δυο φυλών ποντικών είναι η ευαισθησία τους στη μόλυνση με παράσιτα *L. infantum*. Αυτοί οι ποντικοί φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο *Slc11a1*. Το γονίδιο *Slc11a1* (γνωστό και ως *Nramp1* και *Lsh*) κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη-αντλία στα φαγοσώματα των μακροφάγων, η οποία μεταφέρει τα ιόντα Fe^{2+} και Mn^{2+} στο κυτταρόπλασμα και περιορίζει τη διαθεσιμότητα σιδήρου στο παράσιτο. Στους ποντικούς με μεταλλαγμένο γονίδιο, κάτι τέτοιο δεν είναι δυνατό με αποτέλεσμα την ευαισθησία στη μόλυνση. Διαφορά τους αποτελεί το γεγονός ότι η φυλή C57BL/6 (θεραπευμένος φαινότυπος) καταφέρνει να αντιμετωπίσει κάποια στιγμή πιο αποτελεσματικά τη μόλυνση σε σχέση με τη φυλή BALB/c (μη θεραπευμένος φαινότυπος).

4.1.2 Δημιουργία αποικίας της διαγονιδιακής σειράς ποντικών B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J και έλεγχος διατήρησης διαγονιδίου

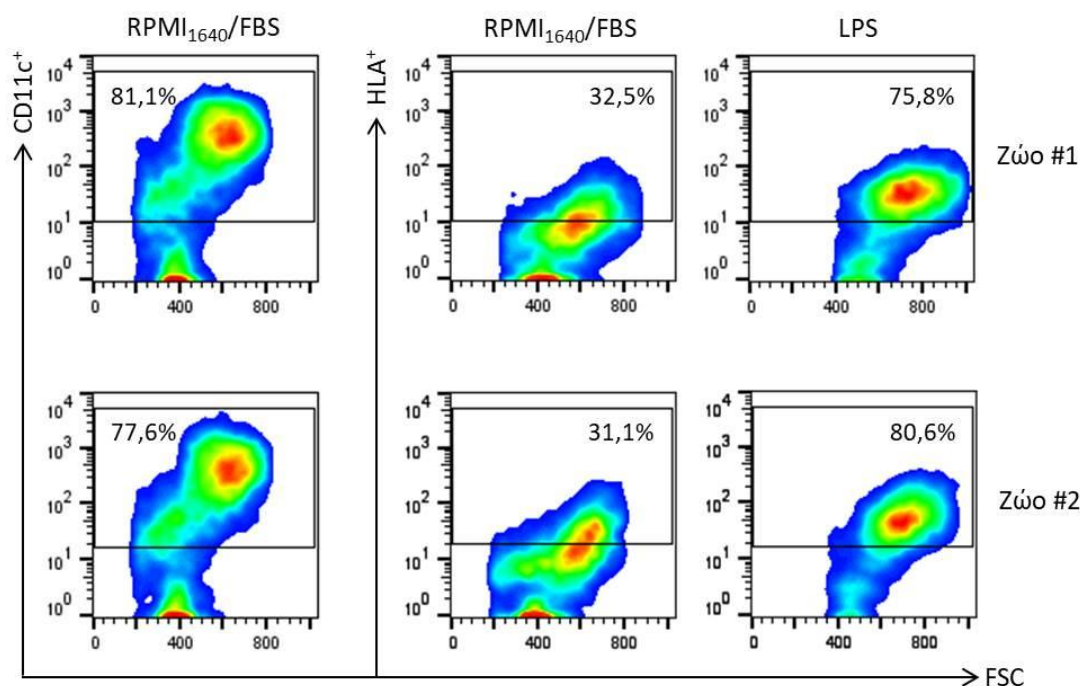
Οι ποντικοί B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J φέρουν ένα διαγονίδιο, το *aad*, το οποίο κωδικοποιεί ένα υβριδικό μόριο MHC τάξης I που αποτελείται από τις $\alpha 1$ και $\alpha 2$ επικράτειες (εξωκυτταρικές) όμοιες με τις αντίστοιχες του μορίου HLA-A2.1 του ανθρώπου, ενώ η $\alpha 3$ επικράτεια και η $\beta 2$ -μικροσφαιρίνη μοιάζουν με τις αντίστοιχες του μορίου H2-D^d ποντικών της φυλής BALB/c. Το υβριδικό μόριο MHC τάξης I παρουσιάζει και αναγνωρίζει πεπτίδια όμοια με εκείνα που παρουσιάζουν και αναγνωρίζουν τα μόρια HLA-A2.1 στους ανθρώπους που φέρουν το συγκεκριμένο αλληλόμορφο, με πληθυσμιακή κάλυψη 72,2% στην Καυκάσια φυλή.



Εικόνα 4.1 Η προμήθεια της διαγονιδιακής σειράς ποντικών B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J έγινε από την εταιρεία The Jackson Laboratory των ΗΠΑ. Οι αναπαραγωγές των ποντικών για τη δημιουργία αποικίας πραγματοποιήθηκαν σε

συμβατικούς κλωβούς επιφάνειας 530 cm² σε SPF συνθήκες στις εγκαταστάσεις του ΤΖΠΒΕ του ΕΙΠ.

Για τη δημιουργία αποικίας, έγινε διασταύρωση της πρώτης θυγατρικής γενιάς και ποντικοί ηλικίας 6-8 εβδομάδων από τη δεύτερη θυγατρική γενιά χρησιμοποιήθηκαν για τις πειραματικές ανάγκες της παρούσας μελέτης (Εικόνα 4.1). Προκειμένου να διαπιστωθεί η διατήρηση του διαγονιδίου στη δεύτερη θυγατρική γενιά των B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Eng/J ποντικών, χρησιμοποιήθηκαν δενδριτικά κύτταρα επτά ημερών από προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα μυελού των οστών αντιπροσωπευτικών απογόνων. Για το χαρακτηρισμό του παραγόμενου πληθυσμού, τα διαφοροποιημένα κύτταρα του μυελού των οστών αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής ως προς την έκφραση του δείκτη CD11c με τη βοήθεια σημασμένου μονοκλωνικού αντισώματος. Η ανάλυση έδειξε διαφοροποίηση των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων του μυελού σε CD11c⁺ δενδριτικά κύτταρα σε ποσοστό >75% του συνολικού πληθυσμού (Εικόνα 4.2).



Εικόνα 4.2 Χαρακτηρισμός διαφοροποιημένων κυττάρων του μυελού των οστών αντιπροσωπευτικών B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Eng/J ποντικών δεύτερης θυγατρικής γενιάς με χρήση σημασμένου μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του μορίου CD11c και έλεγχος διατήρησης του υβριδικού διαγονιδίου στα δενδριτικά κύτταρα ύστερα από επίδραση με LPS. Χρώση του HLA-A2.1/H2-D μορίου MHC τάξης I με αντίσωμα έναντι του μορίου HLA-A2.1 σημασμένο με φυκοερυθρίνη και FACS ανάλυση.

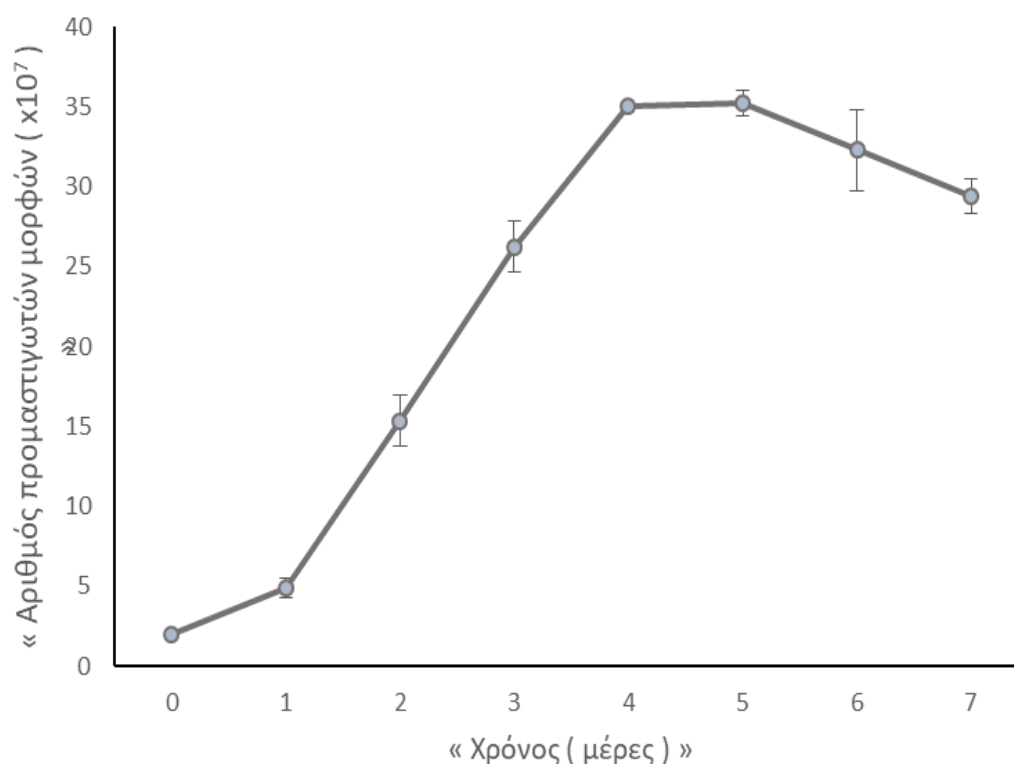
Ο έλεγχος της διατήρησης του υβριδικού διαγονιδίου στη δεύτερη θυγατρική γενιά των ποντικών της διαγονιδιακής σειράς, πραγματοποιήθηκε στα παραγόμενα κύτταρα με τη βοήθεια ειδικού αντισώματος έναντι του μορίου HLA-A2.1 και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (Εικόνα 4.2). Σύμφωνα με τα

αποτελέσματα, τα δενδριτικά κύτταρα αντιπροσωπευτικών απογόνων της δεύτερης θυγατρικής γενιάς εξέφραζαν στην επιφάνειά τους το HLA-A2.1 μόριο σε ποσοστό περίπου 32% απουσία διέγερσης, το οποίο έφτασε έως και 80,6% παρουσία του παράγοντα LPS που επάγει την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων.

4.2. ΣΤΕΛΕΧΟΣ ΜΗΟΜ/GR/2001/GH8 ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ *L. infantum*

4.2.1 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια κλειστού τύπου του παρασίτου *L. infantum* GH8, για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών της ανάπτυξής του και την παρασκευή διαλυτού αντιγόνου (Soluble *Leishmania* Antigen, SLA). Η ανάκτηση του παρασίτου έγινε από το υγρό άζωτο και ο ρυθμός ανάπτυξης αξιολογήθηκε έπειτα από καθημερινή καταμέτρηση του συνολικού αριθμού των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου στην καλλιέργεια, για χρονικό διάστημα μίας εβδομάδας. Η καμπύλη ανάπτυξης παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.1.



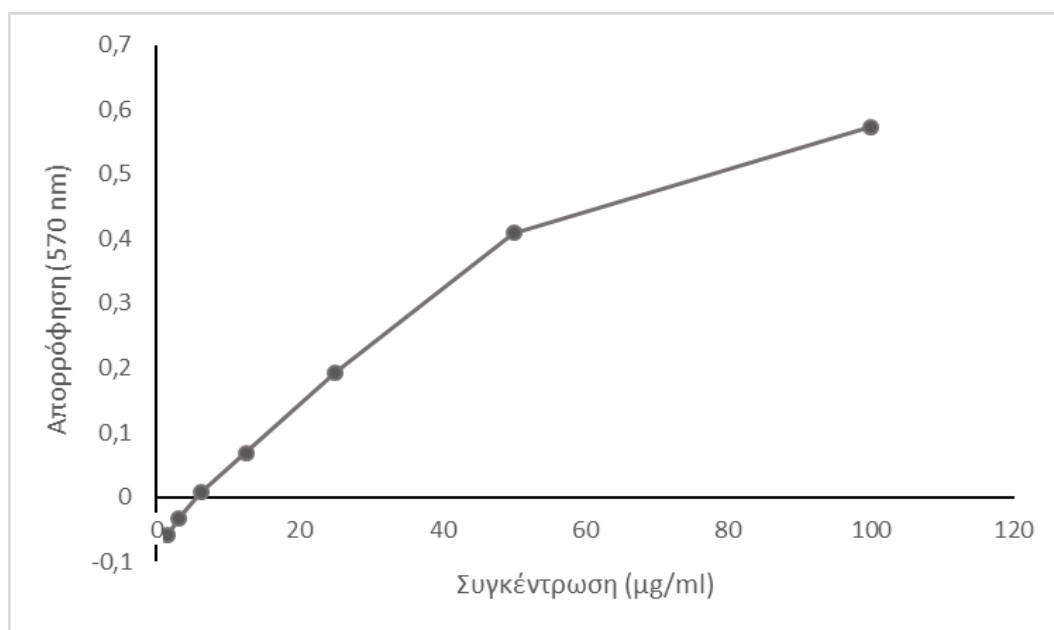
Σχήμα 4.1 Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους ΜΗΟΜ/GR/2001/GH8 του είδους *L. infantum*, για χρονικό διάστημα μίας εβδομάδας ύστερα από ενοφθαλμισμό του θρεπτικού υλικού με 2×10^7 παράσιτα.

Παρατηρήθηκαν οι φάσεις ανάπτυξης μίας κλειστής καλλιέργειας: λανθάνουσα, εκθετική, στατική και φάση θανάτου. Στη **λανθάνουσα φάση**, ο πληθυσμός του παρασίτου παρέμεινε σχετικά σταθερός (πρόκειται για το χρονικό

διάστημα προσαρμογής του παρασίτου στις συνθήκες καλλιέργειας). Στην **εκθετική φάση**, παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού του παρασίτου με γρήγορο ρυθμό, καθώς η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε κάτω από άριστες συνθήκες, ως προς την αφθονία θρεπτικών συστατικών, το pH και τη θερμοκρασία. Ακολούθησε η **στατική φάση**, όπου σημειώθηκε αναστολή της αύξησης του πληθυσμού του παρασίτου λόγω περιορισμού του διαθέσιμου χώρου για την ανάπτυξή του, εξάντλησης των θρεπτικών συστατικών ή/και συσσώρευσης τοξικών προϊόντων του μεταβολισμού και, τέλος, η **φάση θανάτου**, όπου ο αριθμός των παρασίτων άρχισε να μειώνεται.

4.2.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΤΟΥ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ – ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών του διαλυτού αντιγόνου, χρησιμοποιήθηκε το Micro BCA Protein Assay Kit. Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση του δικιγχνικού οξέος (BCA) ως αντιδραστήριο ανίχνευσης του μονοσθενούς χαλκού (Cu^{+1}), που σχηματίζεται κατά την αναγωγή του δισθενούς χαλκού (Cu^{+2}), παρουσία πρωτεΐνης σε αλκαλικό περιβάλλον. Δύο μόρια δικιγχνικού οξέος χηλώνουν το Cu^{+1} σχηματίζοντας υδατοδιαλυτό προϊόν ιώδους χρώματος, του οποίου η ένταση είναι γραμμικά ανάλογη της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στο δείγμα και απορροφά στα 570 nm. Από τη φωτομέτρηση προέκυψε η ακόλουθη πρότυπη καμπύλη (Σχήμα 4.2).



Σχήμα 4.2 Πρότυπη καμπύλη με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων αλβουμίνης ορού βοός (Bovine Serum Albumin, BSA) και φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 570 nm.

Με βάση την πρότυπη καμπύλη, υπολογίστηκε η συγκέντρωση πρωτεϊνών του διαλυτού αντιγόνου σε κάθε αραιώση, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.1).

Πίνακας 4.1 Απορρόφηση και υπολογισμός συγκέντρωσης του διαλυτού αντιγόνου στις διαφορετικές αραιώσεις του άγνωστου δείγματος με βάση την πρότυπη καμπύλη.

| ΑΡΑΙΩΣΗ | 1:20 | 1:40 | 1:80 | 1:160 | 1:320 | 1:640 | 1:1280 | 1:2560 |
|--------------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ (570 nm) | 2,434 | 2,031 | 1,272 | 0,790 | 0,472 | 0,277 | 0,166 | 0,101 |
| ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (µg/ml) | --- | --- | --- | --- | 7821,12 | 8301,44 | 9213,44 | 10222,08 |

Στις αραιώσεις 1:20 μέχρι και 1:160, οι απορροφήσεις ήταν εκτός της περιοχής γραμμικότητας και δεν ήταν δυνατός ο υπολογισμός των αντιστοίχων συγκεντρώσεων. Έτσι λοιπόν ο υπολογισμός της τελικής συγκέντρωσης του δείγματος SLA έγινε από τα δεδομένα των αραιώσεων 1:320 μέχρι και 1:2560. Οπότε βρέθηκε ίση με,

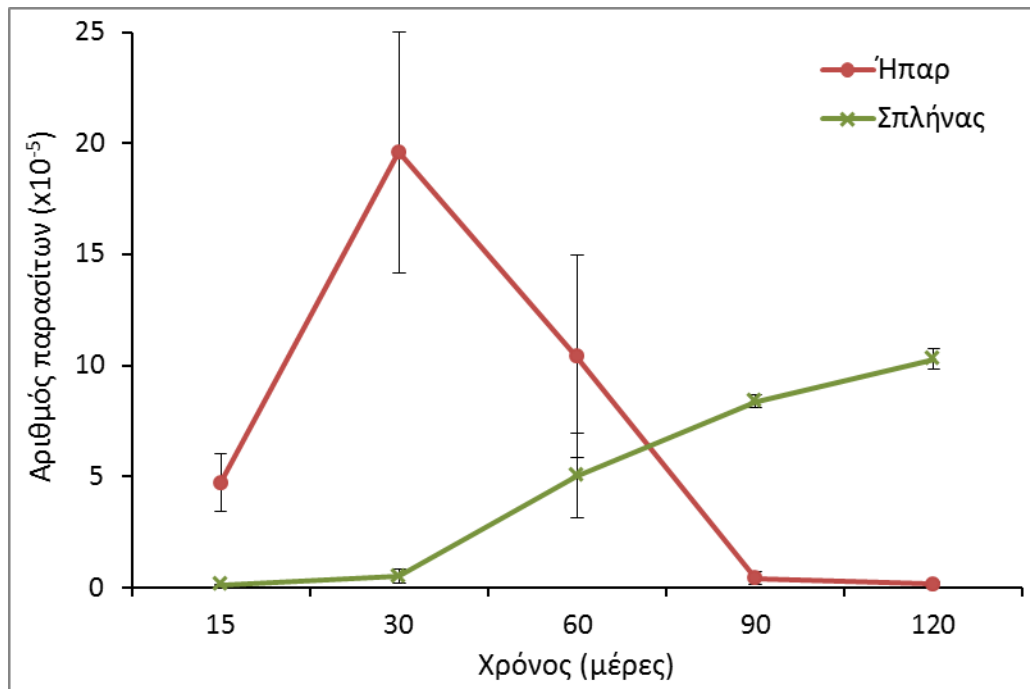
$$\begin{aligned}
 C_{SLA} &= [C_{SLA\ 1:320} + C_{SLA\ 1:640} + C_{SLA\ 1:1280} + C_{SLA\ 1:2560}] / 4 = \\
 &= (7821,12 + 8301,44 + 9213,44 + 10222,08) / 4 \text{ µg/ml} = \\
 &= \mathbf{8.889,52 \text{ µg/ml} \text{ ή } 8,89 \text{ mg/ml}}
 \end{aligned}$$

4.3 ΜΟΛΥΝΣΗ ΚΑΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΠΑΡΑΣΙΤΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ

Σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία μετά τη μόλυνση των ποντικών (15 μέρες, 1, 2, 3 και 4 μήνες), πέντε ζώα από κάθε φυλή απομακρύνθηκαν από τις εγκαταστάσεις του ΤΖΠΒΕ. Η εκτίμηση του παρασιτικού φορτίου έγινε με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων στα ιστοτεμάχια ήπατος και σπλήνα των μολυσμένων ποντικών, όπως έχει περιγραφεί στο κεφάλαιο Y&M. Τα αποτελέσματα για κάθε μια από τις τρεις φυλές περιγράφονται παρακάτω.

4.3.1 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΠΑΡΑΣΙΤΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΣΤΗ ΦΥΛΗ BALB/c

Στο Σχήμα 4.3, απεικονίζεται η πορεία της μόλυνσης στο ήπαρ και το σπλήνα, στην περίπτωση των ποντικών της φυλής BALB/c. Συγκεκριμένα στο ήπαρ, 15 μέρες μετά τη μόλυνση, προσδιορίστηκε ικανοποιητικός αριθμός παρασίτων ($4,74 \times 10^5 \pm 1,30 \times 10^5$ παράσιτα ανά όργανο), ενώ 30 μέρες μετά τη μόλυνση, το παρασιτικό φορτίο έφτασε τη μέγιστη τιμή του ($19,59 \times 10^5 \pm 5,43 \times 10^5$). Στα επόμενα χρονικά σημεία μετά τη μόλυνση, παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση του παρασιτικού φορτίου ($10,39 \times 10^5 \pm 4,56 \times 10^5$ παράσιτα ανά όργανο στις 60 μέρες, $0,44 \times 10^5 \pm 0,27 \times 10^5$ παράσιτα ανά όργανο στις 90 μέρες και $0,15 \times 10^5 \pm 0,12 \times 10^5$ παράσιτα ανά όργανο στις 120 μέρες).



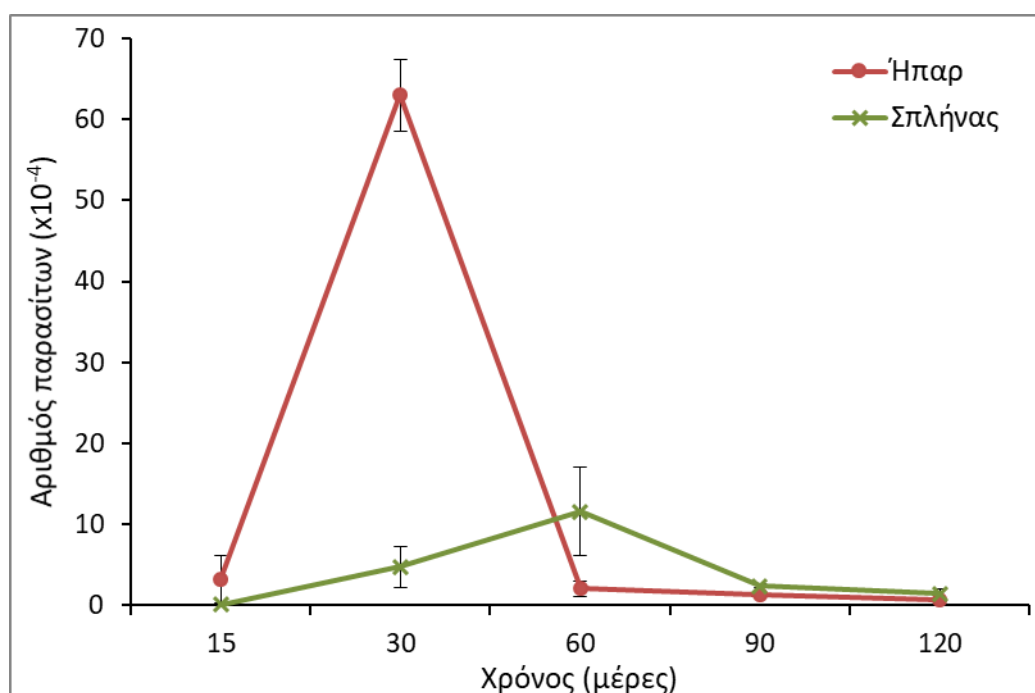
Σχήμα 4.3 Εκτίμηση του παρασιτικού φορτίου στο ήπαρ και το σπλήνα ποντικών της φυλής BALB/c με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, 15, 30, 60, 90 και 120 μέρες μετά τη μόλυνση με το στέλεχος MHOM/GR/2001/GH8 του παρασίτου *L. infantum*.

Στο σπλήνα, το παρασιτικό φορτίο ήταν χαμηλό 15 μέρες μετά τη μόλυνση ($0,13 \times 10^5 \pm 0,042 \times 10^5$ παράσιτα ανά όργανο), τετραπλασιάστηκε στις 30 μέρες ($0,52 \times 10^5 \pm 0,33 \times 10^5$ παράσιτα ανά όργανο) και συνέχισε να αυξάνεται ($5,05 \times 10^5 \pm 1,89$ παράσιτα ανά όργανο στις 60 μέρες και $8,40 \times 10^5 \pm 0,29$ παράσιτα ανά όργανο στις 90 μέρες), φτάνοντας τη μέγιστη τιμή ($10,23 \times 10^5 \pm 0,46 \times 10^5$ παράσιτα ανά όργανο) στις 120 μέρες μετά τη μόλυνση.

Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαίωσαν το πειραματικό μοντέλο σπλαγγικής λεισμανίασης σε ποντικούς της φυλής BALB/c, όπως είναι γνωστό από προηγούμενες μελέτες. Οι συγκεκριμένοι ποντικοί ήταν ευαίσθητοι στη μόλυνση από το παράσιτο *L. infantum* εκδηλώνοντας μη θεραπευμένο φαινότυπο, καθώς σε αντίθεση με το ήπαρ που αυτοιάθηκε στο σπλήνα παρατηρήθηκε εγκατάσταση της μόλυνσης.

4.3.2 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΠΑΡΑΣΙΤΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΣΤΗ ΦΥΛΗ C57BL/6

Η πορεία της μόλυνσης στο ήπαρ και το σπλήνα των ποντικών της φυλής C57BL/6, απεικονίζεται στο Σχήμα 4.4. Στο ήπαρ, η καμπύλη του παρασιτικού φορτίου ήταν παρόμοια με αυτή των ποντικών της φυλής BALB/c με χαμηλότερες όμως τιμές. Πιο συγκεκριμένα, 15 μέρες μετά τη μόλυνση στους ποντικούς της φυλής C57BL/6, προσδιορίστηκε αριθμός παρασίτων ίσος με $3,19 \times 10^4 \pm 2,95 \times 10^4$, ο οποίος αυξήθηκε στις 30 μέρες σημειώνοντας μέγιστη τιμή ($62,98 \times 10^4 \pm 4,46 \times 10^4$ παράσιτα ανά όργανο). Ακολούθως, 60 μέρες μετά τη μόλυνση σημειώθηκε σημαντική μείωση του παρασιτικού φορτίου ($2,11 \times 10^4 \pm 0,94 \times 10^4$ παράσιτα ανά όργανο), η οποία συνεχίστηκε στα επόμενα χρονικά σημεία ($1,33 \times 10^4 \pm 0,45 \times 10^4$ παράσιτα ανά όργανο στις 90 μέρες και $0,65 \times 10^4 \pm 0,28 \times 10^4$ παράσιτα ανά όργανο στις 120 μέρες μετά τη μόλυνση).



Σχήμα 4.4 Εκτίμηση του παρασιτικού φορτίου στο ήπαρ και το σπλήνα ποντικών της φυλής C57BL/6 με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, 15, 30, 60, 90 και 120 μέρες μετά τη μόλυνση με το στέλεχος MHOM/GR/2001/GH8 του παρασίτου *L. infantum*.

Στο σπλήνα, η καμπύλη του παρασιτικού φορτίου των ποντικών της φυλής C57BL/6 διέφερε από την αντίστοιχη των ποντικών της φυλής BALB/c. Ενώ, το παρασιτικό φορτίο ήταν χαμηλό 15 μέρες μετά τη μόλυνση ($0,10 \times 10^4 \pm 0,08 \times 10^4$ παράσιτα ανά όργανο) και αυξήθηκε σταδιακά στις 30 ($4,78 \times 10^4 \pm 2,51 \times 10^4$ παράσιτα ανά όργανο) και 60 μέρες ($11,58 \times 10^4 \pm 5,43 \times 10^4$ παράσιτα ανά όργανο), έπειτα ακολούθησε σημαντική μείωση ($2,43 \times 10^4 \pm 0,22 \times 10^4$ παράσιτα ανά όργανο

στις 90 μέρες και $1,49 \times 10^4 \pm 0,63 \times 10^4$ παράσιτα ανά όργανο στις 120 μέρες μετά τη μόλυνση).

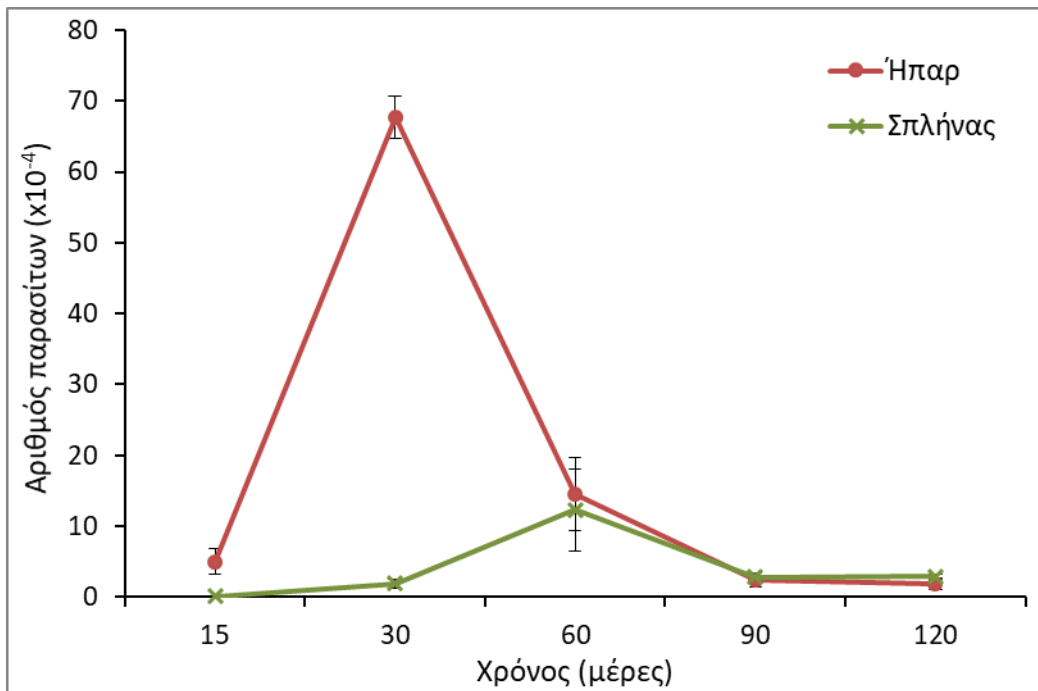
Συμπερασματικά, οι ποντικοί της φυλής C57BL/6 είναι ευαίσθητοι στη μόλυνση από το παράσιτο *L. infantum* όπως και οι ποντικοί της φυλής BALB/c. Ωστόσο, φαίνεται ότι οι πρώτοι καταφέρνουν να ελέγξουν τη μόλυνση, προχωρώντας σε κάποιο βαθμό ίασης.

4.3.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΠΑΡΑΣΙΤΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΣΤΟΥΣ ΠΟΝΤΙΚΟΥΣ ΤΗΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J

Στο Σχήμα 4.5 απεικονίζεται η πορεία της μόλυνσης στους ποντικούς της διαγονιδιακής σειράς B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J. Στο ήπαρ, 15 μέρε μετά την μόλυνση, προσδιορίστηκε αριθμός παρασίτων ίσος με $5,02 \times 10^4 \pm 1,76 \times 10^4$, ο οποίος αυξήθηκε στις 30 μέρες ($67,75 \times 10^4 \pm 3,00 \times 10^4$ παράσιτα ανά όργανο), φτάνοντας σε αυτό το χρονικό σημείο τη μέγιστη τιμή του. Στη συνέχεια, σημειώθηκε σημαντική μείωση του παρασιτικού φορτίου ($14,53 \times 10^4 \pm 5,16 \times 10^4$ παράσιτα ανά όργανο στις 60 μέρες και $2,41 \times 10^4 \pm 1,01 \times 10^4$ παράσιτα ανά όργανο στις 90 μέρες μετά τη μόλυνση), η οποία συνεχίστηκε μέχρι και τις 120 μέρες μετά τη μόλυνση ($1,81 \times 10^4 \pm 0,73 \times 10^4$ παράσιτα ανά όργανο).

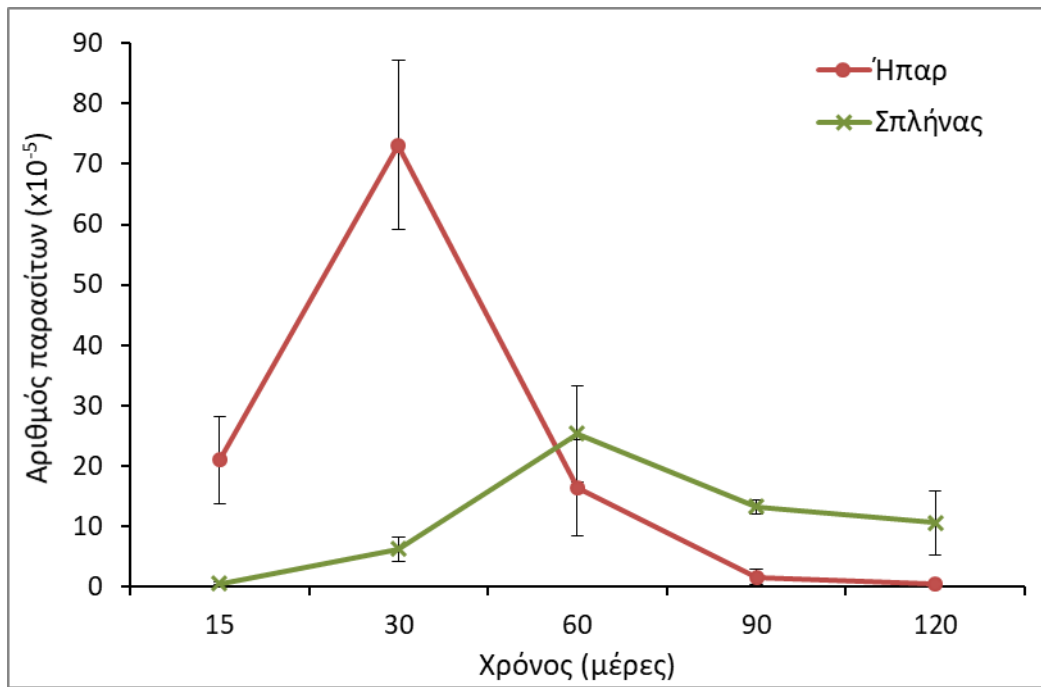
Στο σπλήνα, μικρός αριθμός παρασίτων προσδιορίστηκε 15 μέρες μετά τη μόλυνση ($0,10 \times 10^4 \pm 0,04 \times 10^4$ παράσιτα ανά όργανο). Το παρασιτικό φορτίο αυξήθηκε στις 30 μέρες μετά τη μόλυνση ($0,10 \times 10^4 \pm 0,04 \times 10^4$ παράσιτα ανά όργανο), ενώ 60 μέρες μετά τη μόλυνση έφτασε τη μέγιστη τιμή του ($12,29 \times 10^4 \pm 5,79 \times 10^4$ παράσιτα ανά όργανο). Στα επόμενα χρονικά σημεία, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του παρασιτικού φορτίου ($2,77 \times 10^4 \pm 0,66 \times 10^4$ παράσιτα ανά όργανο στις 90 μέρες και $2,91 \times 10^4 \pm 0,28 \times 10^4$ παράσιτα ανά όργανο στις 120 μέρες μετά τη μόλυνση).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει πως η πορεία της μόλυνσης, τόσο στο ήπαρ όσο και στο σπλήνα, των ποντικών της διαγονιδιακής σειράς B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J ακολουθεί το πρότυπο των ποντικών της φυλής C57BL/6. Η παρατήρηση αυτή δικαιολογείται από το γεγονός ότι η φυλή C57BL/6 αποτελεί το γενετικό υπόβαθρο της διαγονιδιακής σειράς.



Σχήμα 4.5 Εκτίμηση του παρασιτικού φορτίου στο ήπαρ και το σπλήνα ποντικών της διαγονιδιακής σειράς B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Eng/J με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, 15, 30, 60, 90 και 120 μέρες μετά τη μόλυνση με το στέλεχος MHOM/GR/2001/GH8 του παρασίτου *L. infantum*.

Για την επιβεβαίωση της πορείας της μόλυνσης στους ποντικούς της διαγονιδιακής σειράς B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Eng/J, εφαρμόστηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Σύμφωνα με το Σχήμα 4.6, η καμπύλη του παρασιτικού φορτίου τόσο για το ήπαρ όσο και για το σπλήνα, είναι αντίστοιχη της καμπύλης του παρασιτικού φορτίου που προέκυψε από τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Ωστόσο, οι τιμές που προσδιορίστηκαν, ήταν μεγαλύτερες στην περίπτωση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Για παράδειγμα, στο ήπαρ η τιμή του παρασιτικού φορτίου που προσδιορίστηκε με τη μοριακή μέθοδο 30 μέρες μετά τη μόλυνση ήταν $73,14 \times 10^5 \pm 13,96 \times 10^5$ παράσιτα ανά όργανο, σαφώς μεγαλύτερη από την τιμή που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων ($67,75 \times 10^4 \pm 3,00 \times 10^4$ παράσιτα ανά όργανο). Στο σπλήνα, η τιμή του παρασιτικού φορτίου στις 60 μέρες μετά τη μόλυνση που προέκυψε από τη μοριακή μέθοδο ήταν $25,37 \times 10^5 \pm 7,97 \times 10^5$ παράσιτα ανά όργανο, ενώ η τιμή του παρασιτικού φορτίου με βάση τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων ήταν $12,29 \times 10^4 \pm 5,79 \times 10^4$ παράσιτα ανά όργανο.



Σχήμα 4.6 Εκτίμηση του παρασιτικού φορτίου στο ήπαρ και το σπλήνα ποντικών της διαγονιδιακής σειράς B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, 15, 30, 60, 90 και 120 μέρες μετά τη μόλυνση με το στέλεχος MHOM/GR/2001/GH8 του παρασίτου *L. infantum*.

Η παραπάνω διαπίστωση δικαιολογείται από το γεγονός ότι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου αποτελεί μια μέθοδο με μεγάλη ευαισθησία, σε σύγκριση με την διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων στην οποία υπεισέρχεται και η υποκειμενικότητα του ερευνητή.

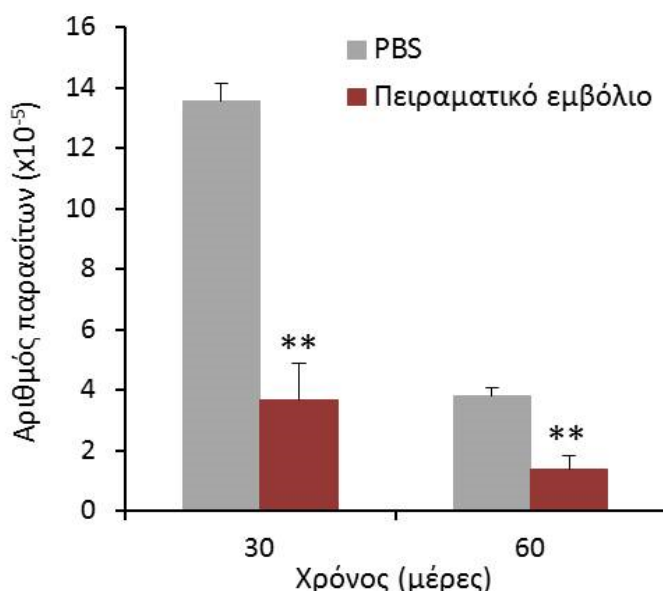
4.4 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΕΜΒΟΛΙΟΥ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΣΠΛΑΓΧΝΙΚΗΣ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ ΣΕ B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J ΠΟΝΤΙΚΟΥΣ

4.4.1 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΠΡΟΦΥΛΑΚΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΕΜΒΟΛΙΟΥ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΠΑΡΑΣΙΤΙΚΟ ΦΟΡΤΙΟ

Η ανάπτυξη του μοντέλου σπλαγχνικής λεϊσμανίασης στους ποντικούς της διαγονιδιακής σειράς B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J έγινε για να προσδιοριστούν τα χρονικά σημεία κατά την πορεία της μόλυνσης, στα οποία μπορεί να αξιολογηθεί η προφυλακτική δράση ενός εμβολίου με βάση το παρασιτικό φορτίο. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, ως κατάλληλα χρονικά σημεία επιλέχθηκαν οι 30 και 60 μέρες μετά τη μόλυνση. Ποντικοί της διαγονιδιακής σειράς B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J ανοσοποιήθηκαν με πειραματικό εμβόλιο το οποίο σχεδιάστηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας Παρασιτώσεων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ και βασίζεται σε χιμαιρικά πολυεπιτοπικά πεπτίδια των ανοσογονικών πρωτεϊνών CPA, KMP-11 και ιστόνη H1 του παρασίτου *L. infantum*. Μία ομάδα ποντικών έλαβε μόνο PBS ως ομάδα ελέγχου. Στη συνέχεια, όλοι οι ποντικοί μολύνθηκαν με ενδοφλέβια

χορήγηση προμαστιγωτών μορφών του στελέχους MHOM/GR/2001/GH8 του παρασίτου *L. infantum*, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο Υ&Μ. Η αξιολόγηση του παρασιτικού φορτίου στα επιλεγμένα χρονικά σημεία έγινε με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων.

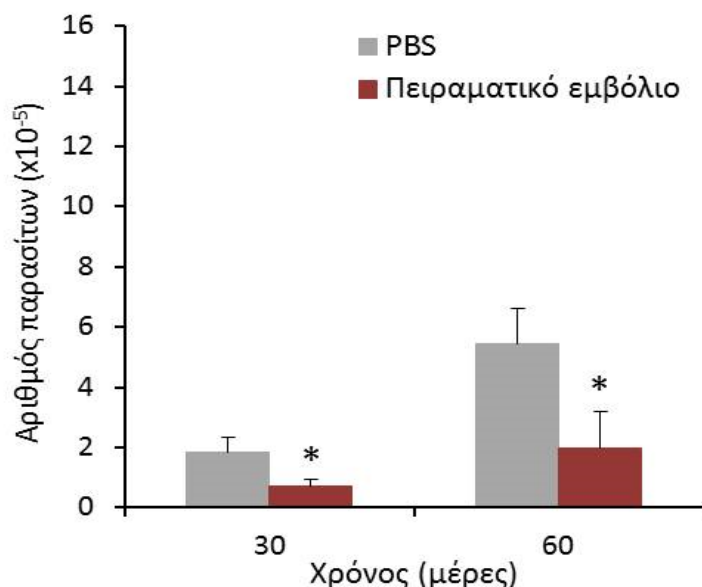
Στο ήπαρ (Σχήμα 4.7), παρατηρήθηκε μείωση του παρασιτικού φορτίου στην ομάδα των ανοσοποιημένων ποντικών σε σύγκριση με την ομάδα ποντικών που έλαβαν μόνο PBS τόσο 30 μέρες μετά τη μόλυνση ($3,68 \times 10^5 \pm 1,17 \times 10^5$ παράσιτα ανά όργανο για την ομάδα των ανοσοποιημένων ποντικών vs $13,55 \times 10^5 \pm 0,60 \times 10^5$ παράσιτα ανά όργανο για την ομάδα των μη ανοσοποιημένων ποντικών), όσο και 60 μέρες μετά τη μόλυνση ($1,36 \times 10^5 \pm 0,46 \times 10^5$ παράσιτα ανά όργανο για την ομάδα των ανοσοποιημένων ποντικών vs $3,81 \times 10^5 \pm 0,25 \times 10^5$ παράσιτα ανά όργανο για την ομάδα των μη ανοσοποιημένων ποντικών).



Σχήμα 4.7 Εκτίμηση του παρασιτικού φορτίου στο ήπαρ ποντικών της διαγονιδιακής σειράς B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Eng/J που ανοσοποιήθηκαν με το πειραματικό εμβόλιο ή έλαβαν μόνο PBS και έπειτα μολύνθηκαν με το στέλεχος MHOM/GR/2001/GH8 του παρασίτου *L. infantum* με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, 30 και 60 μέρες μετά τη μόλυνση.

Ανάλογα ήταν τα αποτελέσματα του παρασιτικού φορτίου στο σπλήνα για τις δύο ομάδες ποντικών (Σχήμα 4.8). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε και στο σπλήνα μείωση του παρασιτικού φορτίου στην ομάδα των ανοσοποιημένων ποντικών σε σύγκριση με την ομάδα ποντικών που έλαβαν μόνο PBS τόσο 30 μέρες μετά τη μόλυνση ($0,70 \times 10^5 \pm 0,23 \times 10^5$ παράσιτα ανά όργανο για την ομάδα των ανοσοποιημένων ποντικών vs $1,84 \times 10^5 \pm 0,49 \times 10^5$ παράσιτα ανά όργανο για την ομάδα των μη ανοσοποιημένων ποντικών), όσο και 60 μέρες μετά τη μόλυνση ($2,00 \times 10^5 \pm 1,21 \times 10^5$ παράσιτα ανά όργανο για την ομάδα των ανοσοποιημένων ποντικών vs $1,84 \times 10^5 \pm 0,49 \times 10^5$ παράσιτα ανά όργανο για την ομάδα των μη ανοσοποιημένων ποντικών).

ποντικών vs $5,46 \times 10^5 \pm 1,16 \times 10^5$ παράσιτα ανά όργανο για την ομάδα των μη ανοσοποιημένων ποντικών).



Σχήμα 4.8 Εκτίμηση του παρασιτικού φορτίου στο σπλήνα ποντικών της διαγονιδιακής σειράς B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Eng/J που ανοσοποιήθηκαν με το πειραματικό εμβόλιο ή έλαβαν μόνο PBS και έπειτα μολύνθηκαν με το στέλεχος MHOM/GR/2001/GH8 του παρασίτου *L. infantum* με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, 30 και 60 μέρες μετά τη μόλυνση.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, υπολογίστηκε το ποσοστό της προστασίας που παρείχε το πειραματικό εμβόλιο στην ομάδα των ανοσοποιημένων ποντικών από τον παρακάτω τύπο.

% προστασία = $\{[\text{αριθμός παρασίτων ομάδας ελέγχου (PBS)} - \text{αριθμός παρασίτων ανοσοποιημένων ποντικών}] / \text{αριθμός παρασίτων ομάδας ελέγχου (PBS)}\} \times 100$

Πίνακας 4.2 % προστασία των ανοσοποιημένων με το πειραματικό εμβόλιο ποντικών 30 και 60 μέρες μετά τη μόλυνση

| ΧΡΟΝΙΚΟ ΣΗΜΕΙΟ (μέρες) | 30 | 60 |
|------------------------|----|----|
| % προστασία | 73 | 64 |

Πίνακας 4.3 % προστασία των ανοσοποιημένων με το πειραματικό εμβόλιο ποντικών 30 και 60 μέρες μετά τη μόλυνση

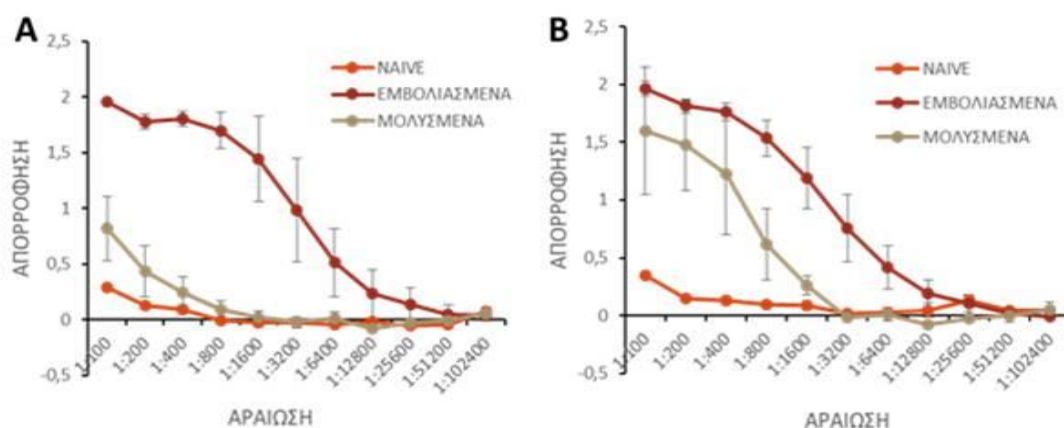
| ΧΡΟΝΙΚΟ ΣΗΜΕΙΟ (μέρες) | 30 | 60 |
|------------------------|----|----|
| % προστασία | 62 | 74 |

Συμπερασματικά, η ανοσοποίηση με το πειραματικό εμβόλιο μείωσε σημαντικά το παρασιτικό φορτίο στο ήπαρ (73% μείωση του παρασιτικού φορτίου, $p < 0,01$) και το σπλήνα (62% μείωση του παρασιτικού φορτίου, $p < 0,05$) 30 μέρες μετά τη μόλυνση, σε σύγκριση με την ομάδα των ποντικών που έλαβαν μόνο PBS και έπειτα μολύνθηκαν. Η εκτίμηση του παρασιτικού φορτίου 60 μέρες μετά τη μόλυνση έδειξε διατήρηση της προφυλακτικής δράσης του πειραματικού εμβολίου και στα δύο όργανα (64% μείωση του παρασιτικού φορτίου στο ήπαρ, $p < 0,01$; και 74% μείωση του παρασιτικού φορτίου στο σπλήνα, $p < 0,05$).

4.4.2 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΧΥΜΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΣΤΟΥΣ ΜΟΛΥΣΜΕΝΟΥΣ ΠΟΝΤΙΚΟΥΣ ΤΗΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J ΠΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΜΕ ΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΕΜΒΟΛΙΟ

Για την εκτίμηση της ύπαρξης ή μη χυμικής ανοσίας, εφαρμόστηκε η ενζυμική μέθοδος ανοσοπροσρόφησης (ELISA) σε δείγματα ορών από ποντικούς της διαγονιδιακής σειράς B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J που ανοσοποιήθηκαν με το πειραματικό εμβόλιο ή έλαβαν PBS και έπειτα μολύνθηκαν με το στέλεχος MHOM/GR/2001/GH8 του παρασίτου *L. infantum*.

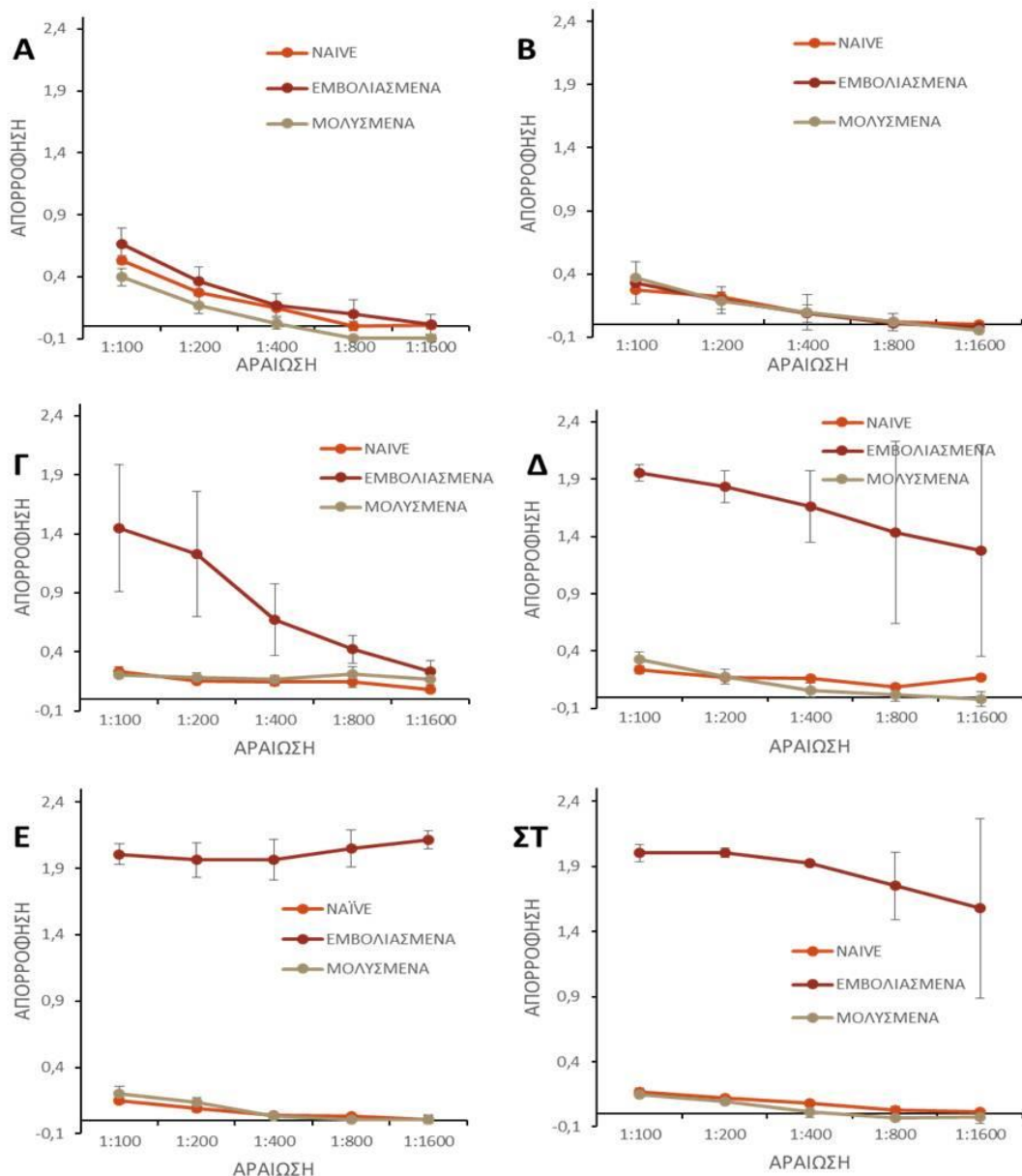
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι ανοσοποιημένοι ποντικοί εμφάνισαν υψηλό τίτλο IgG αντισωμάτων έναντι του διαλυτού αντιγόνου στον ορό τους, τόσο στις 30 (Εικόνα 4.3 Α) αλλά και στις 60 μέρες (Εικόνα 4.3 Β) μετά τη μόλυνση. Χυμική απόκριση παρατηρήθηκε και στους μη ανοσοποιημένους ποντικούς που μολύνθηκαν με το παράσιτο, ωστόσο ο τίτλος των αντισωμάτων ήταν χαμηλότερος στις 30 μέρες μετά τη μόλυνση σε σύγκριση με τους ανοσοποιημένους ποντικούς.



Εικόνα 4.3 Προσδιορισμός ειδικών αντισωμάτων έναντι του διαλυτού αντιγόνου του στελέχους MHOM/GR/2001/GH8 του παρασίτου *L. infantum* με ELISA. Α) IgG αντισώματα στον ορό ποντικών που ανοσοποιήθηκαν με το πειραματικό εμβόλιο ή έλαβαν PBS και έπειτα μολύνθηκαν με το στέλεχος MHOM/GR/2001/GH8 του παρασίτου *L. infantum*, 30 μέρες μετά τη μόλυνση, και Β) IgG αντισώματα στον ορό ποντικών που ανοσοποιήθηκαν με το πειραματικό εμβόλιο ή έλαβαν PBS και έπειτα

μολύνθηκαν με το στέλεχος MHOM/GR/2001/GH8 του παρασίτου *L. infantum* 60 μέρες μετά τη μόλυνση.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η ύπαρξη αντιγονοειδικών IgG αντισωμάτων έναντι των χμαιρικών πολυεπιτοπικών πεπτιδίων των τριών ανοσογονικών πρωτεϊνών CPA, ιστόνης H1 και KMP-11, που εμπεριέχονται στο πειραματικό εμβόλιο. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.8, αντιγονοειδικά IgG αντισώματα ανιχνεύτηκαν μόνο στην ομάδα των ανοσοποιημένων με το πειραματικό εμβόλιο ποντικών έναντι του χμαιρικού πολυεπιτοπικού πεπτιδίου της ιστόνης H1 (Εικόνα 4.8 Γ και Δ) και της KMP-11 (Εικόνα 4.8 Ε και Ζ), τόσο στις 30 όσο και στις 60 μέρες μετά τη μόλυνση.



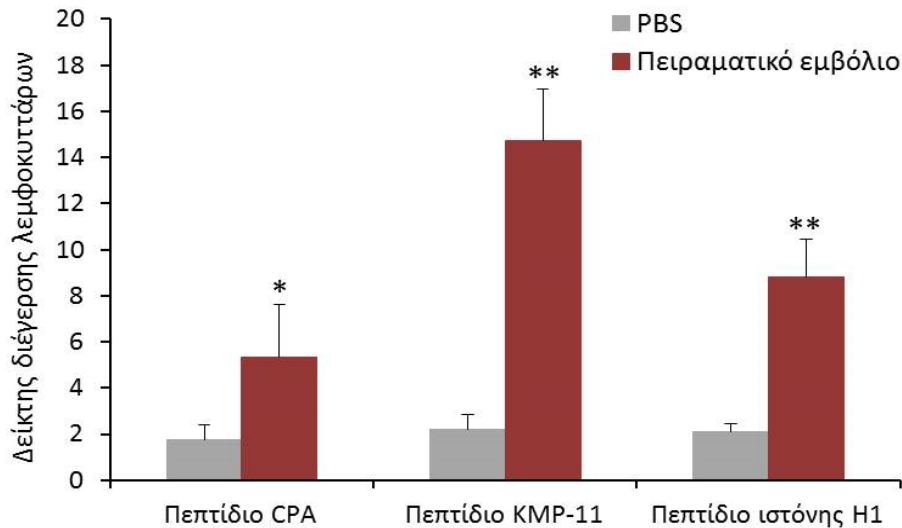
Εικόνα 4.4 Προσδιορισμός των ειδικών IgG αντισωμάτων έναντι των χμαιρικών πολυεπιτοπικών πεπτιδίων των πρωτεϊνών CPA, ιστόνης H1 και KMP-11 με ELISA,

στον ορό των ποντικών της διαγονιδιακής σειράς B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J που ανοσοποιήθηκαν με το πειραματικό εμβόλιο ή έλαβαν PBS και έπειτα μολύνθηκαν με το στέλεχος MHOM/GR/2001/GH8 του παρασίτου *L. infantum*. Α) IgG αντισώματα έναντι του χμαιοειδικού πολυεπιτοπικού πεπτιδίου της CPA 30 μέρες μετά τη μόλυνση, Β) IgG αντισώματα έναντι του χμαιοειδικού πολυεπιτοπικού πεπτιδίου της CPA 60 μέρες μετά τη μόλυνση, Γ) IgG αντισώματα έναντι του χμαιοειδικού πολυεπιτοπικού πεπτιδίου της ιστόνης H1 30 μέρες μετά τη μόλυνση, Δ) IgG αντισώματα έναντι του χμαιοειδικού πολυεπιτοπικού πεπτιδίου της ιστόνης H1 60 μέρες μετά τη μόλυνση, Ε) IgG αντισώματα έναντι του χμαιοειδικού πολυεπιτοπικού πεπτιδίου της KMP-11 30 μέρες μετά τη μόλυνση, και ΣΤ) IgG αντισώματα έναντι του χμαιοειδικού πολυεπιτοπικού πεπτιδίου της KMP-11 60 μέρες μετά τη μόλυνση.

4.4.3 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΣΤΟΥΣ ΜΟΛΥΣΜΕΝΟΥΣ ΠΟΝΤΙΚΟΥΣ ΤΗΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J ΠΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΜΕ ΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΕΜΒΟΛΙΟ

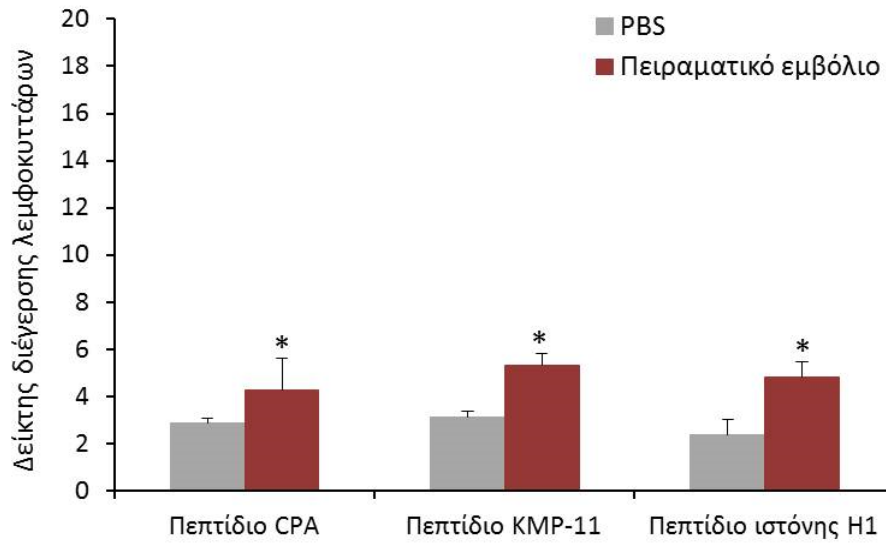
Για την εκτίμηση επαγωγής κυτταρικής ανοσίας, αξιολογήθηκε η ικανότητα των χμαιοειδικών πολυεπιτοπικών πεπτιδίων να προάγουν το λεμφοκυτταρικό πολλαπλασιασμό κυττάρων σπλήνα ποντικών της διαγονιδιακής σειράς B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J που ανοσοποιήθηκαν με το πειραματικό εμβόλιο ή έλαβαν PBS και έπειτα μολύνθηκαν με το στέλεχος MHOM/GR/2001/GH8 του παρασίτου *L. infantum*. Ο πολλαπλασιασμός ειδικών κλώνων έναντι των χμαιοειδικών πολυεπιτοπικών πεπτιδίων προσδιορίστηκε από το βαθμό πρόσληψης της $^3\text{[H]}\text{-TdR}$, με μέτρηση της εκπεμπόμενης β-ακτινοβολίας σε ειδικό μετρητή και οι τιμές δόθηκαν σε κρούσεις ανά λεπτό (counts per minute, cpm). Με βάση τα αποτελέσματα του μετρητή β-ακτινοβολίας, υπολογίστηκε ο δείκτης διέγερσης (Stimulation Index, $\text{SI}=\text{cpm}$ κυττάρων σπλήνα που έχουν διεγερθεί με το αντιγόνο/ cpm κυττάρων σπλήνα σε καλλιεργητικό μέσο). Γενικά $\text{SI}>2$, θεωρείται ως θετική απόκριση των λεμφοκυττάρων στο αντιγόνο.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.9, τα χμαιοειδικά πολυεπιτοπικά πεπτίδια των πρωτεϊνών CPA, KMP-11 και ιστόνης H1, προκάλεσαν πολλαπλασιασμό των κυττάρων σπλήνα που είχαν απομονωθεί από τους ανοσοποιημένους με το πειραματικό εμβόλιο ποντικούς 30 μέρες μετά τη μόλυνση, συγκριτικά με τα κύτταρα από το σπλήνα ποντικών που δεν ανοσοποιήθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, το χμαιοειδικό πολυεπιτοπικό πεπτίδιο της KMP-11 προκάλεσε τον ισχυρότερο λεμφοκυτταρικό πολλαπλασιασμό ($\text{SI}: 14,73 \pm 2,23$), ενώ ακολούθησαν το χμαιοειδικό πολυεπιτοπικό πεπτίδιο της ιστόνης H1 ($\text{SI}: 8,80 \pm 1,65$) και αυτό της CPA ($\text{SI}: 5,33 \pm 2,27$).



Σχήμα 4.9 Επαγωγή λεμφοκυτταρικού πολλαπλασιασμού ύστερα από διέγερση με τα χμαιρικά πολυεπιτοπικά πεπτίδια των πρωτεϊνών CPA, KMP-11 και ιστόνης H1 κυττάρων σπλήνα ποντικών της διαγονιδιακής σειράς B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Engel που ανοσοποιήθηκαν με το πειραματικό εμβόλιο ή έλαβαν μόνο PBS και έπειτα μολύνθηκαν με το στέλεχος MHOM/GR/2001/GH8 του παρασίτου *L. infantum*, 30 μέρες μετά τη μόλυνση. Ο λεμφοκυτταρικός πολλαπλασιασμός προσδιορίστηκε από το βαθμό πρόσληψης ^3H -TdR. Τα αποτελέσματα εκφράζονται με το **δείκτη διέγερσης** \pm SD, και οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές επισημαίνονται με * ($p < 0,05$) και ** ($p < 0,01$).

Σε ότι αφορά τα κύτταρα σπλήνα που απομονώθηκαν από τους ανοσοποιημένους και μη ανοσοποιημένους ποντικούς στις 60 μέρες μετά τη μόλυνση (Σχήμα 4.10), παρατηρήθηκε λεμφοκυτταρικός πολλαπλασιασμός ύστερα από διέγερση με κάθε ένα από τα χμαιρικά πολυεπιτοπικά πεπτίδια αλλά σε μικρότερο βαθμό συγκριτικά με τις 30 μέρες. Πιο συγκεκριμένα, με βάση το δείκτη διέγερσης και τα τρία χμαιρικά πολυεπιτοπικά πεπτίδια βρέθηκαν το ίδιο ικανά να προκαλούν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σπλήνα των ανοσοποιημένων ποντικών (SI: $4,3 \pm 1,30$ ύστερα από διέγερση με το χμαιρικό πολυεπιτοπικό πεπτίδιο της CPA, SI: $5,30 \pm 0,53$ ύστερα από διέγερση με το χμαιρικό πολυεπιτοπικό πεπτίδιο της KMP-11 και SI: $4,80 \pm 0,66$ ύστερα από διέγερση με το χμαιρικό πολυεπιτοπικό πεπτίδιο της ιστόνης H1).



Σχήμα 4.10 Επαγωγή λεμφοκυτταρικού πολλαπλασιασμού ύστερα από διέγερση με τα χιμαιρικά πολυεπιτοπικά πεπτίδια των πρωτεϊνών CPA, KMP-11 και ιστόνης H1 κυττάρων σπλήνα ποντικών της διαγονιδιακής σειράς B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J που ανοσοποιήθηκαν με το πειραματικό εμβόλιο ή έλαβαν μόνο PBS και έπειτα μολύνθηκαν με το στέλεχος MHOM/GR/2001/GH8 του παρασίτου *L. infantum*, 60 μέρες μετά τη μόλυνση. Ο λεμφοκυτταρικός πολλαπλασιασμός προσδιορίστηκε από το βαθμό πρόσληψης $^3\text{[H]}$ -TdR. Τα αποτελέσματα εκφράζονται με το **δείκτη διέγερσης** \pm SD, και οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές επισημαίνονται με * ($p < 0,05$).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πειραματική μόλυνση ποντικών με τα παράσιτα που προκαλούν ανθρώπινη σπλαγγική λείσμανίαση, έχει ως αποτέλεσμα την εγκατάσταση της μόλυνσης στο ήπαρ και το σπλήνα. Στις περισσότερες φυλές ποντικών, τα παράσιτα τελικά εκκαθαρίζονται από το ήπαρ και η ηπατική αντοχή στη λοίμωξη προκύπτει από ένα ευρύ φάσμα τελεστικών και ρυθμιστικών οδών, από πλευράς του ξενιστή. Αντίθετα, τα παράσιτα παραμένουν στον σπλήνα με μηχανισμούς που είναι λιγότερο κατανοητοί. Η μη εκκαθάριση των παρασίτων συνοδεύεται από την αποτυχία σχηματισμού κοκκιωμάτων και από μια ποικιλία παθολογικών αλλαγών, συμπεριλαμβανομένης της σπληνομεγαλίας και της διαταραχής της μικροαρχιτεκτονικής του σπληνικού ιστού.

Στην παρούσα μελέτη, η ευαίσθητη δοκιμασία των διαδοχικών αραιώσεων, χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του στελέχους GH8 του παρασίτου *L. infantum*, σε ιστοτεμάχια ήπατος και σπλήνα, μολυσμένων ποντικών των φυλών BALB/c, C57BL/6 και της διαγονιδιακής σειράς B6.Cg-Tg(HLA/H2-D)2Eng/J, σε διάφορα χρονικά σημεία. Έγινε εμφανές ότι ο αριθμός των παρασίτων που ανιχνεύθηκε στο ήπαρ των ποντικών της φυλής BALB/c, μετά το μέγιστο που σημείωσε στο χρονικό σημείο των 30 ημερών, κατέγραψε φθίνουσα πορεία. Αντίθετα, στην περίπτωση του σπλήνα, έφθασε σε κάποια επίπεδα και διατηρήθηκε. Τα δεδομένα αυτά, κατέδειξαν μια σαφή διατήρηση του παρασίτου στο σπλήνα, παρόλο που στο ήπαρ, φάνηκε να συμβαίνει εκκαθάριση αυτού. Το γεγονός αυτό, υποδηλώνει ότι ακόμη και στο ίδιο ζώο, η ανοσολογική αντίδραση ποικίλλει από ιστό σε ιστό, κάτι που έρχεται σε συμφωνία με ευρήματα προγενέστερης μελέτης (Carrion et al, 2006). Στους ποντικούς της φυλής C57BL/6, καταγράφηκε διαφορά στη περίπτωση των ιστοτεμαχίων του σπλήνα. Ο ιστός αυτός όπως και το ήπαρ, έδειξε επιτυχή αντίδραση έναντι του παρασίτου, οδηγώντας σε έλεγχο της μόλυνσης. Αντίστοιχη εικόνα προέκυψε και στους ποντικούς της διαγονιδιακής σειράς B6.Cg-Tg(HLA/H2-D)2Eng/J. Η παρατήρηση αυτή δικαιολογείται από το γεγονός ότι, η φυλή C57BL/6 αποτελεί το γενετικό υπόβαθρο της διαγονιδιακής φυλής. Και στις δυο φυλές διαπιστώθηκε ότι δε μπορεί να επιτευχθεί έλεγχος της μόλυνσης στα πρώιμα στάδια, γεγονός που επιβεβαιώνει προηγούμενες μελέτες (Kaye et al, 2004). Η ανάπτυξη των αμαστιγωτών μορφών είναι προφανής από τις πρώτες μέρες μετά τη μόλυνση, όσον αφορά το ήπαρ. Ο έλεγχος στο όργανο αυτό βασίζεται στην ανάπτυξη και ωρίμανση κοκκιωμάτων, ως ανοσολογική απάντηση. Αντιθέτως, έπειτα από ένα χρονικό διάστημα δίχως εμφανή ανάπτυξη, ο σπλήνας εμφανίζει εκτεταμένη σπληνομεγαλία, απώλεια της αρχιτεκτονικής υφής του και παρουσία των αμαστιγωτών μορφών (Engwerda et al., 2004). Τελικώς οι ποντικοί των φυλών BALB/c και C57BL/6, φάνηκαν αμφοτεροί ευαίσθητοι στη λοίμωξη, με ένα μη θεραπευμένο (non-cured) και θεραπευμένο (cured) προφίλ, αντιστοίχως (Gangneux et al., 2000).

Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, η εξήγηση των παραπάνω αποτελεσμάτων μπορεί να αποδοθεί στα παρακάτω γεγονότα. Έπειτα από τη χορήγηση στην πλευρική φλέβα της ουράς του ποντικού, τα παράσιτα εισέρχονται στο ήπαρ μέσω της πυλαίας φλέβας και εισβάλλουν σε μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα. Στο εσωτερικό των δυο αυτών τύπων κυττάρων, οι προμαστιγώτες μορφές μετατρέπονται σε αμαστιγώτες. Σε αυτό το σημείο, το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα του ποντικού, αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των παρασίτων *Leishmania*. Τα μακροφάγα που έχουν παρασιτιστεί (κύτταρα Kupffer), εκκρίνουν χημειοκίνες (CCL3, CCL2 και CXCL10), διεγείροντας τη στρατολόγηση μονοκυττάρων και κοκκιοκυττάρων (Stanley & Engwerda, 2007). Παρά την ενεργοποίηση αυτών των μηχανισμών, οι αμαστιγώτες μορφές επιβιώνουν κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης (έως δύο εβδομάδες μετά τη μόλυνση) σε περιβάλλον με μικρές ποσότητες φλεγμονωδών κυτταροκινών, απουσία ενεργοποιημένων T κυττάρων. Συνεπώς, ο αριθμός των παρασίτων στο ήπαρ φθάνει σε μια κορυφή (Σχήμα 4.3, 4.4 και 4.5). Παρ' όλα αυτά, το φορτίο των παρασίτων μπορεί να μειωθεί δραματικά με την απόκτηση της κοκκιωματώδους απόκρισης κατά το επόμενο στάδιο μόλυνσης.

Πρόσφατη έρευνα παρουσιάζει ένα μοντέλο στο οποίο τα ειδικά T κύτταρα έναντι του παρασίτου, ενεργοποιούνται αρχικά στο σπλήνα και στη συνέχεια μεταναστεύουν στο ήπαρ (Engwerda et al., 2000). Εκεί, τα ενεργοποιημένα T κύτταρα αλληλεπιδρούν με παρασιτισμένα δενδριτικά κύτταρα, που χρησιμεύουν ως πηγή παραγωγής IL-12. Η παραγωγή της IL-12, οδηγεί σε επακόλουθη CD4⁺ Th1 απόκριση, ειδική για το παράσιτο, κατά τη διάρκεια των μεταγενέστερων σταδίων της μόλυνσης (Antoine et al., 2004). Ενδιαφέρον είναι ότι, τα ενεργοποιημένα δενδριτικά κύτταρα μπορούν, επίσης, να προκαλέσουν κυτταροτοξικότητα από κύτταρα φυσικών φονέων (NK) και παραγωγή IFN γ (Schleicher et al., 2007). Σε αντίθεση με τα δενδριτικά κύτταρα, η παραγωγή της IL-12 εμποδίζεται σε μολυσμένα μακροφάγα. Κατά συνέπεια, τα μακροφάγα είναι ανίκανα να εκκινήσουν CD4⁺ T κύτταρα ή να διεγείρουν αντιγονοειδικά CD4⁺ T κύτταρα. Συνεπώς, η αλληλεπίδραση ειδικών για τη *Leishmania*, CD4⁺ T κυττάρων με μολυσμένα δενδριτικά κύτταρα στο ήπαρ, παρέχει το προφλεγμονώδες (Th1) περιβάλλον, για τον αποτελεσματικό σχηματισμό κοκκιώματος που περιλαμβάνει την παραγωγή IL-12, IFN- γ , TNF- α και IL-2 (Squires et al., 1989 ; Murray et al., 1992; Wilson et al., 2005; Stanley & Engwerda, 2007).

Σε αυτό το στάδιο της μόλυνσης (2-4 εβδομάδες μετά τη μόλυνση), ξεκινά η ανάπτυξη επίκτητης ηπατικής ανοσοαπόκρισης. Ταυτόχρονα, η σύντηξη μολυσμένων κυττάρων Kupffer για τη δημιουργία πολυπύρηνων κυττάρων, συμβάλλει επίσης στην παραγωγή κυτταροκινών φλεγμονής, κατά τη διάρκεια του σχηματισμού των κοκκιωμάτων (Hernandez-Pardo et al., 2000 ; Murray et al., 2001). Σε ποντικούς BALB/c, η ηπατική αντοχή στο *L. infantum* εξαρτάται σαφώς από την ανάπτυξη κοκκιώματος. Η δομή του ιστού ενός ώριμου κοκκιώματος, αποτελείται από έναν πυρήνα συντηγμένων παρασιτισμένων κυττάρων Kupffer, ο οποίος

περιβάλλεται από ένα μανδύα μονοπύρηνων κυττάρων (μονοκύτταρα, CD4⁺ και CD8⁺ T κύτταρα). Σε μερικές περιπτώσεις, προσελκύνονται και B κύτταρα, πλασματοκύτταρα, καθώς και κοκκιοκύτταρα. Σε ανοσολογικώς δραστικά κοκκιώματα, αντιγονοπαρουσιαστικά δενδριτικά κύτταρα και T κύτταρα που εκκρίνουν κυτταροκίνες, απαιτούνται για αντιμικροβιακή δράση (Murray et al., 2001). Ο σχηματισμός ενός κοκκιώματος, δε συνδέεται πάντοτε με τον έλεγχο των παρασίτων, ενώ και η αποτελεσματικότητα των ηπατικών κοκκιωμάτων για τη θανάτωση των παρασίτων εξαρτάται από το βαθμό ωρίμανσής τους (Murray et al., 1999; Murray et al., 2001). Φαίνεται, επίσης, ότι η οικογένεια κυτταροκινών TNF δεν εμπλέκεται στον σχηματισμό κοκκιωμάτων, αλλά αντίθετα, στην ωρίμανση τους, καθώς και στη διατήρηση της αρχιτεκτονικής του σπλήνα (Kaye et al., 2004).

Αν και πλήρης θεραπεία δεν επιτυγχάνεται ποτέ στο ήπαρ, η αύξηση των παρασίτων τίθεται υπό έλεγχο, ενώ εμφανίζεται και ανθεκτικότητα έναντι δευτερογενών λοιμώξεων με *L. infantum* (Stanley & Engwerda, 2007). Είναι πιθανό ότι η διαμένουσα παρουσία των παρασίτων μπορεί να προκαλέσει μακροπρόθεσμα ανοσία στο όργανο, με τρόπο παρόμοιο με αυτόν που παρατηρήθηκε στο μοντέλο της δερματικής λεισμανίασης, η οποία προκλήθηκε από μόλυνση με χαμηλή δόση *L. major* (Belkaid et al., 2002).

Αντιστοίχως, η ανοσολογική απόκριση έναντι της *L. infantum* στο σπλήνα διακρίνεται σε δύο φάσεις: την οξεία και τη χρόνια. Κατά την οξεία φάση, οι προμαστιγώτες μορφές του *L. infantum*, έπειτα από ενδοφλέβια χορήγηση, εισέρχονται στον σπλήνα μέσω της σπληνικής αρτηρίας και απομακρύνονται ταχέως από την κυκλοφορία, από μακροφάγα της περιθωριακής ζώνης (MZ) και σπάνια από δενδριτικά κύτταρα. Είναι πιθανό πως, η πλειοψηφία των δενδριτικών κυττάρων, αποκτά αντιγόνα του παρασίτου, έπειτα από φαγοκυττάρωση των μολυσμένων μακροφάγων ή των υπολειμμάτων τους στη MZ (Mebius et al., 2005 ; Stanley & Engwerda, 2007). Μέσα σε αυτά τα κύτταρα, οι προμαστιγώτες μορφές αναδιπλασιάζονται ως αμαστιγώτες. Στο σπλήνα, μακροφάγα της MZ φαγοκυττάρωνουν πάνω από το 95% των ενδοφλεβίως χορηγούμενων παρασίτων *L. infantum*, ενώ πάνω από το 50% του αρχικού αριθμού θανατώνεται μέσα σε 24 ώρες από τη μόλυνση (Engwerda et al., 2000). Φαίνεται ότι τα δενδριτικά κύτταρα αποκτούν τα αντιγόνα, μέσα στη MZ και μεταγενέστερα μεταναστεύουν στο περιαρτηρικό λεμφοειδές κολεό (PALS). Μόλις βρεθούν στο PALS, τα δενδριτικά κύτταρα εκκρίνουν IL-12 (Ato et al., 2006) και παρουσιάζουν τα παρασιτικά αντιγόνα σε T και NK κύτταρα, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των τελευταίων. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι κατά τη λοίμωξη, διεγείρεται η παραγωγή της IL-12 από σπληνικά δενδριτικά κύτταρα εντός των PALS, αλλά όχι από μολυσμένα μακροφάγα εντός της MZ (Gorak et al, 1998). Όπως περιγράφεται παραπάνω, ειδικά έναντι του παρασίτου T κύτταρα ενεργοποιούνται στο σπλήνα κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης της λοίμωξης (< 4 εβδομάδες) και μετά μεταναστεύουν στο ήπαρ για

να ξεκινήσουν μια κοκκιωματώδη απόκριση (Engwerda et al, 2000; Murray et al, 2001; Kaye et al, 2004; Stanley et al, 2007).

Από την άλλη πλευρά, κατά τη διάρκεια της χρόνιας φάσης της μόλυνσης (> 4 εβδομάδες) στο σπλήνα, σημειώνεται αδυναμία αντιμετώπισης της λοίμωξης από *L. infantum*, ενώ διαταρράσσεται και η αρχιτεκτονική του οργάνου. Υπάρχουν τρεις τουλάχιστον πιθανές εξηγήσεις για την αποτυχία της συγκεκριμένης απόκρισης (Engwerda et al., 2000): (1) υποθέτοντας ότι η διέγερση των T και NK κυττάρων από τα δενδριτικά κύτταρα συμβαίνει στο PALS, μια θέση που είναι ανατομικά διαχωρισμένη από την MZ, τα μολυσμένα μακροφάγα αποτυγχάνουν να παράγουν χημειοτακτικούς παράγοντες ώστε να φέρουν τα τελεστικά κύτταρα στην περιοχή τους. (2) Τα μολυσμένα μακροφάγα δεν μπορούν να ενεργοποιήσουν εγγενείς λειψμανιοκτόνους μηχανισμούς μετά από έκθεση σε κυτταροκίνες και προσδέτες από T και NK κύτταρα. Έχει αναφερθεί ότι τα μακροφάγα που έχουν μολυνθεί από *L. infantum*, αποτυγχάνουν να παράγουν IL-12 και επίσης έχουν μειωμένη ικανότητα παραγωγής τόσο ROS, όσο και NO που αποτελούν σημαντικά μικροβιοκτόνα μόρια για τη θανάτωση ενδοκυτταρικών παθογόνων (Gorak et al., 1998 ; Stanley et al., 2007; Murray et al., 2001). (3) Στο σπλήνα δεν επιτυγχάνεται ανάπτυξη αποτελεσματικής απόκρισης από πλευράς κοκκιωμάτων. Επιπρόσθετα, τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης μορίων MHC τάξης II σε μολυσμένα με *L. infantum* μακροφάγα, συμβάλλουν στην αποτυχία σχηματισμού φλεγμονώδους εστίας γύρω από μολυσμένα μακροφάγα της MZ (Engwerda et al., 2000).

Οποιαδήποτε από αυτές τις τρεις πιθανότητες, μπορεί να συμβάλει στην αποτυχία του σπλήνα του ποντικού να αντιμετωπίσει μια λοίμωξη σπλαγχνικής λειψμανίασης. Παραδόξως, ο σπλήνας αποτελεί μια αρχική θέση παραγωγής κυτταρομεσολαβούμενων ανοσολογικών αποκρίσεων, αλλά τελικά καταλήγει θέση εγκατάστασης του παρασίτου, με συναφείς ανοσοπαθολογικές μεταβολές (Stanley & Engwerda, 2007).

Εκτός από την παρατηρούμενη διαφοροποίηση της εγκατάστασης της μόλυνσης του παρασίτου στο ήπαρ και στο σπλήνα, τα αποτελέσματα του παρασιτικού φορτίου μεταξύ των διαφορετικών φυλών ποντικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, έχουν σαφή γενετική βάση. Αν και πολλοί παράγοντες συμβάλλουν στην επιβίωση των παρασίτων στα φαγοσώματα, η πρόσβαση στο σίδηρο κατέχει κεντρικό ρόλο. Οι αμαστιγωτές μορφές μπορούν να χρησιμοποιήσουν το δισθενή σίδηρο (Fe^{2+}), τα προϊόντα οξειδωσης του Fe^{3+} του αίμας και αιμοσφαιρίνη. Στους ποντικούς, το γονίδιο *Slc11a1* (γνωστό και ως *Nramp1* και *Lsh*) κωδικοποιεί για μια αντλία εκροής στα φαγοσώματα η οποία μεταφέρει τα Fe^{2+} και Mn^{2+} στο κυτταρόπλασμα και έτσι περιορίζει τη διαθεσιμότητα σιδήρου στο παράσιτο (Blackwell et al., 2001). Ο γενετικός τόπος *Lsh* στο χρωμόσωμα 1 του ποντικού με το *Slc11a1* (*Nramp1*) ως κύριο υποψήφιο γονίδιο (Vidal et al., 1995), επηρεάζει τη φυσική αντίσταση σε μόλυνση από *L. infantum* (Leclercq et al., 1996) (έλεγχος του παρασιτικού φορτίου στο ήπαρ και το

σπλήνα). Σε ποντικούς που φέρουν άγριου τύπου *Slc11a1*, παρεμποδίζεται ο πολλαπλασιασμός των παρασίτων στο ήπαρ. Αντιστρόφως, σε ποντικούς με μεταλλαγμένο *Slc11a1*, όπως τα στελέχη BALB/c και C57BL/6, η ανάπτυξη των παρασίτων δεν περιορίζεται (Kaye et al., 2004). Η πρωτογενής μόλυνση από *L. infantum* ελέγχεται, επίσης, και από το γενετικό τόπο H2 (Leclercq et al., 1996). Και οι δύο τόποι εμπλέκονται στην ανάπτυξη της επίκτητης ανοσοαπόκρισης. Για παράδειγμα, οι ευαίσθητοι σε μόλυνση από *L. infantum* ποντικοί (με μεταλλαγμένο *Slc11a1*) που φέρουν αλληλόμορφα H2-b ή H2-g, παρουσιάζουν “θεραπευμένο φαινότυπο” που σχετίζεται με ισχυρή μείωση του παρασιτικού φορτίου στο ήπαρ. Αντιστρόφως, οι ευαίσθητοι H2-d, H2-q και H2-f ποντικοί χαρακτηρίζονται από “μη ιάσιμο” φαινότυπο. Έτσι, οι ποντικοί μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις φαινοτυπικές κατηγορίες: α) ανθεκτικοί, β) ευαίσθητοι και όταν είναι ευαίσθητοι, σε i) θεραπευμένους και ii) μη θεραπευμένους. Μη θεραπευμένοι ποντικοί, όπως η φυλή BALB/c, θα προχωρήσουν αυθόρμητα σε μια χρόνια φάση της νόσου χωρίς πλήρη εκκαθάριση παρασίτων. Αντιστρόφως, σε θεραπευμένους ποντικούς, όπως η φυλή C57BL/6, το φορτίο των παρασίτων είναι πολύ χαμηλό και τα παράσιτα μπορούν να εξαλειφθούν πλήρως σε ορισμένες περιπτώσεις. Ενώ η πρώιμη ανάπτυξη του παρασίτου μπορεί να ελεγχθεί σε *Slc11a1* ποντικούς άγριου τύπου (π.χ. CBA), δε μπορεί να περιοριστεί σε μεταλλαγμένους *Slc11a1* ποντικούς (συμπεριλαμβανομένων των στελεχών BALB/c και C57BL/6). Έτσι, 14 ημέρες μετά την μόλυνση, τα μεταλλαγμένα στελέχη περιέχουν 50-100 φορές μεγαλύτερο αριθμό αμαστιγωτών μορφών στο ήπαρ, σε σχέση με τα στελέχη αγρίου τύπου (Crocker et al., 1984 ; Blackwell, 1989). Η έκφραση της φυσικής αυτής αντίστασης είναι ανεξάρτητη από T κύτταρα.

Η ηπατική αντίσταση συσχετίζεται καλά με την παραγωγή ριζών οξυγόνου και αζώτου. Στα πρώιμα στάδια της μόλυνσης (μέχρι τη 14η μέρα), οι χημικές αυτές μορφές διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη αναστολή της ανάπτυξης των παρασίτων, όπως προσδιορίζεται από μελέτες σε τροποποιημένους ποντικούς, οι οποίοι δεν ήταν ικανοί να τις παράγουν (Murray et al., 1999). Κατά τη διάρκεια της μεταγενέστερης φάσης της μόλυνσης, όταν η ηπατική αντίσταση εκφράζεται από πτώση του αριθμού των αμαστιγωτών, φαίνεται ότι η ρύθμιση του γονιδίου της συνθετάσης του οξειδίου του αζώτου (NO) παίζει κυρίαρχο ρόλο και η παραγωγή NO αντανάκλα κυρίως την εξαρτώμενη από T κύτταρα ενεργοποίηση των μακροφάγων (Murray et al., 1999). Αν και η αποτελεσματικότητα της ενεργοποίησης των μακροφάγων μπορεί να αντικατοπτρίζει την με μεσολάβηση κυτταροκινών, διασταυρούμενη ρύθμιση στο επίπεδο της διαφοροποίησης των T κυττάρων, η διασταυρούμενη ρύθμιση (με παραγωγή αναστολέων της γονιδιακής έκφρασης, με παραγωγή της IL-10, με παραγωγή του TGFβ) στο επίπεδο έκφρασης του γονιδίου της συνθετάσης του νιτρικού οξειδίου (NOS2) στα μακροφάγα, φαίνεται να διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο (Wilson et al., 2000; Gomes et al., 2001; Murray et al., 2002; 2003). Αυτές οι δύο μη προστατευτικές κυτταροκίνες μπορούν να ρυθμίζονται

χρονικά, με τον TGFβ να εμφανίζεται μάλλον αργά στη μόλυνση σε σύγκριση με την IL-10. Μέχρι σήμερα, οι πηγές αυτών των κυτταροκινών στη σπλαχνική λεισμανίαση δεν έχουν πλήρως χαρακτηριστεί, αν και είναι σαφές ότι τα T κύτταρα συμβάλλουν τόσο στην παραγωγή TGFβ (Gomes et al., 2000), όσο και στην παραγωγή IL-10.

Σε αντίθεση με την αυτοπεριοριζόμενη λοίμωξη που παρατηρείται στο ήπαρ των περισσότερων στελεχών μεταλλαγμένων *Sc11a1* ποντικών, οι πειραματικοί ποντικοί σε μοντέλα σπλαχνικής λεισμανίασης διατηρούν σταθερά ανιχνεύσιμους αριθμούς αμαστιγωτών μορφών στο σπλήνα τους, συνήθως για όλη τους τη ζωή. Ο σπλήνας μεγενθύνεται μαζικά (μέχρι 15% του σωματικού βάρους εντός 6-8 εβδομάδων από τη μόλυνση) (Smelt et al., 1997). Αν και παρατηρείται απόκριση, που είναι εμφανής κατά τη σύγκριση ανοσοκατεσταλμένων και ανοσοανεπαρκών στελεχών καθώς και από τις επιδράσεις της εξουδετέρωσης της IL-12 (Engwerda et al, 1998), οι μηχανισμοί αντίστασης του ξενιστή που επάγονται κατά τη διάρκεια της φυσικής μόλυνσης αποτυγχάνουν να εξαλείψουν τα παράσιτα σε επίπεδο αποκατάστασης της φυσιολογικής ομοιόστασης του ιστού.

Είναι σαφές ότι το γενετικό υπόβαθρο του ποντικού επηρεάζει την έκβαση της λοίμωξης από *Leishmania* και αυτό το χαρακτηριστικό πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά το σχεδιασμό πειραμάτων. Αν και οι ποντικοί BALB/c δε θα πεθάνουν από σπλαχνική λεισμανίαση (σε αντίθεση με τους ανθρώπους που δεν έχουν υποβληθεί σε θεραπευτική αγωγή), μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη των ανοσοπαθολογικών αλλαγών που συμβαίνουν κατά την εξέλιξη του νοσήματος.

Για την παρακολούθηση της πορείας της μόλυνσης στους ποντικούς της διαγονιδιακής σειράς B6.Cg-Tg(HLA/H2-D)2Eng/J, εφαρμόστηκε, επίσης, και η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Από τα γραφήματα που προέκυψαν, τόσο για το ήπαρ, όσο και το σπλήνα, επιβεβαιώθηκε και πάλι η πορεία της μόλυνσης. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι, οι προσδιοριζόμενες τιμές των αριθμών του παρασίτου, και για το ήπαρ και για το σπλήνα, στα χρονικά σημεία του πειράματος, είναι μεγαλύτερες στην περίπτωση της μοριακής μεθόδου. Η παραπάνω διαπίστωση δικαιολογείται από το γεγονός ότι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου αποτελεί μια μέθοδο με μεγάλη ευαισθησία, σε σύγκριση με την διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων στην οποία υπεισέρχεται και η υποκειμενικότητα του ερευνητή (Losada-Barragan et al., 2016).

Η πρόληψη της λεισμανίασης μέσω προφυλακτικού εμβολιασμού μοιάζει να είναι ένας εφικτός στόχος. Η πρόοδος που έχει σημειωθεί στην κατανόηση της παθογένειας και της ανάπτυξης ανοσίας από τον ξενιστή έναντι της μόλυνσης από παράσιτα του γένους *Leishmania*, έδωσε νέα προοπτική στην έρευνα για την ανάπτυξη ενός εμβολίου έναντι της λεισμανίασης (Rajiv Kumar & Engwerda, 2014). Έτσι, έγινε προσπάθεια εκτίμησης της προστασίας που θα μπορούσε να προσφέρει

ένα πειραματικό εμβόλιο το οποίο έχει κατασκευαστεί στο Εργαστήριο Ανοσολογίας Παρασιτώσεων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ και βασίζεται σε χιμαιρικά πολυεπιτοπικά πεπτιδία των πρωτεϊνών CPA, KMP-11 και ιστόνης H1. Η ιδέα των χιμαιρικών πολυεπιτοπικών πεπτιδίων στο σχεδιασμό του πειραματικού εμβολίου βρίσκεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, που υπογραμμίζουν τη σημασία επαγωγής πολλών διαφορετικών κλώνων T κυττάρων-τελεστών για την προαγωγή προστατευτικών ανολογικών αποκρίσεων έναντι της μόλυνσης (Basu et al., 2007; Alves-Silva et al., 2017; Martins et al., 2017). Για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του πειραματικού εμβολίου, χρησιμοποιήθηκε η διαγονιδιακή σειρά ποντικών B6.Cg-Tg(HLA-A/H2-D)2Enge/J. Η επιλογή της διαγονιδιακής σειράς έγινε λόγω του ότι οι συγκεκριμένοι ποντικοί εκθέτουν στα κύτταρα τους το υβριδικό μόριο MHC τάξης I με $\alpha 1$ και $\alpha 2$ επικράτειες όμοιες του ανθρώπινου μορίου HLA-A2.1, αποτελώντας ένα χρήσιμο προκλινικό μοντέλο για τον έλεγχο εμβολίων που έχουν σχεδιαστεί για να επάγουν CD8⁺ T κυτταρικές αποκρίσεις. Πολλά εμβόλια που είχαν χαρακτηριστεί αποτελεσματικά με βάση κλινικές δοκιμές σε ποντικούς άγριου τύπου, αποδείχτηκε πως είχαν μειωμένη προστατευτική δράση όταν εφαρμόστηκαν στο άνθρωπο, ίσως λόγω και του γεγονότος ότι τα μόρια MHC του ποντικού μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορετική έκβαση της ανοσολογικής απόκρισης από αυτά του ανθρώπου (Rajot et al., 2004). Οι ανθρωποποιημένοι διαγονιδιακοί ποντικοί που εκφράζουν ανθρώπινα HLA μόρια έχουν δώσει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα, παρά τις διαφορές στο μηχανισμό της αντιγονοπαρουσίασης (Pascolo, 2005), καθώς 80% των πεπτιδίων που έχουν βρεθεί ανοσογονικά για τον άνθρωπο έχουν βρεθεί ανοσογονικά και για τους ανθρωποποιημένους ποντικούς (Firat et al., 1999).

Με βάση την πορεία της μόλυνσης στο πειραματικό μοντέλο σπλαγχνικής λεϊσμανίασης που αναπτύχθηκε στους ποντικούς της διαγονιδιακής σειράς, επιλέχθηκαν οι 30 και 60 μέρες μετά τη μόλυνση για την εκτίμηση της προφυλακτικής δράσης του πειραματικού εμβολίου. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, έδειξαν σημαντική μείωση του παρασιτικού φορτίου στο ήπαρ και το σπλήνα των ανοσοποιημένων ποντικών 30 μέρες μετά τη μόλυνση, συγκριτικά με τους ποντικούς που δεν είχαν ανοσοποιηθεί. Είναι αξιοσημείωτο ότι η προφυλακτική δράση του πειραματικού εμβολίου διατηρήθηκε και στις 60 μέρες μετά τη μόλυνση και στα δύο σπλαγχνικά όργανα, υποδεικνύοντας ότι η ανοσοποίηση μπορεί να επιταχύνει το μηχανισμό της αυτοϊασης.

Τα δεδομένα από την εφαρμογή της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA, κατέδειξαν την ανάπτυξη μιας ειδικής χυμικής απόκρισης (ανίχνευση anti-SLA IgG αντισωμάτων) έναντι του διαλυτού αντιγόνου του παρασίτου. Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν οι χυμικές αποκρίσεις ήταν αντιγονο-ειδικές, έγινε έλεγχος για ανίχνευση αντισωμάτων έναντι των χιμαιρικών πολυεπιτοπικών πεπτιδίων των πρωτεϊνών CPA, ιστόνης H1 και KMP-11, που αποτελούν συστατικά του

πειραματικού εμβολίου. Διαπιστώθηκε δε ότι, το πεπτίδιο της πρωτεΐνης KMP-11, όπως και της H1, ήταν ικανά να προκαλέσουν ισχυρή χυμική απόκριση (υψηλότερος τίτλος αντισωμάτων) σε σχέση με το πεπτίδιο της CPA. Μεταξύ των δυο πρώτων, αυτό της KMP-11, εμφανίστηκε να υπερέχει. Η ανοσογονικότητα των πρωτεϊνών αυτών, έχει αποδειχθεί και σε διάφορες μελέτες που προηγήθηκαν (Skeiky et al., 1995; Berberich et al., 1997; Jensen et al., 1998; Rafati et al., 2001; Agallou et al., 2011; 2012].

Επιπρόσθετα, η εκτίμηση της ικανότητας επαγωγής κλωνικού πολλαπλασιασμού λεμφοκυττάρων, από τα πολυπεπίδια των πρωτεϊνών CPA, KMP-11 και H1 που περιέχονται στο πειραματικό εμβόλιο, έγινε με εφαρμογή της δοκιμασίας του λεμφοκυτταρικού πολλαπλασιασμού. Από τα αποτελέσματα (εκφραζόμενα με μέτρο το δείκτη διέγερσης των λεμφοκυττάρων), αποδείχθηκε ότι και τα τρία πεπτίδια των πρωτεϊνών CPA, KMP-11 και H1 που χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγόνα, προκάλεσαν λεμφοκυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σύμφωνα δε με τις τιμές του δείκτη διέγερσης, το πολυπεπίδιο της KMP-11 ήταν εκείνο που προκάλεσε ισχυρότερο πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων, ενώ ακολούθησαν το πολυπεπίδιο της ιστόνης H1 και της CPA. Έτσι, φάνηκε ότι τα πολυπεπίδια του πειραματικού εμβολίου, μπορούν να συμβάλλουν στην ανάπτυξη και κυτταρικής ανοσίας.

Συνεπώς τα παραπάνω δεδομένα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το πειραματικό εμβόλιο είναι ικανό να επάγει ταυτοχρόνως χυμική και κυτταρική ανοσοαπόκριση. Στόχος ενός εμβολίου είναι ο έλεγχος ή η εξάλειψη μίας νόσου, κάτι που μπορεί να επιτευχθεί με επαγωγή ανοσίας, περιλαμβάνοντας την ενεργοποίηση B και T κυττάρων και την εγκατάσταση ανοσολογικής μνήμης. Η επαγωγή των B και T κυτταρικών αποκρίσεων προϋποθέτει την ενεργοποίησή τους από τα εξειδικευμένα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Οι παθογόνοι παράγοντες αναγνωρίζονται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, μέσω των υποδοχέων αναγνώρισης προτύπου (Pattern Recognition Receptors, PRRs). Τα πλέον εξειδικευμένα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα είναι τα δενδριτικά κύτταρα, λόγω της ικανότητάς τους να επάγουν πρωτογενείς ανοσολογικές αποκρίσεις, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την εγκαθίδρυση ανοσολογικής μνήμης.

Τα ενεργοποιημένα δενδριτικά κύτταρα που παρουσιάζουν ξένα αντιγόνα στην επιφάνειά τους, μεταναστεύουν στις περιοχές των T κυττάρων στα δευτερογενή λεμφικά όργανα, προκειμένου να προκαλέσουν την έναρξη των ειδικών T κυτταρικών αποκρίσεων. Η ενεργοποίηση των T κυττάρων απαιτεί τη συνεχή διέγερσή τους μέσω του T κυτταρικού υποδοχέα (TCR) με τη δημιουργία της ανοσολογικής σύναψης. Όλοι οι υποπληθυσμοί των T κυττάρων εκφράζουν τον TCR, ένα σύμπλεγμα πολυπεπτιδίων που περιλαμβάνει και το μόριο CD3, ενώ η πλειοψηφία τους διακρίνεται από την παρουσία ή του CD4 ή του CD8 επιφανειακού μορίου. Τα T κύτταρα που εκφράζουν το μεμβρανικό γλυκοπρωτεϊνικό μόριο CD4, περιορίζονται στην αναγνώριση πεπτιδίων που συνδέονται με μόρια του μείζονος

συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC) τάξης II και χαρακτηρίζονται ως βοηθητικά T κύτταρα (Th), ενώ τα T κύτταρα που εκφράζουν το μόριο CD8, ένα διμερές μεμβρανικό γλυκοπρωτεϊνικό μόριο, περιορίζονται στην αναγνώριση πεπτιδίων που συνδέονται με μόρια MHC τάξης I και χαρακτηρίζονται ως κυτταροτοξικά T κύτταρα (CTL). Τα παρθένα T κύτταρα απαιτούν συνδιεγερτικά σήματα για να ενεργοποιηθούν και στη συνέχεια να διαφοροποιηθούν προς ανοσοδραστικά κύτταρα.

Η ενεργοποίηση των παρθένων CD4⁺ T κυττάρων μέσω του TCR προκαλεί τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους σε δραστικά Th κύτταρα τύπου 1 (Th1) ή τύπου 2 (Th2). Τα Th1 κύτταρα παράγουν IFN γ και προάγουν την κυτταρική ανοσία, η οποία κατέχει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο των μολύνσεων από ενδοκυτταρικά παθογόνα, όπως είναι τα παράσιτα του γένους *Leishmania* (Agnello et al, 2003). Αντίθετα, τα Th2 κύτταρα παράγουν IL-4, IL-5 και IL-13 και προάγουν τη χυμική ανοσία (Agnello et al., 2003). Συσχετίζοντας τα παραπάνω δεδομένα με τη συγκράτηση της αύξησης του παρασιτικού φορτίου στα όργανα στόχους, ήπαρ και σπλήνα, των εμβολιασμένων διαγονιδιακών ποντικών γίνεται κατανοητό ότι το εμβόλιο προκάλεσε την επαγωγή μια ανοσοπροστατευτικής ανοσίας έναντι του παρασίτου *L. infantum*. Καθίσταται, επίσης, σαφές ότι η μελέτη πρέπει να συνεχιστεί με μια βαθύτερη διερεύνηση της επαγόμενης ανοσολογικής απόκρισης, χαρακτηρισμό των T κυττάρων, καθώς και προσδιορισμό των εκκρινόμενων κυτταροκινών προκειμένου να αποδειχθεί ο μηχανισμός δια μέσου του οποίου υποστηρίζεται η προστατευτική δράση του εμβολίου.