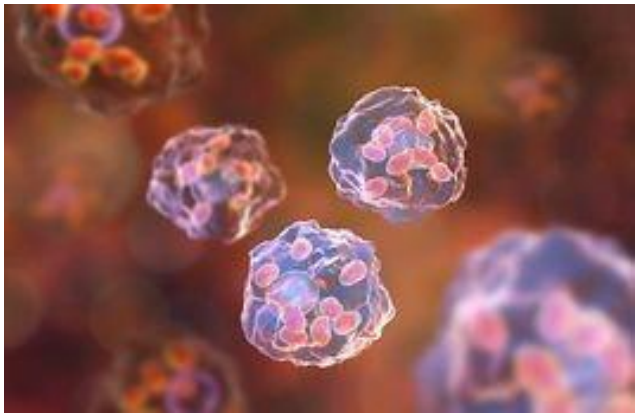
ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

"ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ"

"Ρόλος ανοσοθεραπευτικών ουσιών στη λεϊσμανίαση"



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
Βασιλακάκη Αθηνά, Βιολόγος
Α.Μ. : 41612

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
Αικατερίνη Γαϊτανάκη, Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας Ε.Κ.Π.Α., Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ
Ευδοκία Καραγκούνη, Ερευνήτρια Α', Τμήμα Μικροβιολογίας, Εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Αθήνα, 2019

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

"ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ"

"Ρόλος ανοσοθεραπευτικών ουσιών στη λεϊσμανίαση"

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Βασιλακάκη Αθηνά, Βιολόγος
Α.Μ.: 41612

Τριμελής Επιτροπή

Γαϊτανάκη Αικατερίνη, Καθηγήτρια Βιολογίας (Επιβλέπουσα)

Αγγελή Ιωάννα, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας

Καραγκούνη Ευδοκία, Ερευνήτρια Α' Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Αθήνα, 2019

Περιεχόμενα

Συντμήσεις....iv

Πρόλογος....viii

1. Εισαγωγή 1

1.1 Εισαγωγικά στοιχεία για τη λεϊσμανίαση 1

1.2 Συστηματική κατάταξη του παρασίτου.... 2

1.3 Μορφολογία του παρασίτου 4

1.4 Βιολογικός κύκλος του παρασίτου.... 5

1.5 Επιδημιολογία 8

1.6 Κλινικές μορφές του νοσήματος 10

1.6.1 Δερματική (Cutaneous Leishmaniasis, CL) 10

1.6.2 Σπλαγχνική (Visceral Leishmaniasis, VL).... 11

1.6.3 Βλεννογονοδερματική (Mucocutaneous Leishmaniasis, ML) 13

1.7 Διάγνωση.... 13

1.8 Θεραπεία.... 15

1.9 Δενδριτικά κύτταρα.... 17

1.9.1 Κατηγορίες δενδριτικών κυττάρων 17

1.9.2 Ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων 19

1.9.3 Οδοί παρουσίασης αντιγόνων 21

1.9.4 Διασταυρωτή αντιγονοπαρουσίαση 22

1.10 Ανοσολογική απόκριση έναντι της λεϊσμανίασης 23

1.11 Επιβίωση του παρασίτου 27

1.12 Ανοσοθεραπεία.... 32

1.13 Ανοσολογικά σημεία ελέγχου 34

1.14 Ανοσοθεραπεία στη λεϊσμανίαση.... 35

1.14.1 CTLA-4.... 36

1.14.2 PD-1 36

1.14.3 CD200-R 38

2. Σκοπός 41

3. Υλικά και μέθοδοι.... 43

3.1 Υλικά 43

3.2 Πειραματόζωα.... 43

3.3 Παράσιτο 43
3.3.1 Καλλιέργεια παρασίτου 43
3.3.2 Προσδιορισμός στατικής φάσης καλλιέργειας / καμπύλη ανάπτυξης παρασίτου 44
3.3.3 Διατήρηση παρασίτου 45
3.3.4 Διατήρηση μολυσματικής ικανότητας παρασίτου 45
3.3.5 Χρώση παρασίτου με CFSE 46
3.4 Κυτταροκαλλιέργειες 46
3.5 Απομόνωση και καλλιέργεια δενδριτικών κυττάρων από μυελό των οστών BALB/c ποντικού 47
3.5.1 Απομόνωση 47
3.5.2 Καλλιέργεια 48
3.6 Κυτταρομετρία ροής 48
3.6.1 Εισαγωγή 48
3.6.2 Προετοιμασία κυττάρων για κυτταρομετρία ροής 49
3.6.3 Ανάλυση στο κυτταρόμετρο (FACS Analysis) 51
3.7 Προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης των αντισωμάτων έναντι των ανοσορυθμιστικών μορίων CD200 και CD273 52
3.8 Προσδιορισμός βέλτιστης αναλογίας μόλυνσης 52
3.9 Έλεγχος έκφρασης μορίων CD200 και CD273 σε μολυσμένα δενδριτικά κύτταρα 53
3.10 Έλεγχος ειδικότητας αντισωμάτων σύνδεσης έναντι των μορίων CD200 και CD273 53
3.11 Απομόνωση Τ λεμφοκυττάρων από σπλήνα BALB/c ποντικού 54
3.11.1 Απομόνωση σπληνικών κυττάρων από σπλήνα BALB/c ποντικού 54
3.11.2 Απομόνωση και καθαρισμός Τ λεμφοκυττάρων 55
3.12 Μεικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση (Mixed Lymphocyte Reaction, MLR) 56
3.12.1 Μέτρηση πολλαπλασιασμού Τ λεμφοκυττάρων (Lymphoproliferation) 56
3.12.2 Προσδιορισμός της ενδοκυττάριας παραγωγής κυτταροκινών 57
4. Αποτελέσματα 59
4.1 Καμπύλη ανάπτυξης παρασίτου 59
4.2 Χαρακτηρισμός και ταυτοποίηση μυελοειδών δενδριτικών κυττάρων 60
4.3 Προσδιορισμός βέλτιστων συνθηκών μόλυνσης 61
4.4 Προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης των αντισωμάτων έναντι των μορίων CD200 και CD273 63
4.5 Έλεγχος έκφρασης μορίων CD200 και CD273 σε δενδριτικά κύτταρα μολυσμένα με *Leishmania infantum* 67

4.6 Έλεγχος ειδικότητας μονοκλωνικών αντισωμάτων πρόσδεσης έναντι των μορίων CD200 και CD273 71
4.7 Επίδραση της παρεμπόδισης σύνδεσης των μορίων CD200 και CD273 με τους προσδέτες τους στην ενεργοποίηση παρθένων Τ λεμφοκυττάρων 76
4.7.1 Έλεγχος πολλαπλασιασμού Τ λεμφοκυττάρων 76
4.7.2 Προσδιορισμός της ενδοκυττάριας παραγωγής κυτταροκινών 78
4.8 Επίδραση της παρεμπόδισης της σύνδεσης των μορίων CD200 και CD273, που εκφράζονται σε μολυσμένα δενδριτικά κύτταρα, με τους προσδέτες τους στην ενεργοποίηση Τ λεμφοκυττάρων που προέρχονται από μολυσμένο ζώο 80
4.8.1 Έλεγχος πολλαπλασιασμού Τ λεμφοκυττάρων 80
4.8.2 Προσδιορισμός της ενδοκυττάριας παραγωγής κυτταροκινών 81
5. Συζήτηση 83
5.1 Δενδριτικά κύτταρα στην ανοσοθεραπεία 83
5.2 Προσδιορισμός βέλτιστης αναλογίας και πορείας της μόλυνσης 86
5.3 Επιλογή ανοσορυθμιστικών μορίων 87
5.4 Επίδραση μόλυνσης δενδριτικών κυττάρων με *L. infantum* στην έκφραση των μορίων CD200 και CD273 89
5.5 Επίδραση παρεμπόδισης της σύνδεσης των μορίων CD200 και CD273 με τους προσδέτες τους, στην ενεργοποίηση παρθένων Τ λεμφοκυττάρων 90
5.6 Επίδραση παρεμπόδισης σύνδεσης των μορίων CD200 και CD273 με τους προσδέτες τους, στην ενεργοποίηση Τ λεμφοκυττάρων που προέρχονται από σπλήνα μολυσμένου ζώου 92
6. Συμπεράσματα 94
7. Βιβλιογραφία 96
Παράρτημα Ι 101
Χημικά και Ανοσολογικά Αντιδραστήρια 101
Παράρτημα ΙΙ 103
Αναλώσιμα 103
Παράρτημα ΙΙΙ 104
Τεχνολογικός εξοπλισμός 104
Παράρτημα IV 105
Σκεύη 105

Συντμήσεις

Σύντμηση	Αγγλικός όρος	Ελληνικός όρος
APCs	Antigen-Presenting Cells	Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα
C3	Complement 3	Παράγοντας του συμπληρώματος 3
PRRs	Pattern Recognition Receptors	Υποδοχείς Αναγνώρισης Δομικού Προτύπου
AIDS	Acquired ImmunoDefficiency Syndrome	Επίκτητο Σύνδρομο Ανοσολογικής Ανεπάρκειας
APC	Allophycocyanin	Αλλοφυκοκυανίνη
C3a	Complement protein 3a	Παράγοντας συμπληρώματος 3α
C3b	Complement protein 3b	Παράγοντας του συμπληρώματος 3b
CD200	Cluster of Differentiation 200	Σύμπλεγμα διαφοροποίησης 200
CD200-R	Cluster of Differentiation 200 Receptor	Υποδοχέας του συμπλέγματος διαφοροποίησης 200
CD273	Cluster of Differentiation 273	Σύμπλεγμα διαφοροποίησης 273
CD28	Cluster of Differentiation 28	Σύμπλεγμα διαφοροποίησης 28
CD3	Cluster of Differentiation 3	Σύμπλεγμα διαφοροποίησης 3
CD4	Cluster of Differentiation 4	Σύμπλεγμα διαφοροποίησης 4
CD40	Cluster of Differentiation 40	Σύμπλεγμα διαφοροποίησης 40
CD80	Cluster of Differentiation 80	Σύμπλεγμα διαφοροποίησης 80
CD86	Cluster of Differentiation 86	Σύμπλεγμα διαφοροποίησης 86
cDC	Conventional/ Classic Dendritic Cells	Συμβατικά/Κλασσικά δενδριτικά κύτταρα
CL	Cutaneous Leishmaniasis	Δερματική Λεϊσμανίαση
CLIP	Class II-associated Invariable Chain Peptide	
CTL	Cytotoxic T- Lymphocyte	Κυτταροτοξικό Τ Λεμφοκύτταρο
CTLA-4	Cytotoxic T- Lymphocyte-Associated antigen 4	Συσχετιζόμενο με τα Κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα Αντιγόνο 4
DCL	Diffuse Cutaneous Leishmaniasis	Διάχυτη Δερματική Λεϊσμανίαση
DCs	Dendritic Cells	Δενδριτικά κύτταρα
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	Διμεθυλσουλφοξείδιο
DNA	Deoxyribonucleic Acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DTH	Delayed Type Hypersensitivity	Καθυστερημένου τύπου Υπερευασιθησία
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	Ανοσοπροσροφητική Ανάλυση Στερεάς φάσης με Συνδεδεμένα Ενζυμα

FACS analysis	Fluorecence Actinated Cell Sorting Analysis	Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής
FBS	Fetal Bovine Serum	Ορός εμβρύου βοός
FITC	Fluorescein isothiocyanate	Ισοθειακυανική φλουορεσκεΐνη
FSC	Forward Scatter	Οριζόντιος Σκεδασμός
G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	Αφυδρογονάση της 6 Φωσφορικής Γλυκόζης
rGM-CSF	Recombinant Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor	Ανασυνδυασμένος Παράγοντας Διέγερσης Αποικιών των Κοκκιοκυττάρων και Μακφροφάγων
gp63	Glycoprotein 63	Γλυκοπρωτεΐνη gp63
H1	Histone 1	Ιστόνη 1
HLA-DO	Human Leukocyte Antigen DO	Ανθρώπινο Λεμφοκυτταρικό Αντιγόνο DO
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen DR	Ανθρώπινο Λεμφοκυτταρικό Αντιγόνο DR
IFAT	Indirect Fluorescent Antibody Test	Δοκιμασία Έμμεσου Ανοσοφθορισμού
IFN-γ	Interferon γ	Ιντερφερόνη γ
IL-1	Inteleukin 1	Ιντερλευκίνη 1
IL - 10	Inteleukin 10	Ιντερλευκίνη 10
IL-12	Inteleukin 12	Ιντερλευκίνη 12
IL-13	Inteleukin 13	Ιντερλευκίνη 13
IL-15	Inteleukin 15	Ιντερλευκίνη 15
IL-17	Inteleukin 17	Ιντερλευκίνη 17
IL-18	Inteleukin 18	Ιντερλευκίνη 18
IL-2	Inteleukin 2	Ιντερλευκίνη 2
IL-21	Inteleukin 21	Ιντερλευκίνη 21
IL-4	Inteleukin 4	Ιντερλευκίνη 4
IL-5	Inteleukin 5	Ιντερλευκίνη 5
IL-6	Inteleukin 6	Ιντερλευκίνη 6
IL-7	Inteleukin 7	Ιντερλευκίνη 7
IL-8	Inteleukin 8	Ιντερλευκίνη 8
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase	Επαγόμενη συνθετάση του νιτρικού οξέος
kDNA	kinetoplastid Deoxyribonucleic Acid	Κινητοπλαστικό δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
KMP-11	Kinetoplastid Membrane Protein - 11	Κινητοπλαστική μεμβρανική πρωτεΐνη 11
LCs	Langerhans Cells	Κύτταρα Langerhans
LPG	Lipophosphoglycan	Λιποφωσφογλυκάνη

LPS	Lipopolysacharide	Λιποπολυσακχαρίτης
MAC	Membran Attack Complex	Σύμπλεγμα Μεμβρανικής Επίθεσης
ML	Mycocutaneus Leishmaniasis	Βλεννογονοδερματική λεϊσμανίαση
MLR	Mixed Lymphocyte Reaction	Μεικτή Λεμφοκυτταρική Αντίδραση
MHC I	Major Histocompatibility Complex I	Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητα I
MHC II	Major Histocompatibility Complex II	Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητα II
MLEE	Multilocus Enzyme Electrophoresis	Πολυεστιακή ισοενζυμική ηλεκτροφόρηση
MoDCs	Monocyte-derived Dendritic Cells	Δενδριτικά Κύτταρα που προέρχονται από Μονοκύτταρα
NET	Neutrophil Extracellular Trap	Εξώκυττάριες παγίδες ουδετερόφιλων
NK cells	Natural Killer cells	Φυσικά φονικά κύτταρα
NTD	Neglected Tropical Disease	Παραμελημένη Τροπική Ασθένεια
PAMPS	Pathogen Associated Molecular Patterns	Συντηρημένες μοριακές δομές παθογόνων μικροοργανισμών
PBS	Phosphate-buffered saline	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων
PCR	Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PD-1	Programmed cell death Protein 1	Πρωτεΐνη Προγραμματισμένου Κυτταρικού Θανάτου 1
PD-L1	Programmed cell death Protein - Ligand 1	Πρόσδεμα 1 της πρωτεΐνης Προγραμματισμένου Κυτταρικού Θανάτου
PD-L2	Programmed cell death Protein - Ligand 2	Πρόσδεμα 2 της πρωτεΐνης Προγραμματισμένου Κυτταρικού Θανάτου
pDCs	Plasmacytoid Dendritic Cells	Πλασματοειδή Δενδριτικά Κύτταρα
PE	Phykoerythrin	Φυκοερυθρίνη
PKDL	Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis	Μετά κάλα-αζάρ Δερματική Λεϊσμανίαση
RNS	Reactine Nitrogen Species	Ενεργές ρίζες αζώτου
ROS	Reactive Oxygen species	Ενεργές ρίζες οξυγόνου
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium	Θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιεργειών
SbIII	Pentavalent Antimonial	Πεντασθενές αντιμόνιο
SbV	Trivalent Antimonial	Τρισθενές αντιμόνιο

SSC **TCR**	Side Scatter T Cell Receptor	Πλάγιος Σκεδασμός Υποδοχέας Τ Λεμφοκυττάρων
TGF-β	Transforming Growth Factor β	Μεταμορφωτικός Αυξητικός Παράγοντας β
T_h1	T helper 1	Βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα τύπου 1
T_h2	T helper 2	Βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα τύπου 2
TLRs	Toll-like Receptors	Υποδοχείς τύπου Toll
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α	Παράγοντας νέκρωσης όγκων α
Treg	T regulatory	Ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα
UV-c	Ultra Violet c	Υπεριώδεις Ακτίνες c
VL	Visceral Leishmaniasis	Σπλαγχνική Λεϊσμανίαση
Μφ	Macrophages	Μακροφάγα

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών του τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ), υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Αικατερίνης Γαϊτανάκη. Το σύνολο των πειραμάτων διεξήχθη στο Εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ (Ε.Ι.Π.) τα έτη 2017-2019, υπό την επίβλεψη της Διευθύντριας Ερευνών Ευδοκίας Καραγκούνη. Η εργασία αυτή υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Πράξης «ΛΟΙΜΩΔΗ, ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ: ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ, ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ» (MIS 5002486) που εντάσσεται στη «Δράση Στρατηγικής Ανάπτυξης Ερευνητικών και Τεχνολογικών Φορέων» και χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020, με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης).

Θα ήθελα να ευχαριστώ την κ. Αικατερίνη Γαϊτάνακη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος και την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ με ένα εξωτερικό ερευνητικό ίδρυμα. Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να δώσω και στην Δρ. Ευδοκία Καραγκούνη για την συνολική βοήθεια που μου παρείχε καθ' όλη την διάρκεια της διπλωματικής, το συνεχές ενδιαφέρον της όπως και για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που εξασφάλισε.

Ευχαριστώ θερμά την Μαρίτσα Μαργαρώνη για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση της από την πρώτη στιγμή της συνεργασίας μας, τόσο στον πειραματικό σχεδιασμό όσο και στη συγγραφή αυτής της εργασίας. Η συμβολή της υπήρξε καθοριστική και αναντικατάστατη, χωρίς να περιορίζεται αποκλειστικά σε ακαδημαϊκά επίπεδα. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και σε όλους τους συνεργάτες του Εργαστηρίου Κυτταρικής Ανοσολογίας που συνάντησα τα δύο χρόνια που ήμουν εκεί, για το όμορφο κλίμα που δημιούργησαν και για τις αμέτρητες καλές στιγμές που μοιραστήκαμε.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου που έζησαν παράλληλα με εμένα όλη την εμπειρία μου σε αυτή τη διπλωματική εργασία, και βρέθηκαν δίπλα μου τόσο στα ευχάριστα όσο και στα δυσάρεστα.

Αθηνά Βασιλακάκη

Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης

ΕΠΑνΕΚ 2014-2020
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ

ΕΣΠΑ 2014-2020
ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

1. Εισαγωγή

1.1 Εισαγωγικά στοιχεία για τη λεϊσμανίαση

Ο όρος λεϊσμανίαση περιγράφει ένα σύνολο μολυσματικών ασθενειών των τροπικών και υποτροπικών περιοχών και της Ανατολικής Ευρώπης και έχει καταχωρηθεί ως Παραμελημένη Τροπική Ασθένεια (Neglected Tropical Disease, NTD)[1]. Η λεϊσμανίαση έχει τρεις επίσημες κλινικές μορφές (δερματική, βλεννογονοδερματική και σπλαγχνική) και εμφανίζει ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων, η σοβαρότητα των οποίων ποικίλλει. Προκαλείται από τα είδη του παράσιτου *Leishmania*, ενός πρωτοζώου που μεταδίδεται στον σπονδυλωτό ξενιστή μέσω του τσιμπήματος θηλυκών φλεβοτόμων (γένη *Phlebotomus* ή *Lutzomyia*). Μερικές μορφές της ασθένειας, όπως η σπλαγχνική λεϊσμανίαση είναι θανατηφόρες αν δεν χορηγηθεί έγκαιρα θεραπευτική αγωγή. Η λεϊσμανίαση, θεωρείται ασθένεια εξέχουσας σπουδαιότητας για τη Δημόσια Υγεία, με 2 εκατομμύρια νέα κρούσματα το χρόνο, και μεγάλη κοινωνικο-οικονομική σημασία[2].

Από ιστορικής απόψεως, η λεϊσμανίαση εμφανίζεται ως ασθένεια από αρχαιοτάτων χρόνων στον Παλαιό Κόσμο. Ήδη από τον 7ο π.Χ αιώνα υπάρχουν αναφορές για κάποια μορφή δερματικής λεϊσμανίασης, γνωστή και ως “ανατολίτικη πληγή” η οποία επεκτείνεται ανά τα χρόνια στις χώρες της Ανατολής. Όσον αφορά τη σπλαγχνική λεϊσμανίαση, πρώτη φορά φαίνεται να εμφανίζεται το 1824 στην Ινδία με την ονομασία “kala-azar”, που στα σανσκριτικά σημαίνει “μαύρος πυρετός”, εξαιτίας του σκούρου χρώματος που έπαιρνε το δέρμα των ασθενών στα άκρα και την κοιλιά. Παρά το γεγονός ότι μέχρι το 1862 η διάδοση της ασθένειας είχε φτάσει σε διαστάσεις επιδημίας, η πρώτη επαφή με το παράσιτο έγινε μετά το 1900. Η ανακάλυψη του είδους του παρασίτου που ευθύνεται για τη δερματική λεϊσμανίαση αποδίδεται κυρίως στον Αμερικάνο James Homer Wright, αν και αυτό είναι αμφιλεγόμενο μέχρι σήμερα. Σε ό,τι αφορά τη σπλαγχνική λεϊσμανίαση είναι κοινώς αποδεκτό ότι τόσο ο Σκωτσέζος στρατιωτικός γιατρός William Leishman, όσο και ο καθηγητής φυσιολογίας στο Πανεπιστήμιο του Mandra, Charles Donovan, ανακάλυψαν την ίδια χρονιά (1903) το παράσιτο σε σπλήνες ασθενών με kala-azar, ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλον. Ο τρόπος μετάδοσης του παρασίτου μέσω της

θηλυκής σκνίπας του γένους *Phlebotomus* αποδείχθηκε πειραματικά το 1921 από τους αδερφούς Sergent ενώ ο τρόπος της μόλυνσης επιβεβαιώθηκε το 1941.

Στο Νέο Κόσμο, η δερματική και βλεννογοδερματική λεϊσμανίαση περιγράφονται σε ισπανικές γραφές από τον 5ο π.Χ αιώνα. Αρχικά υπήρχε η αντίληψη ότι αυτή η μορφή της λεϊσμανίασης είναι η ίδια με αυτή που εμφανίζεται στις χώρες του Παλαιού Κόσμου έως ότου το 1911 ο Gaspar Vianna ανακάλυψε ότι τα παράσιτα που απομονώθηκαν στην Νότια Αμερική είναι διαφορετικά από αυτά που συναντώνται στην Αφρική και την Ινδία. Αντίστοιχα, ενώ στην αρχή θεωρούταν ότι ο φορέας μετάδοσης είναι η σκνίπα του γένους *Phlebotomus*, το 1922 ανακαλύφθηκε ότι φορέας είναι η σκνίπα του γένους *Lutzomyia*[3].

1.2 Συστηματική κατάταξη του παρασίτου

Σύμφωνα με το παλαιότερο σύστημα κατάταξης, τα παράσιτα του γένους *Leishmania* κατατάσσονται στο υποβασίλειο των Πρωτοζώων. Αξίζει να σημειωθεί ότι σύμφωνα με τη θεώρηση Cavalier-Smith (1998), τα Πρωτόζωα αναγνωρίζονται ως ένα από τα έξι βασίλεια. Όμως, η πλέον αποδεκτή κατάταξη του παρασίτου ακολουθεί τη θεώρηση των πέντε βασιλείων (Whittaker, 1969) (Πίνακας 1.1).

Πίνακας 1.1 Συστηματική κατάταξη παρασίτου σύμφωνα με τη θεώρηση Whittaker[4].

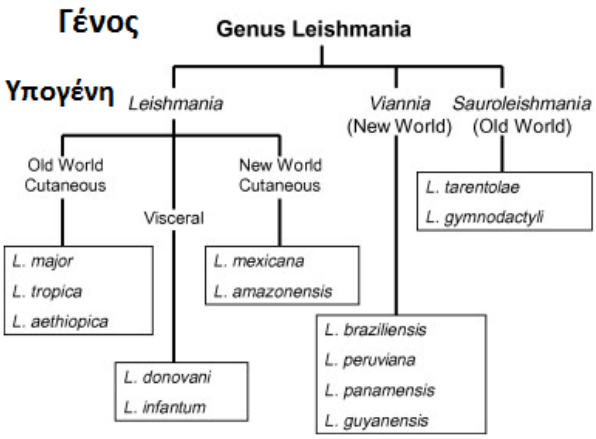
Βασίλειο	*Πρώτιστα (Protista)*
Υποβασίλειο	*Πρωτόζωα (Protozoa)*
Συνομοταξία	*Σαρκομαστιγοφόρα (Sarcomastigophora)*
Υποσυνομοταξία	*Μαστιγοφόρα (Mastigophora)*
Ομοταξία	*Ζωομαστιγοφόρα (Zoomastigophora)*
Τάξη	*Κινητοπλαστίδια (Kinetoplastida)*
Οικογένεια	*Τρυπανοσωματίδια (Trypanosomatidae)*
Γένος	*Λεϊσμάνια (Leishmania)*

Τα τελευταία χρόνια, όμως, υπερισχύει η θεωρεία όπου τα βασίλεια καταργούνται και τη θέση τους παίρνουν τρεις επικράτειες (domains) (Woese, 1990). Σε αυτή τη θεώρηση, τα Πρωτόζωα δεν είναι αποδεκτή ταξινομική βαθμίδα αλλά συμπεριλαμβάνονται στα Ευγληνόζωα[5] (Πίνακας 1.2).

Πίνακας 1.2 Συστηματική κατάταξη παρασίτου κατά θεώρηση Woese.

Επικράτεια	*Ευκαρυώτες (Eykaryota)*
Συνομοταξία	*Ευγληνόζωα (Euglenozoa)*
Υποσυνομοταξία	*Μαστιγοφόρα (Mastigophora)*
Ομοταξία	*Κινητοπλαστίδια (Kinetoplastida)*
Τάξη	*Τρυπανοσωματίδες (Trypanosomatida)*
Οικογένεια	*Τρυπανοσωματίδια (Trypanosomatidae)*
Γένος	*Λεϊσμάνια (Leishmania)*

Το γένος *Leishmania* χωρίζεται περαιτέρω σε τρία υπογένη : *Leishmania, Viannia, Sauroleishmania*.Τα υπογένη *Leishmania* και *Viannia* περιλαμβάνουν ένα σημαντικό αριθμό ειδών τα οποία είναι παθογόνα για αρκετές κατηγορίες θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Αντίθετα, τα είδη του υπογένους *Sauroleishmania* δεν είναι παθογόνα για τον άνθρωπο. Μέχρι τώρα έχουν ανακαλυφθεί περίπου 30 είδη *Leishmania*, εκ των οποίων 20 είναι παθογόνα για τον άνθρωπο[6] (Εικόνα 1.1) .

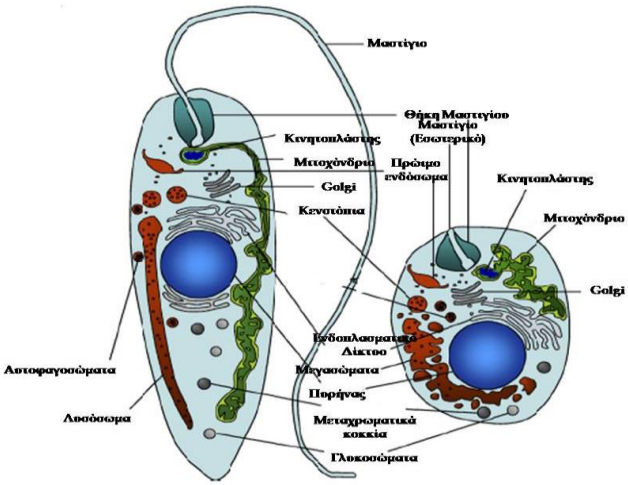


Εικόνα 1.1 Συστηματική κατάταξη *Leishmania* κάτω από το επίπεδο του γένους. Το υπογένος *Leishmania* περιλαμβάνει είδη τόσο του Παλαιού όσο και του Νέου Κόσμου, ενώ τα υποείδη *Viannia* και *Sauroleishmania* περιλαμβάνουν είδη αποκλειστικά του Νέου Κόσμου και Παλαιού Κόσμου, αντίστοιχα. (προσαρμογή εικόνας από Bates et al.,2007 [6])

Για την περαιτέρω ταξινόμηση κάτω από το επίπεδο του είδους χρησιμοποιούνται μοριακές τεχνικές όπως η πολυεστιακή ενζυμική ηλεκτροφόρηση (Multilocus Enzyme Electrophoresis, MLEE), με την οποία ανιχνεύονται διαφορετικά ενζυμικά αλληλόμορφα. Κάθε είδος *Leishmania* περιλαμβάνει διαφορετικά "ζυμοδέματα" (zymodemes), κάθε ένα από τα οποία χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένα ισοένζυμα. Συνεπώς, ένα ζυμόδεμα, περιλαμβάνει όλα τα υπό μελέτη παρασιτικά στελέχη τα οποία εμφανίζουν, το ίδιο πρότυπο για όλα τα ενζυμικά συστήματα[7].

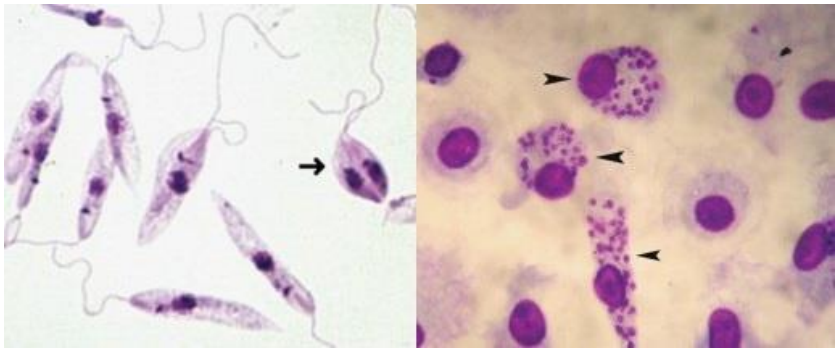
1.3 Μορφολογία του παρασίτου

Η *Leishmania* είναι ένας μονοκύτταρος ευκαρυωτικός οργανισμός. Η οργανολογία του παρασίτου είναι η τυπική ενός ευκαρυωτικού κυττάρου, καθώς εντοπίζεται πυρήνας, πυρηνίσκος, ενδοπλασματικό δίκτυο, σύστημα Golgi, λυσοσώματα, κενοτόπια καθώς και σε κάποια στάδια μαστίγιο. Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό είναι η ύπαρξη του κινητοπλάστη, ο οποίος εμφανίζεται αποκλειστικά στα Κινητοπλαστίδια. Ο κινητοπλάστης είναι ένα οργανίδιο το οποίο περιέχει κυκλικά μόρια DNA (kinetoplast DNA, kDNA) σε πολλές επαναλήψεις και λειτουργεί ως μιτοχόνδριο[8]. Η *Leishmania* μπορεί να βρεθεί σε δύο μορφές, ανάλογα το στάδιο του κύκλου ζωής της.



Εικόνα 1.2 Σχηματική απεικόνιση των ενδοκυτταρικών οργανιδίων της *Leishmania* στην προμαστιγωτή (αριστερά) και αμαστιγωτή (δεξιά) μορφή (Besteiroet et al., 2007 [9]).

- Προμαστιγωτή μορφή: Το παράσιτο εντοπίζεται σε αυτή τη μορφή στο πεπτικό σύστημα της φλεβοτόμου. Είναι εξωκυτταρική και κινητή μορφή, καθώς διαθέτει μαστίγιο. Το παράσιτο έχει ατρακτοειδές σχήμα, λεπτυνόμενο στα άκρα, και είναι ιδιαίτερα επίμηκες, με διαστάσεις που κυμαίνονται από 5 έως 20 μm σε μήκος και από 1 έως 5 μm σε πλάτος, ενώ το μαστίγιο μπορεί να φτάσει τα 20 μm (Εικόνες 1.2, 1.3).
- Αμαστιγωτή μορφή: Το παράσιτο εντοπίζεται σε αυτή τη μορφή στα φαγοκύτταρα και το κυκλοφορικό σύστημα του θηλαστικού ξενιστή. Είναι υποχρεωτικά ενδοκυτταρική μορφή και ακίνητη, καθώς στερείται μαστιγίου. Αυτό έχει συστραφεί και βρίσκεται σε θήκη στο εσωτερικό. Το παράσιτο έχει σφαιρικό έως ωοειδές σχήμα και οι διαστάσεις του κυμαίνονται από 2 έως 4 μm σε μήκος και 1 έως 3 μm σε πλάτος (Εικόνες 1.2, 1.3).



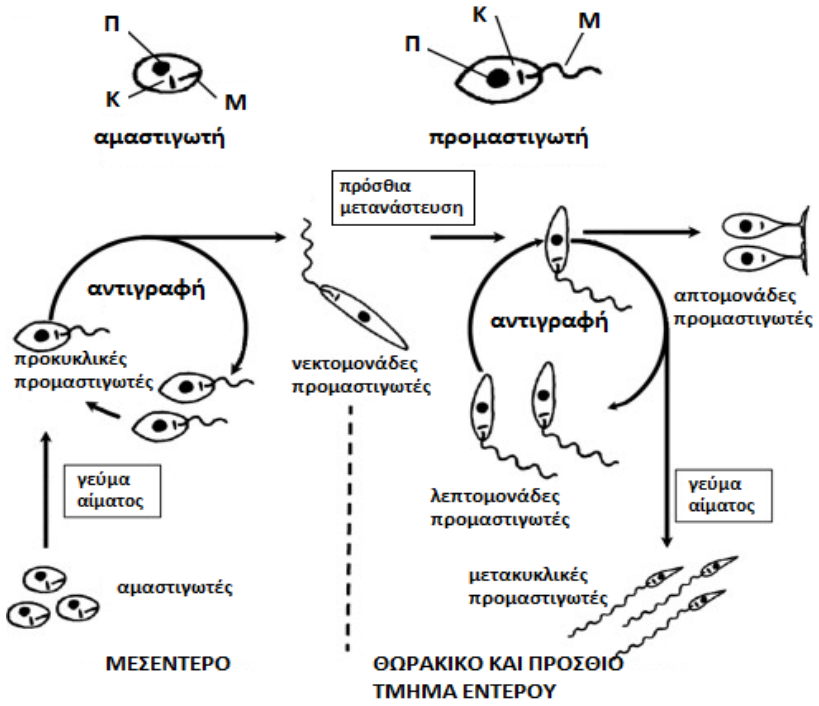
Εικόνα 1.3 Μικροσκοπική απεικόνιση παρασίτου στην προμαστιγωτή μορφή (αριστερά) και την αμαστιγωτή μορφή (δεξιά). (Banuls et al., 2007 [10]).

1.4 Βιολογικός κύκλος του παρασίτου

Η *Leishmania* έχει έναν απλό βιολογικό κύκλο ο οποίος εναλλάσσεται μεταξύ της κινητής μορφής στη φλεβοτόμο και της μη κινητής στον σπονδυλωτό ξενιστή. Όταν η θηλυκή φλεβοτόμος τραφεί από μολυσμένο θηλαστικό, απομυζεί αίμα το οποίο περιέχει το παράσιτο σε αμαστιγωτή μορφή, είτε φαγοκυτταρωμένο σε κύτταρα ή ελεύθερο στην κυκλοφορία. Κατά τη διαδικασία της πέψης του αίματος, οι αμαστιγωτές βρίσκονται στο έντερο της φλεβοτόμου και στη συνέχεια

μεταναστεύουν στο μεσέντερο, όπου και μετατρέπονται σε προκυκλικές προμαστιγωτές μορφές. Στη συνέχεια, κάποιες από τις προκυκλικές προμαστιγωτές μεταμορφώνονται σε νεκτομονάδες, λεπτές και επιμήκεις μορφές (>12 μm) με μεγάλη κινητικότητα. Οι νεκτομονάδες είναι υπεύθυνες για την πρόσθια μετανάστευση του παρασίτου στο θωρακικό τμήμα του πεπτικού συστήματος της φλεβοτόμου. Στη συνέχεια, οι νεκτομονάδες μετατρέπονται σε λεπτομονάδες, εισάγοντας έτσι το παράσιτο σε μια δεύτερη φάση ανάπτυξης στο στομόδαιο* της φλεβοτόμου (Εικόνα 1.4)[11]. Αξίζει να σημειωθεί ότι το παράσιτο μπορεί να αποκτήσει μια ακόμα μορφή μέσα στη φλεβοτόμο, αυτή της απτομονάδας η οποία προκύπτει όταν ορισμένες νεκτομονάδες και λεπτομονάδες μπορούν να προσκολληθούν στο επιθήλιο του ανώτερου πεπτικού συστήματος[6]. Σε αυτές τις προκυκλικές μορφές το παράσιτο έχει πολύ χαμηλή μολυσματικότητα, γι' αυτό υπόκειται στη διαδικασία της μετακυκλογένεσης όπου διαφοροποιείται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να αυξηθεί η μολυσματική του ικανότητα. Οι μετακυκλικές προμαστιγωτές μορφές που προκύπτουν φέρουν αλλαγές τόσο μορφολογικές (μικρότερο μέγεθος σώματος μέχρι 10 μm, αλλά με μεγάλο μαστίγιο που φτάνει τα 20 μm) όσο και μοριακές (έκφραση της LPG και της πρωτεάσης gp53)[12].

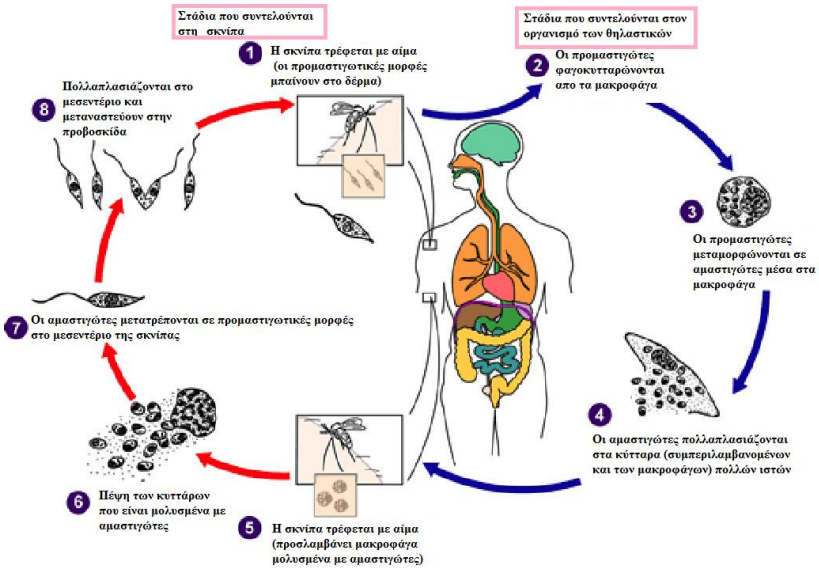
*Στομόδαιο ονομάζεται το πρόσθιο εντερικό τμήμα των εντόμων, το οποίο σχετίζεται κυρίως με την πρόσληψη της τροφής και σε λίγες περιπτώσεις έχει τη λειτουργία της προσωρινή αποθήκευσης. Συνήθως υποδιαιρείται στο στόμα, το φάρυγγα, τον οισοφάγο και το προκοιλίδιο.



Εικόνα 1.4 Σχηματική απεικόνιση των διαφορετικών μορφών της *Leishmania* στο έντομο-ξενιστή. Οι αμαστιγωτές που προσλαμβάνονται κατά το πρώτο γεύμα αίματος του εντόμου μετατρέπονται σε προκυκλικές προμαστιγωτές στο μεσέντερο και στη συνέχεια σε νεκτομονάδες. Οι νεκτομονάδες μεταναστεύουν στο θωρακικό τμήμα του εντέρου και μετατρέπονται σε απτομονάδες ή λεπτομονάδες. Οι λεπτομονάδες μέσω της μετακυκλογένεσης μεταμορφώνονται σε μετακυκλικές προμαστιγωτές και είναι έτοιμες να μολύνουν τα σπονδυλωτό ξενιστή. Π=Πυρήνας, Κ=Κινητοπλάστης, Μ=Μαστίγιο (προσαρμογή εικόνας από Bates et al., 2007 [6])

Στο επόμενο γεύμα της φλεβοτόμου οι μετακυκλικές προμαστιγωτές, οι οποίες βρίσκονται στο θωρακικό τμήμα του πεπτικού συστήματος και στα στοματικά εξαρτήματα του εντόμου, μεταφέρονται στο δέρμα και στη συνέχεια στο αίμα του σπονδυλωτού ξενιστή. Εκεί φαγοκυτταρώνονται από ουδετερόφιλα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα ή μονοκύτταρα και μετατρέπονται σε αμαστιγωτές μορφές. Στο εσωτερικό αυτών των κυττάρων επιβιώνουν αποφεύγοντας την ανοσολογική επιτήρηση του ξενιστή και πολλαπλασιάζονται έως ότου ο αριθμός τους είναι τόσο μεγάλος που το μολυσμένο κύτταρο λύεται και οι αμαστιγωτές απελευθερώνονται

στον περιβάλλοντα χώρο και μολύνουν άλλα κύτταρα, ολοκληρώνοντας το βιολογικό κύκλο (Εικόνα 1.5).



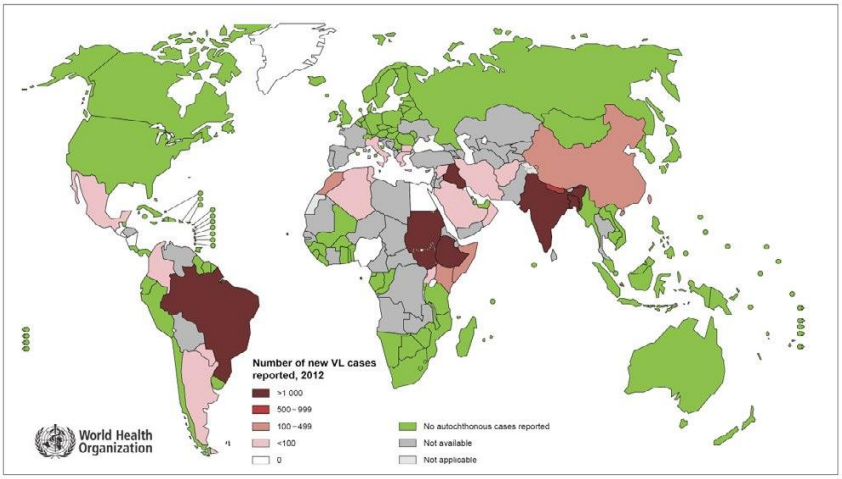
Εικόνα 1.5 Σχηματική απεικόνιση βιολογικού κύκλου *Leishmania* στους δύο ξενιστές. (προσαρμογή εικόνας από Peterson et al., 2011 [13])

1.5 Επιδημιολογία

Η λεϊσμανίαση συναντάται στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές, στην Ανατολική Ευρώπη και τη λεκάνη της Μεσογείου. Η οικολογική κατανομή του παρασίτου είναι από τροπικά δάση μέχρι ερήμους και δείχνει να εμφανίζεται πιο συχνά σε αγροτικές περιοχές απ' ότι σε κατοικημένες. Το κλίμα και οι περιβαλλοντικές αλλαγές έχουν τη δυνατότητα να επεκτείνουν το γεωγραφικό φάσμα των φορέων του παρασίτου και, κατά συνέπεια, τις περιοχές του κόσμου στις οποίες εντοπίζεται λεϊσμανίαση[1].

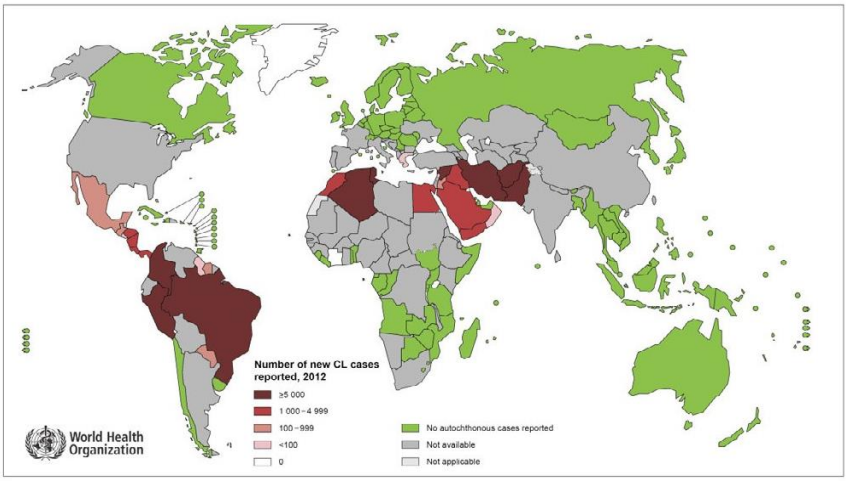
Η ασθένεια πλήττει κυρίως τους φτωχούς ανθρώπους στην Αφρική, την Ασία και τη Λατινική Αμερική, ενώ συνδέεται με τον υποσιτισμό, τις μετακινήσεις πληθυσμών, τις κακές συνθήκες στέγασης, το αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα και την έλλειψη πόρων. Μια πρόσφατη ανασκόπηση δείχνει ότι πάνω από 98 χώρες είναι ενδημικές

για την λεϊσμανίαση. Εκτιμάται ότι κάθε χρόνο σημειώνονται περίπου 0,2 - 0,4 εκατομμύρια νέων περιστατικών σπλαγχνικής λεϊσμανίασης και 0,7 - 1,2 εκατομμύρια δερματικής λεϊσμανίασης σε όλο τον κόσμο. Περισσότερο από το 90% των παγκόσμιων περιπτώσεων σπλαγχνικής λεϊσμανίασης καταγράφονται σε έξι χώρες: το Μπαγκλαντές, τη Βραζιλία, την Αιθιοπία, την Ινδία, το Νότιο Σουδάν και το Σουδάν (Εικόνα 1.6)[2] .



Εικόνα 1.6 Γεωγραφική κατανομή σπλαγχνικής λεϊσμανίασης (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ. [14]).

Η δερματική είναι η πιο ευρέως διαδεδομένη μορφή λεϊσμανίασης, με περίπου το ένα τρίτο των περιστατικών να συμβαίνουν σε κάθε μία από τρεις επιδημιολογικές περιοχές, την Αμερική, τη λεκάνη της Μεσογείου, και τη δυτική Ασία από τη Μέση Ανατολή προς την Κεντρική Ασία. Εκτιμάται ότι οι δέκα χώρες με τα υψηλότερα ποσοστά νοσούντων είναι: το Αφγανιστάν, η Αλγερία, η Βραζιλία, η Κολομβία, η Κόστα Ρίκα, η Αιθιοπία, το Ιράν, το Περού, το Σουδάν και η Συρία, και από κοινού αντιπροσωπεύουν το 70 έως 75% των παγκόσμιων περιπτώσεων δερματικής λεϊσμανίασης [2] (Εικόνα 1.7).



Εικόνα 1.7 Γεωγραφική κατανομή δερματικής λεϊσμανίασης (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ. [14]).

1.6 Κλινικές μορφές του νοσήματος

Η λεϊσμανίαση εμφανίζεται σε τρεις κυρίως κλινικές μορφές: τη δερματική, τη σπλαγχνική και τη βλεννογονοδερματική.

1.6.1 Δερματική (Cutaneous Leishmaniasis, CL)

Είναι η πιο κοινή μορφή του νοσήματος και προκαλείται κυρίως από το είδος *L.major*. Τα συμπτώματα είναι δερματικές αλλοιώσεις με τη μορφή έλκους στα εκτεθειμένα μέρη του σώματος, όπως πρόσωπο, λαιμό, χέρια και πόδια (Εικόνα 1.8). Αρχικά, εμφανίζεται ερυθρότητα του δέρματος στο σημείο του ενοφθαλμισμού του παρασίτου που ακολουθείται από το σχηματισμό μια βλατίδας ή ενός οζιδίου. Μέσα σε μια εβδομάδα αυτό θα μεγαλώσει σταδιακά σχηματίζοντας μια πληγή διαμέτρου έως και 5 εκατοστών. Το παράσιτο εντοπίζεται περιφερικά της πληγής. Αν και στο μεγαλύτερο ποσοστό των περιπτώσεων υπάρχει αυτοΐαση της νόσου μέσα σε διάστημα μηνών ή χρόνων, ανάλογα το είδος του παρασίτου και την

Εικόνα 1.8 Ελκώδης δερματική αλλοίωση ασθενή που πάσχει από δερματική λεϊσμανίαση (CDC [1]).

κατάσταση του ανοσολογικού συστήματος του ασθενή, μένουν δια βίου ουλές και μπορεί να προκύψει μόνιμη παραμόρφωση. Στον Παλαιό Κόσμο υπεύθυνα για τη νόσο είναι τα είδη *L. major*, *L. tropica* και *L. aethiopica*, ενώ στο Νέο Κόσμο τα είδη *L. mexicana*, *L. amazonensis* και από το υπογένος *Viannia* τα είδη *L. peruviana*, *L. gyranensis*, *L. panamensis* και *L. braziliensis*. Το είδος *L. tropica* έχει εντοπιστεί και στην Ελλάδα. [15, 16]

Εικόνα 1.9 Μη ελκώδεις αλλοιώσεις σε ασθενή που πάσχει από DCL (Calvopina et al., 2006 [17]).

Ένας άλλος τύπος δερματικής λεϊσμανίασης είναι η **διάχυτη δερματική λεϊσμανίαση (Diffuse Cutaneous Leishmaniasis, DCL).** Αυτή η μορφή χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη μη-ελκώδων αλλοιώσεων (Εικόνα 1.9) σε σημεία απομακρυσμένα από αυτά του ενοφθαλμισμού του παρασίτου. Προκαλείται κυρίως από τα είδη *L. tropica* και *L. braziliensis*. Δεν υπάρχει αυτοΐαση και η νόσος συχνά υποτροπιάζει μετά από θεραπεία. Εμφανίζεται συχνά σε ασθενείς που πάσχουν από AIDS ή βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή. Όπως και η δερματική λεϊσμανίαση, έτσι και η διάχυτη μορφή της δεν είναι απειλητική για τη ζωή, όμως μπορεί να προκαλέσει μόνιμη παραμόρφωση.[15, 16]

1.6.2 Σπλαγχνική (Visceral Leishmaniasis, VL)

Αποτελεί την πιο σοβαρή μορφή της νόσου. Προκαλείται από παράσιτα των ειδών *L. infantum* και *L. donovani* στον Παλαιό Κόσμο και από το είδος *L. infantum* (στη Λατινική Αμερική αναφέρεται ως *L. chagasi*) στο Νέο Κόσμο. Πρόκειται για μια συστηματική ασθένεια με χρόνο επώασης που κυμαίνεται από 10 ημέρες έως και 1 χρόνο από τη μόλυνση, αλλά συνήθως εκδηλώνεται μέσα στους πρώτους 2-6 μήνες. Με το δήγμα της σκνίπας, τα παράσιτα εισάγονται ενδοδερμικά

Εικόνα 1.10 Ηπατομεγαλία σε ασθενή με σπλαγχνική λεϊσμανίαση (CDC [1]).

και εισβάλουν στα μέλη του Μονοπυρηνικού Φαγοκυτταρικού Συστήματος (ΜΦΣ)[†]. Αρχικά φαγοκυτταρώνονται από μακροφάγα, ουδετερόφιλα ή δενδριτικά κύτταρα και στη συνέχεια μεταφέρονται μέσω των αιμοφόρων αγγείων στους σπλαγχνικούς ιστούς, κυρίως στο ήπαρ, στον σπλήνα και στους λεμφαδένες. Τα συμπτώματα είναι κλιμακωτά ξεκινώντας από ήπιο πυρετό, αίσθημα κακουχίας, ρίγη, απώλεια βάρους ή ανορεξία και καταλήγοντας σε σπληνομεγαλία, ηπατομεγαλία (Εικόνα 1.10) και σε κάποιες περιπτώσεις λεμφαδενοπάθεια. Αυξημένη είναι η συχνότητα εκδήλωσης του νοσήματος υπάρχει στην Ινδία, όπου συμβαίνει υπέρχρωση του δέρματος της κοιλιάς και των άκρων, δίνοντας στην ασθένεια το όνομα kala-azar (μαύρος πυρετός). Σπανιότερα τα συμπτώματα μπορεί να συνοδεύονται από δερματικά οζίδια ή έλκη, ενώ δεν είναι λίγες οι περιπτώσεις που ασθενείς εμφανίζονται εντελώς ασυμπτωματικοί. Προδιάθεση για να νοσήσουν εμφανίζουν άνθρωποι με κακή διατροφή και χαμηλή ανοσολογική επάρκεια. Σε αντίθεση με τη δερματική λεϊσμανίαση, δεν υπάρχει αυτοΐαση και σε περίπτωση που η νόσος δεν αντιμετωπιστεί άμεσα με κατάλληλη φαρμακευτική αγωγή επέρχεται θάνατος μέσα σε 2-3 χρόνια, ενώ σε σοβαρά περιστατικά ακόμα και σε 6-12 μήνες. [15, 16]

Μια ειδική μορφή της νόσου είναι η **μετά Κάλα-αζάρ Δερματική Λεϊσμανίαση (post Kala-azar Dermal Leishmaniasis, PKDL**). Εμφανίζεται σε περιοχές που ενδημεί η *L.* donovani, κυρίως Ανατολική Αφρική και Ινδία, μετά από 0-12 μήνες μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας από σπλαγχνική λεϊσμανίαση. Είναι μια υποτροπιάζουσα μορφή της νόσου που εμφανίζεται με οζώδη εξανθήματα στο πρόσωπο μεγάλου παρασιτικού φορτίου (Εικόνα 1.11). Εξαιτίας αυτού του μεγάλου παρασιτικού

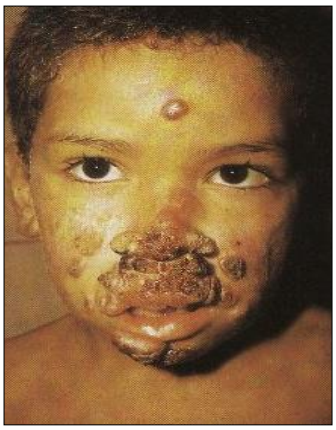
Εικόνα 1.11 Οζώδη εξανθήματα στο πρόσωπο ασθενή που πάσχει από PKDL (WHO [15]).

[†] Το ΜΦΣ είναι το τμήμα του ανοσολογικού που αποτελείται από τα φαγοκύτταρα. Αυτά είναι κυρίως μακροφάγα και μονοκύτταρα και συσσωρεύονται στο σπλήνα και τους λεμφαδένες. Παλαιότερη ονομασία του ΜΦΣ είναι ο όρος *Δικτυοενδοθηλιακό Σύστημα* που δεν χρησιμοποιείται πλέον, καθώς είναι γνωστό ότι η πλειοψηφία των ενδοθηλιακών κυττάρων δεν είναι μακροφάγα.

φορτίου οι ασθενείς είναι εξαιρετικά μολυσματικοί, γεγονός που έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι λειτουργούν ως δεξαμενή του παρασίτου.[15, 16]

1.6.3 Βλεννογονοδερματική (Mucocutaneous Leishmaniasis, ML)

Η τρίτη κύρια μορφή της λεϊσμανίασης είναι η βλεννογονοδερματική. Προκαλείται από τα παράσιτα του είδους *L. braziliensis* και *L. panamensis* στην Κεντρική και Νότια Αμερική. Το παράσιτο μεταναστεύει από το σημείο του δήγματος στο βλεννογόνο του στόματος και του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος μέσω της αιμολέμφου, προκαλώντας παραμορφωτικές αλλοιώσεις. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν έντονη φλεγμονή του βλεννογόνου, ευερεθιστότητα, καταστροφικά για τον ιστό έλκη που εκτείνονται από τη μύτη έως τα εσωτερικά στοματοφαρυγγικά όργανα, πιθανή διάτρηση του ρινικού διαφράγματος καθώς και δυσμορφίες στα χείλη, τη μύτη, το στόμα και τις φωνητικής χορδές (Εικόνα 1.12). Συνήθως αποτελεί μεταστατική μορφή της δερματικής λεϊσμανίασης και μπορεί να κάνει την εμφάνισή της μήνες ή χρόνια μετά την αρχική μόλυνση. Δεν παρατηρείται αυτοΐαση της νόσου, και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να αποβεί θανατηφόρος.



Εικόνα 1.12 Δυσμορφίες στη μύτη και το στόμα ασθενής που πάσχει από ML (Stanford University [18]).

1.7 Διάγνωση

Η διάγνωση της προσβολής από κάποιο είδος *Leishmania* μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους :

1. <u>Απομόνωση και ταυτοποίηση του παρασίτου</u>: Αφού απομονωθεί, το παράσιτο μπορεί να ταυτοποιηθεί με ανάλυση ορισμένων ισοενζύμων όπως η αφυδρογονάση της 6 φωσφορικής γλυκόζης (G6PD)[19].
2. <u>Απομόνωση και καλλιέργεια του παρασίτου</u>: Αν η καλλιέργεια βγει θετική τότε ακολουθούν άλλες εξετάσεις ώστε να καθοριστεί το ακριβές είδος. Τα μειονεκτήματα είναι ο ειδικός εξοπλισμός που απαιτείται, ο κίνδυνος των επιμολύνσεων εάν οι συνθήκες δεν είναι οι αναγκαίες καθώς και ο μεγάλος

χρόνος (>10 ημέρες) που απαιτείται έτσι ώστε να υπάρχει ικανός αριθμός παρασίτων για συμπληρωματικές εξετάσεις[20]. Θεωρείται συνολικά μέθοδος με χαμηλή διαγνωστική ευαισθησία.

3. Μικροσκοπικά: Δείγμα μολυσμένου ιστού (τμήμα δέρματος από εκδορές στην δερματική λεϊσμανίαση[20] ή βιοψία ήπατος, σπλήνα και λεμφαδένων στη σπλαγχνική λεϊσμανίαση[21]) ή επίχρισμα περιφερικού αίματος μονιμοποιείται σε μικροσκοπικό παρασκεύασμα μετά από χρώση Giemsa ή αιματοξυλίνης-ιωσίνης. Η διάγνωση είναι θετική στην περίπτωση που εντοπιστούν μακροφάγα που έχουν φαγοκυτταρώσει παράσιτα. Τα μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι ότι αφενός δεν υπάρχει ταυτοποίηση του είδους της *Leishmania* που απομονώθηκε, και αφετέρου δεν είναι αποτελεσματική σε περιπτώσεις όπου το παρασιτικό φορτίο είναι χαμηλό.
4. Μοριακά: Στηρίζεται στην ανίχνευση του παρασιτικού DNA σε δείγματα ιστών. Η μέθοδος στηρίζεται στην ενίσχυση και ανίχνευση μέσω PCR πυρηνικού DNA της *Leishmania* ή, πιο πρόσφατα, DNA του κινητοπλάστη. Αποτελεί μέθοδο με υψηλή ευαισθησία και χρησιμοποιείται ευρέως μόνη της ή σε συνδυασμό με την μέθοδο της Ανοσοπροσροφητικής Ανάλυσης Στερεάς φάσης με Συνδεδεμένα Ένζυμα (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) [20, 21].
5. Ορολογικά: Πρόκειται για ένα σύνολο μεθόδων ανοσοδιάγνωσης μέσω α) ανίχνευσης ειδικών ή μη ειδικών αντισωμάτων της *Leishmania* στο αίμα ή β) παρασιτικού αντιγόνου σε αίμα ή ούρα. Οι κυριότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι η ELISA και η Δοκιμασία Έμμεσου Ανοσοφθορισμού (Immuno Fluorescent Antibody Test, IFAT).
6. Montenegro test: Είναι μια ορολογική μέθοδος προσαρμοσμένη για άμεση χρήση στο πεδίο. Σε αυτή τη μέθοδο γίνεται ένεση υποδερμικά στον ασθενή από ένα μείγμα παρασιτικών συστατικών (συνήθως παρασιτικού αντιγόνου) και ελέγχεται μετά από 48 ώρες αν υπάρχει αντίδραση καθυστερημένης υπερευαισθησίας (Delayed Type Hypersensitivity, DTH). Το αποτέλεσμα ορίζεται ως θετικό όταν στο σημείο της ένεσης εμφανίζεται σκλήρυνση του δέρματος ή κνίδωση μεγαλύτερη από 5 mm, καθώς η κνίδωση είναι ενδεικτική μόλυνσης. Τα μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι ότι δεν έχει ειδικότητα ως προς το είδος της *Leishmania* ενώ μπορεί να υποδεικνύει και παλιότερες μολύνσεις [20, 21].

1.8 Θεραπεία

Υπάρχει ποικιλία θεραπευτικών προσεγγίσεων απέναντι στη λεϊσμανίαση, που περιλαμβάνουν τόσο κλασσικά φάρμακα όσο και εναλλακτικές μεθόδους. Η θεραπευτική προσέγγιση εξαρτάται εν μέρει από τον ξενιστή και εν μέρει από το παράσιτο. Ορισμένες αγωγές είναι αποτελεσματικές αποκλειστικά ενάντια σε συγκεκριμένα είδη ή στελέχη της *Leishmania* και μόνο σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές. Επίσης, εξειδικευμένη θεραπευτική αγωγή λαμβάνουν ειδικές ομάδες, όπως τα μικρά παιδιά, οι ηλικιωμένοι, οι έγκυες / θηλάζουσες γυναίκες και άτομα που είναι σε ανοσοκαταστολή ή που πάσχουν από άλλα συνοδά νοσήματα[22].

Τα κλασσικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της λεϊσμανίασης είναι χημικές ουσίες οι οποίες μπορεί να έχουν είτε λεϊσμανιοκτόνο δράση, δηλαδή να στοχεύουν και να εξολοθρεύουν το παράσιτο, ή λεϊσμανιοστατική, δηλαδή να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη και την επιβίωσή του οδηγώντας το έμμεσα στο θάνατο. Ακόμα, χωρίζονται σε φάρμακα πρώτης γραμμής, τα οποία χρησιμοποιούνται ενάντια στην ασθένεια, και σε φάρμακα δεύτερης γραμμής, τα οποία χρησιμοποιούνται μετά από ανάπτυξη ανθεκτικότητας του παρασίτου στα φάρμακα της προηγούμενης κατηγορίας και μη επιτυχημένης θεραπείας. Μερικά από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα φάρμακα περιγράφονται παρακάτω.

- Πεντασθενές αντιμόνιο (Sb^{V}): Είναι ένα από τα πρώτα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν στη θεραπεία της λεϊσμανίασης. Το Sb^{V} καθεαυτό αποτελεί την προ-μορφή του φαρμάκου, το οποίο ενεργοποιείται με την μετατροπή του Sb^{V} σε τρισθενές αντιμόνιο (Sb^{III}) που είναι και η δραστική μορφή. Παρά την έντονη λεϊσμανιοκτόνο δράση του, υπάρχουν επιφυλάξεις ως προς τη χρήση του εξαιτίας των παρενεργειών του. Μεγάλο μειονέκτημα είναι και η δυσκολία στη λήψη του, καθώς απαιτείται παρεντερική χορήγηση για μεγάλο χρονικό διάστημα ενώ τα αποτελέσματα δεν είναι πάντα σταθερά. Επιπλέον, έχει αναπτυχθεί ανθεκτικότητα από κάποια είδη, ενώ ανά περιπτώσεις μπορεί να προκαλέσει καρδιοτοξικότητα, νεφροτοξικότητα και παγκρεατίτιδα[23, 24].
- Πενταμιδίνη: Πρόκειται για μια διαμίνη η οποία δρα μέσω πρόσδεσης στο DNA του κινητοπλάστη. Μειονέκτημά της είναι το ότι προκαλεί ισχυρή τοξικότητα[23].

- Αμφοτερικίνη Β και Λιποσωμική Αμφοτερικίνη Β: Η αμφοτερικίνη είναι ένα αντιμυκητιακό φάρμακο το οποίο έχει την ικανότητα να δημιουργεί σύμπλεγμα με στερόλες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του παρασίτου. Τα σημαντικότερα μειονεκτήματά της είναι το γεγονός ότι πρέπει να χορηγείται σε αυστηρά ελεγχόμενο νοσοκομειακό περιβάλλον καθώς και ότι προκαλεί υψηλή νεφροτοξικότητα. Οι παρενέργειες μπορούν να μειωθούν με τη χρήση της λιποσωμικής μορφής της, αλλά δεν απαλείφονται εντελώς[24].
- Μιλτεφοσίνη: Πρόκειται για μια αλκυλοφωσφοχολίνη που χρησιμοποιείται ως χημειοθεραπευτικό φάρμακο και δείχνει να έχει αποτέλεσμα ενάντια στη σπλαγχνική λεϊσμανίαση. Ο τρόπος δράσης της είναι η διατάραξη του λιπιδικού μεταβολισμού του παρασίτου και των μηχανισμών μεταγωγής σήματός του, ενώ είναι ικανή να προκαλέσει βλάβες και στη μεμβράνη του μαστιγίου, οδηγώντας σε σχηματισμό κύστεων[25]. Το πιο σημαντικό μειονέκτημα είναι ότι η χρήση της μπορεί να προκαλέσει τερατογένεση γι' αυτό και αντενδείκνυται ως θεραπεία για γυναίκες σε εγκυμοσύνη ή θηλάζουσες[22]. Επίσης, έχει βρεθεί *in vitro* ανθεκτικότητα του παρασίτου ενώ εμφανίζεται υψηλή τοξικότητα στο 3% των ασθενών[24, 26].

Είναι εμφανές ότι εξαιτίας τόσο των παρενεργειών τους όσο και του υψηλού κόστους παραγωγής των παραπάνω φαρμάκων, η στροφή σε εναλλακτικές θεραπείες, όπως τα φυσικά προϊόντα, είναι πολύ σημαντική. Τα φυσικά προϊόντα τα οποία χρησιμοποιούνται ως φάρμακα είναι κυρίως δευτερογενείς μεταβολίτες που έχουν τη δυνατότητα να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των πρωτοζώων. Δρουν προκαλώντας βλάβη στο DNA, διαταράσσοντας τη δομή των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού ή την ακεραιότητα και τη λειτουργία της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Παρά το γεγονός ότι δεν έχουν τις τοξικές παρενέργειες των χημικών φαρμάκων, η χρήση τους ενέχει ακόμα κινδύνους. Ο λόγος είναι ότι τα πρωτόζωα είναι ευκαρυωτικοί οργανισμοί και, συνεπώς, οι μηχανισμοί τους είναι πιθανό να έχουν ομοιότητες με αυτούς του ξενιστή, με αποτέλεσμα το φάρμακο να αποβεί επικίνδυνο και για τα κύτταρα του ξενιστή[27]. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί αρκετές ουσίες φυτικής προέλευσης ικανές να δράσουν ενάντια στη *Leishmania* και μια εξ' αυτών είναι η ελαιοευρωπεϊνη, ένα φαινολικό παράγωγο του ελαιόλαδου[28].

Τέλος, απαραίτητη κρίνεται η ανάπτυξη εμβολίου έναντι της νόσου, καθώς αυτό θα συμβάλλει στην πρόληψή της αναβαθμίζοντας τη δημόσια υγεία σε πολλά σημεία του πλανήτη, ενώ παράλληλα θα εξοικονομηθούν πόροι που δαπανώνται για τη θεραπεία της λεϊσμανίασης.

1.9 Δενδριτικά κύτταρα

Τα δενδριτικά κύτταρα (Dendritic Cells, DCs) αποτελούν μια κατηγορία λευκοκυττάρων και κύρια ομάδα των φαγοκυττάρων, μαζί με τα κοκκιοκύτταρα (ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα) και τα μακροφάγα. Αποτελούν τον κυριότερο εκπρόσωπο των επαγγελματικών αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (Antigen Presenting Cells, APCs) και επιδεικνύουν εξαιρετική ικανότητα διέγερσης παρθένων Τ λεμφοκυττάρων καθώς και επαγωγής πρωτογενών ανοσολογικών αποκρίσεων[29].

1.9.1 Κατηγορίες δενδριτικών κυττάρων

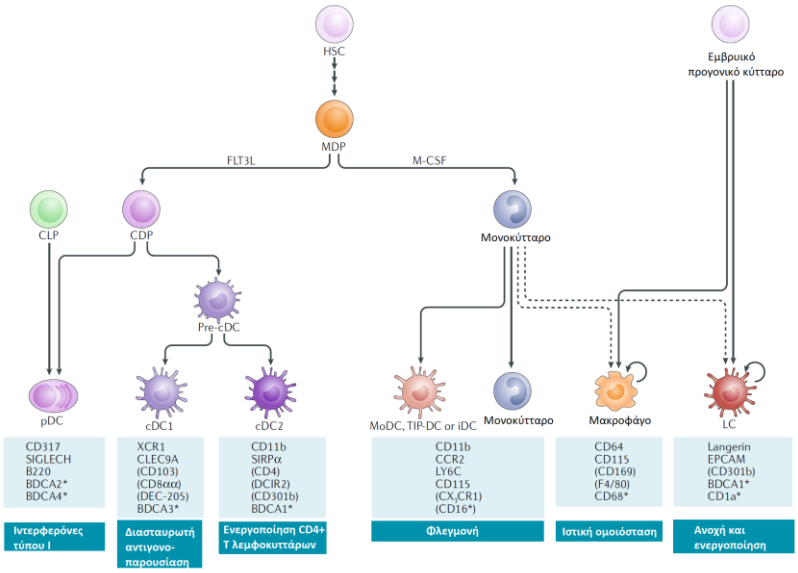
Τα δενδριτικά κύτταρα προέρχονται από αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών τόσο της λεμφοειδούς όσο και της μυελοειδούς κυτταρικής σειράς, και χωρίζονται σε αρκετές υποομάδες ανάλογα με τα επιφανειακά μόρια που εκφράζουν και τη λειτουργία τους. Αρχικά, τα δενδριτικά κύτταρα χωρίζονταν σε λεμφοειδή και μυελοειδή, αλλά αυτή η ονοματολογία δεν ήταν απολύτως αντιπροσωπευτική της αναπτυξιακής προέλευσης τους. Αργότερα προτάθηκε διαχωρισμός ανάλογα με τη λειτουργική διαφοροποίηση αυτών, αλλά και σε αυτή την περίπτωση η πλαστικότητα των δενδριτικών κυττάρων καθιστά αδύνατη μια τέτοια κατηγοριοποίηση. Πλέον τα δενδριτικά κύτταρα ταξινομούνται με κριτήρια οντογένεσης, τα οποία συχνά συσχετίζονται και με τη λειτουργία τους[30].

Σύμφωνα με αυτό το σύστημα τα δενδριτικά κύτταρα διακρίνονται σε :

- ✓ <u>Κλασσικά δενδριτικά κύτταρα (Classic/Conventional Dendritic Cells, cDCs)</u>: κύρια λειτουργία τους αποτελεί η ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων. Διαχωρίζονται περαιτέρω σε cDC1 και cDC2. Τόσο τα cDC1 όσο και τα cDC2 είναι υπεύθυνα για την ενεργοποίηση των $CD4^+$ βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων, ενώ τα cDC1 είναι ο κυριότερος πληθυσμός που επιτρέπει τη διασταυρωτή αντιγονοπαρουσίαση στα $CD8^+$ κυτταροτοξικά Τ

λεμφοκύτταρα[30]. Επιπλέον, τα cDC1 παράγουν μεγάλες ποσότητες Ιντερλευκίνης 12 (Interleukin12, IL-12) με αποτέλεσμα την επαγωγή ισχυρής Th1 απόκρισης καθώς και την κυτταροτοξική δράση των $CD8^+$ Τ λεμφοκυττάρων. Αντιθέτως, τα cDC2 δεν παράγουν IL-12, εγείροντας Th2 αποκρίσεις ή παράγοντας κατασταλτικούς πληθυσμούς $CD8^+$ Τ λεμφοκυττάρων που παράγουν IL-10[29].

- ✓ Πλασματοειδή δενδριτικά κύτταρα (Plasmacytoid Dendritic Cells, pDCs): ενώ δεν είναι αποτελεσματικά ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, εκτός από σπάνιες περιπτώσεις, αποτελούν ισχυρούς παραγωγούς ιντερφερονών τύπου Ι (IFN-α, IFN-β κ.α.).
- ✓ Κύτταρα Langerhans (Langerhans Cells, LCs): μυελοειδή αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα ιστοειδικά ως προς την επιδερμίδα. Προκύπτουν από εμβρυϊκά προγονικά κύτταρα και οντογενετικά τα τελευταία χρόνια έχουν επαναταξινομηθεί ως κατηγορία των μακροφάγων. Όμως, εάν δε ληφθεί υπόψιν η παράμετρος της αναπτυξιακής συγγένειας, τότε λειτουργικά τα κύτταρα Langerhans ανήκουν στα δενδριτικά κύτταρα καθώς φέρουν τα τυπικά χαρακτηριστικά αυτών, όπως παρουσίαση αντιγόνων, μεταναστευτικό δυναμικό και ικανότητα διέγερσης Τ λεμφοκυττάρων[30, 31].
- ✓ Δενδριτικά κύτταρα που προέρχονται από μονοκύτταρα (Monocyte-derived Dendritic Cells, MoDCs): ετερογενής κατηγορία με διαφορετικές λειτουργίες. Παράγονται σε στάδια της φλεγμονής και συνήθως βρίσκονται στους ιστούς όπου παρουσιάζουν αντιγόνα σε εκτελεστικά Τ λεμφοκύτταρα, ενώ συμμετέχουν στην εξάλειψη των παθογόνων και την παραγωγή κυτταροκινών[30].



Εικόνα 1.13 Κατηγορίες δενδριτικών κυττάρων και τα μόρια που τις χαρακτηρίζουν. Ο διαχωρισμός των τύπων των δενδριτικών κυττάρων γίνεται με οντογενετικά κριτήρια και κάθε στάδιο διαφοροποίησης χαρακτηρίζεται από την επίδραση ειδικών μεταγραφικών παραγόντων. HSC: Αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα, MDP: Πρόγονος μακροφάγων δενδριτικών κυττάρων, CLP: Κοινός λεμφοειδής πρόγονος, CDP: Κοινός πρόδρομος δενδριτικών κυττάρων, pDC: Πλασματοειδή δενδριτικά κύτταρα, cDC1/2: κλασσικά δενδριτικά κύτταρα τύπου 1/2, MoDC:_Δενδριτικά κύτταρα που προέρχονται από μονοκύτταρα, LC: Κύτταρα Langerhans (τροποποίηση εικόνας από Eisenbarth et al., 2019 [30])

Κάθε διαφορετικός υποτύπος των δενδριτικών κυττάρων χαρακτηρίζεται από ένα μοναδικό προφίλ επιφανειακών μορίων, το οποίο βοηθάει στο διαχωρισμό τους. Οι υποτύποι που συμμετέχουν στην αντιγονοπαρουσίαση εκφράζουν στην επιφάνειά τους υψηλά επίπεδα του μορίου CD11c, των μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας MHC τάξης II καθώς και των συνδιεγερτικών μορίων CD40, CD80 και CD86[32, 33].

1.9.2 Ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων

Τα πρόδρομα δενδριτικά κύτταρα που παράγονται από τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών εισέρχονται στην κυκλοφορία ως άωρα κύτταρα, τα

οποία χαρακτηρίζονται από μεγάλη φαγοκυτταρική ικανότητα[32]. Σε αυτό το στάδιο ανάπτυξής τους τα μόρια MHC τάξης II εκφράζονται σε σχετικά χαμηλά επίπεδα στην επιφάνειά των δενδριτικών κυττάρων, ενώ αντιθέτως εντοπίζονται σε μεγάλη ποσότητα στα λυσοσώματα. Επιπλέον, τα άωρα δενδριτικά κύτταρα είναι πολύ αποτελεσματικά στην πρόσληψη παθογόνων μικροοργανισμών και παθογόνων, μέσω διαφόρων οδών, όπως η φαγοκυττάρωση, η μακροπινοκυττάρωση καθώς και η ενδοκυττάρωση μέσω υποδοχέων Fcγ τύπου I και II ή μέσω υποδοχέων λεκτίνης τύπου C[34]. Η πρόσληψη των παθογόνων μικροοργανισμών ή των αντιγόνων αυτών σε συνδυασμό με άλλα ερεθίσματα (διέγερση μέσω υποδοχέων TLR, παρουσία προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών στο περιβάλλον ή σύνδεση συνδιεγερτικών μορίων σε υποδοχείς των Τ λεμφοκυττάρων) οδηγούν στην ωρίμαση των δενδριτικών κυττάρων[32].

Τα δενδριτικά κύτταρα αναγνωρίζουν τα παθογόνα μέσω μια ειδικής κατηγορίας υποδοχέων που εκφράζονται στα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας, τους υποδοχείς αναγνώρισης δομικού προτύπου (Pattern Recognition Receptors, PRRs). Αυτοί αναγνωρίζουν και συνδέονται με εξαιρετικά συντηρημένες μοριακές δομές που αποτελούν δομικά μοτίβα αναγνώρισης παθογόνων (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs). Οι περισσότερο μελετημένοι υποδοχείς της υπεροικογένειας των PRRs είναι οι υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like Receptors, TLRs). Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί 13 υποτύποι, εκ των οποίων μεγάλη ποικιλία εκφράζεται στα δενδριτικά κύτταρα, όπως TLR1, TLR2, TLR4 κ.α. . Η σύνδεση τους με τους κατάλληλους προσδέτες διεγείρει ένα καταρράκτη σηματοδοτικών αντιδράσεων που συμβάλλουν στην ενεργοποίηση και τη διαφοροποίηση των Τ λεμφοκυττάρων[35].

Κατά την ωρίμανσή τους, τα δενδριτικά κύτταρα υπόκεινται σε μια δραστική αναδιοργάνωση της δομής και της λειτουργίας τους. Αρχικά, λαμβάνει χώρα μια πολύ έντονη αλλά παροδική αύξηση της φαγοκυτταρικής και μακροπινοκυτταρικής τους ικανότητας, η οποία όμως πολύ γρήγορα μειώνεται σχεδόν σε μηδενικό επίπεδο. Στη συνέχεια, τα μόρια MHC τάξης II που βρίσκονται συσσωρευμένα στο λυσόσωμα μεταφέρονται στη μεμβράνη, ενώ συγχρόνως ενισχύεται η ικανότητα των δενδριτικών κυττάρων να σχηματίζουν συμπλέγματα μορίων MHC τάξης II με αντιγονικά πεπτίδια[32]. Παράλληλα, παρατηρείται αύξηση της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων CD40, CD80 και CD86, τα οποία διαδραματίζουν καίριο ρόλο

στην παρουσίαση των αντιγονικών πεπτιδίων στα Τ λεμφοκύτταρα[35]. Επιπλέον, η σηματοδότηση μέσω TLR δίνει στα δενδριτικά κύτταρα το έναυσμα της μετανάστευσης από την περιφέρεια στα δευτερογενή λεμφικά όργανα όπου βρίσκονται τα παρθένα Τ λεμφοκύτταρα[36]. Τέλος, η ωρίμανση των δενδριτικών διεγείρει την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, με κυριότερη την IL-12, οι οποίες διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην ενεργοποίηση και τη διαφοροποίηση των Τ λεμφοκυττάρων[35, 36].

1.9.3 Οδοί παρουσίασης αντιγόνων

Ανάλογα με την προέλευση των αντιγόνων, αν είναι ενδογενή ή εξωγενή, το ανοσοποιητικό σύστημα χρησιμοποιεί διαφορετική οδό για τη διάσπαση και την παρουσίασή τους. Τα ενδογενή αντιγόνα παρουσιάζονται μέσω της κυτταροπλασματικής οδού, όπου συνδέονται αποκλειστικά σε μόρια MHC τάξης I και παρουσιάζονται σε $CD8^+$ Τ λεμφοκύτταρα. Αντίστοιχα, τα εξωγενή αντιγόνα παρουσιάζονται μέσω της ενδοκυτταρικής οδού, όπου συνδέονται σε μόρια MHC τάξης II και παρουσιάζονται σε $CD4^+$ Τ λεμφοκύτταρα. Τα μόρια MHC τάξης I συναντώνται σε όλα τα εμπύρηνα του οργανισμού, σε αντίθεση με τα μόρια MHC τάξης II που εκφράζονται αποκλειστικά στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα[37]. Τα δενδριτικά κύτταρα ως αντιγονοπαρουσιαστικά αλλά και εμπύρηνα κύτταρα του οργανισμού, συνθέτουν τόσο μόρια MHC τάξης I όσο και τάξης II, με αποτέλεσμα να μπορούν να επεξεργαστούν και να παρουσιάσουν αντιγόνα και με τις δύο οδούς.

Ως ενδογενή αντιγόνα ορίζονται πρωτεϊνικές δομές οι οποίες παράγονται μέσα στα κύτταρα του οργανισμού και μπορεί να είναι είτε παράγωγα του κυττάρου (πρωτεΐνες με μικρό χρόνο ημιζωής ή ελαττωματικές πρωτεΐνες) είτε να έχουν ιική προέλευση. Κατά την κυτταροπλασματική οδό, οι πρωτεΐνες αυτές σημαίνονται με ουβικιτίνη και οδηγούνται στο πρωτεάσωμα, όπου διασπώνται σε μικρότερα πεπτίδια. Στη συνέχεια, τα αντιγονικά πεπτίδια μεταφέρονται από το πρωτεάσωμα στο ενδοπλασματικό δίκτυο μέσω ειδικών πρωτεϊνών μεταφορέων που σχετίζονται με την επεξεργασία του αντιγόνου (Transporter associated with Antigen Processing, TAP), όπου αλληλεπιδρούν με τα μόρια MHC τάξης I. Τέλος, το σύμπλεγμα του αντιγονικού πεπτιδίου με το μόριο MHC τάξης I μεταφέρεται στη μεμβράνη του κυττάρου και παρουσιάζεται σε $CD8^+$ Τ λεμφοκύτταρα[37].

Κατά την ενδοκυτταρική οδό, εξωκυτταρικά αντιγόνα προσλαμβάνονται από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα μέσω φαγοκυττάρωσης, μακροπινοκυττάρωσης ή ενδοκυττάρωσης και διασπώνται περνώντας από διαδοχικά κυτταρικά διαμερίσματα φθίνοντος pH. Ειδικότερα, αρχικά εγκλείονται σε πρώιμα ενδοσώματα (pH=6), στη συνέχεια σε όψιμα ενδοσώματα (pH=5-6) και τέλος σε λυσοσώματα (pH=4-5), όπου τα αντιγονικά πεπτίδια που έχουν προκύψει συνδέονται με τα μόρια MHC τάξης II. Καθώς στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα εκφράζονται MHC μόρια τόσο τάξης I όσο και τάξης II, κρίνεται αναγκαία η ύπαρξη ενός μηχανισμού που θα αποτρέπει τη σύνδεση στα μόρια MHC τάξης II ίδιων ομάδων με τα μόρια MHC τάξης I. Αυτό εξασφαλίζεται με την ύπαρξη μιας αμετάβλητης αλυσίδας (Invariable chain, Ii, CD74) η οποία αλληλεπιδρά με τη θέση δέσμευσης των πεπτιδίων στα μόρια MHC τάξης II και με αυτόν τον τρόπο εμποδίζει τη σύνδεση τους με ενδογενώς παραγόμενα αντιγόνα στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Κατά τη μεταφορά των μορίων MHC τάξης II από το ενδοπλασματικό σύστημα, στο σύμπλεγμα Golgi, στα ενδοσώματα και τέλος στα λυσοσώματα, η αμετάβλητη αλυσίδα σταδιακά αποδιατάσσεται και παραμένει μόνο ένα μικρό θραύσμα, το CLIP (Class II-associated Invariable Chain Peptide). Το CLIP καταλαμβάνει τη θέση δέσμευσης του πεπτιδίου, εξασφαλίζοντας ότι δεν θα υπάρξει πρόωρη δέσμευση οποιουδήποτε αντιγονικού πεπτιδίου στο μόριο MHC τάξης II. Η απομάκρυνση του CLIP γίνεται υπό την παρουσία εξωγενών αντιγονικών πεπτιδίων στο λυσόσωμα και καταλύεται από τη συνεργιστική δράση δύο μη κλασσικών μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας, του HLA-DM και του HLA-DO. Το HLA-DM αντιδρά με το CLIP, απομακρύνοντας το από την αύλακα του μορίου MHC τάξης II, ενώ το HLA-DO έχει ρυθμιστικό ρόλο στη διαδικασία. Με αυτόν τον τρόπο τα αντιγονικά πεπτίδια αλληλεπιδρούν με τα μόρια MHC τάξης II και το σύμπλεγμα που δημιουργείται μεταφέρεται στη μεμβράνη[37].

1.9.4 Διασταυρωτή αντιγονοπαρουσίαση

Η διασταυρωτή αντιγονοπαρουσίαση είναι μια ιδιαίτερη διαδικασία, κατά την οποία εξωγενή αντιγόνα αλληλεπιδρούν και παρουσιάζονται σε μόρια MHC τάξης I. Αυτό το μονοπάτι έχει βρεθεί μέχρι σήμερα *in vivo* μόνο στα δενδριτικά κύτταρα και αποτελεί κομβικό στάδιο στην ενεργοποίηση κυτταροτοξικών αποκρίσεων από τα $CD8^+$ T λεμφοκύτταρα.

Μέσω αυτής της οδού, το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να ανιχνεύσει και να αντιμετωπίσει ιικές μολύνσεις ή μεταλλαγές οι οποίες συμβαίνουν στα παρεγχυματικά κύτταρα. Κάθε κύτταρο που είναι μολυσμένο ή ελαττωματικό μπορεί να εκφράσει τα αντιγονικά πεπτίδια στη μεμβράνη του μέσω μορίων MHC τάξης I, όμως αυτό δεν επαρκεί για να κινητοποιηθεί ανοσολογική απόκριση, καθώς τα παρθένα $CD8^+$ T λεμφοκύτταρα απαιτούν ενεργοποίηση πρώτα από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα προκειμένου να διαφοροποιηθούν σε εκτελεστικά κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CTL). Συνεπώς, όταν τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα δεν είναι άμεσα μολυσμένα με τον ίδιο παράγοντα τότε ο μοναδικός τρόπος να ενεργοποιηθούν τα παρθένα $CD8^+$ T λεμφοκύτταρα είναι μέσω της πρόσληψης των προβληματικών παραγόντων εξωγενώς από τα δενδριτικά κύτταρα και παρουσίασής τους σε μόρια MHC τάξης I [38].

Έχει βρεθεί ότι η διασταυρωτή αντιγονοπαρουσίαση μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω δύο διακριτών μονοπατιών, το κυτταροπλασματικό και το κυστιδιακό. Κατά το κυτταροπλασματικό μονοπάτι, τα εξωγενή αντιγόνα φαγοκυτταρώνονται από τα δενδριτικά κύτταρα και απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα, όπου λαμβάνουν χώρα όλα τα στάδια της επεξεργασίας τους. Όπως και στην κυτταροπλασματική οδό, τα εξωγενή αντιγόνα διασπώνται στο πρωτεάσωμα, χωρίς όμως να είναι ακόμη γνωστό το ακριβές κυτταρικό διαμέρισμα στο οποίο γίνεται η αλληλεπίδραση με τα μόρια MHC τάξης I [38]. Αντιθέτως, στο κυστιδιακό μονοπάτι τα εξωγενή αντιγόνα μετά τη φαγοκυττάρωσή τους εγκλείονται σε κυστίδια, τα φαγοσώματα. Εκεί διασπώνται από την καθεψίνη S, πιθανώς με τη συμβολή και άλλων ενδοσωμικών πρωτεασών, και τέλος συνδέονται με μόρια MHC τάξης I που έχουν προέλθει από ενδοκυττάρωση της κυτταρικής μεμβράνης, από μεταφορά ή από σύντηξη του φαγοσώματος με το ενδοπλασματικό δίκτυο. Και στα δύο μονοπάτια, το σύμπλεγμα αντιγονικού πεπτιδίου με το μόριο MHC τάξης I μεταφέρονται στη μεμβράνη του δενδριτικού κυττάρου όπου παρουσιάζονται σε παρθένα $CD8^+$ T λεμφοκύτταρα[39].

1.10 Ανοσολογική απόκριση έναντι της λεϊσμανίασης

Η πρώτη γραμμή άμυνας που συναντάει το παράσιτο κατά την είσοδό του στον οργανισμό είναι η φυσική ανοσία. Ένας από τους πρώτους μηχανισμούς που επιστρατεύονται από τον οργανισμό για την καταπολέμηση του παρασίτου είναι η

ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος. Συγκεκριμένα ακολουθείται η εναλλακτική οδός, καθώς δεν απαιτείται αντίσωμα για την ενεργοποίηση της και συνεπώς αποτελεί σημαντικό συστατικό της μη ειδικής ανοσίας. Η εναλλακτική οδός ενεργοποίησης του συμπληρώματος ξεκινά από την αναγνώριση των συστατικών της κυτταρικής επιφάνειας του παθογόνου, τα οποία είναι ξένα προς τον ξενιστή. Το μονοπάτι ξεκινά με τον παράγοντα C3 να υδρολύεται αυθόρμητα στα παράγωγα $C3_a$ και $C3_b$, με το δεύτερο να προσκολλάται στην επιφάνεια του παρασίτου προκαλώντας ένα καταρράκτη αντιδράσεων που καταλήγουν στο σχηματισμό του Συμπλέγματος Μεμβρανικής Επίθεσης (Membrane Attack Complex, MAC) το οποίο θανατώνει το παράσιτο με τη δημιουργία οπών στη μεμβράνη του[37].

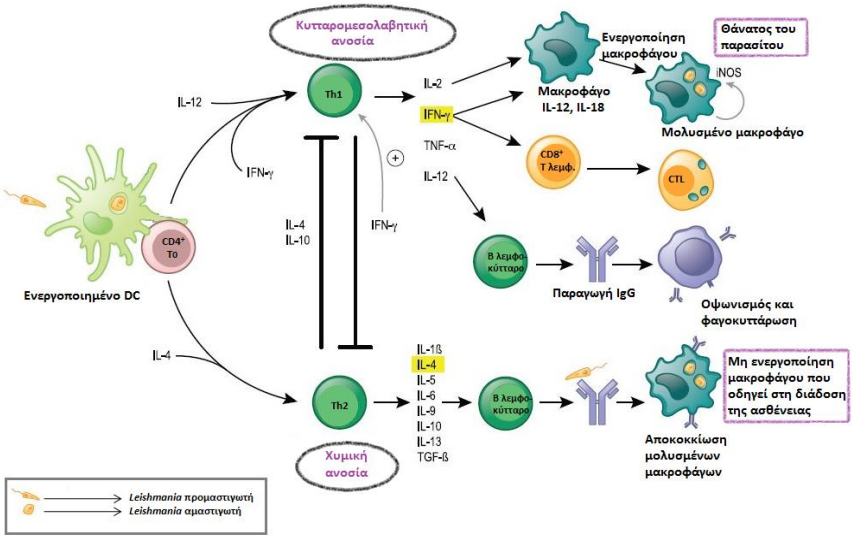
Τα πρώτα κύτταρα που έρχονται σε επαφή με το παράσιτα είναι τα ουδετερόφιλα, τα οποία φαγοκυτταρώνουν το παράσιτο με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των μηχανισμών απόπτωσης τους. Κατά το θάνατο τους, τα ουδετερόφιλα εκκρίνουν τις λεγόμενες "εξωκυτταρικές παγίδες" (Neutrophil Extracellular Traps, NETs), οι οποίες αποτελούνται από DNA, ιστόνες και άλλες πρωτεΐνες και έχουν την ικανότητα να παγιδεύουν το παράσιτο. Έρευνες έχουν δείξει ότι η *Leishmania* και η LPG που φέρει στην επιφάνειά της επάγουν την απελευθέρωση των NETs κατά δοσοεξαρτώμενο τρόπο[40].

Στη συνέχεια, ο οργανισμός επιστρατεύει τα μακροφάγα τα οποία φαγοκυτταρώνουν το παράσιτο είτε άμεσα με ενδοκυττάρωση, είτε έμμεσα φαγοκυτταρώνοντας μολυσμένα αποπτωτικά ουδετερόφιλα. Τα μακροφάγα αποτελούν το περιβάλλον ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού της *Leishmania* καθώς το παράσιτο έχει βρει τρόπο να καταστείλει τους αντιμικροβιακούς μηχανισμούς του μακροφάγου, οι οποίοι αναλύονται στην επόμενη ενότητα.

Γέφυρα ανάμεσα στην έμφυτη και την προσαρμοστική ανοσία αποτελούν τα δενδριτικά κύτταρα. Ως τα κύρια αντιγονοπαρουσιαστικά μόρια του οργανισμού, τα δενδριτικά κύτταρα φαγοκυτταρώνουν το παράσιτο, το διασπούν και εκφράζουν τα παρασιτικά αντιγόνα στη μεμβράνη τους μέσω των μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II (Major Histocompatibility Complex, MHCII). Με αυτόν τον τρόπο παρουσιάζουν τα παρασιτικά αντιγόνα στα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα (T helpers, T_H). Επίσης, εκκρίνουν IL-12, μια πολύ σημαντική κυτταροκίνη η οποία διεγείρει τα φυσικά φονικά κύτταρα (Natural Killer Cells, NK)

και τα Τ λεμφοκύτταρα να παράγουν ιντερφερόνη γ (IFN-γ) και κατ' επέκταση την έναρξη και διατήρησης της T_H1 απόκρισης[40].

Η στροφή της ανοσίας σε T_H1 ή T_H2 απόκριση είναι πολύ κρίσιμη για την πορεία της μόλυνσης. Τα T_H1 κύτταρα παράγουν IFN-γ, IL-2, IL-12, IL-15 και IL-18 και είναι υπεύθυνα για προστατευτική δράση έναντι παθογόνων που μεσολαβείται κυρίως από την κυτταρομεσολαβητική ανοσία. Αντιθέτως, τα T_H2 κύτταρα παράγουν IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 κ.α. και είναι υπεύθυνα για την προστατευτική δράση που μεσολαβείται από τη χυμική ανοσία[41]. Είναι γνωστό ότι η χυμική ανοσία είναι αποτελεσματική απέναντι σε εξωκυττάρια παθογόνα, ενώ η κυτταρομεσολαβητική απέναντι σε κύτταρα του οργανισμού τα οποία είναι μολυσμένα με παράσιτο ή ιό, καθώς και καρκινικά ή γερασμένα κύτταρα. Εφόσον η *Leishmania* είναι υποχρεωτικά ενδοκυτταρικό παράσιτο, είναι εμφανές ότι για την αντιμετώπιση της νόσου απαιτείται ενεργοποίηση της T_H1 απόκρισης. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι διαφορετικά στελέχη της *Leishmania* εγείρουν διαφορετική ανοσοαπόκριση στον ξενιστή, καθώς και ότι η αντιμετώπιση της ασθένειας συνδέεται με την ανάπτυξη T_H1 απόκρισης, ενώ αντίθετα η T_H2 απόκριση ευνοεί την ανάπτυξη της νόσου[42]. Καθώς, όμως, στη διαμόρφωση της ανοσολογικής απάντησης μπορούν να δρουν συνεργιστικά πολλά μόρια, η εξέλιξη της λεϊσμανίασης εξαρτάται από την ισορροπία που δημιουργείται μεταξύ της T_H1 και T_H2 απόκρισης και των κυτταροκινών που η καθεμία εκκρίνει.



Εικόνα 1.14 Η ανοσολογική απόκριση κατά την εξέλιξη της *Leishmania*. Τόσο στην T_H1 όσο και στην T_H2 απόκριση τα DCs παρουσιάζουν το αντιγόνο στα ανώριμα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα. Η σύνδεση αυτή με τη βοήθεια και των άλλων συνδιεγερτικών μορίων, οδηγεί στην ωρίμανση των Τ λεμφοκυττάρων σε ώριμα T_H1 που εκκρίνουν IFN-γ ή T_H2 που εκκρίνουν IL-4. Στον T_H1 κλάδο η σύνδεση του παράσιτου ή των PAMPs που φέρει σε υποδοχείς τύπου Toll σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την έκκριση IL-12. Υπό την επίδραση της IL-12 τα Τ λεμφοκύτταρα ωριμάζουν και εκκρίνουν IFN-γ. Στον T_H2 κλάδο, το αντιγόνο δεν ενεργοποιεί τα δενδριτικά κύτταρα, συνεπώς δεν παράγεται IL-12 και τα Τ λεμφοκύτταρα ωριμάζουν σε κύτταρα που εκκρίνουν IL-4. (προσαρμογή εικόνας από Ezra et al., 2010 [41])

Ασθενείς με σπλαγχνική λεϊσμανίαση εμφανίζουν εξασθενημένη T_H1 απόκριση, ενώ η T_H2 απόκριση παρουσιάζεται ενισχυμένη, κυρίως μέσω αυξημένης παραγωγής της IL-10. Αυτού του τύπου η απόκριση οδηγεί συχνά σε διάσπαρτη νόσο και αυξημένη θνησιμότητα. Αντίθετα, στους ασθενείς με ήπιας μορφής δερματική λεϊσμανίαση υπάρχει ισχυρή T_H1 απόκριση, η οποία συνδέεται με την αυτοΐαση της νόσου, ενώ έχει βρεθεί ότι σε σοβαρά περιστατικά της ασθένειας υπερισχύει η T_H2 απόκριση.[41]

Παρά το γεγονός ότι η προστασία έναντι της *Leishmania* διαμεσολαβείται κυρίως από $CD4^+$ T_H1 κύτταρα, $CD8^+$ Τ κύτταρα έχουν επίσης συσχετιστεί με τη θεραπεία ορισμένων μορφών λεϊσμανίασης. Ειδικότερα, έχει δειχθεί ότι τα $CD8^+$ Τ κύτταρα μαζί

με τα NK κύτταρα, παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματική κάθαρση της δερματικής λεϊσμανίασης (Εικόνα 1.14)[41].

Τέλος, είναι εμφανές ότι καταλυτικός είναι ο ρόλος των κυτταροκινών σε κάθε στάδιο της ανοσολογικής απόκρισης (Εικόνα 1.14). Η ύπαρξη των κατάλληλων κυτταροκινών καθορίζει αν η απόκριση θα στραφεί προς την T_H1 ή T_H2. Η IL-2 που παράγεται από T_H1 κύτταρα οδηγεί στον πολλαπλασιασμό των T και NK κυττάρων. Η IL-12 και ο TNF-α παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των μακροφάγων. Η IFN-γ, η οποία εκκρίνεται από τα T_H1, $CD8^+$ T κύτταρα και τα NK κύτταρα, είναι μια τις σημαντικότερες κυτταροκίνες καθώς ενεργοποιεί τα μακροφάγα ώστε να αρχίζουν τα παράγουν ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS). Η παραγωγή των τοξικών αυτών μορίων είναι αναπόσπαστος παράγοντας στην καταπολέμηση της μόλυνσης από τον οργανισμό[41].

1.11 Επιβίωση του παρασίτου

Η *Leishmania* έχει αναπτύξει μοναδικούς μηχανισμούς ώστε να εξασφαλίσει την επιβίωση της στις αντίξοες συνθήκες που αντιμετωπίζει καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου ζωής της, τόσο στην σκνίπα όσο και στον τελικό ξενιστή .

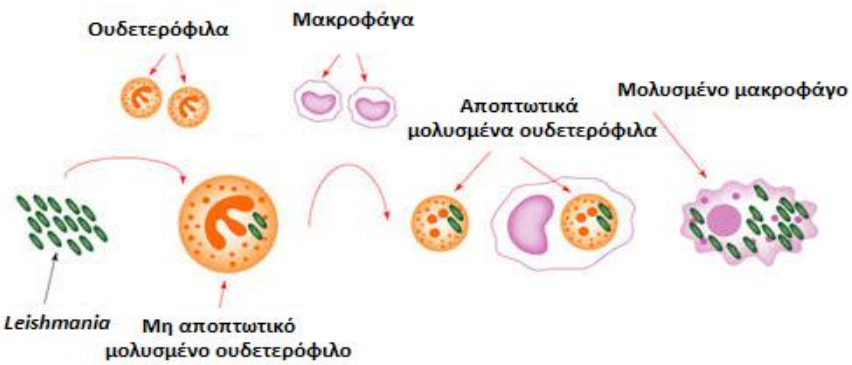
Στη σκνίπα, το παράσιτο όσο ακόμα βρίσκεται στην προκυκλική μορφή του πρέπει να προστατευτεί από τα υδρολυτικά ένζυμα που εκκρίνονται στο πεπτικό σύστημα του εντόμου. Προκειμένου να μην απεκκριθεί κατά την πέψη του αίματος, χρησιμοποιεί επιφανειακά μόρια, όπως η LPG και η μεταλοπρωτεάση gp63, για να προσκολληθεί στο επιθήλιο του εντερικού σωλήνα. Οι αλλαγές που προκύπτουν στα επιφανειακά αυτά μόρια κατά τη μετακυκλογένεση οδηγούν στην μείωση της συγγένειάς τους με το επιθήλιο και συνεπώς στην αποκόλληση του παρασίτου από αυτό[43].

Κατά τη μόλυνση του τελικού ξενιστή, το παράσιτο εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος αυτού, όπου πρέπει να αντιμετωπίσει την ανοσολογική του απόκριση. Ένας από τους πρώτους μηχανισμούς που επιστρατεύονται από τον οργανισμό για την καταπολέμηση του παρασίτου είναι η ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος. Το παράσιτο έχει αναπτύξει την ικανότητα να διαφεύγει του συμπληρώματος με διάφορους τρόπους: εμποδίζοντας την πρόσδεση του παράγοντα $C3_b$ (*L. donovani*), εμποδίζοντας την πρόσδεση άλλων απαραίτητων συστατικών του

MAC (*L. major*) ή ακόμα και με πρόσδεση στην επιφάνειά του άλλων πρωτεϊνών του ορού οι οποίες το προστατεύουν από τη λύση μέσω του συμπληρώματος και ταυτόχρονα διευκολύνουν και την είσοδό του στα μακροφάγα (σύνδεση της C αντιδρώσας πρωτεΐνης σε μόρια LPG στη μεμβράνη του παρασίτου στην *L.donovani*)[43].

Στη συνέχεια, καθώς το παράσιτο φαγοκυτταρώνεται από το μακροφάγο πρέπει να αποφύγει τη μικροβιοκτόνο δράση του, ώστε να μπορέσει να το χρησιμοποιήσει ως περιβάλλον ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού. Για να το πετύχει αυτό χρησιμοποιεί μια ποικιλία διαφορετικών συστατικών.

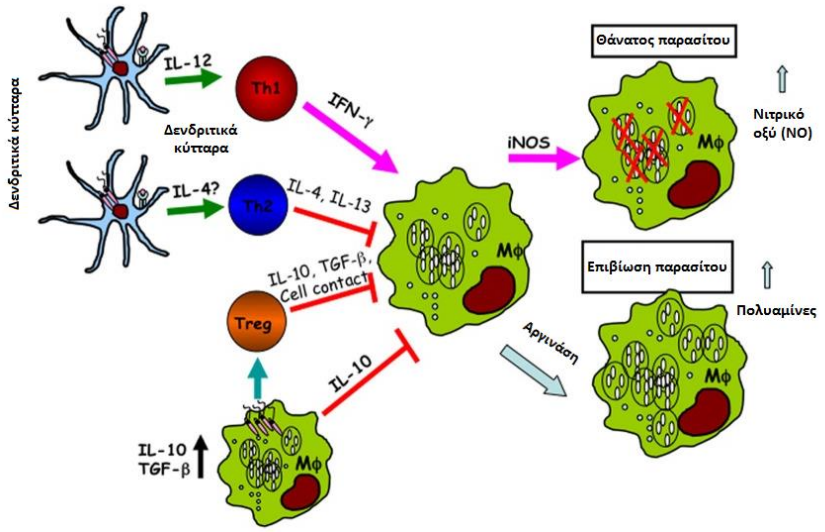
1. **Χρήση ουδετερόφιλων ως Δούρειο Ίππο**: Είναι γνωστό ότι τα πρώτα κύτταρα που έρχονται σε επαφή με το παράσιτο είναι τα ουδετερόφιλα. Αυτά φαγοκυτταρώνουν το παράσιτο, γεγονός που φαίνεται να ενεργοποιεί μηχανισμούς απόπτωσης σε αυτά. Στη συνέχεια, μακροφάγα φαγοκυτταρώνουν μολυσμένα αποπτωτικά ουδετερόφιλα με αποτέλεσμα το παράσιτο να μένει προστατευμένο στο εσωτερικό των ουδετερόφιλων[44]. Με αυτόν τον τρόπο δεν ενεργοποιούνται οι μηχανισμοί άμυνας του μακροφάγου και η μόλυνση εξαπλώνεται σε αυτά (Εικόνα 1.15).



Εικόνα 1.15 Υπόθεση Δούρειου Ίππου. Το παράσιτο μολύνει ουδετερόφιλα στα οποία ενεργοποιούνται μηχανισμοί απόπτωσης. Τα μακροφάγα φαγοκυτταρώνουν τα αποπτωτικά μολυσμένα ουδετερόφιλα με αποτέλεσμα το παράσιτο να μολύνει τα μακροφάγα χωρίς να ενεργοποιεί τους αντιμικροβιακούς μηχανισμούς του τελευταίου. (προσαρμογή εικόνας από University of California [45])

2. **Παρεμπόδιση σχηματισμού του φαγολυσοσώματος**: Η LPG που βρίσκεται στην μεμβράνη του παρασίτου εμποδίζει τη σύντηξη του φαγοσώματος με το λυσόσωμα προς σχηματισμό του φαγολυσοσώματος.

3. **Έλεγχος/χειραγώγηση της ενεργοποίησης των μακροφάγων**: Η ενεργοποίηση των μακροφάγων μπορεί να είναι είτε κλασσική, από προϊόντα της T_H1 απόκρισης ή NK κυττάρων και κυρίως την IFN-γ, είτε εναλλακτική, από κυτταροκίνες της T_H2 απόκρισης. Κατά την κλασσική ενεργοποίηση, η IFN-γ διεγείρει τα μακροφάγα να παράξουν τη συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου (iNOS), ένα ένζυμο που καταλύει την μετατροπή της L-αργινίνης σε μονοξείδιο του αζώτου (NO), ένα τοξικό μόριο που παίζει σημαντικό ρόλο στην εξάλειψη των ενδοκυτταρικών παρασίτων (Εικόνα 1.16). Στην εναλλακτική ενεργοποίηση, κύρια δράση έχουν οι κυτταροκίνες IL-4, IL-13 και IL-10. Η IL-4 και IL-13 διεγείρουν την παραγωγή αργινάσης που οδηγεί στην βιοσύνθεση πολυαμινών, γεγονός που έχει δειχθεί ότι ενισχύει την επιβίωση του παρασίτου (Εικόνα 1.16). Η IL-10, από την άλλη, αναστέλλει την αναπνευστική έκρηξη του μακροφάγου καθώς και την παραγωγή κυτταροκινών που συνδέονται με τη φλεγμονή, κυρίως του TNF-α, γεγονός που επιδρά αρνητικά στην παρασιτοκτόνο δράση των μολυσμένων μακροφάγων. Το παράσιτο προκειμένου να επιβιώσει μέσα στο μακροφάγο πρέπει να στρέψει την απάντηση σε έναν τρόπο που να ευνοεί την ανάπτυξη και την επιβίωσή του. Η IL-12 είναι μια πολύ σημαντική κυτταροκίνη η οποία παράγεται κυρίως από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της $CD4^+$ T_H1 απόκρισης και την παραγωγή IFN-γ. Έχει δειχθεί ότι το παράσιτο διαταράσσει την ικανότητα των μακροφάγων να παράγουν IL-12, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να ενεργοποιηθούν μέσω της κλασσικής οδού[46].

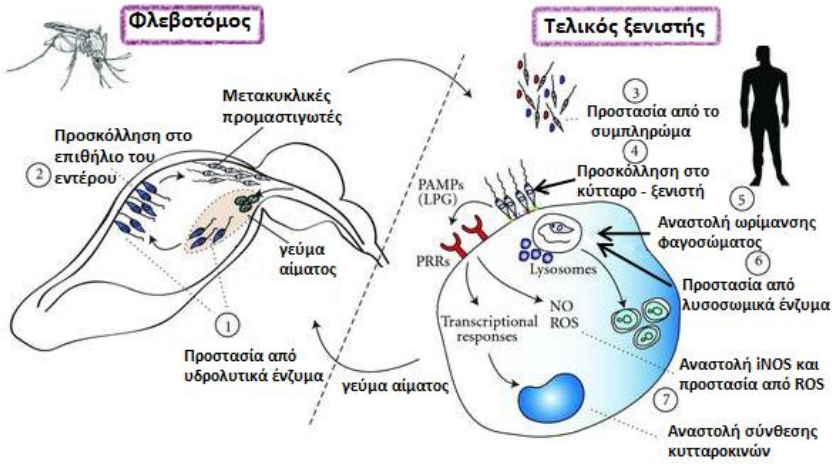


Εικόνα 1.16 Τα δενδριτικά κύτταρα (DC) και τα μακροφάγα (Μφ) ρυθμίζουν το αποτέλεσμα της μόλυνσης από *Leishmania*. Το παράσιτο φαγοκυτταρώνεται τόσο από Μφ όσο και από δενδριτικά κύτταρα, με διαφορετική έκβαση σε κάθε περίπτωση. Μολυσμένα δενδριτικά κύτταρα παράγουν IL-12, η οποία είναι κρίσιμη για την παραγωγή της IFN-γ από $CD4^+$ T_H1 κύτταρα. Η IFN-γ δρα σε μολυσμένα μακροφάγα προκαλώντας την ενεργοποίηση τους (κλασσική ενεργοποίηση), με θετική ρύθμιση της iNOS και την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου και άλλων ελευθέρων ριζών, σημαντικών για τη θανάτωση των ενδοκυτταρικών παρασίτων. Αντίθετα, η παραγωγή της IL-4 από άλλους τύπους κυττάρων υποστηρίζει την $CD4^+$ T_H2 ανάπτυξη. Τα T_H2 κύτταρα παράγουν IL-4 και IL-13, οι οποίες οδηγούν σε προς θετική ρύθμιση της αργινάσης προκαλώντας εναλλακτική ενεργοποίηση μακροφάγων και παραγωγής πολυαμινών που ευνοούν τον πολλαπλασιασμό των ενδοκυτταρικών παράσιτων. Επιπλέον, ρυθμιστικά Τ κύτταρα (Treg) και μολυσμένα μακροφάγα παράγουν ορισμένες ανοσορυθμιστικές κυτταροκίνες, συμπεριλαμβανομένων των IL-10 και TGF-β, οι οποίες απενεργοποιούν περαιτέρω μολυσμένα κύτταρα, οδηγώντας σε μειωμένη θανάτωση παράσιτου.
Όπου, TGF-β : Μεταμορφωτικός Αυξητικός Παράγοντας β (Transforming Growth Factor β), μέσα στις δράσεις του οποίου είναι και η παρεμπόδιση των μακροφάγων. (προσαρμογή εικόνας από Liu et al., 2012 [46])

4. Διαφυγή της αντιγονοπαρουσίασης από τα δενδριτικά κύτταρα: Είναι γνωστό ότι το παράσιτο αναστέλλει τη μετανάστευση των δενδριτικών κυττάρων από την περιφέρεια στα δευτερογενή λεμφικά όργανα μέσω της εμπλοκής του στα μονοπάτια έκφρασης των χημειοκινών. Ακόμα, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι καθυστερεί την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων προκειμένου να ευνοηθεί η

εγκατάσταση της νόσου πριν ενεργοποιηθεί η ανοσολογική απόκριση του ξενιστή. Παράλληλα, κάποια στελέχη του παρασίτου, όπως η *L. donovani* αναστέλλουν επιπλέον και την παραγωγή της IL-12p70, λειτουργικής υπομονάδας της IL-12. Τέλος, τα δενδριτικά κύτταρα επηρεάζονται και έμμεσα από το παράσιτο, μέσω της έκκρισης IL-10 από γειτονικά μολυσμένα κύτταρα[47]. Υπό την επίδραση της IL-10, τα δενδριτικά κύτταρα αποκτούν ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες και κατευθύνουν το ανοσολογικό σύστημα σε μια κατάσταση ανοχής απέναντι στα αντιγόνα του παρασίτου. Οι κυριότεροι μηχανισμοί που συμβάλλουν σε αυτό είναι η ανέργια ή απόπτωση των Τ λεμφοκυττάρων, η διέγερση της διαφοροποίησής σε ρυθμιστικά (Tregs) καθώς και η παραγωγή αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών[47, 48].

~~4.~~ 5. Προσανατολισμός ωρίμανσης Τ λεμφοκυττάρων : Έχει δειχθεί ότι η LPG είναι συνδέτης του υποδοχέα TLR2. Ο TLR2 είναι ένας υποδοχέας τύπου Toll (Toll-like receptors, TLR), οι οποίοι αποτελούν σημαντικούς υποδοχείς αναγνώρισης δομικού προτύπου (Pattern Recognition Receptors, PRRs) και εμπλέκονται τόσο στην αναγνώριση εαυτού-μη εαυτού από το φυσικό κλάδο της ανοσίας, όσο και στη μετέπειτα καθοδήγηση της επίκτητης ανοσίας. Ανήκουν στην οικογένεια υποδοχέων της ιντερλευκίνης 1 και είναι άφθονοι σε μακροφάγα, δενδριτικά και NK κύτταρα. Η σύνδεση των TLR με τις αντίστοιχες συντηρημένες μοριακές δομές του παθογόνου που περιέχουν το μοτίβο αναγνώρισης (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs) οδηγεί σε ένα καταρράκτη συντονισμένων αντιδράσεων μεταβίβασης σήματος που καταλήγει στην παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η IL-12, χημειοκινών και αντιμικροβιακών πεπτιδίων. Η IL-12 είναι πολύ σημαντική για τον προσανατολισμό της ωρίμανσης των Τ λεμφοκυττάρων προς τον T_H1 κλάδο της ανοσολογικής απόκρισης και, κατά συνέπεια, για την παραγωγή την IFN-γ (Εικόνα 1.16). Συνεπώς, η σύνδεση της LPG στον TLR2 έχει ως αποτέλεσμα την αδρανοποίηση του υποδοχέα, παρέχοντας ένα είδος προστατευτικής ανοσίας για τη *Leishmania*[46].



Εικόνα 1.17 Ο ρόλος της LPG στην επιβίωση και μολυσματικότητα της *Leishmania*. (προσαρμογή εικόνας από Franco et al., 2012 [49])

1.12 Ανοσοθεραπεία

Παρά τις ραγδαίες εξελίξεις που έχουν σημειωθεί τις τελευταίες δεκαετίες στον τομέα της ιατρικής και της φαρμακολογίας, η δημόσια υγεία εξακολουθεί να απειλείται. Αρχικά, η αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών έχει οδηγήσει στη δημιουργία ανθεκτικών μικροβιακών στελεχών, τα οποία απαιτούν ολοένα και ισχυρότερα φάρμακα προκειμένου να αντιμετωπιστούν. Επίσης, υπάρχουν λοιμώδεις ασθένειες για τις οποίες δεν έχει βρεθεί ακόμα αποτελεσματική θεραπεία (π.χ. AIDS) ή που η υπάρχουσα θεραπευτική προσέγγιση είναι επικίνδυνη (π.χ. χρήση αμφοτερικίνης)[50]. Τέλος, τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί σημαντική αύξηση στα κρούσματα καρκίνου σε παγκόσμια κλίμακα[51]. Η μη αποτελεσματικότητα των υπαρχόντων φαρμακευτικών προϊόντων σε συνδυασμό με την ανάγκη αντιμετώπισης έως τώρα ανίατων ασθενειών καθιστά απαραίτητη την εύρεση νέων εναλλακτικών τρόπων θεραπείας, όπως η ανοσοθεραπεία.

Ως ανοσοθεραπεία ορίζεται η θεραπευτική προσέγγιση η οποία στηρίζεται στην τροποποίηση της δραστηριότητας του ανοσοποιητικού συστήματος, είτε διεγείροντάς το (ενεργοποιητική ανοσοθεραπεία), είτε καταστέλλοντάς το (κατασταλτική ανοσοθεραπεία). Η πιο ευρέως διαδεδομένη εφαρμογή της ενεργοποιητικής ανοσοθεραπείας είναι στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Αποτελεί

από τις πλέον ελπιδοφόρες θεραπευτικές στρατηγικές καθώς λειτουργεί αφυπνίζοντας τους φυσικούς ανοσολογικούς μηχανισμούς του οργανισμού προκειμένου να αναγνωρίσει και να στοχεύσει ειδικά τα καρκινικά κύτταρα. Με αυτόν τον τρόπο, εξασφαλίζεται η εξάλειψη αποκλειστικά των καρκινικών κυττάρων χωρίς τη συστημική τοξικότητα και τις επικίνδυνες παρενέργειες των συμβατικών θεραπευτικών προσεγγίσεων. Αντίστοιχα, η ενεργοποιητική ανοσοθεραπεία μπορεί να προβεί αποτελεσματική στην αντιμετώπιση λοιμωδών νοσημάτων τα οποία οφείλονται σε παθογόνους μικροοργανισμούς που εμπλέκονται στους αμυντικούς μηχανισμούς του οργανισμού και προκαλούν καταστολή του ανοσολογικού συστήματος. Η χρήση μιας τέτοιας θεραπευτικής προσέγγισης αποφέρει κοινωνικό όφελος καθώς, εκτός από την επιτυχή κάθαρση της εκάστοτε λοίμωξης, αποφεύγεται η χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων, γεγονός που μειώνει τον κίνδυνο δημιουργίας ανθεκτικών μικροβιακών στελεχών[50]. Τέλος, η κατασταλτική ανοσοθεραπεία χρησιμοποιείται ήδη για την αντιμετώπιση αντιδράσεων υπερευαισθησίας και σαν προφυλακτικό μέσο στις μεταμοσχεύσεις, ενώ γίνεται έρευνα για τη σύσταση πρωτοκόλλων ανοσοθεραπείας σε περιστατικά αυτοάνοσων νοσημάτων[50, 52, 53].

Η ανοσοθεραπεία μπορεί να εφαρμοστεί με πολλούς διαφορετικούς τρόπους, που εξαρτώνται κυρίως από τη φύση της εκάστοτε νόσου. Οι κυριότεροι τύποι ανοσοθεραπείας είναι οι εξής[54].

1. Μη ειδική ανοσοθεραπεία: χορήγηση μη ειδικών ανοσολογικών παραγόντων, όπως είναι οι χημειοκίνες, οι κυτταροκίνες (κυρίως ιντερφερόνες και ιντερλευκίνες) και οι αυξητικοί παράγοντες
2. Ειδική θεραπεία με τροποποιημένα Τ λεμφοκύτταρα: Τ λεμφοκύτταρα απομονώνονται από τον οργανισμό, τροποποιούνται ex vivo και επαναχορηγούνται στον ασθενή
3. Θεραπεία με χρήση ογκολυτικών ιών: ιοί τροποποιούνται με τέτοιο τρόπο ώστε να αναγνωρίζουν καρκινικά αντιγόνα
4. Χρήση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων: τα μονοκλωνικά αντισώματα συντίθενται τεχνητά και μπορούν να εφαρμοστούν θεραπευτικά με πάνω από ένα τρόπο. Ένα τρόπος εφαρμογής είναι η σύνδεση τους σε ειδικά αντιγόνα καρκινικών ή ελαττωματικών κυττάρων, σημαίνοντας τα και με

αυτό τον τρόπο κάνοντάς τα ορατά στο ανοσολογικό σύστημα. Εναλλακτικά, μονοκλωνικά αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προσδέτες ειδικών υποδοχέων που εμπλέκονται στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων και ονομάζονται ανοσολογικά σημεία ελέγχου.

1.13 Ανοσολογικά σημεία ελέγχου

Ως ανοσολογικά σημεία ελέγχου (Immune Checkpoints) ορίζονται οι ανασταλτικοί υποδοχείς οι οποίοι εκφράζονται σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και εγείρουν σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία προκαλούν ανοσοκαταστολή. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, αυτά τα μόρια διαδραματίζουν κομβικό ρόλο στην ανοχή του εαυτού καθώς και στη ρύθμιση της έντασης και της διάρκειας της ανοσολογικής απόκρισης, ελαχιστοποιώντας την παράπλευρη βλάβη στους ιστούς[55]. Η σηματοδότηση που μεσολαβείται από αυτά τα μονοπάτια μπορεί να οδηγήσει τα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος, και ιδιαίτερα τα Τ λεμφοκύτταρα, σε μια κατάσταση "εξουθένωσης" (exhaustion). Τα "εξουθενωμένα" Τ λεμφοκύτταρα χαρακτηρίζονται από μειωμένη εκτελεστική ικανότητα, υψηλά επίπεδα έκφρασης ανοσοκατασταλτικών μορίων και μειωμένη ικανότητα ανοσολογικής μνήμης, ενώ βρίσκονται σε διαφορετικό μεταγραφικό στάδιο σε σχέση με τα εκτελεστικά Τ λεμφοκύτταρα ή τα Τ κύτταρα μνήμης[55].

Είναι γνωστό ότι πολλά παθογόνα, καθώς και τα καρκινικά κύτταρα, προκειμένου να διαφύγουν της ανοσολογικής επιτήρησης προωθούν τις ανασταλτικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω των ανοσολογικών σημείων ελέγχου. Η διερεύνηση αυτών των ανοσοκατασταλτικών αλληλεπιδράσεων έχει οδηγήσει τα τελευταία χρόνια στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων οι οποίες στοχεύουν άμεσα τα εμπλεκόμενα σηματοδοτικά μονοπάτια. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση αναστολέων ανοσολογικού σημείου ελέγχου (Immune Checkpoint Inhibitors, ICIs), δηλαδή παραγόντων οι οποίοι παρεμποδίζουν την αλληλεπίδραση ανάμεσα στους υποδοχείς που αποτελούν ανοσολογικά σημεία ελέγχου και στους προσδέτες αυτών[56].

Τα περισσότερο μελετημένα μόρια που εμπίπτουν στην κατηγορία των ανοσολογικών σημείων ελέγχου είναι το CTLA-4 (Cytotoxic T- Lymphocyte-Associated antigen 4) και το PD-1 (Programmed cell death Protein 1). Σήμερα είναι διαθέσιμα

πολλά φαρμακευτικά σκευάσματα εγκεκριμένα από τον Αμερικανικό Οργανισμό Φαρμάκων και Τροφίμων (FDA) τα οποία αποτελούνται από μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των μορίων CTLA-4 και PD-1 και χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου. Αν και κλινικά δεδομένα είναι διαθέσιμα μόνο σχετικά με τη στόχευση των μορίων CTLA-4 και PD-1, γίνεται εκτεταμένη μελέτη πάνω σε πληθώρα μορίων που αποτελούν σημεία ανοσολογικού ελέγχου καθώς και στα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία αυτά συμμετέχουν[57].

1.14 Ανοσοθεραπεία στη λεϊσμανίαση

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι συμβατικές θεραπευτικές προσεγγίσεις ενάντια στη λεϊσμανίαση είναι μερικώς μόνο αποτελεσματικές και συνοδεύονται από επικίνδυνες παρενέργειες. Κατά συνέπεια, τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια στροφής σε εναλλακτικές μορφές θεραπείας, μια εκ των οποίων είναι και η ανοσοθεραπεία.

Από τις πρώτες ανοσοθεραπευτικές προσεγγίσεις στην αντιμετώπιση της λεϊσμανίασης, αποτέλεσε η δημιουργία ενός εμβολίου που αποτελείτο από νεκρό παράσιτο σε συνδυασμό με ανοσοενισχυτικό. Κλινικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν ότι αν και το εμβόλιο μπορούσε να λειτουργήσει θεραπευτικά, ήταν αποτελεσματικό μόνο απέναντι σε ορισμένα μόνο στελέχη του παρασίτου[58].

Μια άλλη προσέγγιση ήταν ο σχεδιασμός πρωτοκόλλων μη ειδικής ανοσοθεραπείας. Αυτά στηρίχθηκαν στη χορήγηση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως η IL-12 και η IFN-γ, ή στην παρεμπόδιση της παραγωγής ανασταλτικών κυτταροκινών, όπως η IL-10. Αν και ιδιαίτερα ελπιδοφόρα ως στρατηγική, τα μέχρι τώρα κλινικά δεδομένα είναι ασαφή και σε κάποιες περιπτώσεις αντικρουόμενα μεταξύ τους[58].

Τα τελευταία χρόνια, η κλινική έρευνα έχει εστιάσει στη μελέτη μορίων ανοσολογικού ελέγχου τα οποία εμπλέκονται στην καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης κατά τη λεϊσμανίαση. Τα επικρατέστερα μόρια που θεωρείται ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ανοσοθεραπευτικά πρωτόκολλα είναι το CTLA-4, το PD-1 και το CD200R.

1.14.1 CTLA-4

Τα CTLA-4 είναι ένας ανασταλτικός υποδοχέας ο οποίος εκφράζεται στα Τ λεμφοκύτταρα. Συνδέεται με μόρια της οικογένειας B7 (B7-1 ή CD80 και B7-2 ή CD86) τα οποία αντίστοιχα εκφράζονται στα δενδριτικά κύτταρα και τα μακροφάγα. Η αλληλεπίδραση του CTLA-4 με τους προσδέτες του αποτελεί την απαρχή ενός σηματοδοτικού μονοπατιού το οποίο οδηγεί σε καταστολή του μονοπατιού της PI3K/Akt και έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή των Τ λεμφοκυττάρων[58, 59].

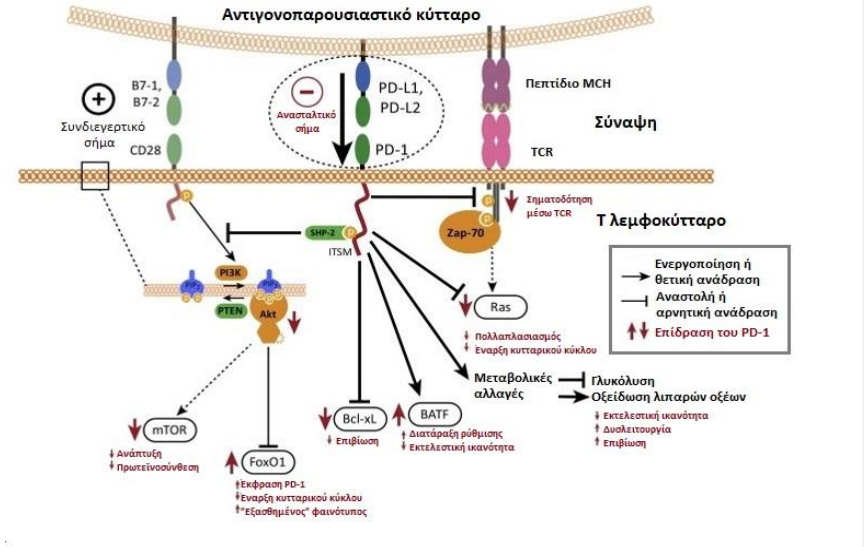
Τα μόρια της οικογένειας B7 δεν συνδέονται αποκλειστικά στο CTLA-4, αλλά μπορούν να προσδεθούν και σε CD28 μόρια, τα οποία εκφράζονται επίσης στα Τ λεμφοκύτταρα. Η σηματοδότηση που μεσολαβείται από τη σύνδεση του CD28 με τους προσδέτες του αποτελεί συνδιεγερτικό σήμα, απαραίτητο για την ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων[58, 59]. Καθώς η συγγένεια των μορίων της οικογένειας B7 με το CTLA-4 είναι υψηλότερη σε σχέση με το CD28, πολλές φορές το CTLA-4 αποκλείει το CD28 από την ανοσολογική σύναψη με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων[58].

Σε ασθενείς με λεϊσμανίαση, έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα του CTLA-4 είναι αυξημένα στα $CD4^+$ Τ λεμφοκύτταρα. Αν και έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες οι οποίες εστιάζουν στην επίδραση της παρεμπόδισης της σύνδεσης του μορίου CTLA-4 με τον προσδέτη του κατά την εξέλιξη της λεϊσμανίασης, τα αποτελέσματα δεν είναι ξεκάθαρα. Εντούτοις, εξαιτίας της επίδρασης που έχει στην ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων, το μόριο CTLA-4 εξακολουθεί να αποτελεί δυνητικό στόχο της έρευνας για τη θεραπεία της λεϊσμανίασης[58].

1.14.2 PD-1

Το μόριο PD-1 είναι ένας ανασταλτικός υποδοχέας ο οποίος εκφράζεται σε διεγερμένα $CD4^+$ και $CD8^+$ Τ λεμφοκύτταρα, καθώς και σε Β λεμφοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, μονοκύτταρα και μακροφάγα. Μπορεί να αλληλεπιδράσει με δύο προσδέτες, το μόριο PD-L1 (CD274) το οποίο εντοπίζεται σε μεγάλη ποικιλία κυττάρων, και το μόριο PD-L2 (CD273), το οποίο αντιθέτως εκφράζεται αποκλειστικά σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (δενδριτικά κύτταρα, μονοκύτταρα και σε κάποιους υποπληθυσμούς των Β λεμφοκυττάρων). Η αλληλεπίδραση του PD-1 με τους προσδέτες του διαταράσσει τη σηματοδότηση που μεσολαβείται από τον TCR,

μέσω αναστολής των σηματοδοτικών μονοπατιών PI3K/Akt και Ras/MEK/Erk. Ως αποτέλεσμα, αναστέλλεται η ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων, δημιουργείται ένας "εξουθενωμένος" φαινότυπος κυρίως στα $CD8^+$ Τ λεμφοκύτταρα, και τέλος οδηγούνται σε απόπτωση (Εικόνα 1.18) [60].



Εικόνα 1.18 Σηματοδοτικό μονοπάτι που μεσολαβείται από τον PD-1. Η αλληλεπίδραση του PD-1 με τους προσδέτες του οδηγεί στη φωσφορυλίωση των τυροσινικών καταλοίπων ITIM και ITSM που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική ουρά του υποδοχέα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την προσέλκυση και ενεργοποίηση της φωσφατάσης SHP-2, η οποία αναστέλλει τη φωσφορυλίωση της κινάσης Zap-70. Στην αποφωσφορυλιωμένη της μορφή, η Zap-70 δεν μπορεί να προσδεθεί στην ζ αλυσίδα του μορίου CD3 του TCR, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Ras/MEK/Erk και να διακόπτεται η σηματοδότηση μέσω του TCR. Επιπλέον, η SHP-2 απενεργοποιεί την κινάση PI3K, διαταράσσοντας έτσι το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt. Όλα τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση του πολλαπλασιασμού των Τ λεμφοκυττάρων, την απώλεια της εκτελεστικής τους ικανότητας καθώς και την επαγωγή ενός "εξασθενημένου" και δυσλειτουργικού φαινοτύπου. (τροποποίηση εικόνας από Chinai et al., 2015 [60])

Αν και η έκφραση των PD-L1 και PD-L2 ρυθμίζεται από τα επίπεδα κυτταροκινών όπως η IL-2, IL-7, IL-15, IL-21 και IFN-γ, η έκφραση του PD-1 επάγεται αποκλειστικά από την αντιγονοπαρουσίαση και υπό φυσιολογικές συνθήκες μειώνεται μετά την κάθαρση της λοίμωξης όπου απουσιάζει η σηματοδότηση μέσω του TCR. Όμως, σε

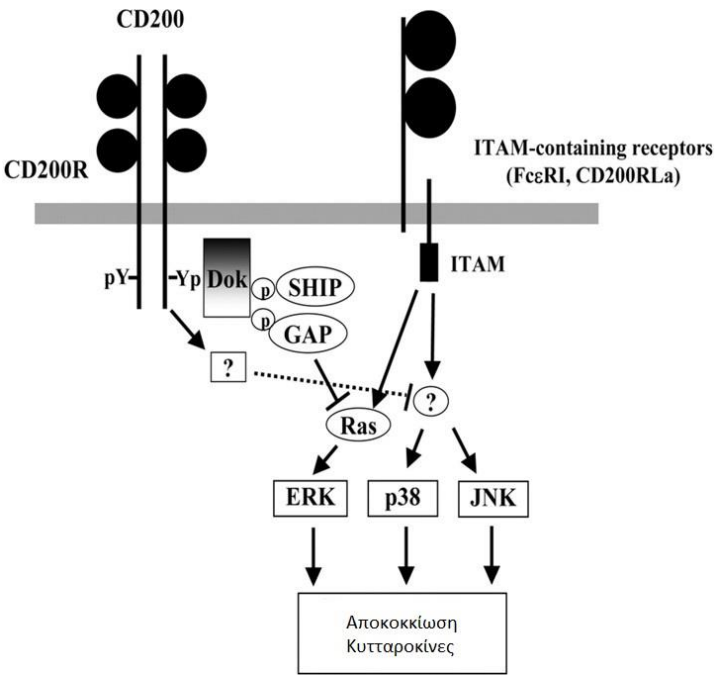
πολλές χρόνιες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένης και της λεϊσμανίασης, έχει παρατηρηθεί παρατεταμένη έκφραση του PD-1 στα Τ λεμφοκύτταρα. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι ορισμένα μόριο του παρασίτου, όπως η LPG, επάγουν την έκφραση του PD-1 στα C8+ Τ λεμφοκύτταρα, καθώς και του PD-L2 στα μακροφάγα[58].

Σύμφωνα με πολλές μελέτες, έχει βρεθεί ότι η παρεμπόδιση του σηματοδοτικού μονοπατιού του PD-1 εγείρει λειτουργικές αποκρίσεις από τα Τ λεμφοκύτταρα, γεγονός που καθιστά τη χρήση του μια ελπιδοφόρα στρατηγική στο σχεδιασμό εναλλακτικών θεραπειών ενάντια στη λεϊσμανίαση[58].

1.14.3 CD200-R

Το μόριο CD200-R είναι ένας ανασταλτικός υποδοχέας που εκφράζεται σε Τ λεμφοκύτταρα, Β λεμφοκύτταρα, φυσικά φονικά κύτταρα, δενδριτικά κύτταρα και μακροφάγα. Ο αποκλειστικός προσδέτης του είναι το μόριο CD200, μια γλυκοπρωτεΐνη που εντοπίζεται σε μεγάλη ποικιλία κυττάρων, τόσο του ανοσοποιητικού συστήματος (δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα, Τ λεμφοκύτταρα και Β λεμφοκύτταρα), όσο και εκτός αυτού (ενδοθηλιακά κύτταρα, νευρώνες, καρδιομυοκύτταρα, οπτικό νεύρο, αμφιβληστροειδής χιτώνας και κερατινοκύτταρα)[61].

Η αλληλεπίδραση του CD200 με τον υποδοχέα του εγείρει ένα καταρράκτη αντιδράσεων ο οποίος καταλήγει στην καταστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού Ras/MEK/Erk. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τη μείωση της αποκοκκίωσης των μαστοκυττάρων, τη μείωση της σύνθεσης προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως TNF-α, IFN-γ, IL-1, IL-17, IL-6, IL-8, IL-10 και MIG, τη μείωση της παραγωγής της επαγόμενης συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (iNOS) καθώς και την αύξηση της σύνθεση των ρυθμιστικών κυτταροκινών IL-10 και TGF-β (Εικόνα 1.19) [61, 62].



Εικόνα 1.19 Σηματοδοτικό μονοπάτι που μεσολαβείται από το CD200-R. Η αλληλεπίδραση του CD200-R με τον προσδέτη του έχει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση των τυροσινικών ITAM καταλοίπων που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική ουρά του CD200-R, με αποτέλεσμα την προσέλκυση και πρόσδεση των Dok1 και Dok2 στην κυτταροπλασματική ουρά του υποδοχέα όπου και φωσφορυλιώνονται. Οι ενεργές πλέον Dok1 και Dok2 προσελκύουν και προσδένουν τα μόρια RasGAP και SHIP, γεγονός που οδηγεί στην καταστολή του μονοπατιού RAS/MEK/Erk. (τροποποίηση εικόνας από Zhang et al., 2004 [63])

Μέχρι τώρα είναι γνωστό ότι η μόλυνση με κάποια στελέχη της *Leishmania*, όπως *L. amazonensis* ή *L. donovani*, προκαλεί αύξηση της έκφρασης του CD200 σε δενδριτικά κύτταρα και μακροφάγα, γεγονός που ευνοεί την εγκαθίδρυση της μόλυνσης. Επιπλέον, στη μόλυνση με *L. amazonensis* έχει βρεθεί ότι εκτός από το CD200 αυξάνεται και η έκφραση του CD200-R στα μακροφάγα. Η αλληλεπίδραση του CD200 με το CD200-R στην επιφάνεια των μακροφάγων οδηγεί στην αναστολή της παραγωγής της iNOS, με αποτέλεσμα να ευνοείται η επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός του παρασίτου εντός των μακροφάγων[58].

Σύμφωνα με τα παραπάνω, το μόριο CD200 αποτελεί ένα κατάλληλο μόριο-στόχος στα πλαίσια της ανάπτυξης ενός ανοσοθεραπευτικού πρωτοκόλλου ενάντια στη λεϊσμανίαση.

2. Σκοπός

Η λεϊσμανίαση είναι μια επικίνδυνη ασθένεια, η οποία πλήττει εκατομμύρια ανθρώπων και χωρίς την κατάλληλη θεραπεία μπορεί να αποδειχθεί θανατηφόρος. Οι μέχρι τώρα θεραπευτικές προσεγγίσεις αποτελούνται από χημειοθεραπευτικούς παράγοντες οι οποίοι έχουν μικρό φάσμα δράσης και δεν επαρκούν για την προστασία από τη *Leishmania*. Αυτό σε συνδυασμό με το πλήθος παρενεργειών που εμφανίζουν αυτές οι θεραπείες καθιστά επιτακτική την ανάγκη εύρεσης εναλλακτικών θεραπευτικών προσεγγίσεων για την αντιμετώπιση της λεϊσμανίασης. Στα πλαίσια αυτού του εγχειρήματος, η ανοσοθεραπεία αποτελεί μια ελπιδοφόρα προσέγγιση, καθώς δρα μέσω τροποποίησης της απόκρισης του ανοσοποιητικού συστήματος του ασθενούς. Με αυτόν τον τρόπο, αυξάνεται η εξειδίκευση της θεραπευτικής μεθόδου ενώ ταυτόχρονα ελαχιστοποιούνται οι παρενέργειες αυτής. Τα δενδριτικά κύτταρα, ως αναπόσπαστο συστατικό της αναγνώρισης του παρασίτου και καθώς αποτελούν τη γέφυρα ανάμεσα στην έμφυτη και την επίκτητη ανοσολογική απόκριση, αποτελούν ιδανικό πληθυσμό στόχευσης σε ένα ανοσοθεραπευτικό πρωτόκολλο που στοχεύει στην καταπολέμηση της λεϊσμανίασης.

Σκοπός της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η διερεύνηση της αποδοτικότητας της χρήσης μονοκλωνικών αντισωμάτων πρόσδεσης ως μέσο παρεμπόδισης της σύνδεσης των ανοσορυθμιστικών μορίων CD200 και CD273 (PD-L2) με τους προσδέτες τους και κατ' επέκτασιν, ως ανοσοθεραπευτική μέθοδος για την αντιμετώπιση της σπλαγχνικής λεϊσμανίασης. Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση που έχει μόλυνση με *L. infantum* στην έκφραση των μορίων CD200 και CD273 στην επιφάνεια δενδριτικών κυττάρων, τα οποία προέρχονται από το μυελό των οστών BALB/c ποντικών. Στη συνέχεια, ελέγχθηκε εάν η παρεμπόδιση της σύνδεσης των μορίων CD200 και CD273, που εκφράζονται στην επιφάνεια των μολυσμένων δενδριτικών κυττάρων, με τους προσδέτες τους, είναι ικανή να αποκαταστήσει την αντιγονοπαρουσιαστική τους ικανότητα των δενδριτικών κυττάρων και, ως αποτέλεσμα, και την ικανότητά τους να ενεργοποιήσουν παρθένα Τ λεμφοκύτταρα. Τέλος, διερευνήθηκε εάν η παρεμπόδιση της σύνδεσης των μορίων CD200 και CD273, που εκφράζονται στην επιφάνεια των μολυσμένων δενδριτικών κυττάρων, με τους

προσδέτες τους, μπορεί να αναστρέψει τον εξουθενωμένο φαινότυπο που εμφανίζουν τα Τ λεμφοκύτταρα κατά τη χρόνια φάση της νόσου.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Υλικά

Αναφέρονται αναλυτικά στα Παραρτήματα I-IV.

3.2 Πειραματόζωα

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ποντικοί της ομομικτικής φυλής BALB/c που χαρακτηρίζονται από αλφισμό και ανοσολογική ανεπάρκεια. Τα BALB/c είναι ένα από τα πιο συνήθη ζωικά πειραματικά μοντέλα καθώς είναι εύκολο να συντηρηθούν, έχουν μικρό αναπαραγωγικό κύκλο και υπάρχει καλή γνώση της φυσιολογίας και του γενετικού προφίλ τους. Είναι επίσης γνωστό ότι είναι ευαίσθητα σε μόλυνση από είδη του γένους *Leishmania,* σε αντίθεση με άλλες φυλές ποντικών[64]. Αυτά τα χαρακτηριστικά σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το 99% των γονιδίων τους είναι ομόλογα προς τα ανθρώπινα, τα καθιστούν ιδανικά για τη μελέτη της λεϊσμανίασης.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν ποντικοί BALB/c, τόσο αρσενικοί όσο και θηλυκοί, 6-8 εβδομάδων, η αναπαραγωγή των οποίων έλαβε χώρα στο τμήμα Ζωικών Προτύπων και Βιοϊατρικής Έρευνας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ. Οι εγκαταστάσεις του χώρου είναι ειδικά διαμορφωμένες έτσι ώστε τα πειραματόζωα να διατηρούνται σε συνθήκες ελεύθερες παθογόνων, σε θερμοκρασία 20-22 °C και με δωδεκάωρη φωτοπερίοδο. Η χρήση των ζώων εργαστηρίου ακολούθησε τους κανόνες βιοηθικής και δεοντολογίας σύμφωνα με την οδηγία της Ευρωπαϊκής Επιτροπής 2010/63 και το νόμο 1992/2015.

3.3 Παράσιτο

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος MHOM/GR/2001/GH8 που ανήκει στο είδος *Leishmania infantum*, ζυμόδεμα MON-1. Το στέλεχος GH8 έχει απομονωθεί στην Ελλάδα από άνθρωπο και έχει εμφανίσει ανθεκτικότητα σε φαρμακευτική αγωγή.

3.3.1 Καλλιέργεια παρασίτου

Η καλλιέργεια του παρασίτου γίνεται σε 10 mL πλήρους θρεπτικού υλικού ($RPMI_{1640}$ εμπλουτισμένο με 10% v/v ορό FBS (Παράρτημα I)) και διατηρείται σε αποστειρωμένες πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιέργειας 25 cm^2, σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 26 °C και απουσία CO_2. Μετά από 3-5 ημέρες επώασης, ώστε

η καλλιέργεια να έχει εισέλθει στη στατική φάση ανάπτυξης, γίνεται ανακαλλιέργεια με μεταφορά εμβολίου της καλλιέργειας σε νέα φιάλη κυτταροκαλλιέργειας με πλήρες θρεπτικό υλικό. Προκειμένου η νέα καλλιέργεια που θα προκύψει να έχει συγκεκριμένη συγκέντρωση (συνήθως 2 x 10^6 παράσιτα/mL) η συγκέντρωση της αρχικής καλλιέργειας προσδιορίζεται με χρήση αιμοκυτταρομέτρου (πλάκα Malassez). Σε αποστειρωμένο πλαστικό σωλήνα τύπου eppendorf όγκου 1,5 mL παρασκευάζεται διάλυμα τελικού όγκου 0,2 mL από: α) δείγμα καλλιέργειας σε αραίωση 1:20, β) χρωστική Trypan Blue ώστε να γίνει ο διαχωρισμός νεκρών και ζωντανών παρασίτων και γ) φορμαλίνη ώστε να ακινητοποιηθεί το παράσιτο στο αιμοκυτταρόμετρο (185 μL Trypan Blue + 5 μL φορμαλίνη + 10 μL δείγμα). Γίνεται καταμέτρηση των προμαστιγωτών σε οπτικό μικροσκόπιο και η συγκέντρωση υπολογίζεται με βάση τον παρακάτω τύπο :

C (παρ./mL) =*Αριθμός παρασίτων (÷) Αριθμός τετραγώνων (÷) Αραίωση (x)* 10^5

Η απόρριψη καλλιέργειας γίνεται με προσθήκη διαλύματος χλωρίνης στις φιάλες με την καλλιέργεια και μετά από την πάροδο είκοσι λεπτών, όπου έχει θανατωθεί το παράσιτο, το περιεχόμενο απορρίπτεται με προσοχή.

Καθώς πρόκειται για κυτταροκαλλιέργεια, η πειρατική διαδικασία γίνεται υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, προκειμένου να μην υπάρχει επιμόλυνση της καλλιέργειας[65].

3.3.2 Προσδιορισμός στατικής φάσης καλλιέργειας / καμπύλη ανάπτυξης παρασίτου

Η καμπύλη ανάπτυξης είναι απαραίτητη σε μελέτες που χρησιμοποιούν κάποιο μικροοργανισμό, καθώς δίνει πληροφορίες για τον πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα του. Στα πειράματα που έγιναν σε αυτή την εργασία, χρησιμοποιήθηκε παράσιτο στατικής φάσης ανάπτυξης, καθώς στη στατική φάση υπάρχει μεγαλύτερο ποσοστό μετακυκλικών που είναι οι μολυσματικές μορφές του παρασίτου. Προκειμένου να μελετηθεί η ανάπτυξη του παρασίτου, γίνεται καλλιέργεια αυτού με την αρχική συγκέντρωση γνωστή (2 x 10^6 παρ./mL) και μετά την πάροδο 24 ωρών γίνεται υπολογισμός της νέας συγκέντρωσης με αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα

Malassez). Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι η συγκέντρωση της καλλιέργειας να σταθεροποιηθεί[65].

3.3.3 Διατήρηση παρασίτου

Η διατήρηση του παρασίτου επιτυγχάνεται με την αποθήκευσή του σε υγρό άζωτο. Αρχικά, 5 mL καλλιέργειας παρασίτου στατικής φάσης φυγοκεντρούνται στις 1.700 rpm, στους 4 °C, για 10 λεπτά. Το ίζημα επαναιωρείται σε ειδικό διάλυμα κατάψυξης που αποτελείται από 70% v/v $RPMI_{1640}$, 20% v/v FBS και 10% v/v DMSO, ένα κρυοπροστατευτικό μέσο που προστατεύει τα κύτταρα από την καταστροφή λόγω κρυστάλλωσης του νερού. Στη συνέχεια, γίνεται μεταφορά του εναιωρήματος σε ειδικούς κρυοπροστατευτικούς σωλήνες όγκου 1,5 mL και τοποθετείται για 18 ώρες σε ειδικό δοχείο που εξασφαλίζει σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας. Τέλος οι σωλήνες φυλάσσονται σε φιάλη με υγρό άζωτο.

Κατά την απόψυξη οι σωλήνες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 37 °C μέχρι να ξεπαγώσει το περιεχόμενό του και στη συνέχεια αυτό μεταφέρεται σε 10 mL πλήρους θρεπτικού υλικού και επωάζεται για 30 λεπτά σε κλίβανο στους 27 °C. Έπειτα, γίνεται φυγοκέντρηση στις 1.700 rpm, στους 27 °C για 10-15 λεπτά και το ίζημα επαναιωρείται σε 10 mL πλήρους θρεπτικού υλικού, ώστε να γίνει έκπλυση του DMSO. Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε αποστειρωμένες πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιέργειας 25 cm^2 και διατηρείται όπως περιγράφεται παραπάνω.

3.3.4 Διατήρηση μολυσματικής ικανότητας παρασίτου

Προκειμένου να διατηρηθεί η μολυσματική ικανότητα του, το παράσιτο χορηγείται περιοδικά σε πειραματόζωα. Στην παρούσα εργασία, η χορήγηση γίνεται σε θηλυκούς BALB/c ποντικούς, ηλικίας 6 έως 8 εβδομάδων. Η μόλυνση των πειραματοζώων γίνεται με ενδοφλέβια χορήγηση 10^7 προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου, σε όγκο 100μL PBS, στην αριστερή ουριαία φλέβα με χρήση βελόνας διαμέτρου 29G. Με αυτόν τον τρόπο, το παράσιτο μεταφέρεται μέσω της κυκλοφορίας στους σπλαγχνικούς ιστούς του ζώου, όπου εγκαθίσταται και πολλαπλασιάζεται. Όταν η νόσος εισέλθει στη χρόνια φάση, δηλαδή σε χρονικό διάστημα δύο μηνών μετά τη μόλυνση, το πειραματόζωο θανατώνεται με αυχενική παρεκτόπιση και ο σπλήνας του απομονώνεται και ομογενοποιείται. Στη συνέχεια, 0,2-0,4 mL του ομογενοποιήματος ενοφθαλμίζονται σε 10 mL πλήρους θρεπτικού

μέσου και τέλος, το παρασιτικό εναιώρημα μεταφέρεται σε φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας 25 cm^2 , όπου καλλιεργείται για 3 έως 5 ημέρες. Μετά το πέρας της επώασης, οι αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου έχουν μετατραπεί σε προμαστιγωτές.

3.3.5 Χρώση παρασίτου με CFSE

Για την εκτέλεση ορισμένων πειραμάτων ήταν απαραίτητη η σήμανση του παρασίτου με τη χρωστική CFDA, SE (CFSE). Προκειμένου να γίνει αυτό, προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου που βρίσκονται σε στατική φάση ανάπτυξης φυγοκεντρούνται στις 1600 rpm, στους 25 °C, για 10 λεπτά και επαναιωρούνται σε στείρο διάλυμα PBS. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις και τα παράσιτα επαναιωρούνται σε στείρο διάλυμα PBS σε τελική συγκέντρωση 1,2 x 10^8 παράσιτα/mL. Στη συνέχεια, επωάζονται με CFSE σε συγκέντρωση 5μM για 10 λεπτά στους 37°C υπό περιοδική ανάδευση και ύστερα για 5 min στον πάγο. Μετά το πέρας της επώασης, η περίσσεια της χρωστικής απομακρύνεται με φυγοκέντρηση. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις με στείρο διάλυμα PBS και τέλος τα παράσιτα επαναιωρούνται σε πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI και επωάζονται για 24 ώρες στους 25°C πριν τη χρήση τους.

3.4 Κυτταροκαλλιέργειες

Ο όρος κυτταροκαλλιέργεια περιγράφει την καλλιέργεια κυττάρων που έχουν απομονωθεί από ζωικό οργανισμό. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιούνται καλλιέργειες δενδριτικών κυττάρων που έχουν απομονωθεί από ποντικούς BALB/c. Οι καλλιέργειες πρέπει να γίνονται υπό αυστηρά ασηπτικές συνθήκες έτσι ώστε να ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος επιμόλυνσης από κάποιο μικροοργανισμό, κυρίως βακτήριο ή μύκητα. Καθώς οι μικροοργανισμοί έχουν χρόνο διπλασιασμού πολύ μικρότερο σε σχέση με τα ζωικά κύτταρα, σε περίπτωση επιμόλυνσης η καλλιέργεια καθίσταται ακατάλληλη για πειραματική διάθεση.

Οι ασηπτικές συνθήκες εξασφαλίζονται με τη χρήση θαλάμου κάθετης νηματικής ροής, ο οποίος διηθεί τον αέρα μέσω ηθμομεμβράνης και εμποδίζει την επιμόλυνση από αερομεταφερόμενους μικροοργανισμούς ή σκόνη. Στο θάλαμο υπάρχει ενσωματωμένη μικροβιοκτόνος λυχνία που εκπέμπει ακτινοβολία UV-C μήκους κύματος 253,7 nm. Η χρήση της εξασφαλίζει αποστείρωση του εσωτερικού του

θαλάμου καθώς η UV ακτινοβολία είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό διμερών θυμίνης στο DNA, γεγονός το οποίο ανακόπτει τον πολλαπλασιασμό κυττάρων και οργανισμών. Η αποστείρωση επιτυγχάνεται στα 15-20 λεπτά λειτουργίας της λυχνίας σε σκοτεινό περιβάλλον, ώστε να περιοριστεί πιθανή έκθεση του δέρματος ή των ματιών σε τυχαίως εκτρεπόμενες ακτίνες[66]. Τέλος, κάθε εργασία σε θάλαμο νηματικής ροής πρέπει να γίνεται φορώντας γάντια και εργαστηριακή ποδιά και πριν την εισαγωγή οποιουδήποτε αντικειμένου πρέπει να έχει προηγηθεί ψεκασμός του με 70% αιθανόλη.

3.5 Απομόνωση και καλλιέργεια δενδριτικών κυττάρων από μυελό των οστών BALB/c ποντικού

3.5.1 Απομόνωση

Ποντικοί BALB/c ηλικίας 6-8 εβδομάδων θανατώνονται με αυχενική παρεκτόπιση και απομονώνονται τα μηριαία οστά και οι κνήμες τους. Τα οστά αποστειρώνονται με εμβάπτιση σε αιθανόλη 70% για 1-2 λεπτά και στη συνέχεια μεταφέρονται σε πλαστικό τρυβλίο που περιέχει θρεπτικό υλικό $RPMI_{1640}$. Οι επιφύσεις των οστών αποκόβονται με τη χρήση ψαλιδιού και λαβίδας με λεπτά άκρα και ο μυελός εκπλένεται με έγχυση θρεπτικού υλικού RPMI μέσω σύριγγας που φέρει βελόνα διαμέτρου 27GX1/2 inch. Το κυτταρικό εναιώρημα μεταγγίζεται διαμέσου φίλτρου με διάμετρο πόρων 70 μm σε πλαστικό κωνικό σωλήνα και φυγοκεντρείται στις 1.300 rpm, στους 4 °C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, το ίζημα επαναιωρείται σε 3-5 mL ψυχρού διαλύματος ACK (Παράρτημα I), εξασφαλίζοντας έτσι την λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, και μετά από 3 λεπτά προστίθεται ίσος όγκος θρεπτικού υλικού $RPMI_{1640}$ ώστε να αποκατασταθεί η ωσμωτική ισορροπία. Ακολουθεί έκπλυση με $RPMI_{1640}$ με φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και τελικώς το ίζημα επαναιωρείται σε πλήρες θρεπτικό υλικό. Η πυκνότητα του δείγματος υπολογίζεται με αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Malassez) και χρώση με Trypan Blue προκειμένου να γίνει διαχωρισμός νεκρών και ζώντων κυττάρων. Συγκεκριμένα, σε πλαστικό αποστειρωμένο σωλήνα τύπου eppendorf παρασκευάζεται διάλυμα τελικού όγκου 0,2 mL από εναιώρημα μυελοειδών κυττάρων σε αραίωση 1:10 και χρωστική Trypan Blue (180 μL Trypan Blue + 20 μL δείγματος). Τα κύτταρα καταμετρώνται σε οπτικό μικροσκόπιο και η συγκέντρωση υπολογίζεται με βάση τον παρακάτω τύπο:

C (κυττάρων/mL) = *Αριθμός κυττάρων (÷) Αριθμός τετραγώνων (÷) Αραίωση (x)* 10^5

3.5.2 Καλλιέργεια

Προκειμένου τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα που απομονώθηκαν από το μυελό των οστών να διαφοροποιηθούν σε δενδριτικά κύτταρα, καλλιεργούνται για 7 ημέρες παρουσία ειδικών διαφοροποιητικών παραγόντων. Ειδικότερα, 3,5 x 10^6 μυελοειδών κυττάρων επιστρώνονται σε πλαστικό τρυβλίο τύπου Petri σε τελικό όγκο 10 mL πλήρους θρεπτικού υλικού, παρουσία ανασυνδυασμένου παράγοντα διέγερσης σχηματισμού αποικιών κοκκιοκυττάρων (rGM-CSF) σε συγκέντρωση 20 ng/mL, και καλλιεργούνται για 7 ημέρες σε κλίβανο 37 °C και 5 % CO_2. Την τρίτη ημέρα της καλλιέργειας προστίθενται 10 mL πλήρους θρεπτικού υλικού, παρουσία rGM-CSF (20ng/mL), ενώ την έκτη μέρα συλλέγονται 10mL της καλλιέργειας, φυγοκεντρούνται στις 1.300 rpm, στους 4 °C για 10 λεπτά και το ίζημα αφού επαναιωρηθεί σε 10mL πλήρους θρεπτικού υλικού παρουσία rGM-CSF (20ng/mL), μεταφέρεται πίσω στην καλλιέργεια. Την έβδομη ημέρα, η καλλιέργεια συλλέγεται μετά από ήπια ανάδευση, ώστε να γίνει πρόσληψη μόνο τον εναιωρηματικών και ημι-προσκολλητικών κυττάρων, στα οποία αντιστοιχούν τα διαφοροποιημένα δενδριτικά κύτταρα. Τα απομονωμένα δενδριτικά κύτταρα φυγοκεντρούνται στις 1.300 rpm, στους 4 °C για 10 λεπτά, επαναιωρούνται σε πλήρες θρεπτικό υλικό και η συγκέντρωσή τους προσδιορίζεται με αιμοκυτταρόμετρο.

3.6 Κυτταρομετρία ροής

3.6.1 Εισαγωγή

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια αυτοματοποιημένη, πολυπαραμετρική, ποσοτική μέθοδο μέτρησης κυττάρων με βάση:

α) συγκεκριμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους, όπως μέγεθος και κοκκίωση

β) την ύπαρξη συγκεκριμένων μορίων - δεικτών, επιφανειακά του κυττάρου (π.χ. μόρια CD) ή ενδοκυτταρικά (π.χ. κυτταροκίνες). Αυτό επιτυγχάνεται με σήμανση των μορίων - δεικτών με φθορίζοντα μονοκλωνικά αντισώματα και καταγραφή της έντασης του φθορισμού κατά την κυτταρομετρική ανάλυση.

Σκοπός της κυτταρομετρίας ροής είναι ο διαχωρισμός των κυτταρικών πληθυσμών και ο υπολογισμός του ποσοστού που αυτοί καταλαμβάνουν επί του συνόλου ενός δείγματος.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται σε σάρωση του κάθε κυττάρου ενός εναιωρήματος με μια φωτεινή δέσμη laser και ανάλυση του σκεδασμού που προκύπτει ώστε να ληφθούν πληροφορίες για το κύτταρο. Ακόμα, τα σημασμένα κύτταρα έχουν την ικανότητα να φθορίζουν, γεγονός που αυξάνει το ποσό των πληροφοριών που μπορούν να ληφθούν. Οι ευαίσθητοι φωτοπολλαπλασιαστές ενός κυτταρομέτρου μπορούν να ανιχνεύσουν:

α) <u>τον ευθύγραμμο ή οριζόντιο σκεδασμό</u> (FSC, **F**orward **Sc**atter), ο οποίος δίνει πληροφορίες για τον όγκο και, κατά συνέπεια, το μέγεθος του κυττάρου.

β) <u>τον πλάγιο ή κάθετο σκεδασμό</u> (SSC, **S**ide **Sc**atter), ο οποίος δίνει πληροφορίες για το σχήμα και την οπτική ομοιογένεια (κοκκίωση) του κυττάρου.

γ) <u>τον φθορίζοντα πλάγιο σκεδασμό</u>, ο οποίος ανιχνεύει την ένταση του φθορισμού των σημασμένων κυττάρων και κατ΄ επέκταση δίνει πληροφορίες για τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του κυττάρου (π.χ. έκφραση συγκεκριμένων μορίων-δεικτών στην επιφάνεια του, ύπαρξη ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών ή άλλων μορίων κ.α.).

Οι πιο κοινές φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται είναι οι:

α) <u>φυκοερυθρίνη</u> (PE), η οποία έχει μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης 490 nm και εκπομπή χαρακτηριστικής κόκκινης-πορτοκαλί ακτινοβολίας σε μήκος κύματος 580 nm.

β) <u>ισοθειοκυανική φλουορεσκεϊνη</u> (FITC),η οποία έχει μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης 490 nm και εκπομπή χαρακτηριστικής πράσινης ακτινοβολίας σε μήκος κύματος 520 nm.

γ) <u>αλλοφυκοκυανίνη</u> (APC), η οποία έχει μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης 650 nm και εκπομπή χαρακτηριστικής κόκκινης ακτινοβολίας σε μήκος κύματος 660 nm

Οι διαφορές στο φάσμα εκπομπής καθιστά δυνατή την πολλαπλή σήμανση ενός κυττάρου με διαφορετικά φθοριοχρώματα, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα ταυτόχρονου προσδιορισμού πολλαπλών παραμέτρων[67].

3.6.2 Προετοιμασία κυττάρων για κυτταρομετρία ροής

Η ταυτοποίηση των δενδριτικών κυττάρων γίνεται με ανίχνευση του μορίου CD11c, μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των ιντεγκρινών και αποτελεί κοινό δείκτη πληθυσμών δενδριτικών κυττάρων. Χρησιμοποιείται για να

καθοριστεί το ποσοστό των δενδριτικών κυττάρων επί του συνόλου των κυττάρων του εκάστοτε δείγματος. Τα κύτταρα που φέρουν στην επιφάνειά τους το μόριο CD11c και ταυτοποιούνται κατόπιν σήμανσης με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του μορίου CD11c του ποντικού συνδεδεμένο με αλλοφυκοκυανίνη (APC).

Σε αυτή την εργασία, η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιείται για την ανάλυση κυττάρων που προέρχονται από πρωτογενείς καλλιέργειες. Αρχικά, τα κύτταρα προς μελέτη συλλέγονται σε σωλήνες φυγοκέντρησης τύπου eppendorf και η περίσσεια του θρεπτικού μέσου απομακρύνεται με φυγοκέντρηση υπό κλίση σε επιτραπέζια μικροφυγόκεντρο στις 4.000 rpm, σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, τα δείγματα επιστρώνονται σε πλάκα μικροτιτλοδότησης με κωνικό πυθμένα και γίνονται δύο εκπλύσεις με 0,1 mL διαλύματος PBS/3% FBS (FACS Buffer) με φυγοκέντρηση στις 800 rpm, στους 4° C για 5 λεπτά.

- Χρώση με αντισώματα έναντι μεμβρανικών δεικτών: Μετά τις εκπλύσεις, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 0,1 mL FACS Buffer στο οποίο περιέχονται τα φθορίζοντα αντισώματα και επωάζονται στο σκοτάδι, σε πάγο για 30 λεπτά.
- Χρώση με αντισώματα έναντι ενδοκυτταρικών δεικτών: Προκειμένου να γίνει ανίχνευση ενδοκυτταρικών μορίων, τα φθορίζοντα αντισώματα πρέπει να μπορέσουν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη, χωρίς όμως να διαταραχθεί η συνοχή αυτής. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση μονιμοποιώντας τα κύτταρα πριν τη χρώση καθώς και χρώση παρουσία παραγόντων που καθιστούν την κυτταρική μεμβράνη διαπερατή. Με αυτόν τον τρόπο, το αντίσωμα μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη χωρίς να διακόψει τη συνοχή της ή να αλλοιώσει η δομή της[68]. Στην παρούσα εργασία, η μονιμοποίηση γίνεται με παραφολμαλδεΰδη και η χρώση παρουσία σαπωνίνης, ενός γλυκοζίτη που έχει τόσο υδρόφιλες όσο και υφρόφοβες ιδιότητες. Η αμφιπαθητική αυτή φύση της σαπωνίνης, της δίνει τη δυνατότητα να λειτουργεί ως επιφανειοδραστικός παράγοντας και να αλληλεπιδρά με στοιχεία της κυτταρικής μεμβράνης όπως η χοληστερόλη και τα φωσφολιπίδια, προσδίδοντας μια αντιστρεπτή διαπερατότητα της μεμβράνης. Συνεπώς, η χρώση με τα φθορίζοντα

αντισώματα γίνεται σε διάλυμα διάτρησης PBS/3% FBS/0,1% σαπωνίνη (Permeabilization Buffer). Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: Μετά το πέρας των εκπλύσεων τα κύτταρα μονιμοποιούνται με προσθήκη 0,050 mL παραφορμαλδεΰδης 2% v/v και επώαση για 15 λεπτά στον πάγο. Η περίσσεια της παραφορμαλδεΰδης απομακρύνεται με φυγοκέντρηση στις 800 rpm, στους 4° C για 5 λεπτά ακολουθούμενη από μια έκπλυση με FACS Buffer. Στη συνέχεια, γίνεται επώαση με τα επιθυμητά φθορίζοντα αντισώματα για 15 λεπτά, στο σκοτάδι και στον πάγο. Μετά το πέρας της επώασης, γίνεται προσθήκη 0,050 mL Permeabilization Buffer και τα κύτταρα επωάζονται για άλλα 20 λεπτά στις ίδιες συνθήκες.

Στο τέλος της επώασης τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στις 800 rpm, σε στους 4° C για 5 λεπτά ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του αντισώματος και μετά από τρεις εκπλύσεις με PBS και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 0,5 mL PBS και μεταφέρονται σε ειδικό δοκιμαστικό σωλήνα πολυστυρενίου στον οποίο θα γίνει η ανάλυση στο κυτταρόμετρο[69]. Στον κυτταρομετρητή ροής αναλύονται 10.000-30.000 γεγονότα/δείγμα.

3.6.3 Ανάλυση στο κυτταρόμετρο (FACS Analysis)

Η ανάλυση των δειγμάτων γίνεται στο κυτταρόμετρο FACS Calibur της εταιρείας Becton Dickinson ενώ η επεξεργασία των αποτελεσμάτων γίνεται με το λογισμικό FlowJo_V στους 4° C 10 (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA). Για κάθε δείγμα αναλύονται από 10.000 έως 30.000 γεγονότα (κύτταρα) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε ειδικά διαγράμματα. Οι τύποι των διαγραμμάτων είναι οι ακόλουθοι:

α) <u>στικτόγραμμα (dotplot)</u>: παρουσιάσει τις τιμές δύο διαφορετικών μεταβλητών και κάθε γεγονός απεικονίζεται ως ένα σημείο πάνω στο διάγραμμα.

β) <u>ιστόγραμμα (histogram plot)</u>: παρουσιάζει τις τιμές μιας παραμέτρου σε σχέση με το συνολικό αριθμό των κυττάρων

3.7 Προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης των αντισωμάτων έναντι των ανοσορυθμιστικών μορίων CD200 και CD273

Ο καθορισμός της βέλτιστης συγκέντρωσης στην οποία δρουν τα αντισώματα έναντι των ανοσορυθμιστικών μορίων CD200 και CD273 κρίνεται απαραίτητος προκειμένου να προσδιοριστεί με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ακρίβεια η έκφραση των μορίων στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων. Προκειμένου να γίνει αυτό, αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα απομονώνονται από μυελό των οστών BALB/c ποντικού και καλλιεργούνται για 7 ημέρες παρουσία GM-CSF. Τα διαφοροποιημένα δενδριτικά κύτταρα συλλέγονται και επιστρώνονται σε πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 24άρων φρεατίων σε υποδιπλάσιες συγκεντρώσεις (από $1,25x10^5$ έως $100x10^5$ κύτταρα/φρεάτιο) όπου καλλιεργούνται για 24 ώρες στους 37 °C και 5% CO_2, παρουσία ή απουσία LPS (1 μg/mL). Μετά το πέρας της επώασης, τα δενδριτικά συλλέγονται, φυγοκεντρούνται στις 1.300 rpm, στους 4 °C για 10 λεπτά και το ίζημα επαναιωρείται σε FACS Buffer. Ακολουθεί επώαση με αντισώματα σημασμένα με φυκοερυθρίνη (PE) έναντι των μορίων CD200 και CD273 σε διαδοχικές συγκεντρώσεις (0,250 έως 0,03 μg/δείγμα και από 0,5 έως 0,06 μg/δείγμα, αντίστοιχα) για 30 λεπτά. Το ποσοστό της έκφρασης των μορίων CD200 και CD273 στον πληθυσμό προσδιορίζεται με χρήση κυτταρομετρίας ροής.

3.8 Προσδιορισμός βέλτιστης αναλογίας μόλυνσης

Ένα απαραίτητο βήμα στη μελέτη της ανοσοαπόκρισης του οργανισμού κατά τη μόλυνση από *Leishmania infantum* είναι η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στο παράσιτο και τα δενδριτικά κύτταρα. Δενδριτικά κύτταρα που έχουν απομονωθεί από μυελό των οστών BALB/c μυός και έχουν καλλιεργηθεί για 7 ημέρες παρουσία GM-CSF (όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 3.6.1) επιστρώνονται σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 24άρων φρεατίων σε συγκέντρωση $5x10^5$ κυττάρων/φρεάτιο. Στον πυθμένα των φρεατίων έχουν προ-τοποθετηθεί γυάλινες καλυπτρίδες με επίστρωση πολύ-L-λυσίνης, ένα ομοπολυμερές που επιτρέπει την προσκόλληση των κυττάρων στην καλυπτρίδα. Προκειμένου να προσκολληθούν, τα δενδριτικά κύτταρα επωάζονται για 2 ώρες σε κλίβανο 37 °C και 5 % CO_2 και ακολουθεί έκθεση σε προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *L. infantum* στατικής φάσης ανάπτυξης σε αναλογίες 1:5, 1:10 και 1:20, για 4 ώρες σε κλίβανο 37 °C και 5% CO_2. Στη συνέχεια,

το παράσιτο απομακρύνεται με 2-3 εκπλύσεις με θερμό $RPMI_{1640}$ και, αφού επαναιωρηθούν σε πλήρες θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα επωάζονται σε κλίβανο 37 °C και 5% CO_2 για 4, 12, 24 και 48 ώρες. Στο πέρας της κάθε επώασης, τα κύτταρα εκπλένονται τρεις φορές με θερμό PBS, μονιμοποιούνται με μεθανόλη για 20 min και χρωματίζονται με διάλυμα χρωστικής Giemsa (Παράρτημα Ι). Το ποσοστό των μολυσμένων δενδριτικών κυττάρων καθώς και ο αριθμός των αμαστιγωτών ανά κύτταρο προσδιορίζονται με παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο [70].

3.9 Έλεγχος έκφρασης μορίων CD200 και CD273 σε μολυσμένα δενδριτικά κύτταρα

Δενδριτικά κύτταρα που έχουν απομονωθεί από μυελό των οστών BALB/c μυός και έχουν καλλιεργηθεί για 7 ημέρες παρουσία GM-CSF (όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 3.6.1) επιστρώνονται σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 24άρων φρεατίων σε συγκέντρωση $5x10^5$ κύτταρα/φρεάτιο. Ακολουθεί έκθεση σε προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου στατικής φάσης ανάπτυξης, σημασμένου με CFSE, σε αναλογία 1:20, για 4 ώρες στους 37 °C, 5% CO_2. Το παράσιτο που δεν έχει προσληφθεί από τα δενδριτικά κύτταρα απομακρύνεται με φυγοκέντρηση υπό κλίση σε επιτραπέζια μικροφυγόκεντρο στις 3.000 rpm, σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Αφού επαναιωρηθούν σε πλήρες θρεπτικό υλικό $RPMI_{1460}$, τα δενδριτικά επωάζονται σε κλίβανο 37 °C και 5% CO_2 για 4, 12 και 24 ώρες. Μετά το πέρας της επώασης, τα δενδριτικά συλλέγονται, φυγοκεντρούνται στις 1.300 rpm, στους 4 °C για 10 λεπτά και το ίζημα επαναιωρείται σε FACS Buffer. Ακολουθεί επώαση με αντισώματα σημασμένα με φυκοερυθρίνη έναντι των μορίων CD200 και CD273 για 30 λεπτά. Το ποσοστό των κυττάρων που φέρουν στην επιφάνειά τους το μόριο CD200 ή CD273 προσδιορίζεται με κυτταρομετρίας ροής.

3.10 Έλεγχος ειδικότητας αντισωμάτων σύνδεσης έναντι των μορίων CD200 και CD273

Δενδριτικά κύτταρα που έχουν απομονωθεί από μυελό των οστών BALB/c μυός και έχουν καλλιεργηθεί για 7 ημέρες παρουσία GM-CSF (όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 3.6.1) επιστρώνονται σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 24άρων φρεατίων σε συγκέντρωση $5x10^5$ κύτταρα/φρεάτιο. Ακολουθεί έκθεση σε προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου στατικής φάσης ανάπτυξης, σημασμένου με

CFSE, σε αναλογία 1:20 (όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 3.9). Το σύνολο των δειγμάτων επωάζεται σε κλίβανο 37 °C και 5% CO_2 για 24 ώρες. Στη συνέχεια, γίνεται επίδραση με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των μορίων CD200 (0,250 και 0,125 μg/δείγμα) ή CD273 (0,125 και 0,06 μg/δείγμα) και τα δενδριτικά επωάζονται σε κλίβανο 37 °C και 5% CO_2 για 24 ώρες. Μετά το πέρας της επώασης, τα δενδριτικά συλλέγονται, φυγοκεντρούνται στις 1.300 rpm, στους 4 °C για 10 λεπτά και το ίζημα επαναιωρείται σε FACS Buffer. Ακολουθεί επώαση με μονοκλωνικά αντίσωμα έναντι του μορίου CD200 (0,125 μg/δείγμα) ή CD273 (0,250 μg/δείγμα) που είναι συνδεδεμένα με φυκοερυθρίνη για 30 λεπτά. Το ποσοστό της έκφρασης των μορίων CD200 και CD273 στον πληθυσμό προσδιορίζεται με χρήση κυτταρομετρίας ροής.

3.11 Απομόνωση Τ λεμφοκυττάρων από σπλήνα BALB/c ποντικού

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν Τ λεμφοκύτταρα από σπλήνα ποντικού BALB/c προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση των ανοσορυθμιστικών μορίων CD200 και CD273 αναλυτικότερα στην ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων. Μελετήθηκαν οι υποπληθυσμοί των βοηθητικών Τ κυττάρων (Th) και κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων (Tc), που ορίζονται ως $CD4^+$ και $CD8^+$ κύτταρα, αντίστοιχα.

3.11.1 Απομόνωση σπληνικών κυττάρων από σπλήνα BALB/c ποντικού

Στην παρούσα εργασία πηγή των Τ λεμφοκυττάρων αποτελεί ο σπλήνας ποντικών BALB/c, τόσο υγιών όσο και μολυσμένων με *Leishmania*, με τη νόσο να έχει εισέλθει στη χρόνια φάση της. Ποντικοί BALB/c ηλικίας 6-8 εβδομάδων θανατώνονται με αυχενική παρεκτόπιση και οι σπλήνες τους απομονώνονται και ομογενοποιούνται σε θρεπτικό υλικό $RPMI_{1640}$. Το εναιώρημα των σπληνικών κυττάρων συλλέγεται με γυάλινη πιπέτα τύπου Pasteur και μεταφέρεται σε πλαστικό κωνικό σωλήνα τύπου Falcon όπου φυγοκεντρείται στις 1.600 rpm, στους 4 °C για 15 λεπτά. Το ίζημα επαναιωρείται σε 3-5 mL ψυχρού διαλύματος ACK, εξασφαλίζοντας έτσι τη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, και μετά από 3 λεπτά προστίθεται ίσος όγκος θρεπτικού μέσου $RRMI_{1640}$ προκειμένου να αποκατασταθεί η ωσμωτική ισορροπία. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και τα σπληνικά κύτταρα επαναιωρούνται 5-10 mL θρεπτικού μέσου $RRMI_{1640}$. Η πυκνότητα του δείγματος υπολογίζεται με αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Malassez) και χρώση Trypan Blue σε αραίωση 1:10. Τα σπληνικά κύτταρα φυγοκεντρούνται στις ίδιες συνθήκες και

επαναιωρούνται σε τέτοιο όγκο διαλύματος Isolation Buffer (Παράρτημα Ι) ώστε η τελική συγκέντρωση του εναιωρήματος να είναι 10^8 σπληνικά κύτταρα /mL.

3.11.2 Απομόνωση και καθαρισμός Τ λεμφοκυττάρων

Η απομόνωση καθαρού πληθυσμού $CD4^+$ και $CD8^+$ Τ λεμφοκυττάρων από το εναιώρημα σπληνικών κυττάρων γίνεται με τη χρήση μαγνητικών σωματιδίων. Η αρχή λειτουργίας αυτής της μεθόδου στηρίζεται στην απομόνωση των $CD4^+$ ή $CD8^+$ κυττάρων, μέσω της εξάλειψης των υπόλοιπων κυτταρικών τύπων που βρίσκονται στο σπλήνα. Τα ανεπιθύμητα κύτταρα σημαίνονται μέσω της επίδρασης με ειδικό μείγμα μονοκλωνικών αντισωμάτων αρουραίου έναντι των μορίων CD45R (Β λεμφοκύτταρα), CD11b (μονοκύτταρα), Ter-119 (ερυθρά αιμοσφαίρια) και CD16 (NK κύτταρα, ουδετερόφιλα, πολυμορφοπύρηνα λευκά αιμοσφαίρια, μονοκύτταρα και μακροφάγα) καθώς και έναντι του CD8 ή του CD4 στην περίπτωση απομόνωσης $CD4^+$ ή $CD8^+$ Τ λεμφοκυττάρων αντίστοιχα. Τα αντισώματα αυτά συνδέονται δευτερογενώς σε μαγνητικά σφαιρίδια που περιβάλλονται από ένα στρώμα πολυκλωνικών αντισωμάτων προβάτου sheep anti-rat IgG. Τέλος, ο διαχωρισμός των κυτταρικών πληθυσμών γίνεται με χρήση μαγνήτη ο οποίος έλκει τα μαγνητικά σφαιρίδια που είναι συνδεδεμένα με τα σημασμένα κύτταρα, αφήνοντας στο υπερκείμενο καθαρό τον επιθυμητό κυτταρικό πληθυσμό.

Αναλυτικότερα, η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται είναι βασισμένη στις οδηγίες του κατασκευαστή της προτυποποιημένης συσκευασίας των αντιδραστηρίων. Κάθε μεμονωμένο δείγμα αποτελείται από 0,5 mL εναιωρήματος σπληνικών κυττάρων, συγκέντρωσης 10^8 σπληνικά κύτταρα /mL. Αρχικά, σε κάθε προστίθενται 0,1 mL FBS καθώς και 0,1mL του ειδικού μείγματος μονοκλωνικών αντισωμάτων και τα δείγματα επωάζονται υπό περιοδική ανάδευση στους 2-8 °C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται 10 mL διαλύματος Isolation Buffer και τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στις 350g, στους 2-8 °C για 10 λεπτά. Αφού το ίζημα επαναιωρηθεί σε 4mL διαλύματος Isolation Buffer, προστίθεται 1 mL από τα μαγνητικά σφαιρίδια Dynabeads Mouse Depletion και τα κύτταρα επωάζονται υπό περιοδική ανάδευση στους 18-25 °C για 20 λεπτά για 15 λεπτά. Μετά το πέρας της επώασης προστίθενται 5 mL διαλύματος Isolation Buffer και τα δείγματα τοποθετούνται στο μαγνήτη για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο συλλέγεται με γυάλινη

πιπέτα τύπου Pasteur και μεταφέρεται σε πλαστικό κωνικό σωλήνα τύπου Falcon και φυγοκεντρείται στις 1.600 rpm, στους 25°C για 10 λεπτά. Τέλος, η συγκέντρωση του καθαρού πληθυσμού των Τ λεμφοκυττάρων υπολογίζεται με αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Malassez) και χρώση Trypan Blue σε αραίωση 1:10.

3.12 Μεικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση (Mixed Lymphocyte Reaction, MLR)

Η συγκεκριμένη μέθοδος αφορά στη μεικτή καλλιέργεια δύο πληθυσμών λεμφοκυττάρων και στην μέτρηση της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης. Η MLR μπορεί να χαρακτηριστεί είτε ως αυτόλογη, όταν οι δυο πληθυσμοί προέρχονται από γενετικά όμοιες πηγές, είτε ως ετερόλογη, όταν οι πληθυσμοί προέρχονται από πηγές που ενώ ανήκουν στο ίδιο είδος, εμφανίζουν διαφορές στο γενετικό τους υπόβαθρο (π.χ. ποντικοί BALB/c και ποντικοί C57/B6). Επίσης, η MLR μπορεί να είναι είτε αμφίδρομη, όταν και οι δύο πληθυσμοί έχουν δυναμικό πολλαπλασιασμού, είτε μονόδρομη, όταν μόνο ο ένας πληθυσμός πολλαπλασιάζεται ενώ ο άλλος λειτουργεί σαν διεγέρτης. Στον ρόλο του πληθυσμού-διεγέρτη, συχνά χρησιμοποιούνται και άλλοι πληθυσμοί οι οποίοι είναι ικανοί να διεγείρουν τα λεμφοκύτταρα, όπως δενδριτικά κύτταρα ή μακροφάγα.

Στην παρούσα εργασία, η MLR χρησιμοποιείται προκειμένου να διερευνηθεί εάν η παρεμπόδιση της σύνδεσης των μορίων CD200 και CD273 που εκφράζονται από μολυσμένα δενδριτικά κύτταρα με τους προσδέτες τους, συμβάλλει στην ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων, μέσω μέτρησης του πολλαπλασιασμού τους καθώς και την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Πρόκειται για ομόλογη MLR καθώς και οι δύο πληθυσμοί προέρχονται από ποντικό BALB/c καθώς και μονόδρομη αφού τα δενδριτικά κύτταρα χρησιμοποιούνται ως πληθυσμός διεγέρτης.

3.12.1 Μέτρηση πολλαπλασιασμού Τ λεμφοκυττάρων (Lymphoproliferation)

Δενδριτικά κύτταρα που έχουν απομονωθεί από μυελό των οστών BALB/c μυός και έχουν καλλιεργηθεί για 7 ημέρες παρουσία GM-CSF (όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 3.6.1) επιστρώνονται εις τριπλούν σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 96άρων φρεατίων σε συγκέντρωση $4x10^4$ κύτταρα/φρεάτιο. Ακολουθεί έκθεση σε προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου στατικής φάσης ανάπτυξης σε αναλογία 1:20, για 24 ώρες σε κλίβανο 37 °C και 5% CO_2. Μετά το πέρας της επώασης, γίνεται

επίδραση με τα ειδικά αντισώματα δέσμευσης έναντι των μορίων CD200 και CD273 και τα κύτταρα επωάζονται σε κλίβανο 37 °C και 5% CO_2 για 4 ώρες. Για την πραγματοποίηση της MLR, το εναιώρημα των μολυσμένων δενδριτικών κυττάρων αναμειγνύεται με ίσο όγκο εναιωρήματος καθαρού πληθυσμού $CD4^+$ ή $CD8^+$ T λεμφοκυττάρων σε αναλογία δενδριτικά κύτταρα : λεμφοκύτταρα 1:5, και τα κύτταρα επωάζονται κλίβανο 37 °C και 5% CO_2 για 5 ημέρες. Η εκτίμηση του δυναμικού πολλαπλασιασμού των T λεμφοκυττάρων επιτυγχάνεται με προσθήκη τριτιωμένης θυμιδίνης (1μQ/φρεάτιο) 18 ώρες πριν τη συλλογή των κυττάρων. Μετά το πέρας της επώασης, η πλάκα μεταφέρεται σε ειδικό μηχάνημα συλλογής κυττάρων (Cell Harvester), όπου τα κύτταρα αφού πρώτα λύονται υπό υδροστατική πίεση προκειμένου να απελευθερωθεί το γενετικό υλικό, συλλέγονται σε φίλτρο από διηθητικό χαρτί επικαλυμμένο με πλέγμα από μικροσκοπικές ίνες γυαλιού. Τα φίλτρα στεγνώνουν σε ξηρό κλίβανο, στους 60°C για 1 ώρα και έπειτα τοποθετούνται σε ειδικές μεμβράνες και διαποτίζονται με υγρό σπινθηρισμού. Η εκπεμπόμενη β ακτινοβολία μετράται σε ειδικό μηχάνημα (β counter) και οι τιμές εκφράζονται σε κρούσεις ανά λεπτό (cpm). Ως μάρτυρες χρησιμοποιούνται δείγματα εις τριπλούν με δενδριτικά κύτταρα, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι δεν πολλαπλασιάζονται, και T λεμφοκύτταρα, αντίστοιχα ώστε να μετρηθεί στη συνέχεια ο πολλαπλασιασμό τους. Το θετικό μάρτυρα αποτελούν T λεμφοκύτταρα επωασμένα με 3 μg/mL κονκαναβαλίνη A (ConA), ενός μιτογόνου φυτικής προέλευσης που είναι γνωστό ότι διεγείρει τον πολλαπλασιασμό λεμφοκυτταρικών πληθυσμών ποντικού.

3.12.2 Προσδιορισμός της ενδοκυττάριας παραγωγής κυτταροκινών

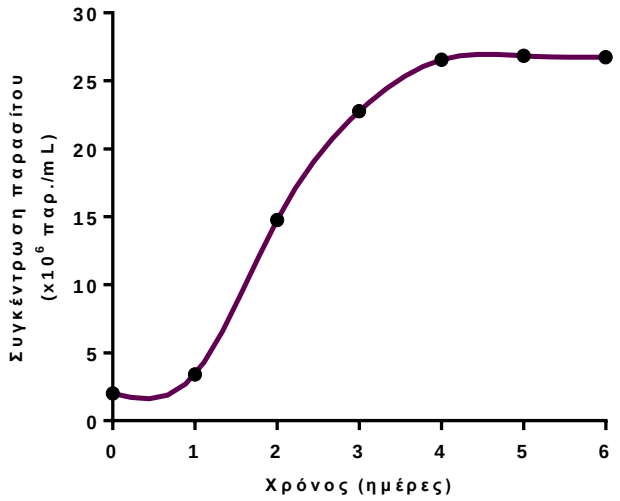
Δενδριτικά κύτταρα που έχουν απομονωθεί από μυελό των οστών BALB/c μυός και έχουν καλλιεργηθεί για 7 ημέρες παρουσία GM-CSF (όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 3.6.1) επιστρώνονται σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 24άρων φρεατίων σε συγκέντρωση $4x10^5$ κύτταρα/φρεάτιο. Ακολουθεί έκθεση σε προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου στατικής φάσης ανάπτυξης σε αναλογία 1:20, για 24 ώρες σε κλίβανο 37 °C και 5% CO_2. Μετά το πέρας της επώασης, γίνεται επίδραση με τα ειδικά αντισώματα δέσμευσης έναντι των μορίων CD200 και CD273 και τα κύτταρα επωάζονται σε κλίβανο 37 °C και 5% CO_2 για 4 ώρες. Για την πραγματοποίηση της MLR, το εναιώρημα των μολυσμένων δενδριτικών κυττάρων αναμειγνύεται με

εναιώρημα καθαρού πληθυσμού $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων σε αναλογία δενδριτικά κύτταρα : λεμφοκύτταρα 1:5, και τα κύτταρα επωάζονται κλίβανο 37 °C και 5% CO_2 για 3, 4 ή 5 ημέρες. Προκειμένου να μπορέσουν να εντοπιστούν ενδοκυτταρικά οι παραγόμενες κυτταροκίνες, 4 ώρες πριν τη συλλογή των κυττάρων γίνεται επίδραση με 2.5 μg/mL μπρεφελδίνης A, η οποία έχει την ικανότητα να αναστέλλει την πρωτεϊνική μεταφορά μέσω του συμπλέγματος Golgi. Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα συλλέγονται, φυγοκεντρούνται στις 1.300 rpm, στους 4 °C για 10 λεπτά και το ίζημα επαναιωρείται σε FACS Buffer. Αφού προηγηθεί μονιμοποίηση (όπως περιγράφηκε στην ενότητα 3.5.2), τα κύτταρα επωάζονται με φθορίζοντα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των κυτταροκινών IFN-γ, IL-10 και TNF-α για 30 λεπτά. Ο προσδιορισμός της παραγωγής των κυτταροκινών πραγματοποιείται με κυτταρομετρία ροής.

4. Αποτελέσματα

4.1 Καμπύλη ανάπτυξης παρασίτου

Η χρήση παρασίτων σε πειραματικά μοντέλα προϋποθέτει γνώση του κύκλου ζωής του και της πορείας ανάπτυξης τους. Στόχος είναι ο προσδιορισμός της στατικής φάσης της καλλιέργειας, καθώς τότε το παράσιτο έχει τη μέγιστη μολυσματικότητα. Αυτό επετεύχθη με υπολογισμό της συγκέντρωσης καλλιέργειας παρασίτου ανά 24 ώρες έως ότου αυτή σταθεροποιηθεί. Από τις διαδοχικές μετρήσεις της συγκέντρωσης της καλλιέργειας προέκυψε η καμπύλη ανάπτυξης του παρασίτου (Εικόνα 4.1).



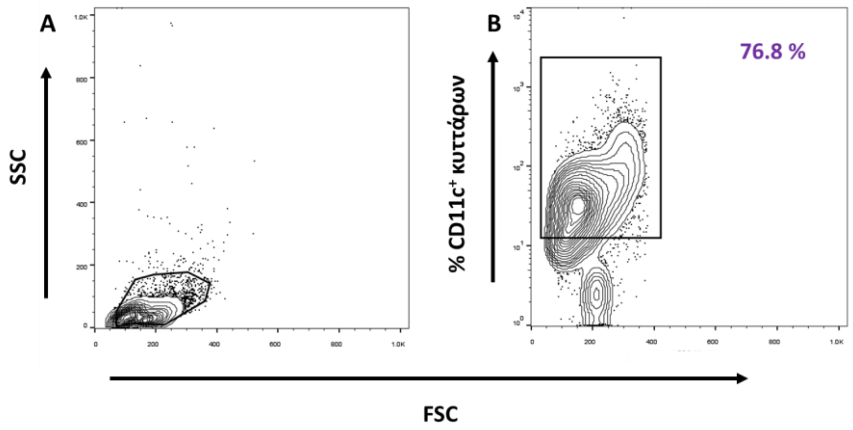
Εικόνα 4.1. Καμπύλη ανάπτυξης παρασίτου. Καλλιέργεια *Leishmania infantum* παρασκευάζεται με αρχική συγκέντρωση 2x10^6 παράσιτα/mL. Προκειμένου να μελετηθεί η πορεία ανάπτυξης του παρασίτου, η συγκέντρωση της καλλιέργειας υπολογίζεται κάθε 24 ώρες, μέχρι να σταθεροποιηθεί.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η λανθάνουσα φάση διαρκεί 24 ώρες και γρήγορα τη διαδέχεται η εκθετική φάση ανάπτυξης. Στο τέλος της τρίτης ημέρας, η καλλιέργεια μεταβαίνει στη φάση επιβράδυνσης, όπου ο ρυθμός αύξησης είναι μεν λογαριθμικός αλλά μειώνεται σε σχέση με αυτόν της εκθετικής φάσης. Την τέταρτη ημέρα η καλλιέργεια εισέρχεται στη στατική φάση ανάπτυξης, όπου ο πληθυσμός παραμένει πρακτικά σταθερός μέχρι την έκτη μέρα, όπου αρχίζει να μειώνεται καθώς έχει μεταβεί πλέον στη φάση θανάτου. Συνεπώς, το παράσιτο βρίσκεται στη στατική φάση ανάπτυξης από την τέταρτη έως την έκτη μέρα της καλλιέργειάς του.

4.2 Χαρακτηρισμός και ταυτοποίηση μυελοειδών δενδριτικών κυττάρων

Τα δενδριτικά κύτταρα ανήκουν στην κατηγορία των επαγγελματικών αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος των θηλαστικών. Χαρακτηρίζονται από την ικανότητα φαγοκυττάρωσης παθογόνων μικροοργανισμών, έκφρασης των αντιγόνων τους στην επιφάνειά τους μέσω των MHC μορίων και παρουσίασης αυτών στα Τ και τα Β λεμφοκύτταρα. Ο ρόλος τους αυτός στην ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων τα καθιστά τους κύριους διαμεσολαβητές ανάμεσα στη φυσική και την ειδική ανοσία.

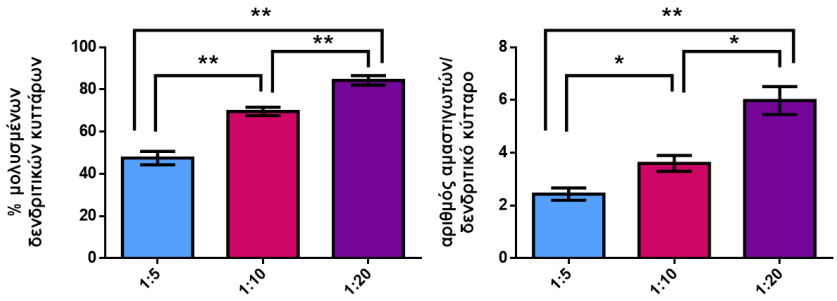
Στην παρούσα εργασία, αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα απομονώθηκαν από το μυελό των οστών ποντικού BALB/c και καλλιεργήθηκαν παρουσία GM-CSF για 7 ημέρες προκειμένου να διαφοροποιηθούν σε δενδριτικά κύτταρα. Ο χαρακτηρισμός των δενδριτικών κυττάρων έγινε με εντοπισμό του μορίου CD11c, χαρακτηριστικό δείκτη μυελοειδών δενδριτικών κυττάρων ποντικού, χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το 76,8% των κυττάρων της καλλιέργειας είναι δενδριτικά κύτταρα (Εικόνα 4.2).



Εικόνα 4.2. Ταυτοποίηση δενδριτικών κυττάρων. Αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα απομονώνονται από μυελό των οστών ποντικού BALB/c και καλλιεργούνται για 7 ημέρες παρουσία GM-CSF ώστε να μονοκλωνικό αντίσωμα σημασμένο με αλλοφυκοκυανίνη (APC) και ανάλυση κυτταρομετρίας ροής. Στα στικτογράμματα απεικονίζονται: (A) Επιλογή του πληθυσμού (gating), (B) Πληθυσμός CD11c$^+$ δενδριτικών κυττάρων.

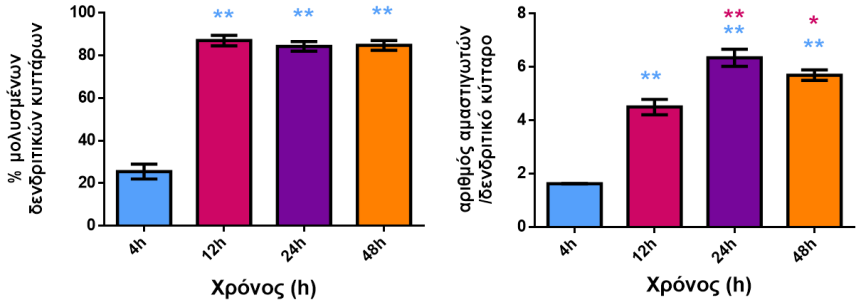
4.3 Προσδιορισμός βέλτιστων συνθηκών μόλυνσης

Ένα απαραίτητο βήμα στη μελέτη της ανοσοαπόκρισης του οργανισμού κατά τη μόλυνση από *Leishmania infantum* είναι η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στο παράσιτο και τα δενδριτικά κύτταρα. Προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη αναλογία μόλυνσης των δενδριτικών από το στέλεχος GH8 του παρασίτου *L. infantum* που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, δενδριτικά κύτταρα επωάστηκαν για 4 ώρες με παρασιτικό εναιώρημα σε αναλογίες δενδριτικό:παράσιτο 1:5, 1:10 και 1:20 και καλλιεργήθηκαν περαιτέρω 24 ώρες. Στη συνέχεια, έγινε χρώση Giemsa και προσδιορίστηκε το ποσοστό των μολυσμένων δενδριτικών καθώς και ο αριθμός των αμαστιγωτών/δενδριτικό κύτταρο με οπτική μικροσκοπία. (Εικόνα 4.3).



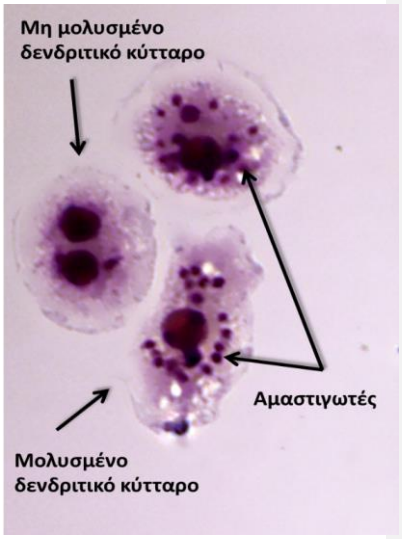
Εικόνα 4.3 Υπολογισμός βέλτιστης αναλογίας μόλυνσης δενδριτικών κυττάρων από *L. infantum*. Δενδριτικά κύτταρα μολύνθηκαν με παράσιτο σε αναλογίες 1:5, 1:10 και 1:20 και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες. Η βέλτιστη αναλογία εξετάστηκε με χρώση Giemsa και παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο. Το μέγιστο επίπεδο της μόλυνσης επετεύχθη στην αναλογία 1:20. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στον μέσο όρο ± SD τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων. (*: p<0.05, **: p<0.01)

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, όλες οι εξεταζόμενες αναλογίες διέφεραν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό η μία από την άλλη τόσο στο ποσοστό των μολυσμένων δενδριτικών κυττάρων (**1:5** 47,5 ± 6,5%, **1:10** 69,6 ± 4,5%, **1:20** 84,3 ± 5,9%), όσο και στον αριθμό των αμαστιγωτών/δενδριτικό κύτταρο (**1:5** 2,4 ± 0,4 αμαστιγωτές/κύτταρο, **1:10** 3,6 ± 4,5 αμαστιγωτές/κύτταρο, **1:20** 5,9 ± 1,2 αμαστιγωτές/κύτταρο). Σύμφωνα με τα παραπάνω, η βέλτιστη μόλυνση επιτυγχάνεται στην αναλογία 1:20 (Εικόνα 4.3).



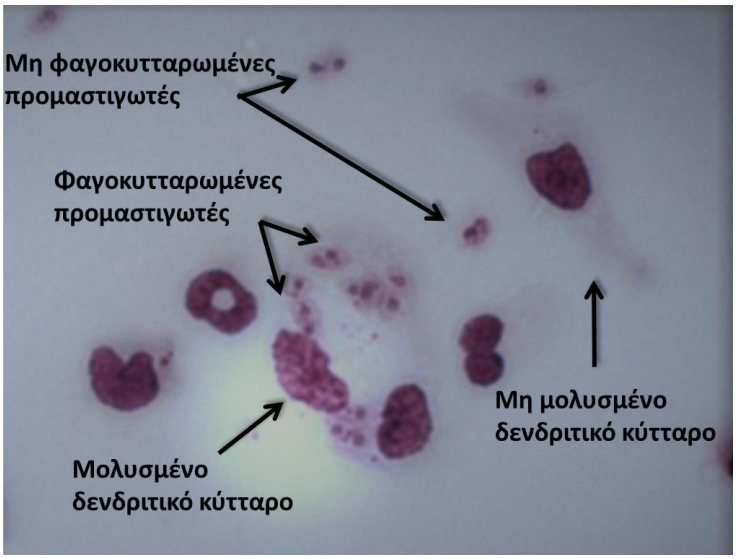
Εικόνα 4.4 Εξέλιξη της μόλυνσης με το παράσιτο σε σχέση με το χρόνο. Δενδριτικά κύτταρα μολύνθηκαν με παράσιτο σε αναλογία 1:20 και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν για 4, 12, 24 και 48 ώρες. Ο υπολογισμός του ποσοστού των μολυσμένων μακροφάγων και του παρασιτικού φορτίου έγινε με χρώση Giemsa και δημιουργία μικροσκοπικού παρασκευάσματος. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στον μέσο όρο ± SD αντιπροσωπευτικά τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων. (*: p<0.05, **: p<0.01) Με μπλε χρώμα συμβολίζονται οι διαφορές με ομάδα ελέγχου τις 4 ώρες, ενώ με ροζ οι διαφορές με ομάδα ελέγχου τις 12 ώρες.

Στη συνέχεια, η εξέλιξη της μόλυνσης μελετήθηκε σε τέσσερα χρονικά σημεία και με αναλογία δενδριτικό:παράσιτο 1:20. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ήδη από τις 4 ώρες μετά τη μόλυνση ένα ποσοστό των δενδριτικών κυττάρων έχει φαγοκυτταρώσει το παράσιτο (25,5±5%), ενώ στις 12 ώρες μετά τη μόλυνση η πλειοψηφία των δενδριτικών κυττάρων φάνηκε να ήταν μολυσμένα (87±5%). Ο αριθμός των μολυσμένων κυττάρων παραμένει σταθερός τόσο στις 24 (84,2±6%) όσο και στις 48 ώρες (84,5±4,6%). Αντίστοιχα κυμάνθηκαν και οι τιμές στον αριθμό των αμαστιγωτών που εντοπίστηκαν ανά δενδριτικό κύτταρο (Εικόνα 4.4). Στο χρονικό διάστημα των 4 ωρών μετά τη μόλυνση, παράσιτο εντοπίστηκε στο κυτταρόπλασμα των δενδριτικών κυττάρων, αλλά σε μικρό αριθμό (1,6±0,01 αμαστιγωτές/κύτταρο)



Εικόνα 4.5 Μικροσκοπική απεικόνιση μολυσμένων δενδριτικών κυττάρων μετά από χρώση με Giemsa, 24 ώρες μετά τη μόλυνση με το παράσιτο.

και χωρίς να έχει μεταμορφωθεί από την προμαστιγωτή μορφή του στην αμαστιγωτή (Εικόνα 4.6). Στις 12 ώρες μετά τη μόλυνση ο αριθμός των παρασίτων που φαγοκυτταρώθηκαν από το παράσιτο αυξάνεται (4,5±0,5 αμαστιγωτές/κύτταρο), ωστόσο βρίσκεται ακόμα στη φάση της μεταμόρφωσης από την προμαστιγωτή στην αμαστιγωτή μορφή του. Τέλος, στο χρονικά διάστημα των 24άρων ωρών μετά τη μόλυνση ο αριθμός των φαγοκυτταρωμένων παρασίτων αυξάνεται (6.4±0,8 αμαστιγωτές/κύτταρο) και διατηρείται σταθερός ως τις 48 ώρες (5,7±0,4 αμαστιγωτές/κύτταρο), ενώ πλέον έχει ολοκληρωθεί η μεταμόρφωσή του στην αμαστιγωτή μορφή (Εικόνα 4.5). Σύμφωνα με τα παραπάνω, το επιλεγόμενο χρονικό διάστημα επώασης του παρασίτου είναι οι 24 ώρες.

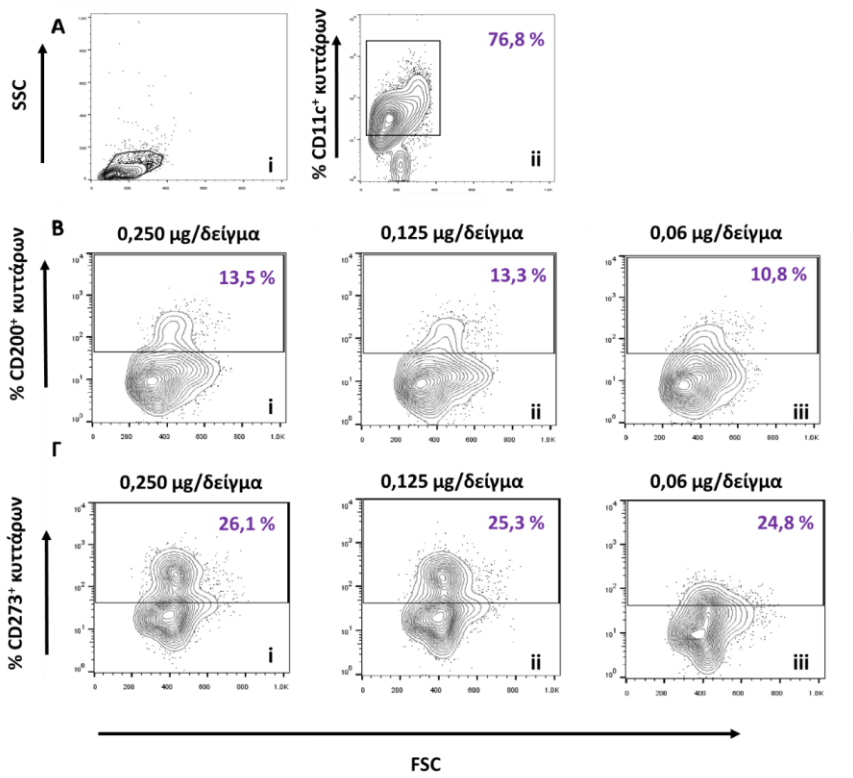


Εικόνα 4.6 Μικροσκοπική απεικόνιση μολυσμένων δενδριτικών κυττάρων μετά από χρώση με Giemsa, 4 ώρες μετά τη μόλυνση με το παράσιτο.

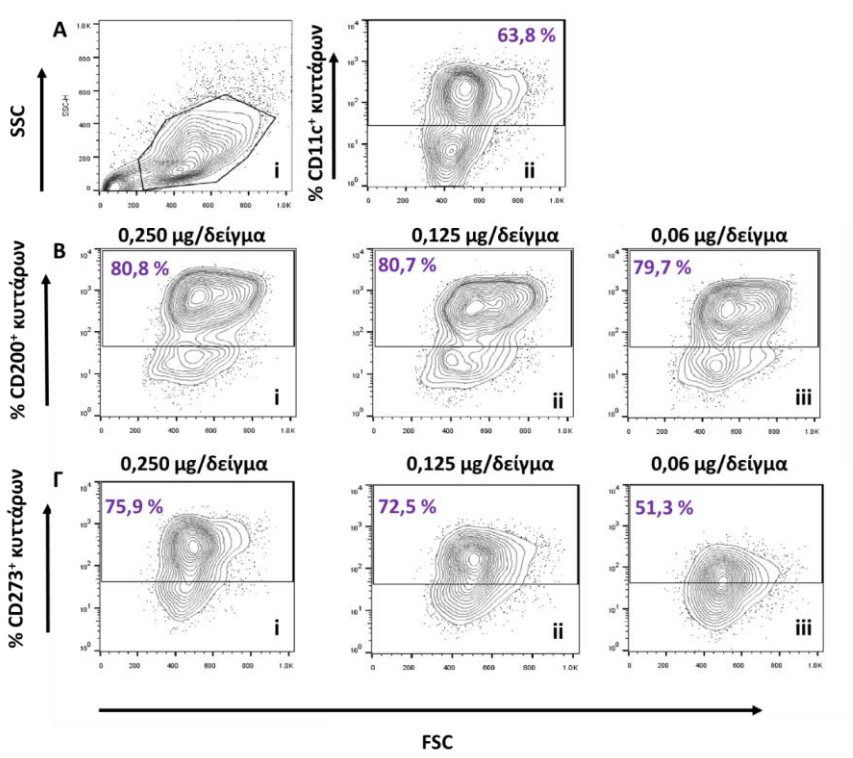
4.4 Προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης των αντισωμάτων έναντι των μορίων CD200 και CD273

Στο πλαίσιο της βελτιστοποίησης των πειραματικών συνθηκών, πραγματοποιήθηκε κινητική της συγκέντρωσης των φθορίζοντων μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι των μορίων CD200 και CD273. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό, δενδριτικά κύτταρα σημάνθηκαν με τα εν λόγω μονοκλωνικά αντισώματα σε

διαδοχικές συγκεντρώσεις από 0,250 έως 0,06 μg/δείγμα και το ποσοστό έκφρασης των μορίων CD200 και CD273 στον πληθυσμό προσδιορίστηκε με κυτταρομετρία ροής (Εικόνες 4.7, 4.8).



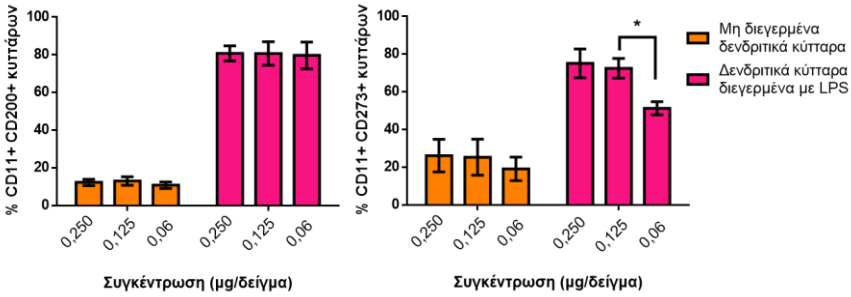
Εικόνα 4.7 Κινητική συγκέντρωσης των φθορίζοντων αντισωμάτων έναντι των μορίων CD200 και CD273 σε μη διεγερμένα δενδριτικά κύτταρα. (Α) Μεθοδολογία ανάλυσης των δεδομένων που προέκυψαν από την κυτταρομετρία ροής i) Επιλογή του πληθυσμού (gating), ii) Επιλογή των CD11c⁺ κυττάρων (Β) Δενδριτικά κύτταρα που επωάστηκαν με φθορίζον αντίσωμα έναντι του μορίου CD200, σε συγκέντρωση i) 0,250 μg/δείγμα, ii) 0,125 μg/δείγμα και iii) 0,06 μg/δείγμα, (Γ) Δείγματα που επωάστηκαν με φθορίζον αντίσωμα έναντι του μορίου CD273, σε συγκέντρωση i) 0,250 μg/δείγμα, ii) 0,125 μg/δείγμα και iii) 0,06 μg/δείγμα. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στον μέσο όρο ± SD τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων.



Εικόνα 4.8 Κινητική συγκέντρωσης των φθορίζοντων αντισωμάτων έναντι των μορίων CD200 και CD273 σε δενδριτικά κύτταρα διεγερμένα με LPS. (Α) Μεθοδολογία ανάλυσης των δεδομένων που προέκυψαν από την κυτταρομετρία ροής i) Επιλογή του πληθυσμού (gating), ii) Επιλογή των CD11c⁺, (Β) Δείγματα που επωάστηκαν με φθορίζον αντίσωμα έναντι του μορίου CD200, σε συγκέντρωση i) 0,250 μg/δείγμα, ii) 0,125 μg/δείγμα και iii) 0,06 μg/δείγμα , (Γ) Δείγματα που επωάστηκαν με φθορίζον αντίσωμα έναντι του μορίου CD273, σε συγκέντρωση i) 0,250 μg/δείγμα, ii) 0,125 μg/δείγμα και iii) 0,06 μg/δείγμα. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στον μέσο όρο ± SD τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων.

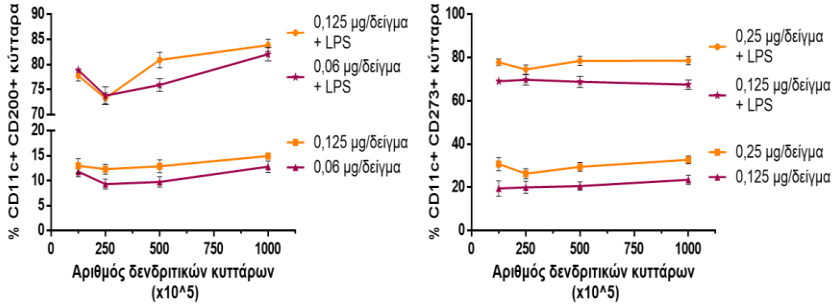
Όπως φαίνεται και στις εικόνες 4.7 και 4.8, το ποσοστό της έκφρασης του μορίου CD200 δεν επηρεάζεται από τη μεταβολή της συγκέντρωσης του φθορίζοντος μονοκλωνικού αντισώματος, τόσο σε αδιέγερτα δενδριτικά κύτταρα (**0,250 μg/δείγμα** 13.5±0.14%, **0,125 μg/δείγμα** 13,3±1,67%, **0,06 μg/δείγμα** 10,8±1,74%) όσο και σε διεγερμένα με LPS (**0,250 μg/δείγμα** 80,75±4,53%, **0,125 μg/δείγμα** 80,7±4,43%, **0,06 μg/δείγμα** 79,7±7,1%) (Εικόνα 4.9). Αντίστοιχα, το ποσοστό έκφρασης του μορίου CD273 δεν επηρεάστηκε από τη μεταβολή της συγκέντρωσης του φθορίζοντος μονοκλωνικού αντισώματος σε αδιέγερτα δενδριτικά κύτταρα (**0,250 μg/δείγμα** 26,1±8,61%, **0,125 μg/δείγμα** 25,3±9,54%, **0,06 μg/δείγμα**

24,8±12,44%) (Εικόνα 4.7). Αντίθετα, μετά από διέγερση των δενδριτικών κυττάρων με LPS παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού έκφρασης του μορίου CD273 στην συγκέντρωση 0,06 μg/δείγμα (**0,06 μg/δείγμα** 51,3±3,46%) σε σχέση με τις δύο υψηλότερες (**0,250 μg/δείγμα** 75,9±7,86%, **0,125 μg/δείγμα** 72,5±4,5%) (Εικόνα 4.9).



Εικόνα 4.9 Κινητική συγκέντρωσης των φθορίζοντων αντισωμάτων έναντι των μορίων CD200 και CD273. Δενδριτικά κύτταρα επωάστηκαν για μισή ώρα με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των μορίων CD200 ή CD273 σημασμένα με φυκοερυθρίνη (PE) σε διαδοχικές συγκεντρώσεις και το ποσοστό έκφρασης των μορίων στον πληθυσμό προσδιορίστηκε με κυτταρομετρία ροής. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στον μέσο όρο ± SD τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων. (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$)

Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε το εύρος των κυττάρων που ήταν δυνατόν να σημανθούν επιτυχώς στις διαφορετικές συγκεντρώσεις των φθορίζοντων μονοκλωνικών αντισωμάτων. Προκειμένου να γίνει αυτό, δενδριτικά κύτταρα σε διαδοχικές συγκεντρώσεις (από 10^6 έως $125x10^5$ δενδριτικά κύτταρα/mL) σημάνθηκαν με τα μονοκλωνικά αντισώματα σε συγκεντρώσεις 0,125 και 0,06 μg/δείγμα για το μόριο CD200 και 0,250 και 0,125 μg/δείγμα για το μόριο CD273 και το ποσοστό έκφρασης των μορίων στον πληθυσμό προσδιορίστηκε με κυτταρομετρία ροής. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο ποσοστό της έκφρασης ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων σε καμία από τις συγκεντρώσεις των μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι τόσο του μορίου CD200 όσο και του CD273 (Εικόνα 4.10).

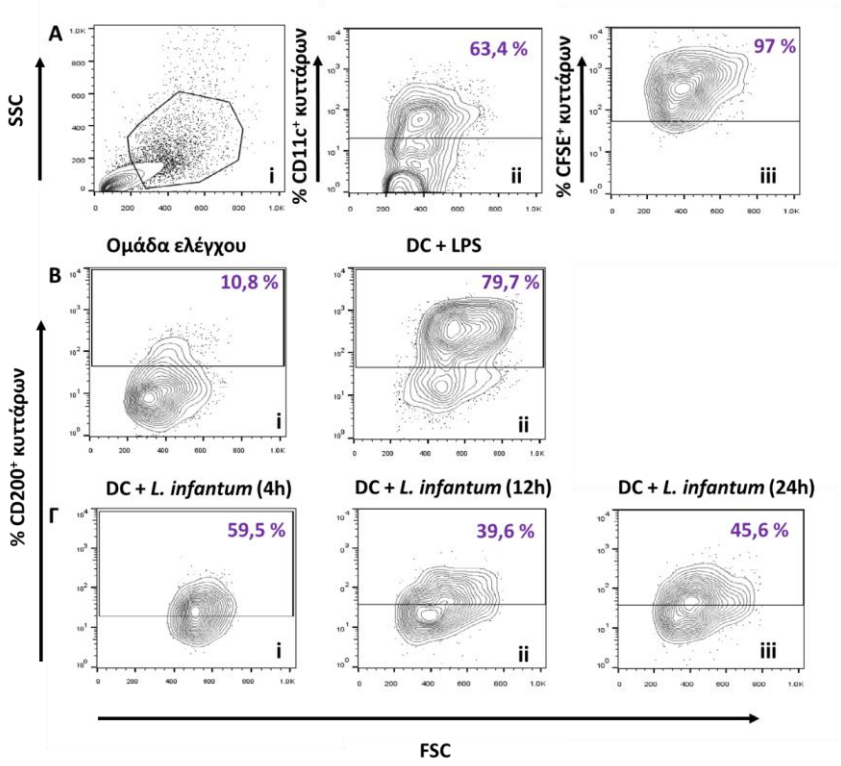


Εικόνα 4.10 Έλεγχος του εύρους των κυττάρων ανά δείγμα που μπορούν να σημανθούν αποτελεσματικά από τα φθορίζοντα αντισώματα έναντι των μορίων CD200 και CD273. Δενδριτικά κύτταρα σε διαδοχικές συγκεντρώσεις επωάστηκαν για μισή ώρα με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των μορίων CD200 ή CD273 σημασμένα με φυκοερυθρίνη (PE) και το ποσοστό έκφρασης των μορίων στον πληθυσμό προσδιορίστηκε με κυτταρομετρία ροής. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στον μέσο όρο ± SD δύο πειραμάτων.

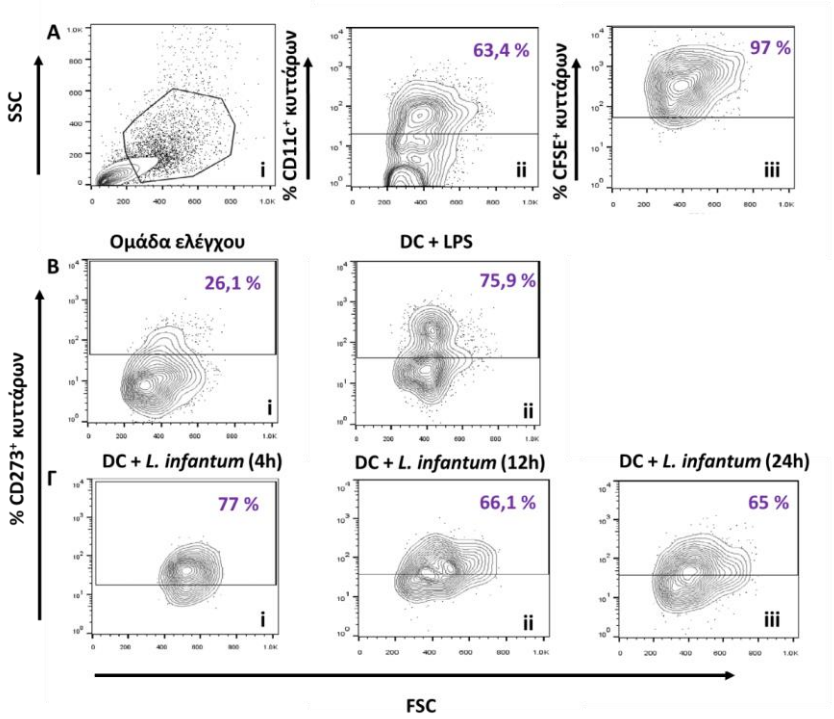
Σύμφωνα με τα παραπάνω, ο προσδιορισμός της έκφρασης του μορίου CD200 ως βέλτιστη συγκέντρωση επιλέγεται να γίνει με συγκέντρωση φθορίζοντος μονοκλωνικού αντισώματος 0,06 μg/δείγμα, ενώ αντίστοιχα του μορίου CD273 σε συγκέντρωση 0,250 μg/δείγμα. Αν και στην περίπτωση του CD273 θα ήταν εξίσου αποτελεσματική η χρήση της συγκέντρωσης 0,125 μg/δείγμα, επιλέγεται η μεγαλύτερη για πρακτικούς λόγους, καθώς ο τελικός όγκος αραίωσης του αντισώματος σε αυτή τη συγκέντρωση ήταν πολύ μικρός.

4.5 Έλεγχος έκφρασης μορίων CD200 και CD273 σε δενδριτικά κύτταρα μολυσμένα με *Leishmania infantum*

Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση του παρασίτου στην έκφραση των μορίων CD200 και CD273, δενδριτικά κύτταρα μολύνθηκαν με παράσιτο σε αναλογία 1:20 και μετά από 24 ώρες τα επίπεδα των μορίων CD200 και CD273 προσδιορίστηκαν με χρήση φθορίζοντων αντισωμάτων και κυτταρομετρία ροής (Εικόνες 4.11, 4.12).

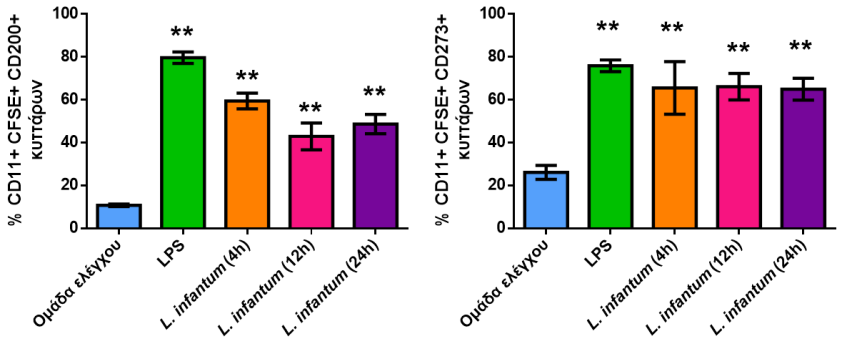


Εικόνα 4.11 Επίδραση του παρασίτου στην έκφραση των μορίων CD200. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν συνδεδεμένο με φυκοερυθρίνη (PE), της οποίας ο φθορισμός ανιχνεύεται από την παράμετρο FL2, ενώ το παράσιτο είχε σημανθεί με χρώση CFSE, της οποίας ο φθορισμός ανιχνεύεται από την παράμετρο FL1. (A) Μεθοδολογία ανάλυσης των δεδομένων που προέκυψαν από την κυτταρομετρία ροής i) Επιλογή του πληθυσμού (gating), ii) Επιλογή των CD11c$^+$ κυττάρων, iii) Επιλογή των CFSE$^+$ κυττάρων (δενδριτικά κύτταρα που έχουν μολυνθεί από το παράσιτο), (B) i) Ομάδα ελέγχου: δενδριτικά μη διεγερμένα, ii) Θετικός μάρτυρας: δενδριτικά κύτταρα διεγερμένα με LPS, (Γ) Δείγματα μολυσμένων δενδριτικών κυττάρων σε χρονικά διαστήματα i) 4h, ii) 12h και iii) 24h μετά τη μόλυνση. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στον μέσο όρο ± SD πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων.



Εικόνα 4.12 Επίδραση του παρασίτου στην έκφραση των μορίων CD273. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν συνδεδεμένο με φυκοερυθρίνη (PE), της οποίας ο φθορισμός ανιχνεύεται από την παράμετρο FL2, ενώ το παράσιτο είχε σημανθεί με χρώση CFSE, της οποίας ο φθορισμός ανιχνεύεται από την παράμετρο FL1. (A) Μεθοδολογία ανάλυσης των δεδομένων που προέκυψαν από την κυτταρομετρία ροής i) Επιλογή του πληθυσμού (gating), ii) Επιλογή των CD11c⁺ κυττάρων, iii) Επιλογή των CFSE+ κυττάρων (δενδριτικά κύτταρα που έχουν μολυνθεί από το παράσιτο), (B) i) Ομάδα ελέγχου: δενδριτικά μη διεγερμένα, ii) Θετικός μάρτυρας: δενδριτικά κύτταρα διεγερμένα με LPS (Γ) Δείγματα μολυσμένων δενδριτικών κυττάρων σε χρονικά διαστήματα i) 4h, ii) 12h και iii) 24h μετά τη μόλυνση. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στον μέσο όρο ± SD πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων.

Αρχικά, προσδιορίστηκε η μεταβολή της έκφρασης των δύο μορίων στο πληθυσμό των δενδριτικών κυττάρων σε τρία χρονικά διαστήματα μετά τη μόλυνση (4, 12 και 24 ώρες) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (**CD200** 10,8±1,7%, **CD273** 26,1±8,6%). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ήδη από τις 4 ώρες μετά τη μόλυνση παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στον αριθμό των δενδριτικών κυττάρων που εκφράζουν τόσο το CD200 (59,5±6,5%) όσο και το CD273 (77±10,9%) και τα επίπεδα αυτά διατηρήθηκαν στις 12 (**CD200** 39,6±11,1%, **CD273** 66,1±12,4%) και τις 24 ώρες μετά τη μόλυνση (**CD200** 45,6±11,7%, **CD273** 65±12,4%) (Εικόνα 4.12).

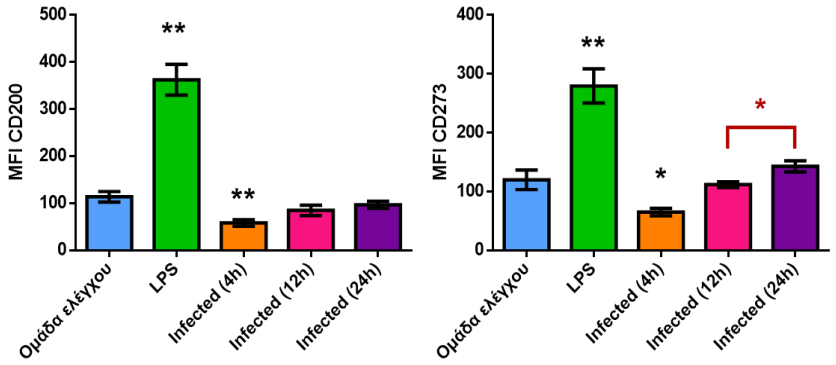


Εικόνα 4.13 Έλεγχος επίδρασης του παρασίτου στην έκφραση των μορίων CD200 και CD273. Δενδριτικά κύτταρα μολύνθηκαν με παράσιτο σε αναλογία 1:20 και το ποσοστό έκφρασης των μορίων στον πληθυσμό προσδιορίστηκε με χρήση φθορίζοντων αντισωμάτων και κυτταρομετρία ροής. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στον μέσο όρο ± SD πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$). LPS: θετικός μάρτυρας.

Εκτός από το ποσοστό των δενδριτικών κυττάρων που εκφράζουν τα μόρια CD200 και CD273, εξετάστηκε και η μέση ένταση φθορισμού (Mean Fluorescent Intensity, MFI), ένας δείκτης που αντιπροσωπεύει το μέσο φθορισμό ανά κύτταρο. Στην περίπτωση του μορίου CD200, παρατηρήθηκε ότι η τιμή του MFI 4 ώρες μετά τη μόλυνση εμφανίζεται σημαντικά μειωμένη σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ αυξάνεται στα ίδια επίπεδα με αυτόν στις 12 ώρες μετά τη μόλυνση και διατηρείται σταθερή ως τις 24 ώρες(Εικόνα 4.14, Πίνακας 4.1). Στην περίπτωση του CD273, η τιμή του MFI επίσης βρέθηκε σημαντικά μειωμένη σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα 4 ώρες μετά τη μόλυνση. Στο χρονικό διάστημα των 12 ωρών μετά τη μόλυνση, η τιμή του MFI έχει σχεδόν διπλασιάστηκε σε σχέση με τις 4 ώρες, ενώ 24 ώρες μετά τη μόλυνση έχει αυξηθεί σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, αλλά όχι σε στατιστικά σημαντικό βαθμό. Σε αντίθεση με το μόριο CD200, η διαφορά της τιμής του MFI ανάμεσα στα χρονικά διαστήματα των 12 και 24άρων ωρών μετά τη μόλυνση κρίνεται στατιστικά σημαντική (Εικόνα 4.14, Πίνακας 4.1). Ως αποτέλεσμα, οι 24 ώρες μετά τη μόλυνση θεωρούνται καταλληλότερο χρονικό σημείο για να χρησιμοποιηθούν στα επόμενα πειράματα.

Πίνακας 4.3 Επίδραση του παρασίτου στην έκφραση των μορίων CD200 και CD273 από τα δενδριτικά κύτταρα. Τιμές της μέσης έντασης φθορισμού (MFI) που προκύπτουν από ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στον μέσο όρο ± SD πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων. DC: δενδριτικά κύτταρα, DCinf: δενδριτικά κύτταρα μολυσμένα με το παράσιτο

MFI	CD200	CD273
DC	113.9 ± 27.68	120.2 ± 47.09
DC + LPS	362.8 ± 80.73	279.7 ± 87.4
DCinf. (4h)	58.5 ± 15.37	65.2 ± 12.87
DCinf. (12h)	85.13 ± 22.08	112.9 ± 9.89
DCinf. (24h)	96.82 ± 16.57	143 ± 18.83

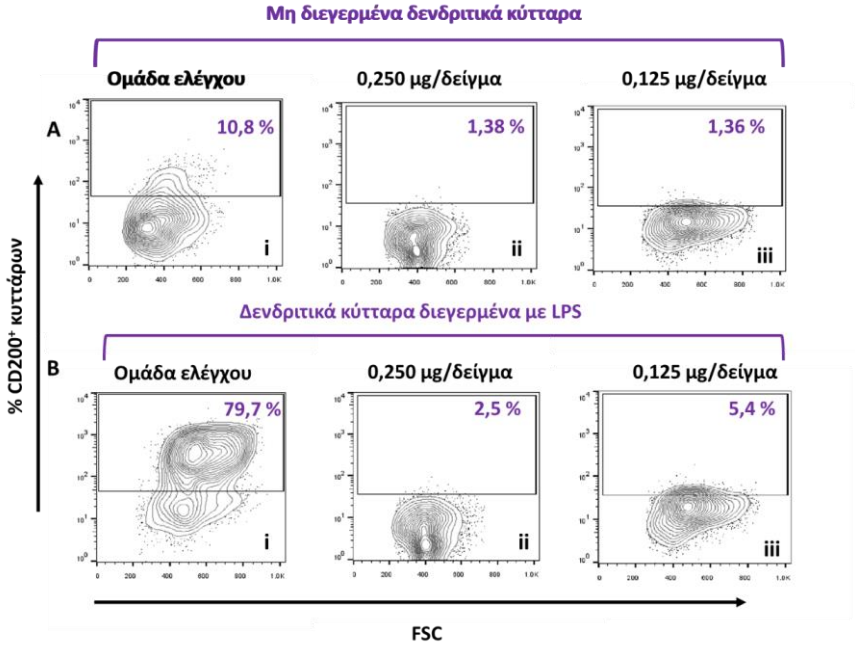


Εικόνα 4.14 Έλεγχος επίδρασης του παρασίτου στην έκφραση των μορίων CD200 και CD273. Δενδριτικά κύτταρα μολύνθηκαν με παράσιτο σε αναλογία 1:20, σημάνθηκαν με φθορίζοντα αντισώματα έναντι των μορίων CD200 και CD273 και ο φθορισμός ανιχνεύθηκε με κυτταρομετρία ροής. Τα δεδομένα είναι αντιστοιχούν στον μέσο όρο ± SD (*: p<0.05, **: p<0.01). LPS: θετικός μάρτυρας

4.6 Έλεγχος ειδικότητας μονοκλωνικών αντισωμάτων πρόσδεσης έναντι των μορίων CD200 και CD273

Στην παρούσα εργασία, η παρεμπόδιση της σύνδεσης των μορίων CD200 και CD273 με τους προσδέτες τους έγινε με χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι των μορίων αυτών. Προκειμένου να μελετηθεί η ειδικότητα αυτών των αντισωμάτων, δενδριτικά κύτταρα (μη διεγερμένα, διεγερμένα με LPS ή μολυσμένα με παράσιτο) επωάστηκαν με το κάθε αντίσωμα πρόσδεσης σε διαδοχικές συγκεντρώσεις (**CD200** 0,250 και 0,125 μg/δείγμα, **CD273** 0,125 και 0,06 μg/δείγμα) για 24 ώρες. Ακολούθησε χρώση με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του μορίου CD200 ή CD273

σημασμένο με φυκοερυθρίνη και το ποσοστό έκφρασης των μορίων CD200 και CD273 στον πληθυσμό προσδιορίστηκε με κυτταρομετρία ροής (Εικόνες 4.15, 4.17). Τόσο τα μονοκλωνικά αντισώματα που λειτούργησαν ως μεσολαβητές της παρεμπόδισης της σύνδεσης των μορίων CD200 και CD273 με τους προσδέτες τους, όσο αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για τη σήμανση τους, έχουν προέλθει από τον ίδιο κλώνο, συνεπώς δρουν συναγωνιστικά ως προς τη θέση πρόσδεσης στο μόριο στόχο.



Εικόνα 4.15 Έλεγχος ειδικότητας μονοκλωνικών αντισωμάτων πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200. (A) Επίδραση με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200 σε μη διεγερμένα δενδριτικά κύτταρα i) Ομάδα ελέγχου: δενδριτικά κύτταρα που δεν έχουν επωαστεί με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης, ii) Αντίσωμα πρόσδεσης σε συγκέντρωση 0,25 μg/δείγμα, iii) Αντίσωμα πρόσδεσης σε συγκέντρωση 0,125 μg/δείγμα, (B) Επίδραση με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200 σε δενδριτικά κύτταρα διεγερμένα με LPS i) Ομάδα ελέγχου: δενδριτικά κύτταρα που δεν έχουν επωαστεί με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης, ii) Αντίσωμα πρόσδεσης σε συγκέντρωση 0,25 μg/δείγμα, iii) Αντίσωμα πρόσδεσης σε συγκέντρωση 0,125 μg/δείγμα. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στον μέσο όρο ± SD πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η επίδραση με το αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του CD200, επέφερε στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης του μορίου CD200 στον πληθυσμό των αδιέγερτων δενδριτικών κυττάρων καθώς και αυτών που είχαν διεγερθεί με LPS, σε κάθε συγκέντρωση που μελετήθηκε (Εικόνα 4.16, Πίνακας 4.2). Παράλληλα, παρατηρήθηκε μείωση και του MFI στις ομάδες αυτές, γεγονός που

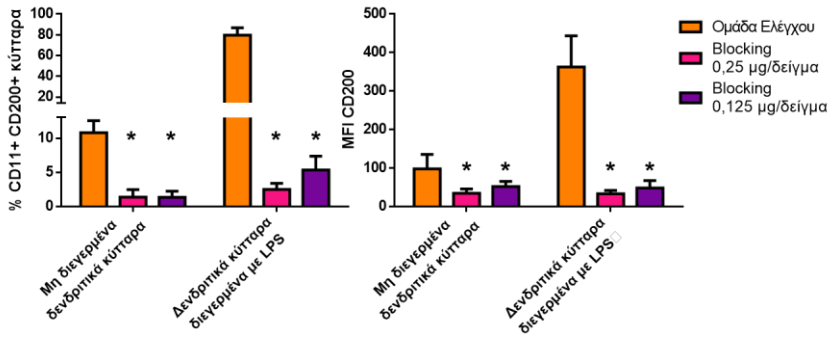
υποδεικνύει ότι το αντίσωμα πρόσδεσης συνδέεται επιτυχώς στην πλειοψηφία των δενδριτικών κυττάρων του πληθυσμού και σχεδόν καθολικά στα μόρια CD200 στην επιφάνεια του κάθε δενδριτικού κυττάρου (Εικόνα 4.16, Πίνακας 4.3).

Πίνακας 4.4 Έλεγχος ειδικότητας μονοκλωνικών αντισωμάτων πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200. Τιμές της ποσοστού έκφρασης του μορίου CD200 στον πληθυσμό δενδριτικών κυττάρων μετά από επίδραση με αντίσωμα πρόσδεσης σε διαδοχικές συγκεντρώσεις. DC: δενδριτικά κύτταρα. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στον μέσο όρο ± SD πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων.

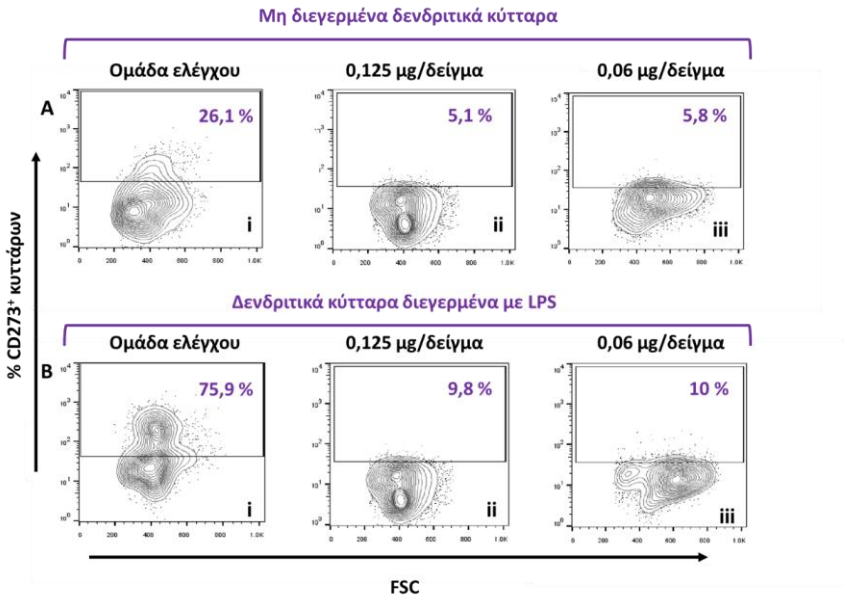
% έκφρασης μορίου CD200	Ομάδα Ελέγχου	CD200 (0,25 μg/δείγμα)	CD200 (0,125 μg/δείγμα)
DC	10,8 ± 1,74	1,38 ± 1,11	1,36 ± 0,91
DC + LPS	79,7 ± 7,1	2,5 ± 0,9	5,4 ± 2,02

Πίνακας 4.5 Έλεγχος ειδικότητας μονοκλωνικών αντισωμάτων πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200. Τιμές της μέσης έντασης φθορισμού (MFI) του μορίου CD200 στον πληθυσμό δενδριτικών κυττάρων μετά από επίδραση με αντίσωμα πρόσδεσης σε διαδοχικές συγκεντρώσεις. DC: δενδριτικά κύτταρα. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στον μέσο όρο ± SD πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων.

MFI	Ομάδα Ελέγχου	CD200 (0,25 μg/δείγμα)	CD200 (0,125 μg/δείγμα)
DC	98 ± 37,7	34,7 ± 11,49	52,3 ± 13,18
DC + LPS	362,8 ± 8073	33,5 ± 8,65	48,4 ± 19,32



Εικόνα 4.16 Έλεγχος ειδικότητας μονοκλωνικών αντισωμάτων πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200. Δενδριτικά κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες με αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200 σε διαδοχικές συγκεντρώσεις και το ποσοστό έκφρασης των εν λόγω μορίων στον πληθυσμό προσδιορίστηκε με χρήση φθορίζοντων αντισωμάτων και κυτταρομετρία ροής. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στον μέσο όρο ± SD πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων (*: p<0.05, **: p<0.01). blocking: επίδραση με αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200.



Εικόνα 4.17 Έλεγχος ειδικότητας μονοκλωνικών αντισωμάτων πρόσδεσης έναντι του μορίου CD273. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν συνδεδεμένο με φυκοερυθρίνη (PE), της οποίας ο φθορισμός ανιχνεύεται από την παράμετρο FL2. (A) Επίδραση με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του μορίου CD273 σε μη διεγερμένα δενδριτικά κύτταρα i) Ομάδα ελέγχου: δενδριτικά κύτταρα που δεν έχουν επωαστεί με αντίσωμα πρόσδεσης, ii) Αντίσωμα πρόσδεσης σε συγκέντρωση 0,125 μg/δείγμα, iii) Αντίσωμα πρόσδεσης σε συγκέντρωση 0,06 μg/δείγμα, (B) Επίδραση με αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD273 σε δενδριτικά κύτταρα διεγερμένα με LPS i) Ομάδα ελέγχου: δενδριτικά κύτταρα που δεν έχουν επωαστεί με αντίσωμα πρόσδεσης, ii) Αντίσωμα πρόσδεσης σε συγκέντρωση 0,125 μg/δείγμα, iii) Αντίσωμα πρόσδεσης σε συγκέντρωση 0,06 μg/δείγμα. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στον μέσο όρο ± SD πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων.

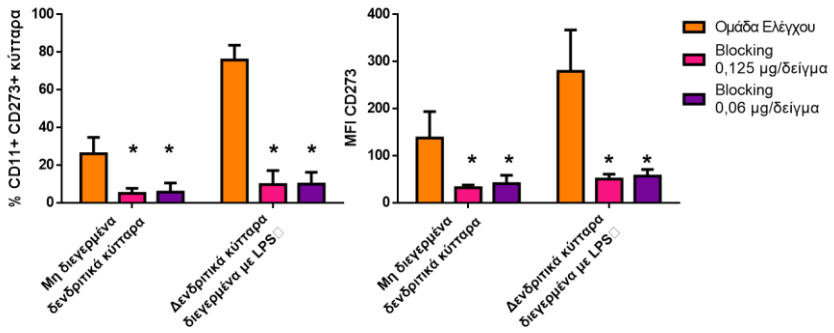
Αντίστοιχα ήταν και τα αποτελέσματα και για το μόριο CD273. Η επίδραση με το αντίσωμα πρόσδεσης, σε κάθε συγκέντρωση που μελετήθηκε, επέφερε στατιστικά μείωση της έκφρασης του μορίου CD273 στον πληθυσμό των αδιέγερτων δενδριτικών κυττάρων καθώς και αυτών που είχαν διεγερθεί με LPS (Εικόνα 4.18, Πίνακας 4.4), ενώ συνοδεύεται από αντίστοιχα μείωση του MFI (Εικόνα 4.18, Πίνακας 4.5).

Πίνακας 4.6 Έλεγχος ειδικότητας μονοκλωνικών αντισωμάτων πρόσδεσης έναντι του μορίου CD273. Τιμές της ποσοστού έκφρασης του μορίου CD273 στον πληθυσμό δενδριτικών κυττάρων μετά από επίδραση με αντίσωμα πρόσδεσης σε διαδοχικές συγκεντρώσεις. DC: δενδριτικά κύτταρα. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στον μέσο όρο ± SD πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων.

% έκφρασης μορίου CD273	Ομάδα Ελέγχου	CD273 (0,125 μg/δείγμα)	CD273 (0,06 μg/δείγμα)
DC	26,1 ± 8,6	5,1 ± 2,7	5,8 ± 4,82
DC + LPS	75,9 ± 7,9	9,8 ± 7,47	10 ± 6,3

Πίνακας 4.7 Έλεγχος ειδικότητας μονοκλωνικών αντισωμάτων πρόσδεσης έναντι του μορίου CD273. Τιμές της μέσης έντασης φθορισμού (MFI) του μορίου CD273 στον πληθυσμό δενδριτικών κυττάρων μετά από επίδραση με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης σε διαδοχικές συγκεντρώσεις. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στον μέσο όρο ± SD πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων. DC: δενδριτικά κύτταρα.

MFI	Ομάδα Ελέγχου	CD273 (0,125 μg/δείγμα)	CD273 (0,06 μg/δείγμα)
DC	137,9 ± 55,9	32,7 ± 5,59	41,2 ± 17,71
DC + LPS	279,7 ± 87,4	50,9 ± 10,23	57,3 ± 13,86



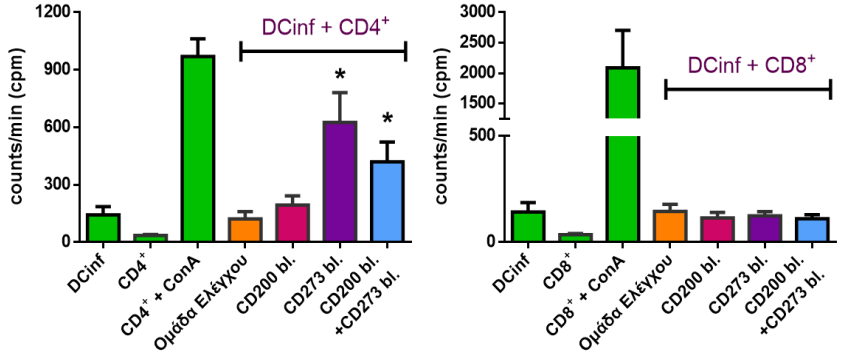
Εικόνα 4.18 Έλεγχος ειδικότητας μονοκλωνικών αντισωμάτων πρόσδεσης έναντι των μορίων CD200 και CD273. Δενδριτικά κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200 ή CD273 σε διαδοχικές συγκεντρώσεις και ο φθορισμός ανιχνεύθηκε με κυτταρομετρία ροής. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στον μέσο όρο ± SD πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων (*: p<0.05, **: p<0.01).Blocking: επίδραση με αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD273.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η βέλτιστη συγκέντρωση δράσης των αντισωμάτων δέσμευσης έναντι των μορίων CD200 και CD273 είναι 0,25 μg/δείγμα και 0,125 μg/δείγμα αντίστοιχα.

4.7 Επίδραση της παρεμπόδισης σύνδεσης των μορίων CD200 και CD273 με τους προσδέτες τους στην ενεργοποίηση παρθένων Τ λεμφοκυττάρων

4.7.1 Έλεγχος πολλαπλασιασμού Τ λεμφοκυττάρων

Είναι γνωστό ότι η μόλυνση των δενδριτικών κυττάρων με *Leishmania* δρα ανασταλτικά στην ικανότητά τους να ενεργοποιήσουν προστατευτικούς πληθυσμούς Τ λεμφοκυττάρων[48]. Η επίδραση της παρεμπόδισης της σύνδεσης των μορίων CD200 και CD273 στα δενδριτικά κύτταρα με τους προσδέτες τους ως προς την ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων, ελέγχεται μέσω του δυναμικού πολλαπλασιασμού τους. Προκειμένου να γίνει αυτό, μολυσμένα δενδριτικά κύτταρα που έχουν προ-επωαστεί με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200, CD273 ή του συνδυασμού τους, συγκαλλιεργούνται σε αναλογία 1:5 με καθαρό πληθυσμό παρθένων $CD4^+$ ή $CD8^+$ Τ λεμφοκυττάρων, που έχουν απομονωθεί από σπλήνα ποντικού BALB/c, για 5 ημέρες. Ο πολλαπλασιασμός των Τ λεμφοκυττάρων προσδιορίστηκε με την ενσωμάτωση τριτιωμένης θυμιδίνης στο γενετικό τους υλικό και μέτρηση της εκπεμπόμενης β ακτινοβολίας (Εικόνα 4.19).



Εικόνα 4.19 Έλεγχος πολλαπλασιασμού CD4+ ή CD8⁺ Τ λεμφοκυττάρων. Δενδριτικά κύτταρα μολυσμένα με το παράσιτο επωάστηκαν για 24 ώρες με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200 ή CD273 και στη συνέχεια συγκαλλιεργήθηκαν με CD4⁺ ή CD8⁺ Τ λεμφοκύτταρα. Το δυναμικό πολλαπλασιασμού εκτιμήθηκε με ενσωμάτωση τριτιωμένης θυμιδίνης στο γενετικό υλικό και μέτρηση της εκπεμπόμενης β ακτινοβολίας. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στον μέσο όρο ± SD τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$). CD200 bl.: επίδραση με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200, CD273 bl.: επίδραση με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD273, CD200 bl + CD273 bl.: συνδυαστική επίδραση με μονοκλωνικά αντισώματα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200 και του CD273, DCinf., CD4⁺/CD8⁺: αρνητικοί μάρτυρες, CD4⁺/CD8⁺ + ConA: θετικός μάρτυρας

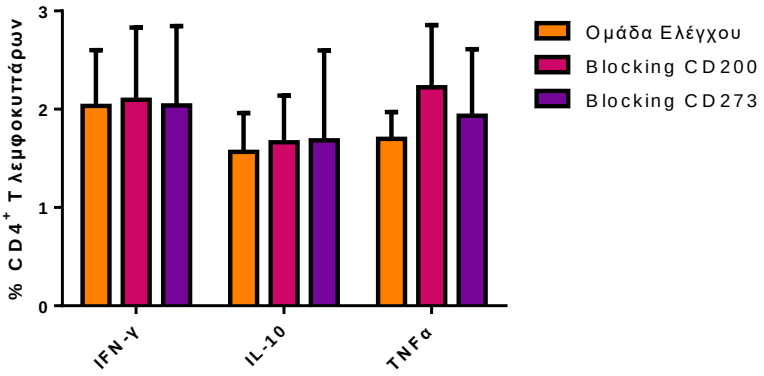
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε ότι η επίδραση με το αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD273 προκαλεί στατιστικά σημαντική μεταβολή του πολλαπλασιασμού των CD4⁺ Τ λεμφοκυττάρων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (μολυσμένα δενδριτικά κύτταρα με Τ λεμφοκύτταρα), ενώ αντιθέτως η χορήγηση αντισώματος πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200 δεν επηρεάζει το δυναμικό του πολλαπλασιασμού. Η ταυτόχρονη χορήγηση των δύο αντισωμάτων πρόσδεσης οδηγεί σε στατιστικά σημαντική αύξηση του πολλαπλασιασμού των CD4⁺ Τ λεμφοκυττάρων, η οποία όμως είναι μειωμένη σε σχέση με την αποκλειστική χορήγηση αντισώματος πρόσδεσης έναντι του μορίου CD273. Αντιθέτως, ο πολλαπλασιασμός των CD8⁺ Τ λεμφοκυττάρων παρέμεινε αμετάβλητος σε όλες τις υπό διερεύνηση ομάδες (Πίνακας 4.6).

Πίνακας 4.8 Έλεγχος πολλαπλασιασμού παρθένων CD4$^+$ ή CD8$^+$ Τ λεμφοκυττάρων. Τιμές των κρούσεων ανά λεπτό (cpm) μετά από επίδραση με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι των μορίων CD200 και CD273 σε μολυσμένα δενδριτικά κύτταρα. Τα δεδομένα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. DCinf.: δενδριτικά κύτταρα μολυσμένα με το παράσιτο, Tcells: Τ λεμφοκύτταρα CD200 bl.: επίδραση με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200, CD273 bl.: επίδραση με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD273, CD200 bl + CD273 bl.: συνδυαστική επίδραση με μονοκλωνικά αντισώματα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200 και του CD273.

Κρούσεις (cpm)	CD4$^+$	CD8$^+$
DCinf. + Tcells	122,3 ± 37,88	145,8 ± 33,21
DCinf. + Tcells + CD200 bl.	194 ± 48,15	115 ± 26,14
DCinf. + Tcells + CD273 bl.	625 ± 156,3	124,5 ± 19,77
DCinf. + Tcells + CD200 bl. + CD273 bl.	420 ±103,8	111,3 ± 18,43

4.7.2 Προσδιορισμός της ενδοκυττάριας παραγωγής κυτταροκινών

Παράλληλα με τη διερεύνηση της επίδρασης των μονοκλωνικών αντισωμάτων πρόσδεσης στο δυναμικό πολλαπλασιασμού των Τ λεμφοκυττάρων, έγινε έλεγχος των παραγόμενων κυτταροκινών από τα CD4$^+$ Τ λεμφοκύτταρα . Μολυσμένα δενδριτικά κύτταρα που έχουν προεπωαστεί με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200 ή CD273 συγκαλλιεργούνται με καθαρό πληθυσμό CD4$^+$ Τ λεμφοκυττάρων σε αναλογία 1:5 για 3 ημέρες. Ο προσδιορισμός της ενδοκυττάριας παραγωγής των κυτταροκινών IFN-γ, IL-10 και TNF-α έγινε με χρήση φθορίζοντων αντισωμάτων και κυτταρομετρία ροής (Εικόνα 4.20).



Εικόνα 4.20 Προσδιορισμός ενδοκυττάριας παραγωγής κυτταροκινών. Δενδριτικά κύτταρα μολυσμένα με το παράσιτο επωάστηκαν για 24 ώρες με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200 ή CD273 και στη συνέχεια συγκαλλιεργήθηκαν με CD4+ T λεμφοκύτταρα για 3 ημέρες. Το ποσοστό των T λεμφοκυττάρων στο οποίο εκφράζονται κυτταροκίνες προσδιορίστηκε με χρήση φθορίζοντων αντισωμάτων και κυτταρομετρία ροής. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στον μέσο όρο ± SD τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (*: p<0.05, **: p<0.01). CD200 bl.: επίδραση με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200, CD273 bl.: επίδραση με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD273.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η παρεμπόδιση της σύνδεσης με τον προσδέτη του τόσο του μορίου CD200 όσο και του CD273 δεν προκάλεσε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των ενδοκυτταρικών κυτταροκινών σε παρθένα $CD4^+$ T λεμφοκύτταρα (Πίνακας 4.7).

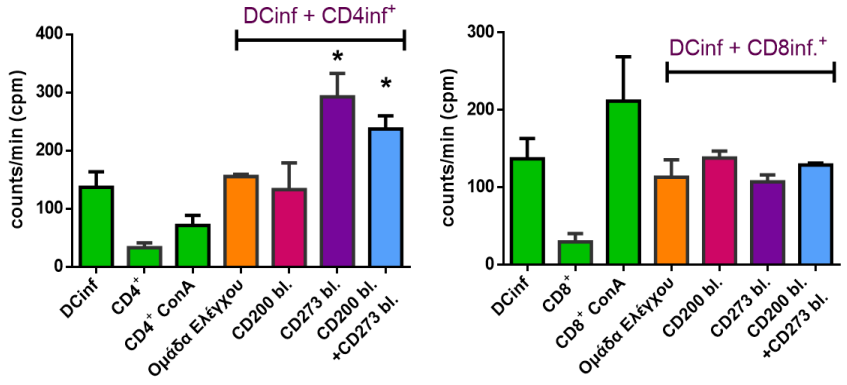
Πίνακας 4.9 Προσδιορισμός ενδοκυττάριας παραγωγής κυτταροκινών από παρθένα $CD4^+$ T λεμφοκύτταρα μετά από επίδραση με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι των μορίων CD200 ή CD273. Τιμές του ποσοστού των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων στα οποία εντοπίζονται κυτταροκίνες. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στον μέσο όρο ± SD τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. CD200 bl.: επίδραση με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200, CD273 bl.: επίδραση με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD273

Ποσοστό $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων	IFN-γ	IL-10	TNFα
DCinf. + Tcells	2,03 ± 0,57	1,57 ± 0,4	1,7 ± 0,27
DCinf. + Tcells + CD200 bl.	2,1 ± 0,74	1,67 ± 0,47	2,22 ± 0,63
DCinf. + Tcells + CD273 bl.	2,04 ± 0,81	1,68 ± 0,92	1,93 ± 0,68

4.8 Επίδραση της παρεμπόδισης της σύνδεσης των μορίων CD200 και CD273, που εκφράζονται σε μολυσμένα δενδριτικά κύτταρα, με τους προσδέτες τους στην ενεργοποίηση Τ λεμφοκυττάρων που προέρχονται από μολυσμένο ζώο

4.8.1 Έλεγχος πολλαπλασιασμού Τ λεμφοκυττάρων

Ένας από τους λόγους για τους οποίους δεν εγείρεται προστατευτική ανοσολογική απόκριση κατά τη σπλαγχνική λεϊσμανίαση, είναι το γεγονός ότι το παράσιτο οδηγεί τα Τ λεμφοκύτταρα του οργανισμού σε μια κατάσταση εξασθένησης[47]. Προκειμένου να διερευνηθεί εάν η παρεμπόδιση της σύνδεσης των μορίων CD200 και CD273 με τους προσδέτες τους είναι ικανή να αναστρέψει τον εξασθενημένο φαινότυπο των Τ λεμφοκυττάρων, το παραπάνω πείραμα επαναλήφθηκε με χρήση $CD4^+$ και $CD8^+$ Τ λεμφοκυττάρων απομονωμένων από σπλήνα ποντικού BALB/c που έχει μολυνθεί με *L. infantum* και βρίσκεται στη χρόνια φάση της νόσου.



Εικόνα 4.21 Έλεγχος πολλαπλασιασμού $CD4^+$ ή $CD8^+$ Τ λεμφοκυττάρων που προέρχονται από μολυσμένο ζώο. Δενδριτικά κύτταρα μολυσμένα με το παράσιτο επωάστηκαν για 24 ώρες με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200 ή CD273 και στη συνέχεια συγκαλλιεργήθηκαν με $CD4^+$ ή $CD8^+$ Τ λεμφοκύτταρα. Το δυναμικό πολλαπλασιασμού εκτιμήθηκε με ενσωμάτωση τριτιωμένης θυμιδίνης στο γενετικό υλικό και μέτρηση της εκπεμπόμενης β ακτινοβολίας. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στον μέσο όρο ± SD τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$). CD200 bl.: επίδραση με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200, CD273 bl.: επίδραση με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD273, CD200 bl + CD273 bl.: συνδυαστική επίδραση με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200 και του CD273, DCinf: δενδριτικά κύτταρα μολυσμένα με παράσιτο, $CD4^+/CD8^+$: αρνητικοί μάρτυρες, $CD4^+/CD8^+$ + ConA: θετικός μάρτυρας

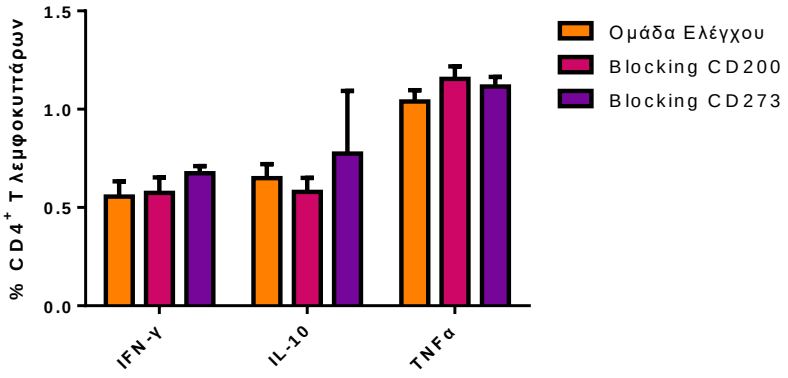
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε ότι η επίδραση με αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD273, είτε όταν χρησιμοποιείται μόνος του είτε σε συνδυασμό με αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200, προκαλεί στατιστικά σημαντική μεταβολή του πολλαπλασιασμού των $CD4^+$ Τ λεμφοκυττάρων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (μολυσμένα δενδριτικά κύτταρα με Τ λεμφοκύτταρα). Αντίθετα, η χορήγηση αντισώματος πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200 δεν επηρεάζει το δυναμικό του πολλαπλασιασμού (Εικόνα 4.21). Τέλος, το δυναμικό πολλαπλασιασμού των $CD8^+$ Τ λεμφοκυττάρων δεν επηρεάζεται από την επίδραση κανενός από τα μονοκλωνικά αντισώματα πρόσδεσης που ελέγχθηκαν (Πίνακας 4.8).

Πίνακας 4.10 Έλεγχος πολλαπλασιασμού $CD4^+$ ή $CD8^+$ Τ λεμφοκυττάρων που προέρχονται από μολυσμένο ζώο. Τιμές των κρούσεων ανά λεπτό (cpm) μετά από επίδραση με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι των μορίων CD200 και CD273 σε μολυσμένα δενδριτικά κύτταρα. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στον μέσο όρο ± SD τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. DCinf.: δενδριτικά κύτταρα μολυσμένα με το παράσιτο, Tcells: Τ λεμφοκύτταρα CD200 bl.: επίδραση με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200, CD273 bl.: επίδραση με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD273, CD200 bl + CD273 bl.: συνδυαστική επίδραση με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200 και του CD273.

Κρούσεις (cpm)	$CD4^+$	$CD8^+$
DCinf. + Tcells	155,5 ± 3,5	113,3 ± 22,5
DCinf. + Tcells + CD200 bl.	133 ± 45,97	138 ± 9
DCinf. + Tcells + CD273 bl.	292 ± 40,7	107,3 ± 9,02
DCinf. + Tcells + CD200 bl. + CD273 bl.	237 ± 22,91	129 ± 2,65

4.8.2 Προσδιορισμός της ενδοκυττάριας παραγωγής κυτταροκινών

Ο προσδιορισμός της ενδοκυττάριας παραγωγής των κυτταροκινών IFN-γ, IL-10 και TNF-α έγινε με χρήση φθορίζοντων αντισωμάτων και κυτταρομετρία ροής (Εικόνα 4.22).



Εικόνα 4.22 Προσδιορισμός ενδοκυττάριας παραγωγής κυτταροκινών. Δενδριτικά κύτταρα μολυσμένα με το παράσιτο επωάστηκαν για 24 ώρες με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200 ή CD273 και στη συνέχεια συγκαλλιεργήθηκαν με CD4+ T λεμφοκύτταρα που προέρχονται από μολυσμένο ζώο για 3 ημέρες. Το ποσοστό των T λεμφοκυττάρων στο οποίο εκφράζονται κυτταροκίνες προσδιορίστηκε με χρήση φθορίζοντων αντισωμάτων και κυτταρομετρία ροής. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στον μέσο όρο ± SD τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (*: p<0.05, **: p<0.01). CD200 bl.: επίδραση με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200, CD273 bl.: επίδραση με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD273.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η παρεμπόδιση της σύνδεσης στον προσδέτη του τόσο του μορίου CD200 όσο και του CD273 δεν προκάλεσε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των ενδοκυτταρικών κυτταροκινών που παράγονται από τα CD4+ T λεμφοκύτταρα (Πίνακας 4.9).

Πίνακας 4.11 Προσδιορισμός ενδοκυττάριας παραγωγής κυτταροκινών από CD4+ T λεμφοκύτταρα που προέρχονται από μολυσμένο ζώο μετά από επίδραση με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι των μορίων CD200 ή CD273. Τιμές του ποσοστού των CD4+ T λεμφοκυττάρων στα οποία εντοπίζονται κυτταροκίνες. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στον μέσο όρο ± SD τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. CD200 bl.: επίδραση με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD200, CD273 bl.: επίδραση με μονοκλωνικό αντίσωμα πρόσδεσης έναντι του μορίου CD273.

Ποσοστό CD4+ T λεμφοκυττάρων	IFN-γ	IL-10	TNFα
DCinf. + Tcells	0,56 ± 0,08	0,65 ± 0,07	1,04 ± 0,06
DCinf. + Tcells + CD200 bl.	0,58 ± 0,08	0,58 ± 0,07	1,16 ± 0,06
DCinf. + Tcells + CD273 bl.	0,68 ± 0,04	0,78 ± 0,32	1,12 ± 0,05

5. Συζήτηση

Η λεϊσμανίαση είναι μια σοβαρή ασθένεια που επηρεάζει εκατομμύρια ανθρώπων κάθε χρόνο και συνεπώς η εύρεση μιας αποτελεσματικής θεραπείας είναι μεγάλης σημασίας. Η αμφίβολη αποτελεσματικότητα των μέχρι τώρα θεραπευτικών προσεγγίσεων σε συνδυασμό με τις έντονες παρενέργειες και το υψηλό κόστος παραγωγής τους, κάνουν επιτακτική την ανάγκη ανεύρεσης εναλλακτικών μορφών θεραπείας. Ιδιαίτερα ελπιδοφόρα προσέγγιση αποτελεί ο σχεδιασμός πρωτοκόλλων ανοσοθεραπείας.

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η αποδοτικότητα της χρήσης μονοκλωνικών αντισωμάτων πρόσδεσης ως μέσο παρεμπόδισης της σύνδεσης των ανοσορυθμιστικών μορίων CD200 και CD273 (PD-L2) με τους προσδέτες τους και κατ' επέκτασιν, ως ανοσοθεραπευτική μέθοδος για την αντιμετώπιση της σπλαγχνικής λεϊσμανίασης. Η παραπάνω υπόθεση εξετάστηκε σε τρεις άξονες. Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση που έχει η μόλυνση με *L. infantum* στην έκφραση των μορίων CD200 και CD273 στα δενδριτικά κύτταρα. Στη συνέχεια, ελέγχθηκε εάν η επίδραση με μονοκλωνικά αντισώματα πρόσδεσης έναντι των μορίων CD200 και CD273 στην επιφάνεια δενδριτικών κυττάρων μολυσμένων με *L. infantum*, είναι ικανή να αποκαταστήσει την αντιγονοπαρουσιαστική τους ικανότητα των δενδριτικών κυττάρων και, ως αποτέλεσμα, και την ικανότητά τους να ενεργοποιήσουν παρθένα Τ λεμφοκύτταρα. Τέλος, διερευνήθηκε εάν η επίδραση με μονοκλωνικά αντισώματα πρόσδεσης έναντι των μορίων CD200 και CD273 στην επιφάνεια δενδριτικών κυττάρων μολυσμένων με *L. infantum* μπορεί να αναστρέψει τον εξουθενωμένο φαινότυπο που εμφανίζουν τα Τ λεμφοκύτταρα κατά τη χρόνια φάση της νόσου.

5.1 Δενδριτικά κύτταρα στην ανοσοθεραπεία

Ως τα επαγγελματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του οργανισμού, τα δενδριτικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από μεγάλη ικανότητα πρόσληψης και επεξεργασίας αντιγόνων και στη συνέχεια παρουσίασης τους στα Τ λεμφοκύτταρα μέσω μορίων MHC τάξης I ή II. Στην επιφάνεια τους εκφράζονται συνδιεγερτικά μόρια, όπως CD40, CD80 και CD86, τα οποία αυξάνονται κατά την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων και συμβάλλουν στην επιτυχή σύναψη μεταξύ των δενδριτικών κυττάρων και των Τ λεμφοκυττάρων. Επιπλέον, μετά την ενεργοποίηση

τους , τα δενδριτικά κύτταρα παράγουν προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως IL-12, IL-1 και IL-6, οι οποίες διαδραματίζουν κομβικό ρόλο στην ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η μοναδική ικανότητα των δενδριτικών κυττάρων να επάγουν πρωτογενείς ανοσολογικές αποκρίσεις μέσω της ενεργοποίησης παρθένων Τ λεμφοκυττάρων, τα καθιστά ένα πληθυσμό-κλειδί στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης[71].

Η εκμετάλλευση των ανοσορυθμιστικών ιδιοτήτων των δενδριτικών κυττάρων αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη ανοσοθεραπευτική στρατηγική στην αντιμετώπιση πληθώρας παθήσεων, όπως ο καρκίνος, τα αυτοάνοσα νοσήματα και οι λοιμώδεις ασθένειες. Οι παρούσες κλινικές εφαρμογές εστιάζουν στην αξιοποίηση των δενδριτικών κυττάρων του ίδιου του ασθενούς προκειμένου να δημιουργηθεί ένα θεραπευτικό εμβόλιο. Ειδικότερα, τα δενδριτικά κύτταρα απομονώνονται από τον ασθενή, ωριμάζουν ex vivo παρουσία αυξητικών παραγόντων και επαναχορηγούνται στον ασθενή. Εκτός από την τεχνητή ωρίμαση, τα δενδριτικά μπορούν να επεξεργαστούν και με άλλους τρόπους πριν χορηγηθούν στον ασθενή, όπως η συγκαλλιέργειά τους με πεπτίδια ή πρωτεΐνες ανοσολογικού ενδιαφέροντος, η ενσωμάτωση σε αυτά ειδικών αντιγόνων καθώς και η διαμόλυνση τους με ιικό ή άλλο γενετικό υλικό που κωδικοποιεί αντιγονικές αλληλουχίες. Επίσης, είναι δυνατόν να μην χρησιμοποιηθούν αυτούσια τα δενδριτικά κύτταρα, αλλά τα εξωσώματα που εκκρίνονται από αυτά[72].

Μελέτες που εστιάζουν στη χορήγηση δενδριτικών κυττάρων για την αντιμετώπιση λοιμωδών νοσημάτων έχουν δείξει ότι ο εμβολιασμός επάγει προστατευτικές αποκρίσεις ενάντια σε ποικιλία παθογόνων, όπως η *Leishmania*, ο απλός ιός του έρπητα, ο ιός της γρίπης και η *Candida albicans*[73]. Ωστόσο, η προσοχή έχει στραφεί στα ιδιαίτερα ενθαρρυντικά αποτελέσματα που προκύπτουν από τη χορήγηση εμβολίων βασισμένων σε δενδριτικά κύτταρα σε ασθενείς με σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS). Η πρώτη κλινική εφαρμογή αυτής της θεραπείας έγινε από τους Lu et al., όπου διαπιστώθηκε ότι σε ασθενείς μολυσμένους με τον ιό HIV τύπου I, η χορήγηση αυτόλογων δενδριτικών κυττάρων, στα οποία έχουν ενσωματωθεί απενεργοποιημένα στελέχη του ιού, οδηγεί σε σημαντική μείωση του ιικού φορτίου στο πλάσμα του αίματος[74]. Τουλάχιστον δώδεκα μεταγενέστερες μελέτες πάνω στο ίδιο θεραπευτικό πρωτόκολλο στη λοίμωξη με HIV

είχαν ελπιδοφόρα αποτελέσματα και οδήγησαν σε κλινικές, όπου παρατηρήθηκαν ειδικές ανοσολογικές αποκρίσεις στους ασθενείς που συμμετείχαν[73].

Ενώ η ανοσοθεραπεία με χρήση δενδριτικών κυττάρων είναι εφαρμόσιμη και στην αντιμετώπιση της λεϊσμανίασης, ακόμα δεν υπάρχει κάποια εγκεκριμένη μορφή θεραπείας και οι πειραματικές προσεγγίσεις αφορούν σε ζωικά μοντέλα. Μεγάλη πληθώρα μελετών υποστηρίζει την αποτελεσματικότητα των εμβολίων που στηρίζονται σε δενδριτικά κύτταρα σε πειραματικά μοντέλα ποντικών, τόσο για την αντιμετώπιση της δερματικής όσο και της σπλαγχνικής λεϊσμανίασης[73].

Όσον αφορά τη δερματική λεϊσμανίαση, σε μελέτη των Matos et al. παρατηρήθηκε ότι η ανοσοποίηση ποντικών BALB/c και C57BL/6 με μονοκλωνικό αντίσωμα που έχει προκύψει από γενετική τροποποίηση της πρωτεΐνης LmSTI1a της *L. major* και το οποίο στοχεύει το δείκτη CD205 (CED-205) στην επιφάνεια των δενδριτικών, οδηγεί σε αύξηση των αντιγονοειδικών $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων που παράγουν IFN-γ, IL-2 και TNF-α μετά από μόλυνση με *L. major*[75]. Αντίστοιχα, σε άλλη μελέτη έχει δειχθεί ότι η ανοσοποίηση ποντικών BALB/c ή C57BL/6 με δενδριτικά κύτταρα που έχουν καλλιεργηθεί παρουσία λυμένης *L. major* και CpG πεπτιδίων, προκαλεί μείωση στην παραγωγή της IL-10 στα αρχικά στάδια της μόλυνσης από *L. major*[76].

Ανάλογες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και για τη σπλαγχνική λεϊσμανίαση. Έχει δειχθεί ότι η ανοσοποίηση ποντικών BALB/c με δενδριτικά κύτταρα στα οποία έχει ενσωματωθεί τμήμα της μεμβρανικής πρωτεΐνης του κινητοπλάστη του παρασίτου KMP-11, σε συνδυασμό με ολιγοδεοξυνουκλεοτίδια CpG, οδηγεί σε μια μεικτή Th1/Th2 απόκριση η οποία χαρακτηρίζεται από την παραγωγή IFN-γ, IL-10, IgG1 και IgG2, καθώς και σε μείωση του παρασιτικού φορτίου στα σπλαγχνικά όργανα μετά από μόλυνση από *L. infantum*[77]. Σε μεταγενέστερη μελέτη της ίδιας εργαστηριακής ομάδας βρέθηκε ότι η ανοσοποίηση ποντικών BALB/c με δενδριτικά κύτταρα στα οποία έχει ενσωματωθεί η ιστόνη 1 του παρασίτου (LeishH1), οδηγεί σε αντιγονοειδικές ανοσολογικές αποκρίσεις στη μόλυνση με *L. infantum*, γεγονός που υποδεικνύει αλληλεπίδραση των δενδριτικών κυττάρων με πληθυσμούς T λεμφοκυττάρων[78].

5.2 Προσδιορισμός βέλτιστης αναλογίας και πορείας της μόλυνσης

Το στέλεχος του παρασίτου που χρησιμοποιήθηκε ήταν το MHOM/GR/2001/GH8 το οποίο ανήκει στο είδος *Leishmania infantum* και το ζυμόδεμα MON-1. Το είδος *L. infantum* είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της σπλαγχνικής λεϊσμανίασης, της σοβαρότερης μορφής της νόσου, ενώ το ζυμόδεμα MON-1 συναντάται κυρίως στη λεκάνη της Μεσογείου[79, 80]. Επιπλέον, το MON-1 είναι το μοναδικό ζυμόδεμα το οποίο συναντάται στον ελληνικό χώρο τόσο στη σκνίπα και το σκύλο όσο και στον άνθρωπο. Το στέλεχος MHOM/GR/2001/GH8 έχει απομονωθεί από ανθρώπινο ξενιστή και έχει εμφανίσει ανθεκτικότητα σε αντιλεϊσμανικά φάρμακα πρώτης γραμμής, όπως το πεντασθενές αντιμόνιο[79]. Η σπλαγχνική λεϊσμανίαση αποτελεί ένα διαχρονικό πρόβλημα στη λεκάνη της Μεσογείου και η ανάγκη εύρεσης αποτελεσματικών τρόπων αντιμετώπισής της είναι επιτακτική. Πρώτο βήμα σε αυτό το εγχείρημα είναι η αποσαφήνιση των μηχανισμών δράσης του παρασίτου και ιδιαίτερα των ανθεκτικών στελεχών, όπως το GH8.

Για να διαπιστωθεί η βέλτιστη αναλογία μόλυνσης στην παρούσα πειραματική διάταξη, δενδριτικά κύτταρα επωάστηκαν με παράσιτο σε αναλογίες 1:5, 1:10 και 1:20 και τα αποτελέσματα των μολύνσεων εκτιμήθηκαν σε χρονικά διαστήματα 4, 12, 24, 48 και 72 ώρες μετά τη μόλυνση. Διαπιστώθηκε ότι η αναλογία 1:5 δεν παρείχε τον απαραίτητο αριθμό παρασίτων ώστε να μολυνθεί ικανός αριθμός δενδριτικών κυττάρων και ως εκ τούτου κρίθηκε ακατάλληλη. Στην αναλογία 1:10 παρατηρήθηκε αύξηση τόσο του αριθμού των μολυσμένων κυττάρων, όσο και του αριθμού των αμαστιγωτών/κύτταρο, αλλά τα υψηλότερα επίπεδα μόλυνσης σημειώθηκαν στην αναλογία 1:20. Ως εκ τούτου, η επιλεγόμενη αναλογία είναι η 1:20 και από αυτήν λαμβάνονται τα δεδομένα προκειμένου να γίνει μελετηθεί η πορεία της μόλυνσης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, διαπιστώθηκε ότι ήδη από τις 4 ώρες μετά τη μόλυνση ένα ποσοστό των δενδριτικών κυττάρων έχει φαγοκυτταρώσει το παράσιτο, ενώ στις 12 ώρες μετά τη μόλυνση η πλειοψηφία των δενδριτικών κυττάρων ήταν μολυσμένα και ο αριθμός των μολυσμένων κυττάρων διατηρήθηκε σταθερός στις 24 και 48 ώρες μετά τη μόλυνση. Αντίστοιχα κυμάνθηκαν και οι τιμές στον αριθμό των αμαστιγωτών που εντοπίστηκαν ανά δενδριτικό κύτταρο. Στο χρονικό διάστημα των 4 ωρών μετά τη μόλυνση, μικρός αριθμός παρασίτου εντοπίστηκε στο

κυτταρόπλασμα των δενδριτικών κυττάρων και χωρίς να έχει μεταμορφωθεί από την προμαστιγωτή μορφή του στην αμαστιγωτή. Στις 6 ώρες μετά τη μόλυνση ο αριθμός των παρασίτων που φαγοκυτταρώθηκαν από το παράσιτο αυξάνεται έως ότου σταθεροποιηθεί στις 12 ώρες, χωρίς όμως να έχει ολοκληρωθεί η φάση της μεταμόρφωσης από την προμαστιγωτή μορφής στην αμαστιγωτή. Τέλος, από το χρονικά διάστημα των 24άρων ωρών μετά τη μόλυνση, ο αριθμός των φαγοκυτταρωμένων παρασίτων παραμένει σταθερός ως τις 48 ώρες, ενώ πλέον έχει ολοκληρωθεί η μεταμόρφωσή του στην αμαστιγωτή μορφή. Σύμφωνα με τα παραπάνω, το επιλεγόμενο χρονικό διάστημα επώασης του παρασίτου είναι οι 24 ώρες. Τα παραπάνω αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία, καθώς στις περισσότερες μελέτες οι αλληλεπιδράσεις του παρασίτου μελετώνται σε χρονικό διάστημα 24 ωρών μετά τη μόλυνση[81-84].

5.3 Επιλογή ανοσορυθμιστικών μορίων

Έχει τεκμηριωθεί επιστημονικά ότι η κάθαρση της μόλυνσης από *Leishmania* βασίζεται στην ανάπτυξη μιας ισχυρής Th_1 απόκρισης. Στη σπλαγχνική λεϊσμανίαση το παράσιτο εξασφαλίζει την επιβίωση του στον οργανισμό χειραγωγώντας την ενεργοποίηση των ανοσολογικών κυττάρων με τέτοιο τρόπο ώστε να εγκαθιδρυθεί μια Th_2 τύπου απόκριση. Ένας από τους τρόπους που το επιτυγχάνει είναι η επαγωγή της έκφρασης ανοσοκατασταλτικών μορίων στην επιφάνεια των κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος, όπως είναι οι υποδοχείς CD200R, PD-1, CTLA-4 καθώς και οι αντίστοιχοι προσδέτες τους. Η παρούσα εργασία εστιάζει στη μελέτη των μορίων CD200 και CD273 (PD-L2), καθώς τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται σε σημαντικό βαθμό στην εγκαθίδρυση και την εξέλιξη της νόσου[85].

Το CD200 είναι ένα μόριο το οποίο εντοπίζεται σε μεγάλη ποικιλία κυττάρων, τόσο του ανοσοποιητικού συστήματος (δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα, Τ λεμφοκύτταρα και Β λεμφοκύτταρα), όσο και εκτός αυτού, και αποτελεί τον αποκλειστικό προσδέτη του ανοσοκατασταλτικού υποδοχέα CD200-R που εκφράζεται σε Τ λεμφοκύτταρα, Β λεμφοκύτταρα, φυσικά φονικά κύτταρα, δενδριτικά κύτταρα και μακροφάγα[61]. Η αλληλεπίδραση του CD200 με τον υποδοχέα του οδηγεί στην καταστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού Ras/MEK/Erk, με αποτέλεσμα πληθώρα ανοσοκατασταλτικών επιδράσεων[61, 62]. Το CD273 είναι ένα

μόριο που εντοπίζεται αποκλειστικά στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και αποτελεί έναν από τους δύο συνδέτες του ανοσοκατασταλτικού υποδοχέα PD-1, ο οποίος εκφράζεται σε διεγερμένα $CD4^+$ και $CD8^+$ T λεμφοκύτταρα, καθώς και σε B λεμφοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, μονοκύτταρα και μακροφάγα. Η αλληλεπίδραση του CD273 με τον PD-1 διαταράσσει τη σηματοδότηση που μεσολαβείται από τον TCR, μέσω αναστολής των σηματοδοτικών μονοπατιών PI3K/Akt και Ras/MEK/Erk. Ως αποτέλεσμα, αναστέλλεται η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων, δημιουργείται ένας "εξουθενωμένος" φαινότυπος κυρίως στα $CD8^+$ T λεμφοκύτταρα, και τέλος οδηγούνται σε απόπτωση[60].

Η επιλογή των δύο αυτών μορίων αρχικά στηρίχθηκε σε προγενέστερη μελέτη του εργαστηρίου σύμφωνα με την οποία διαπιστώθηκε ότι η μόλυνση δενδριτικών κυττάρων με *L. infantum* επάγει τη μεταγραφή των μορίων CD200 και CD273. Τα παραπάνω αποτελέσματα συγκλίνουν και με την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Ειδικότερα, έχει δειχθεί ότι κατά τη μόλυνση C57BL/6 ποντικών με *L. amazonensis* επάγεται η μεταγραφή του γονιδίου που κωδικοποιεί το μόριο CD200 σε μακροφάγα που απομονώνονται από το μυελό των οστών, ενώ αντίστοιχη είναι και αύξηση της έκφρασης του μορίου[84]. Επιπλέον, πολύ πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η *in vitro* μόλυνση με *L. donovani* αυξάνει την έκφραση του μορίου CD200 σε δενδριτικά κύτταρα που έχουν απομονωθεί από μυελό των οστών[81]. Αντίστοιχα, έχει βρεθεί ότι η LPG του στελέχους *L. mexicana* επάγει την αύξηση της έκφρασης του μορίου PD-1 σε $CD8^+$ T λεμφοκύτταρα ποντικών BALB/c *in vivo*, καθώς και του CD273 σε μακροφάγα ποντικών BALB/c *in vitro*[86]. Τέλος, έχει βρεθεί ότι κατά τη χρόνια φάση της μόλυνσης από *L. donovani* σε χάμστερ, τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου του PD-1 στα $CD4^+$ T λεμφοκύτταρα είναι αυξημένα, ενώ αντίστοιχα αυξημένη είναι και η μεταγραφή του γονιδίου του PD-L2 στα μακροφάγα του σπλήνα[83].

Σύμφωνα με τα παραπάνω, είναι σαφές ότι τα μόρια CD200 και CD273 διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εγκαθίδρυση και την εξέλιξη της λεϊσμανίασης και κατά συνέπεια αποτελούν μόρια-κλειδιά στο σχεδιασμό ανοσοθεραπευτικών πρωτοκόλλων.

5.4 Επίδραση μόλυνσης δενδριτικών κυττάρων με *L. infantum* στην έκφραση των μορίων CD200 και CD273

Προκειμένου να διευκρινιστεί η επίδραση της μόλυνσης δενδριτικών κυττάρων με *L. infantum* στην έκφραση των μορίων CD200 και CD273, δενδριτικά κύτταρα μολύνθηκαν με το παράσιτο σε αναλογία 1:20 για 4h και στη συνέχεια επωάστηκαν για 4, 12 και 24 ώρες. Ο προσδιορισμός της έκφρασης των μορίων CD200 και CD273 στον πληθυσμό έγινε με χρήση φθορίζοντων αντισωμάτων και κυτταρομετρία ροής. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τόσο στην περίπτωση του CD200 όσο και του CD273, το ποσοστό των μολυσμένων δενδριτικών κυττάρων που εκφράζουν το υπό διερεύνηση μόριο βρέθηκε αυξημένο ήδη από τις 4 ώρες μετά τη μόλυνση και παρέμεινε σταθερό έως και τις 24 ώρες. Παράλληλα, ο αριθμός των εκφραζόμενων μορίων CD200 ή CD273 ανά μολυσμένο δενδριτικό κύτταρο εκτιμήθηκε εξετάζοντας την μέση ένταση του φθορισμού (MFI). Στην περίπτωση του μορίου CD200, ο αριθμός των μορίων ανά κύτταρο 4 ώρες μετά τη μόλυνση εμφανίστηκε μειωμένος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ενώ 12 ώρες μετά τη μόλυνση αυξήθηκε στα επίπεδα του αρνητικού μάρτυρα όπου και παρέμεινε σταθερός έως τις 24 ώρες. Αντίστοιχα στην περίπτωση του μορίου CD273, ο αριθμός των μορίων ανά κύτταρο επίσης βρέθηκε μειωμένος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου 4 ώρες μετά τη μόλυνση, ωστόσο διπλασιάστηκε στις 12 ώρες μετά τη μόλυνση, ενώ στις 24 ώρες μετά τη μόλυνση αυξήθηκε περαιτέρω και κατά στατιστικά σημαντικό βαθμό σε σχέση με τις 12 ώρες.

Συμπερασματικά, η επίδραση του παρασίτου επάγει την έκφραση των μορίων CD200 και CD273 στον πληθυσμό των δενδριτικών κυττάρων στα αρχικά στάδια της μόλυνσης αλλά ο συνολικός των εκφραζόμενων μορίων ανά κύτταρο σταθεροποιείται μετά την πάροδο 24 ωρών μετά τη μόλυνση. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με το θεωρητικό υπόβαθρο που είναι γνωστό βιβλιογραφικά για την επαγωγή της έκφρασης των μορίων CD200 και CD273. Ειδικότερα, έχει δειχθεί ότι η έκφραση του μορίου CD200 ενισχύεται κατά την ενεργοποίηση της ανοσολογικού συστήματος και αυξάνεται ταχύτατα παρουσία προφλεγμονωδών κυτταροκινών που έχουν προκύψει μέσω της σηματοδότησης από τον υποδοχέα TLR-4[62], ο οποίος είναι γνωστό ότι διεγείρεται κατά τη μόλυνση από *Leishmania*[87, 88]. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η έκφραση του μορίου CD273 επάγεται

από την ενεργοποίηση των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και ρυθμίζεται από επίπεδα προφλεγμονωδών κυτταροκινών[58, 89], οι οποίες παράγονται από τα ενεργοποιημένα δενδριτικά κύτταρα[90].

5.5 Επίδραση παρεμπόδισης της σύνδεσης των μορίων CD200 και CD273 με τους προσδέτες τους, στην ενεργοποίηση παρθένων Τ λεμφοκυττάρων

Εφόσον διαπιστώθηκε ότι η μόλυνση των δενδριτικών κυττάρων με *L. infantum* οδηγεί σε αύξηση των ανοσορυθμιστικών μορίων CD200 και CD273 στην επιφάνειά του, επόμενο βήμα της μελέτης ήταν να ελεγχθεί εάν η παρεμπόδιση της σύνδεσης των μορίων αυτών με τους προσδέτες τους είναι ικανή να αποκαταστήσει την αντιγονοπαρουσιαστική ικανότητα των δενδριτικών. Η αξιολόγηση της αντιγονοπαρουσιαστικής ικανότητας των δενδριτικών κυττάρων εκτιμήθηκε μελετώντας το δυναμικό πολλαπλασιασμού παρθένων Τ λεμφοκυττάρων. Προκειμένου να γίνει αυτό, μολυσμένα δενδριτικά κύτταρα επωάστηκαν για 4 ώρες με ειδικά αντισώματα δέσμευσης έναντι των μορίων CD200 ή CD273 και στη συνέχεια συγκαλλιεργήθηκαν σε αναλογία 1:5 με καθαρό πληθυσμό παρθένων $CD4^+$ ή $CD8^+$ Τ λεμφοκυττάρων για 5 ημέρες. Η εκτίμηση του πολλαπλασιασμού των Τ λεμφοκυττάρων έγινε με ενσωμάτωση τριτιωμένης θυμιδίνης στο γενετικό τους υλικό και μέτρηση της εκπεμπόμενης β ακτινοβολίας. Παράλληλα με τη διερεύνηση του πολλαπλασιασμού των Τ λεμφοκυττάρων, εξετάστηκε και η επίδραση της παρεμπόδισης σύνδεσης των μορίων CD200 και CD273 με τους προσδέτες τους στην ενδοκυττάρια παραγωγή κυτταροκινών από τα $CD4^+$ Τ λεμφοκύτταρα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η παρεμπόδιση σύνδεσης του μορίου CD200 με τον προσδέτη του δεν επέφερε στατιστικά σημαντική μεταβολή τόσο του πολλαπλασιασμού είτε των $CD4^+$ είτε των $CD8^+$ Τ λεμφοκυττάρων, όσο και της ενδοκυττάριας παραγωγής κυτταροκινών. Καθώς η αναστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού του CD200-CD200R είναι καινοτόμος ως μέθοδος στην θεραπεία της λεϊσμανίασης, υπάρχει διαθέσιμη μόνο μια αντίστοιχη εργασία που μελετάει την επίδραση της παρεμπόδισης σύνδεσης του μορίου CD200 με τον προσδέτη, του σε δενδριτικά κύτταρα κατά τη λεϊσμανίαση[81]. Τα δεδομένα αυτής της εργασίας έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, καθώς

υποστηρίζουν ότι η επίδραση με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του μορίου CD200 σε δενδριτικά μολυσμένα με *L. donovani* οδηγεί σε πολλαπλασιασμό OT-II $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων και επάγει την έκκριση της IFN-γ και του TNF-α. Μια πιθανή αιτία που δικαιολογεί αυτή τη διαφορά, είναι η χρήση $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων που προέρχονται από διαγονιδιακό OT-II ποντίκια, καθώς είναι ότι γνωστό ότι τα OT-II T λεμφοκύτταρα εγείρουν ισχυρότερη ανοσολογική απόκριση όταν ενεργοποιούνται σε σχέση με τα άγριου τύπου. Επιπλέον, σημαντική διαφοροποίηση αποτελεί το γεγονός ότι σε αυτή τη μελέτη έγινε προσδιορισμός της παραγωγής των εκκρινόμενων κυτταροκινών, ενώ στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η ενδοκυτταρική παραγωγή τους. Η περαιτέρω ερμηνεία των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας γίνεται με βάση το θεωρητικό υπόβαθρο. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η έκφραση του CD200 δεν περιορίζεται στα δενδριτικά κύτταρα, αλλά συναντάται και στα T λεμφοκύτταρα. Ως εκ τούτου, ενδέχεται η ποσότητα του μονοκλωνικού αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε να μην ήρθε σε αλληλεπίδραση αποκλειστικά με το μόριο CD200 που εδράζεται στα δενδριτικά κύτταρα, αλλά και με ένα ποσοστό του μορίου CD200 στην επιφάνεια των T λεμφοκυττάρων. Κατά συνέπεια, η παρεμπόδιση του μορίου CD200 στα δενδριτικά κύτταρα ενδεχομένως να μην έγινε αποτελεσματικά, και ως εκ τούτου δεν ανακόπηκε η σύνδεση του με τον υποδοχέα CD200R στα T λεμφοκύτταρα, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο σε ανοσοκαταστολή. Μια πιθανή επίλυση αυτού του προβλήματος αποτελεί η χορήγηση μεγαλύτερης ποσότητας μονοκλωνικού αντισώματος παρεμπόδισης, ώστε να επαρκεί, προκειμένου να καλυφθούν όλα τα μόρια CD200 στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων.

Σε αντίθεση με το μόριο CD200, η παρεμπόδιση σύνδεσης του μορίου CD273 με τον προσδέτη του επέφερε στατιστικά σημαντική μεταβολή στον πολλαπλασιασμού των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων, αλλά όχι των $CD8^+$ T λεμφοκυττάρων. Και σε αυτή την περίπτωση, η ενδοκυττάρια παραγωγή κυτταροκινών δεν μεταβλήθηκε σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Αυτά τα αποτελέσματα βρίσκονται εν μέρει σε συμφωνία με παρόμοιες μελέτες, σύμφωνα με τις οποίες η παρεμπόδιση σύνδεσης του μορίου CD273 με τον προσδέτη του του επιφέρει αύξηση του πολλαπλασιασμού των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων καθώς τα διεγείρει ώστε να παράγουν IFN-γ και TNF-α[82, 83, 91]. Στην παρούσα εργασία, ενώ η παρεμπόδιση σύνδεσης του μορίου CD273 με τον προσδέτη

του ενεργοποιεί τα CD4$^+$ Τ λεμφοκύτταρα και διεγείρει τον πολλαπλασιασμό τους, δεν παρατηρείται η αναμενόμενη αύξηση στα επίπεδα των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών. Ένας λόγος που μπορεί να συμβαίνει αυτό είναι η ίδια η φύση της *in vitro* καλλιέργειας που επελέγη στην πειραματική διάταξη, καθώς δεν χρησιμοποιήθηκε κάποιος επιπλέον παράγοντας διέγερσης των Τ λεμφοκυττάρων. Σε ένα *in vivo* σύστημα, η ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων επηρεάζεται και από κυτταροκίνες του περιβάλλοντος χώρου, οι οποίες έχουν προκύψει στα πλαίσια της συντονισμένης απόκρισης του συνόλου του ανοσολογικού συστήματος από ποικιλία κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος, τα οποία απουσιάζουν από την *in vitro* καλλιέργεια. Προκειμένου να διερευνηθεί αυτή η υπόθεση, ο πειραματικός σχεδιασμός θα πρέπει να περιλαμβάνει παράγοντες διέγερσης, όπως η IL-2 ή LPS. Τέλος, η αδυναμία διέγερσης του πολλαπλασιασμού των CD8$^+$ Τ λεμφοκυττάρων υποδηλώνει ότι δε λαμβάνει χώρα διασταυρωτή αντιγονοπαρουσίαση. Δεδομένου ότι δεν έχουν διευκρινιστεί οι ακριβείς συνθήκες υπό τις οποίες συμβαίνει φυσιολογικά η διασταυρωτή αντιγονοπαρουσίαση, σε συνδυασμό με την έλλειψη βιβλιογραφίας σχετικά με την παρεμπόδιση της σύνδεσης του CD273 με τον προσδέτη του σε παρθένα CD8$^+$ Τ λεμφοκύτταρα, δεν είναι εφικτή η ασφαλής διεξαγωγή συμπερασμάτων ως προς τον ακριβή λόγο που συμβαίνει αυτό.

Η ταυτόχρονη παρεμπόδιση της σύνδεσης και των δύο μορίων με τους προσδέτες τους οδηγεί σε αύξηση του πολλαπλασιασμού των CD4$^+$ Τ λεμφοκυττάρων, η οποία όμως οφείλεται εξ ολοκλήρου στην επίδραση της παρεμπόδισης της σύνδεσης του μορίου CD273 με τον προσδέτη του.

5.6 Επίδραση παρεμπόδισης σύνδεσης των μορίων CD200 και CD273 με τους προσδέτες τους, στην ενεργοποίηση Τ λεμφοκυττάρων που προέρχονται από σπλήνα μολυσμένου ζώου

Είναι γνωστό ότι κατά τη χρόνια φάση της σπλαγχνικής λεϊσμανίασης, το παράσιτο οδηγεί τα Τ λεμφοκύτταρα του οργανισμού σε μια κατάσταση εξασθένησης με αποτέλεσμα την αδυναμία έγερσης προστατευτικής ανοσολογικής απόκρισης[47]. Προκειμένου να διερευνηθεί εάν η παρεμπόδιση της σύνδεσης των μορίων CD200 και CD273 με τους προσδέτες τους είναι ικανή να αναστρέψει τον εξασθενημένο

φαινότυπο των Τ λεμφοκυττάρων, έγινε επανάληψη του προηγούμενου πειράματος (Ενότητα 5.7) με χρήση $CD4^+$ και $CD8^+$ Τ λεμφοκυττάρων απομονωμένων από σπλήνα ποντικού BALB/c που έχει μολυνθεί με *L. infantum* και βρίσκεται στη χρόνια φάση της νόσου.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η παρεμπόδιση της σύνδεσης του μορίου CD200 με τον προσδέτη του δεν οδήγησε σε καμία μεταβολή τόσο του πολλαπλασιασμού είτε των $CD4^+$ είτε των $CD8^+$ Τ λεμφοκυττάρων, όσο και της ενδοκυττάριας παραγωγής κυτταροκινών. Οι πιθανοί λόγοι που συμβαίνει αυτό ταυτίζονται με αυτούς που αναφέρθηκαν και στην περίπτωση των παρθένων Τ λεμφοκυττάρων (Ενότητα 5.6).

Η παρεμπόδιση της σύνδεσης του μορίου CD273 με τον προσδέτη του οδήγησε σε αύξηση του πολλαπλασιασμού των $CD4^+$ Τ λεμφοκυττάρων, αλλά όχι των $CD8^+$, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στα επίπεδα της ενδοκυτταρικής παραγωγής κυτταροκινών. Αυτά τα αποτελέσματα συγκλίνουν με τη βιβλιογραφία ως προς τον πολλαπλασιασμό του $CD4^+$ υποπληθυσμού των Τ λεμφοκυττάρων[82, 83], αλλά εμφανίζουν διαφοροποίηση ως τον πολλαπλασιασμό των $CD8^+$, καθώς και την παραγωγή κυτταροκινών[82, 83, 91]. Είναι γνωστό ότι κατά τη χρόνια φάση της σπλαγχνικής λεϊσμανίασης τα επίπεδα του PD-1 αυξάνονται στην επιφάνεια των $CD8^+$ και η αλληλεπίδραση με τους προσδέτες του οδηγεί στην εμφάνιση ενός "εξουθενωμένου" φαινοτύπου στα Τ λεμφοκύτταρα. Μια πιθανή αιτία που η παρεμπόδιση της σύνδεσης του μορίου CD273 με τον προσδέτη του δεν αναστρέφει αυτό το φαινότυπο αποτελεί το γεγονός ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι του PD-1, εκτός από την αλληλεπίδρασή του με το μόριο CD273 (PL-2), εγείρεται και από την αλληλεπίδραση του με το μόριο PD-L1, το οποίο εκφράζεται από τα δενδριτικά κύτταρα. Η ταυτόχρονη επίδραση με αντισώματα δέσμευσης έναντι και των δύο προσδετών του PD-1 μπορεί να προταθεί ως κατάλληλη μέθοδος για την αναστροφή του φαινοτύπου των εξασθενημένων Τ λεμφοκυττάρων[82].

6. Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία επετεύχθη μια αρχική εκτίμηση της επίδρασης της παρεμπόδισης της σύνδεσης των μορίων CD200 και CD273 με τους προσδέτες τους στην ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων σε συνθήκες μόλυνσης από *L. infantum*. Τα τελικά αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά και ενισχύουν την υπόθεση ότι η εκμετάλλευση των μορίων CD200 και CD273 αποτελεί ελπιδοφόρα στρατηγική σχεδιασμού ενός ανοσοθεραπευτικού πρωτοκόλλου ενάντια στη λεϊσμανίαση.

Αρχικά, αποδείχθηκε η μόλυνση δενδριτικών με το παράσιτο επάγει την έκφραση των μορίων CD200 και CD273 στην επιφάνεια του. Συγχρόνως, παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός των μορίων CD200 και CD273 ανά δενδριτικό κύτταρο αυξάνεται σε σχέση με το χρόνο επώασης των δενδριτικών κυττάρων μετά τη μόλυνση με το παράσιτο.

Στη συνέχεια, φάνηκε ότι η παρεμπόδιση της σύνδεσης του μορίου CD273, που εκφράζονται στην επιφάνεια των μολυσμένων δενδριτικών κυττάρων, με τον προσδέτη του οδηγεί σε πολλαπλασιασμό των $CD4^+$ παρθένων Τ λεμφοκυττάρων, γεγονός που υποδεικνύει την ενεργοποίησή τους.

Τέλος, διαπιστώθηκε ότι η παρεμπόδιση της σύνδεσης του μορίου CD273, που εκφράζεται στην επιφάνεια μολυσμένων δενδριτικών κυττάρων, με τον προσδέτη του είναι ικανή να εγείρει τον πολλαπλασιασμό $CD4^+$ Τ λεμφοκυττάρων που προέρχονται από ζώο που πάσχει από λεϊσμανίαση και βρίσκεται στη χρόνια φάση της νόσου.

Σύμφωνα με όσα παρουσιάστηκαν παραπάνω, φαίνεται ότι η επέμβαση στο σηματοδοτικό μονοπάτι του PD-1 μέσω αναστολής της σύνδεσης του ενός υποδοχέα του, αποτελεί έναν αποτελεσματικό τρόπο ενεργοποίησης των $CD4^+$ Τ λεμφοκυττάρων, αλλά και μερικής αναστροφής του "εξουθενωμένου" φαινοτύπου που παρουσιάζουν κατά τη μόλυνση από το παράσιτο. Το γεγονός αυτό καθιστά το μόριο CD273 ένα ελπιδοφόρο υποψήφιο στόχο στο σχεδιασμό ενός ανοσοθεραπευτικού πρωτοκόλλου κατά της λεϊσμανίασης.

Αν και τα παραπάνω αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά, είναι αναγκαίο, ωστόσο, να διασαφηνιστούν οι λόγοι για τους οποίους ενώ η παρεμπόδιση της σύνδεσης του μορίου CD273 με τον προσδέτη του διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των $CD4^+$ Τ λεμφοκυττάρων, συγχρόνως δεν ανιχνεύεται η παραγωγή κυτταροκινών. Επιπλέον,

απαραίτητη είναι και η διερεύνηση των πιθανών αιτιών για τις οποίες δεν σημειώνεται αντίστοιχη διέγερση του πολλαπλασιασμού των $CD8^+$ υποπληθυσμών των Τ λεμφοκυττάρων.. Τέλος, ο σχεδιασμός *in vivo* πειραματικών διεργασιών κρίνεται απαραίτητος προκειμένου να ελεγχθεί ο τρόπος δράσης της παρεμπόδισης της σύνδεσης των ανοσορυθμιστικών μορίων CD200 και CD273 με τους προσδέτες τους σε βιολογικά συστήματα.

7. Βιβλιογραφία

1. (CDC) CfDCaP. Leishmaniasis. http://wwwcdcgov/parasites/leishmaniasis/.
2. (WHO) WHO. Leishmaniasis. http://wwwwhoint/leishmaniasis/about_disease/en/.
3. Cox FE. History of human parasitology. Clinical microbiology reviews.2002;15:595-612.
4. (MSU) MSU. https://wwwmsuedu/course/zol/316/lspptaxhtm.
5. M. T. Mardigan JMM, J. Parker. Brock. Βιολογία των μικροοργανισμών. 2010.
6. Bates PA. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. International journal for parasitology.2007;37:1097-1106.
7. Schonian G, Mauricio I, Gramiccia M, Canavate C, Boelaert M, Dujardin JC. Leishmaniases in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. Trends in parasitology.2008;24:135-142.
8. Shapiro TA, Englund PT. The structure and replication of kinetoplast DNA. Annual review of microbiology.1995;49:117-143.
9. Besteiro S, Williams RA, Coombs GH, Mottram JC. Protein turnover and differentiation in Leishmania. International journal for parasitology.2007;37:1063-1075.
10. Banuls AL, Hide M, Prugnolle F. Leishmania and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. Advances in parasitology.2007;64:1-109.
11. Θεσσαλίας Π. Ανατομία και Φυσιολογία των Εντόμων. http://eclassuthgr/eclass/modules/document/filephp/SEYC153/%CE%A6%CF%85%CF%83%CE%B9%CE%BF%CE%BB%CE%BF%CE%B3%CE%AF%CE%B1%20%CE%95%CE%BD%CF%84%CF%8C%CE%BC%CF%89%CE%BD/%CE%91%CE%BD%CE%B1%CF%84%CE%BF%CE%BC%CE%AF%CE%B1%20%CE%BA%CE%B1%CE%B9%20%CE%A6%CF%85%CF%83%CE%B9%CE%BF%CE%BB%CE%BF%CE%B3%CE%AF%CE%B1%20%CE%B5%CE%BD%CF%84%CF%8C%CE%BC%CF%89%CE%BDpdf.
12. Muskus CE, Marin Villa M. [Metacyclogenesis: a basic process in the biology of Leishmania]. Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud.2002;22:167-177.
13. Petersen CA, Greenlee MH. Neurologic Manifestations of Leishmania spp. Infection. Journal of neuroparasitology.2011;2.
14. (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.) ΚΕκΠΝ. Λεϊσμανίαση. http://www2keelpnogr/blog/?p=6127.
15. (WHO) WHO. Control of the leishmaniases. http://appswhoint/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_engpdf.
16. Chappuis F, et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nature reviews Microbiology.2007;5:873-882.
17. Calvopina M, Gomez EA, Sindermann H, Cooper PJ, Hashiguchi Y. Relapse of new world diffuse cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania (Leishmania) mexicana after miltefosine treatment. The American journal of tropical medicine and hygiene.2006;75:1074-1077.
18. University S. http://wwwstanfordedu/.
19. Pratlong F, et al. Isoenzymatic analysis of 712 strains of Leishmania infantum in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. Journal of clinical microbiology.2004;42:4077-4082.
20. Vega-Lopez F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Current opinion in infectious diseases.2003;16:97-101.
21. Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. Clinical and diagnostic laboratory immunology.2002;9:951-958.
22. (CDC) CfDCaP. Treatment of Leishmaniasis.http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health_professionals/.

23. Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. Trends in parasitology.2003;19:502-508.
24. Roatt BM, et al. Immunotherapy and Immunochemotherapy in Visceral Leishmaniasis: Promising Treatments for this Neglected Disease. Frontiers in immunology.2014;5:272.
25. Croft SL, Seifert K, Duchene M. Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. Molecular and biochemical parasitology.2003;126:165-172.
26. Sundar S, Olliaro PL. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. Therapeutics and clinical risk management.2007;3:733-740.
27. Wink M. Medicinal plants: a source of anti-parasitic secondary metabolites. Molecules.2012;17:12771-12791.
28. Kyriazis JD, Aligiannis N, Polychronopoulos P, Skaltsounis AL, Dotsika E. Leishmanicidal activity assessment of olive tree extracts. Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology.2013;20:275-281.
29. Liu YJ. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. Cell.2001;106:259-262.
30. Eisenbarth SC. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. Nat Rev Immunol.2019;19:89-103.
31. Doebel T, Voisin B, Nagao K. Langerhans Cells - The Macrophage in Dendritic Cell Clothing. Trends Immunol.2017;38:817-828.
32. Trombetta ES, Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. Annu Rev Immunol.2005;23:975-1028.
33. Macri C, Pang ES, Patton T, O'Keeffe M. Dendritic cell subsets. Semin Cell Dev Biol.2018;84:11-21.
34. Banchereau J, et al. Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol.2000;18:767-811.
35. Reis e Sousa C. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. Curr Opin Immunol.2004;16:21-25.
36. Malissen B, Ewbank JJ. 'TaiLoRing' the response of dendritic cells to pathogens. Nat Immunol.2005;6:749-750.
37. Goldsby R. KT, Osborne B., Kuby J. Ανοσολογία. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2007.
38. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. Nat Rev Immunol.2012;12:557-569.
39. Rock KL, Shen L. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. Immunol Rev.2005;207:166-183.
40. Mougneau E, Bihl F, Glaichenhaus N. Cell biology and immunology of Leishmania. Immunological reviews.2011;240:286-296.
41. Ezra N, Ochoa MT, Craft N. Human immunodeficiency virus and leishmaniasis. Journal of global infectious diseases.2010;2:248-257.
42. Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. The Journal of experimental medicine.1989;169:59-72.
43. Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. Experimental and molecular pathology.2002;72:132-141.
44. Ribeiro-Gomes FL, Sacks D. The influence of early neutrophil-Leishmania interactions on the host immune response to infection. Frontiers in cellular and infection microbiology.2012;2:59.
45. University of California LAU.http://dna.kdna.ucla.edu/parasite_course-old/leish_files/subchapters/morphology%20and%20life%20cycle.htm.

46. Liu D, Uzonna JE. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. Frontiers in cellular and infection microbiology.2012;2:83.
47. Brandonisio O, Spinelli R, Pepe M. Dendritic cells in Leishmania infection. Microbes Infect.2004;6:1402-1409.
48. Hill M, Cuturi MC. Negative vaccination by tolerogenic dendritic cells in organ transplantation. Curr Opin Organ Transplant.2010;15:738-743.
49. Franco LH, Beverley SM, Zamboni DS. Innate immune activation and subversion of Mammalian functions by leishmania lipophosphoglycan. Journal of parasitology research.2012;2012:165126.
50. Masihi KN. Fighting infection using immunomodulatory agents. Expert Opin Biol Ther.2001;1:641-653.
51. UK CR. Worldwide cancer incidence statistics. https://wwwcancerresearchukorg/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer/incidence.
52. Immunotherapies for autoimmune diseases. Nat Biomed Eng.2019;3:247.
53. Jutel M, et al. International consensus on allergy immunotherapy. J Allergy Clin Immunol.2015;136:556-568.
54. cancer.net. Understanding Immunotherapy. https://wwwcancernet/navigating-cancer-care/how-cancer-treated/immunotherapy-and-vaccines/understanding-immunotherapy.
55. Wykes MN, Lewin SR. Immune checkpoint blockade in infectious diseases. Nat Rev Immunol.2018;18:91-104.
56. Darvin P, Toor SM, Sasidharan Nair V, Elkord E. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. Exp Mol Med.2018;50:165.
57. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer.2012;12:252-264.
58. Okwor I, Uzonna JE. Immunotherapy as a strategy for treatment of leishmaniasis: a review of the literature. Immunotherapy.2009;1:765-776.
59. Rudd CE, Taylor A, Schneider H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. Immunol Rev.2009;229:12-26.
60. Chinai JM, Janakiram M, Chen F, Chen W, Kaplan M, Zang X. New immunotherapies targeting the PD-1 pathway. Trends Pharmacol Sci.2015;36:587-595.
61. Rygiel TP, Meyaard L. CD200R signaling in tumor tolerance and inflammation: A tricky balance. Curr Opin Immunol.2012;24:233-238.
62. Holmannova D, Kolackova M, Kondelkova K, Kunes P, Krejsek J, Andrys C. CD200/CD200R paired potent inhibitory molecules regulating immune and inflammatory responses; Part I: CD200/CD200R structure, activation, and function. Acta Medica (Hradec Kralove).2012;55:12-17.
63. Zhang S, Cherwinski H, Sedgwick JD, Phillips JH. Molecular mechanisms of CD200 inhibition of mast cell activation. J Immunol.2004;173:6786-6793.
64. Labome. Laboratory Mice and Rats. http://wwwlabomecom/method/Laboratory-Mice-and-Ratshtml.
65. Laboratory M. Protocols for handling and working with *Leishmania* species. http://wwwglaacuk/media/media_91939_enpdf.2008.
66. Yang JH, Wu UI, Tai HM, Sheng WH. Effectiveness of an ultraviolet-C disinfection system for reduction of healthcare-associated pathogens. J Microbiol Immunol Infect.2019;52:487-493.
67. Γαϊτανάκη Κ. ΚΕ, Παπαζαφείρη Π., Τσιτσιλώνη Ο. Εργαστηριακές Ασκήσεις Ανοσολογίας. Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Σχολή Θετικών Επιστημών - Ζώων & Ανθρώπου.2003.

68. Systems) B-TRD. Flow Cytometry Protocol for Staining Intracellular Molecules using Detergents to Permeabilize the Cell Membrane. https://wwwrndsystemscom/resources/protocols/flow-cytometry-protocol-staining-intracellular-molecules-using-detergents.
69. Assreuy J, et al. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of Leishmania major. Eur J Immunol.1994;24:672-676.
70. Chang KP, Dwyer DM. Leishmania donovani. Hamster macrophage interactions in vitro: cell entry, intracellular survival, and multiplication of amastigotes. The Journal of experimental medicine.1978;147:515-530.
71. Le Gall CM, Weiden J, Eggermont LJ, Figdor CG. Dendritic cells in cancer immunotherapy. Nat Mater.2018;17:474-475.
72. Figdor CG, de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Melief CJ. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. Nat Med.2004;10:475-480.
73. Freitas-Silva R, Brelaz-de-Castro MC, Pereira VR. Dendritic cell-based approaches in the fight against diseases. Front Immunol.2014;5:78.
74. Lu W, Arraes LC, Ferreira WT, Andrieu JM. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. Nat Med.2004;10:1359-1365.
75. Matos I, Mizenina O, Lubkin A, Steinman RM, Idoyaga J. Targeting Leishmania major Antigens to Dendritic Cells In Vivo Induces Protective Immunity. PLoS One.2013;8:e67453.
76. Schwarz T, et al. T cell-derived IL-10 determines leishmaniasis disease outcome and is suppressed by a dendritic cell based vaccine. PLoS Pathog.2013;9:e1003476.
77. Agallou M, Margaroni M, Karagouni E. Cellular vaccination with bone marrow-derived dendritic cells pulsed with a peptide of Leishmania infantum KMP-11 and CpG oligonucleotides induces protection in a murine model of visceral leishmaniasis. Vaccine.2011;29:5053-5064.
78. Agallou M, Smirlis D, Soteriadou KP, Karagouni E. Vaccination with Leishmania histone H1-pulsed dendritic cells confers protection in murine visceral leishmaniasis. Vaccine.2012;30:5086-5093.
79. Antoniou M, Doulgerakis C, Pratlong F, Dedet JP, Tselentis Y. Short report: Treatment failure due to mixed infection by different strains of the parasite Leishmania infantum. The American journal of tropical medicine and hygiene.2004;71:71-72.
80. Sideris V, Papadopoulou G, Dotsika E, Karagouni E. Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. European journal of epidemiology.1999;15:271-276.
81. Singh RK, Gannavaram S, Ismail N, Kaul A, Gedda MR, Nakhasi HL. Centrin-Deleted Leishmania donovani Parasites Help CD4(+) T Cells to Acquire Th1 Phenotype and Multi-Functionality Through Downregulation of CD200-CD200R Immune Inhibitory Axis. Front Immunol.2018;9:1176.
82. Filippis C, et al. Nivolumab Enhances In Vitro Effector Functions of PD-1(+) T-Lymphocytes and Leishmania-Infected Human Myeloid Cells in a Host Cell-Dependent Manner. Front Immunol.2017;8:1880.
83. Medina-Colorado AA, et al. Splenic CD4+ T Cells in Progressive Visceral Leishmaniasis Show a Mixed Effector-Regulatory Phenotype and Impair Macrophage Effector Function through Inhibitory Receptor Expression. PLoS One.2017;12:e0169496.
84. Cortez M, Huynh C, Fernandes MC, Kennedy KA, Aderem A, Andrews NW. Leishmania promotes its own virulence by inducing expression of the host immune inhibitory ligand CD200. Cell Host Microbe.2011;9:463-471.
85. Gannavaram S, Bhattacharya P, Ismail N, Kaul A, Singh R, Nakhasi HL. Modulation of Innate Immune Mechanisms to Enhance Leishmania Vaccine-Induced Immunity: Role of Coinhibitory Molecules. Front Immunol.2016;7:187.

86. Martinez Salazar MB, Delgado Dominguez J, Silva Estrada J, Gonzalez Bonilla C, Becker I. Vaccination with Leishmania mexicana LPG induces PD-1 in CD8(+) and PD-L2 in macrophages thereby suppressing the immune response: a model to assess vaccine efficacy. Vaccine.2014;32:1259-1265.
87. Murray HW, Zhang Y, Zhang Y, Raman VS, Reed SG, Ma X. Regulatory actions of Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 in Leishmania donovani infection in the liver. Infect Immun.2013;81:2318-2326.
88. Tuon FF, Amato VS, Bacha HA, Almusawi T, Duarte MI, Amato Neto V. Toll-like receptors and leishmaniasis. Infect Immun.2008;76:866-872.
89. Yamazaki T, et al. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. J Immunol.2002;169:5538-5545.
90. Stober D, Schirmbeck R, Reimann J. IL-12/IL-18-dependent IFN-gamma release by murine dendritic cells. J Immunol.2001;167:957-965.
91. Joshi T, Rodriguez S, Perovic V, Cockburn IA, Stager S. B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8(+) T cells and confers protection against Leishmania donovani infections. PLoS Pathog.2009;5:e1000431.

Παράρτημα Ι

Χημικά και Ανοσολογικά Αντιδραστήρια

- **Θρεπτικό υλικό $RPMI_{1640}$:** Το θρεπτικό υλικό $RPMI_{1640}$ (BIOCHROM AG, Berlin, Germany) εμπλουτίστηκε με 2mM L-γλουταμίνη (Fluka, Germany), 100 U/mL πενικιλίνη και 100 μg/mL στρεπτομυκίνη (PEST, Gibco, Invitrogen, UK), 10 mM HEPES (Euroclone, EU) και φυλασσόταν στους 4 ^{o}C.
- **Ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS):** Ο ορός FBS (Gibco, Invitrogen, Germany) προτού χρησιμοποιηθεί αδρανοποιήθηκε για 30 λεπτά στους 56 ^{o}C και διατηρήθηκε στους -20°C.
- **Διάλυμα διμεθυλσουλφοξειδίου (Dimethyl sulfoxide, DMSO)** (Applichem GmbH, Darmstadt, Germany).
- **Διάλυμα λύσης χλωριούχου αμμωνίου ACK:** 0,15M NH_4Cl (Sigma, Germany), 1 mM
- **PBS (Phosphate-buffered-saline) 10×, pH 7,2-7,4:** 1,37M NaCl (Sigma, Germany), 27 mM KCl (Merck, Germany), 43 mM Na_2HPO_4 (Merck, Germany), 14 mM KH_2PO_4 (Merck, Germany)
- **FACS Buffer:** PBS 1×, FBS 3% v/v
- **PERM Buffer:** PBS 1×, FBS 3% v/v, 0,1% σαπωνίνη
- **Isolation Buffer:** PBS 1×, FBS 2% v/v, EDTA 2 mM
- **Διάλυμα μονιμοποίησης παραφορμαλδεΰδης 2% w/v σε PBS 1×**
- **Χρωστική Giemsa:** μείγμα κυανού του μεθυλενίου, ηωσίνης και Azure B. Είναι ειδική για τις φωσφορικές ομάδες του DNA και προσκολλάται σε περιοχές πλούσιες σε αδενίνη-θυμίνη. (Merck, Germany)
- **Χρωστική Trypan Blue 0,4% w/v:** Αυτή η χρωστική (BDH Chemicals Ltd, Poole, England) προέρχεται από την τολουϊδίνη και έχει την ικανότητα να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη των νεκρών κυττάρων. Το διάλυμα παρασκευάστηκε με την προσθήκη 0,4 g χρωστικής μέσα σε 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος PBS 1x.
- **Φορμαλίνη** (Riedel-deHaen, Sigma-Aldrich, Germany).
- **LPS** (Sigma-Aldrich, Germany)
- **Μεθανόλη**
- **CD200 Monoclonal Antibody (OX90)** (Invitrogen - Thermo Fischer Scientific, USA)

- **CD200 Monoclonal Antibody (OX90), PE** (Invitrogen-Thermo Fischer Scientific, USA)
- **CD273 (B7-DC) Monoclonal Antibody (TY25), Functional Grade** (Invitrogen - Thermo Fischer Scientific, USA)
- **CD273 (B7-DC) Monoclonal Antibody (TY25), PE** (Invitrogen - Thermo Fischer Scientific, USA)
- **APC Hamster Anti-Mouse CD11c** (Becton Dickinson, USA)
- **PE anti-mouse TNF-α Antibody** (Biolegend, USA)
- **FITC anti-mouse IL-10 Antibody** (Biolegend, USA)
- **PE anti-mouse IFN-γ Antibody** (Biolegend, USA)
- **FITC Anti-Mouse CD4** (FITC Rat Anti-Mouse CD4)
- **Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit** (Molecular Probes, USA)
- **Μπρεφελδίνη Α** (Applichem, Germany)
- **Κονκαβαλίνη Α** (Sigma, Germany)
- **Dynabeads Untouched Mouse CD4 Cells** (Invitrogen - Thermo Fischer Scientific, USA)
- **Dynabeads Untouched Mouse CD8 Cells** (Invitrogen - Thermo Fischer Scientific, USA)

Παράρτημα ΙΙ

Αναλώσιμα

- **Φιάλες κυτταροκαλλιέργειας εμβαδού 25 cm^2** (Cellstar. Greiner, Bio-one, Germany)
- **Πλαστικά ορολογικά σιφώνια όγκου 2 ml, 5 ml, 10 ml** (Greiner Bio-one, Germany)
- **Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες τύπου Falcon όγκου 15 ml, 50 ml** (Greiner Bio-one, Germany)
- **Πλαστικοί σωλήνες τύπου eppendorf 1,5 ml** (Greiner Bio-one, Germany)
- **Πλαστικά ακρορύγχια (tips)** (Greiner Bio-one, Germany)
- **Πλαστικές πιππέτες Pasteur**
- **Γυάλινες πιππέτες Pasteur**
- **Parafilm M** (Bemis Flexible Packaging, Neenah, WI)
- **Σύριγγες όγκου 1 ml** (Nipro, Osaka, Japan)
- **Σύριγγες όγκου 5 ml** (Nipro, Osaka, Japan)
- **Αντικειμενοφόροι πλάκες** (Thermo Scientific, Germany)
- **Γυάλινες λαμέλλες**
- **Καλυπτρίδες** (Knittel Gluss, Germany)
- **Πλάκα καλλιέργειας 24 φρεατίων** (Cell Star Greiner Bio-one, cell culture plate, Germany)
- **Πλάκα καλλιέργειας 96 φρεατίων κοίλου πυθμένα** (Cell Star Greiner Bio-one, cell culture plate, Germany)
- **Δοκιμαστικοί σωλήνες προπυλαινίου, ειδικοί για κυτταρομετρία ροής όγκου 5 ml** (Sarstedt, Germany)
- **Πλάκες μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων κωνικού πυθμένα** (Becton Dickinson, USA)
- **Τρυβλία Petri** (Cell Star Greiner Bio-one, cell culture plate, Germany)
- **Φίλτρα με πόρους 70 μM** (Falcon, Germany)

Παράρτημα ΙΙΙ

Τεχνολογικός εξοπλισμός

- **Μικροζυγός ακριβείας και αναλυτικός ζυγός** (Kern 430-33, Albstadt, Germany και Mettler PM4600, Switzerland αντίστοιχα)
- **Πιππέτες μεταβλητού όγκου1000 μl/200 μl/20 μl** (Pippetman P1000, P200, P20, Gilson, France), **10 μl** (Brand, Germany)
- **Πολυκάναλη πιππέτα μεταβλητού όγκου 200 μl** (Brand Transferpette S-8, Germany)
- **Ηλεκτρικές πιππέτες** (Accu-jet pro, Brand, Germany)
- **Vortex** (Heiddph Top-mix 94323 Bioblock, Germany)
- **Επιτραπέζια μικροφυγόκεντρος** (Micro-Centifuge Model 59A, Fisher Scientific, USA)
- **Επιτραπέζια μικροφυγόκεντρος** (Heraeus, Sepatech, Biofuge 13 ,Thermo Electron Corporation, Germany)
- **Επιτραπέζια φυγόκεντρος με μεταβλητή γωνιακή κλίση** (Centurion Scientific)
- **Επιτραπέζια φυγόκεντρος** (Centrifuge 5417 R, Eppendorf, Germany)
- **Μαγνήτης Dyna Mag-15** (Invitrogen - Thermo Fischer Scientific, USA)
- **Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής** (Telstar Class II Cabinet, France)
- **Οπτικό μικροσκόπιο** (Olympus, Japan)
- **Οπτικό μικροσκόπιο** (Leitz Laborlux D, Leitz Wetzlar, Germany)
- **Ανάστροφο μικροσκόπιο** (Olympus, Japan)
- **Συσκευή συλλογής κυττάρων-Cell harvester** (Skatron, Norway)
- **Μετρητής β ακτινοβολίας** (Wallac, Turcu, Finland)
- **Πλάκα μικροσκοπικής αιμοκυτταρομέτρησης Malassez** (WSCHRECH, HOFHEIN/TS)
- **Κλίβανος 37 °C** (Eppendorf Galaxy 170S, Germany)
- **Κυτταρομετρητής ροής** (FACS Calibur, Becton Dickinson)
- **Πεχάμετρο** (Orion 3 Star pH Benchtop Meter, Thermo Scientific, Germany)
- **Συσκευή κυκλικής ανάδευσης** (P-Selecta, Abrera, Barcelona, Spain)
- **Υδατόλουτρο** (Bioline Scientific, Athens, Greece)

Παράρτημα IV

Σκεύη

- **Ογκομετρικοί κύλινδροι όγκου 1 και 2 L**
- **Γυάλινες κωνικές φιάλες όγκου100, 250, 500 mL, 1 και 2 L**
- **Αποστειρωμένο μεταλλικό ψαλίδι ανατομίας με αιχμηρά άκρα**
- **Αποστειρωμένη μεταλλική λαβίδα με πεπλατυσμένα άκρα**
- **Αποστειρωμένα πλαστικά και γυάλινα δοχεία όγκου 500 ml, 1.000 ml αντίστοιχα**