



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΩΝ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ ΣΤΑ
ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΤΩΝ ΚΑΡΔΙΑΚΩΝ Η9c2
ΜΥΟΒΛΑΣΤΩΝ**

ΔΙΟΝΥΣΙΑ ΤΟΜΑΡΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2019



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΩΝ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ ΣΤΑ
ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΤΩΝ ΚΑΡΔΙΑΚΩΝ Η₉c₂
ΜΥΟΒΛΑΣΤΩΝ**

ΔΙΟΝΥΣΙΑ ΤΟΜΑΡΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2019

ΣΕ ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΤΟ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
ΤΟΜΕΑΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΩΝ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ ΣΤΑ
ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΤΩΝ ΚΑΡΔΙΑΚΩΝ Η9c2
ΜΥΟΒΛΑΣΤΩΝ**

ΔΙΟΝΥΣΙΑ ΤΟΜΑΡΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: Καθηγήτρια Αικατερίνη Γαϊτανάκη, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ: Δρ. Ευδοκία Καραγκούνη, Διευθύντρια Ερευνών,
Τομέας Μικροβιολογίας, Εργαστήριο Ανοσολογίας Λοιμώξεων, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Αικατερίνη Γαϊτανάκη, Καθηγήτρια Φυσιολογίας ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.
- Ευδοκία Καραγκούνη, Διευθύντρια Ερευνών, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ
- Ιωάννα Αικατερίνη Αγγελή, Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας ζώων, τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ 2019

Στους γονείς μου

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	x
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	ii
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ	1
1.2 ΣΧΗΜΑ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ	1
1.3 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ	2
1.4. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	4
1.5 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΤΗΣ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ	4
1.5.1 Σπλαγγχνική λείσμανίαση (Visceral Leishmaniasis, VL)	5
1.5.2 Δερματική λείσμανίαση (Cutaneous Leishmaniasis).....	6
1.5.3 Βλεννογονοδερματική λείσμανίαση (Mucocutaneous Leishmaniasis, MC).....	7
1.6 ΚΑΡΔΙΑΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΚΥΛΟΥΣ ΟΙ ΟΠΟΙΟΙ ΕΙΧΑΝ ΜΟΛΥΝΘΕΙ ΜΕ ΤΟ ΠΑΡΑΣΙΤΟ <i>LEISHMANIA INFANTUM CHAGASI</i>	8
1.7 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΜΑΡΚ.....	8
1.7.1 ERK1/2	10
1.7.2 p38-MARK.....	12
1.7.3 Σηματοδοτικά μονοπάτια ΜΑΡΚ σε παρασιτική μόλυνση	13
1.8 NF-κΒ.....	15
1.9 PARP.....	16
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΥΛΙΚΑ	19
2.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ H9c2	19
2.2 ΟΡΓΑΝΑ	20
2.3 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ.....	22
2.4 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	23
2.4.1.Θρεπτικά υλικά	23
2.4.2 Χημικά αντιδραστήρια.....	23
2.4.3 Αντισώματα.....	24
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΜΕΘΟΔΟΙ	30
3.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	30
3.1.1 Αποστείρωση	30

3.1.2 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς καρδιακών μυοβλαστών H9c2.....	30
3.1.3 Διατήρηση κυτταρικής σειράς καρδιακών μυοβλαστών H9c2.....	31
3.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ	32
3.2.1 Παράσιτο <i>Leishmania Infantum</i> (στέλεχος GH8)	32
3.2.1.1 Καλλιέργεια παρασίτου <i>Leishmania infantum</i>	32
3.3 ΜΟΛΥΝΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ H9c2 ΜΕ ΤΟ ΠΑΡΑΣΙΤΟ LEISHMANIA INFANTUM	35
3.3.1 Προσδιορισμός βέλτιστης αναλογίας μόλυνσης (κύτταρα/παρασίτα)	35
3.3.2 Μελέτη κινητικής χρόνου της μόλυνσης των H9c2 κυττάρων με το παράσιτο <i>L. infantum</i> .	37
3.3.3 Μόλυνση των H9c2 κυττάρων με <i>L. infantum</i> για την απομόνωση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών.....	37
3.4 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	37
3.4.1 Εκχύλιση πρωτεϊνών από κύτταρα κυτταρικής σειράς H9c2.....	39
3.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	39
3.5.1 Μέθοδος Bradford	39
3.6 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ.....	41
3.6.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE).....	41
3.7 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN	44
3.7.1 Ημι-στεγνή μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	44
3.7.2 Αντιστρεπτή χρώση των μεταφερόμενων πρωτεϊνών με Ponceau-S.....	45
3.7.3 Ανοσοεντόπιση των πρωτεϊνών στην μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης.....	45
3.7.4 Ανίχνευση των ανοσοσυμπλόκων με την τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced ChemiLuminescence, ECL)	46
3.8 ΛΟΓΙΣΜΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	47
3.9 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	49
4.1 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ	49
4.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΕΛΤΙΣΤΗΣ ΑΝΑΛΟΓΙΑΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ	50
4.3 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΤΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΤΩΝ H9c2 ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΟ ΠΑΡΑΣΙΤΟ <i>L. INFANTUM</i>	52
4.4 ΜΟΛΥΝΣΗ ΚΑΡΔΙΑΚΩΝ ΜΥΟΒΛΑΣΤΩΝ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ H9c2 ΜΕ <i>L.</i> <i>INFANTUM</i> ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΣΤΕΡΗΣΗΣ ΟΡΟΥ.	55

4.5.1 Επίπτωση της μόλυνσης καρδιακών μυοβλαστών H9c2 με το παράσιτο <i>L.infantum</i> στη φωσφορυλίωση των ERK1/2	58
4.5.2 Επίπτωση της μόλυνσης καρδιακών μυοβλαστών H9c2 με το παράσιτο <i>L.infantum</i> στη φωσφορυλίωση της p-38 MAPK	61
4.5.3 Επίπτωση της μόλυνσης καρδιακών μυοβλαστών H9c2 με το παράσιτο <i>L.infantum</i> στη φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ	63
4.5.4 Διερεύνηση της πρωτεόλυσης της PARP κατά την μόλυνση της κυτταρικής σειράς των καρδιακών μυοβλαστών H9c2 με το παράσιτο <i>L.infantum</i>	65
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	67
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	76
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	85

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος “Κλινική Βιοχημεία-Μοριακή Διαγνωστική” των τμημάτων Βιολογίας, Ιατρικής, Χημικού και Νοσηλευτικής του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κυρίας Αικατερίνης Γαϊτανάκη. Το πειραματικό μέρος διεξήχθη στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου του τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και στο εργαστήριο Ανοσολογίας Λοιμώξεων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ υπό την επίβλεψη της Διευθύντριας Ερευνών Δρ. Ευδοκίας Καραγκούνη, κατά τα έτη 2017-2019.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Καθηγήτρια κυρία Αικατερίνη Γαϊτανάκη, η οποία με εμπιστεύθηκε, δίνοντας μου την ευκαιρία να εκπονήσω την διπλωματική εργασία στο εργαστήριο της και να μάθω πολύτιμες τεχνικές για την μετέπειτα πορεία μου. Επίσης, ήθελα να την ευχαριστήσω για την καθοδήγηση και τις συμβουλές καθ’ όλη την διάρκεια της διπλωματικής εργασίας, καθώς και για την ενθάρρυνση και την υπομονή της. Αντιστοίχως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Διευθύντρια Ερευνών Δρ. Ευδοκία Καραγκούνη, η οποία με δέχτηκε στο εργαστήριό της, για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή της, καθώς και για τις εύστοχες παρατηρήσεις της και συμβουλές, οι οποίες με βοήθησαν να προχωρήσω στο ερευνητικό μου έργο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επίκουρη Καθηγήτρια κυρία Ιωάννα-Αικατερίνη Αγγελή, η οποία με την υπομονή που την διακρίνει απαντούσε σε κάθε μου απορία και με βοηθούσε σε όλη την διάρκεια της διπλωματικής ενθαρρύνοντας με συνεχώς. Ακόμη ευχαριστώ θερμά την Δρ. Μαρία Αγάλλου, συνεργαζόμενη Ερευνήτρια στο Εργαστήριο Ανοσολογίας Λοιμώξεων, η οποία με βοήθησε οργάνωση των πειραμάτων μου και στην επίλυση μεθοδολογικών προβλημάτων, επιλύοντας κάθε μου απορία, όσο βρισκόμουν στο εργαστήριο του Ε.Ι.Π.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την υπομονή, την αγάπη και την στήριξη που μου προσέφεραν συνεχώς καθ’ όλη την διάρκεια του Μεταπτυχιακού Διπλώματος.

Διονυσία Τομαρά

Αθήνα, 2019

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

- **APS:** Υπερθειϊκό αμμώνιο (Ammonium Persulfate)
- **BSA:** Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin)
- **Buffer G:** Γλυκεροφωσφορικό διάλυμα (Glycerophosphate Buffer)
- **CL:** Δερματική λεισμανίαση (cutaneous *Leishmaniasis*)
- **DAMPs:** σχετιζόμενα με κίνδυνο μοριακά πρότυπα (Danger Associated Molecular Patterns)
- **DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium
- **DMSO:** Διμεθυλσουλφοξείδιο (Dimethyl Sulfoxide)
- **DNA:** Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (Deoxyribonucleic Acid)
- **E-64:** N- (Trans-Epoxy succinyl)-L-Leucine-4-Guanidinobutylamide-N
- **ECG:** Ηλεκτροκαρδιογράφημα (Electrocardiography)
- **ECL:** Ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (Enhanced Chemiluminescence)
- **ERK:** Ρυθμιζόμενη από εξωκυττάριο σήμα κινάση (Extracellular Signal-Regulated Kinase)
- **FBS:** Ορός εμβρύου βοδιού (Fetal Bovine Serum)
- **Glu:** Γλουταμίνη (Glutamine)
- **H9c2:**
- **HEPES:** 4-2(υδροξυαιθυλο)-1-πιπεραζίνη αιθανοσουλφονικό οξύ (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
- **HSP27:** Πρωτεΐνη θερμικού σοκ (Heat Shock Protein 27)
- **LCL:** Διάχυτη δερματική λεισμανίαση (Diffuse Cutaneous Leishmaniasis)
- **MAPK:** Ενεργοποιούμενη από μιτογόνα πρωτεϊνική κινάση (Mitogen Activated Protein Kinase)
- **MAPKAPK:** Κινάση που ενεργοποιείται από τις MAPKs (MAPK Activated Protein Kinase)
- **MAPKKs:** Κινάση της κινάσης των MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase Kinases)
- **MAPKKKs:** Κινάση των MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinases)
- **MC:** Βλεννογονοδερματική λεισμανίαση (Mucocutaneous Leishmaniasis)

- **NF-κB:** Πυρηνικός παράγοντας κB (Nuclear Factor κB)
- **PAMPs:** Σχετιζόμενα με παθογόνα μοριακά πρότυπα (Pathogen Associated Molecular Patterns)
- **PARP:** Πολυμεράση της ADP-ριβόζης (Poly (ADP-ribose) polymerase)
- **PBS:** Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Phosphate Buffer Solution)
- **PEST:** Πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (Penicillin-Streptomycin)
- **PKDL:** Μετά-καλα-αζάρ δερματική λεισμανίαση (Post Kala-azar dermal Leishmaniasis)
- **PMSF:** Φαινυλομεθυλοσουλφονυλοφθορίδιο (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride)
- **RPMI:** Roswell Park Memorial Institute
- **SDS:** Δωδεκακυλο-θειϊκό νάτριο
- **SDS-PAGE:** Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης SDS πολυακρυλαμίδης (SDS polyacrylamide gel electrophoresis)
- **TBS:** Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (Tris Buffered Saline)
- **TBST:** Tris ρυθμιστικό διάλυμα με απορρυπαντικό Tween 20 (Tris Buffered Saline Tween 20)
- **TEMED:** N, N, N, N-Τετραμεθυλενο-1, 2-Διαμίνη (N, N, N, N – Tetramethylenediamine -1,2 – diamine)
- **Thr:** Θρεονίνη (Threonine)
- **Tyr:** Τυροσίνη (Tyrosine)
- **VL:** Σπλαγχνική λεισμανίαση (Visceral Leishmaniasis)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ

Η λειψμανίαση θεωρείται μια παραμελημένη τροπική νόσος, η οποία προκαλείται με το δήγμα μολυσμένων φλεβοτόμων (κοινή σκνίπα) στον ξενιστή. Παρόλο που εμφανίζεται, κυρίως, σε αναπτυσσόμενες περιοχές, όπως η Νοτιοανατολική Ασία, η Ανατολική Αφρική και η Λατινική Αμερική, η λειψμανίαση είναι, επίσης, ενδημική σε πολλές περιοχές της Μεσογείου. Αρχικά, η λειψμανίαση εμφανίζεται με δερματικές αλλοιώσεις, οι οποίες εάν αφεθούν χωρίς θεραπεία μπορεί να εξελιχθούν σε παραμορφωτικές ουλές ή με τη μορφή της σπλαγγικής λειψμανίασης, η οποία είναι θανατηφόρος εάν δεν χορηγηθεί θεραπεία. Μεταξύ όλων των παρασιτικών ασθενειών, η λειψμανίαση καταλαμβάνει τη δεύτερη θέση ως προς την θνησιμότητα μετά την ελονοσία [1]. Η αύξηση του αριθμού των ανοσοκατεσταλμένων ατόμων λόγω HIV, μεταμοσχεύσεων, χημειοθεραπειών ή βιολογικών θεραπειών για την αντιμετώπιση χρόνιων φλεγμονών έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των κρουσμάτων λειψμανίασης στην Ευρώπη [2]. Επίσης, τα διεθνή ταξίδια έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση των περιπτώσεων λειψμανίασης σε μη ενδημικές χώρες [3], καθιστώντας αναγκαία την έγκαιρη διάγνωση της παρασιτικής μόλυνσης με σκοπό τον περιορισμό της νόσου σε μη ενδημικές χώρες [4].

1.2 ΣΧΗΜΑ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ

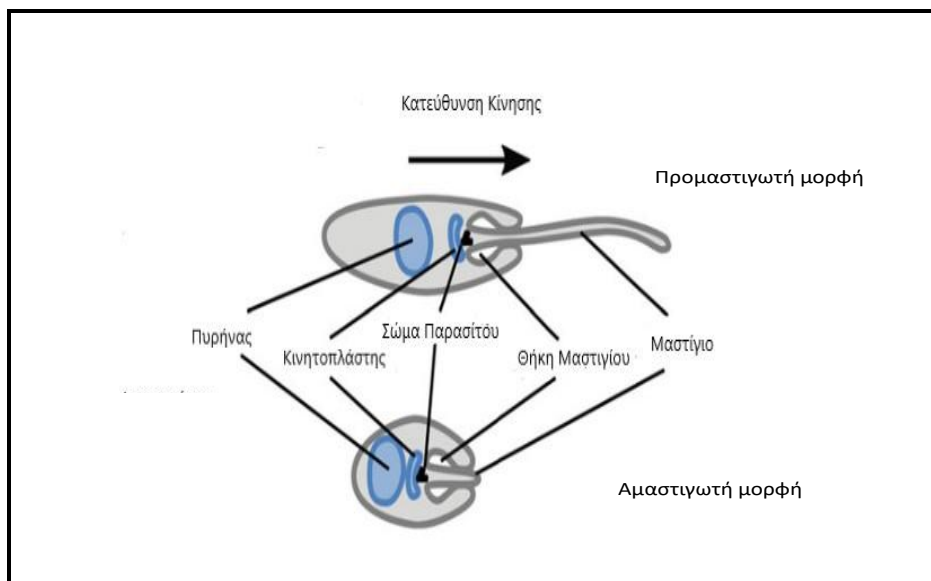
Το παράσιτο *Leishmania* υφίσταται σε δύο μορφές, την προμαστιγωτή μορφή, η οποία απαντάται στο έντερο της θηλυκής φλεβοτόμου σκνίπας και την αμαστιγωτή μορφή, η οποία απαντάται στα μακροφάγα/μονοκύτταρα του ξενιστή (Εικόνα 1.1).

Η βασική κυτταρική αρχιτεκτονική του παρασίτου διατηρείται μεταξύ των δύο κυτταρικών μορφών και ορίζεται από διασταυρούμενους μικροσωληνίσκους. Η κυτταρική διαίρεση βασίζεται στην εισαγωγή και την επιμήκυνση των μικροσωληνίσκων στην υπάρχουσα δομή. Το παράσιτο *Leishmania* αποτελείται από ένα σύνολο οργανιδίων συμπεριλαμβανομένου του πυρήνα, του μιτοχονδρίου και του συμπλέγματος Golgi. Κοντά στον πυρήνα βρίσκεται ο κινητοπλάστης όπου είναι συγκεντρωμένο το μιτοχονδριακό DNA, και είναι συνδεδεμένος με το κυρίως σώμα από όπου εκτείνεται το μαστίγιο [5]–[7]. Στη βάση του μαστιγίου σχηματίζεται μια δομή, η οποία ονομάζεται θήκη του μαστιγίου, και είναι πολύ

σημαντική καθώς είναι η περιοχή που συμμετέχει στην ενδοκυττάρωση και την εξωκυττάρωση, λειτουργώντας ως σύνδεσμος μεταξύ του παρασίτου και του περιβάλλοντος του ξενιστή [8]. Όλες αυτές οι ξεχωριστές δομές τοποθετούνται κατάλληλα η μία προς την άλλη ώστε να δημιουργήσουν τις δύο μορφές του παρασίτου [9], [10].

Η προμαστιγωτή μορφή όπως φαίνεται στην εικόνα 1.1 χαρακτηρίζεται από ένα επίμηκες σώμα, με ένα μακρύ και κινητικό μαστίγιο, το οποίο εκτείνεται έξω από την θήκη του μαστιγίου και δίνει την απαραίτητη ώθηση στο παράσιτο προκειμένου να διασχίσει εύκολα την πεπτική οδό της σκνίπας [11].

Η αμαστιγωτή μορφή όπως φαίνεται στην εικόνα 1.1 χαρακτηρίζεται από μικρότερο και περισσότερο ωοειδές σώμα σε σχέση με την προμαστιγωτή μορφή. Το μαστίγιο είναι μη κινητικό, βρίσκεται μέσα στην θήκη και έχει αισθητήριες λειτουργίες [12]–[14].

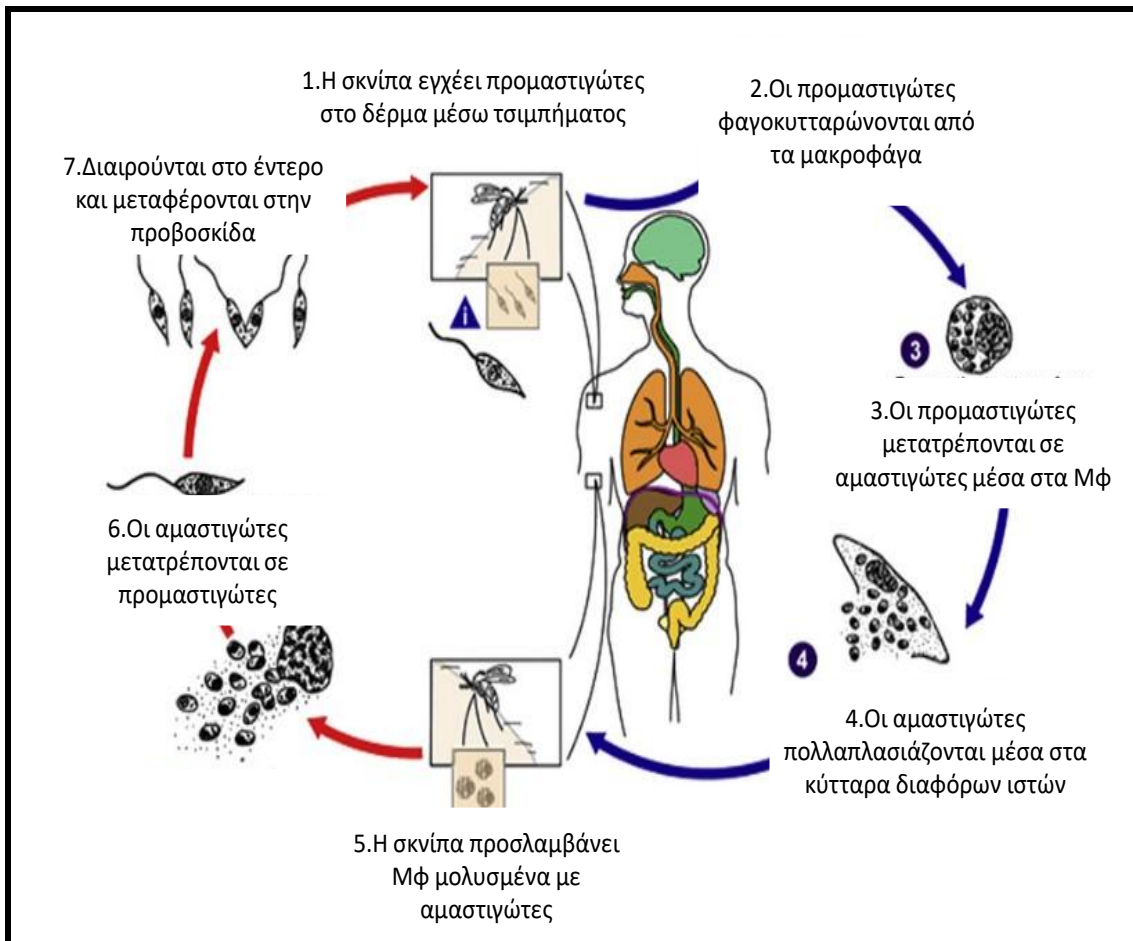


Εικόνα 1.1: Μορφολογία της προμαστιγωτής (πάνω) και αμαστιγωτής (κάτω) μορφής της *Leishmania* (Sunter και συν., 2017)

1.3 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ

Ο κύκλος ζωής του παρασίτου ξεκινά με την έγχυση προμαστιγωτών μορφών στο δέρμα του ξενιστή κατά τη διάρκεια απομύζησης αίματος από αυτόν. Μέσα σε λίγα λεπτά οι προμαστιγωτές μορφές φαγοκυτταρώνονται από τα μακροφάγα ή τα ιστοκύτταρα του δέρματος. Εκεί τα παθογόνα μεταμορφώνονται στην υποχρεωτικά ενδοκυττάρια μορφή του παρασίτου, την αμαστιγωτή μορφή. Οι αμαστιγωτές μορφές της *Leishmania* επιβιώνουν στα φαγολυσοσώματα των μακροφάγων και ουδετερόφιλων, όπου και πολλαπλασιάζονται. Όταν

απελευθερώνονται από τα μολυσμένα κύτταρα, μολύνουν άλλα παρακείμενα κύτταρα. Μετά από λίγες εβδομάδες, η συγκέντρωση των κυττάρων φλεγμονής (μακροφάγα, ουδετερόφιλα, δενδριτικά, T-κύτταρα), δημιουργεί ένα χαρακτηριστικό κοκκίωμα. Ο κύκλος ζωής του παθογόνου ολοκληρώνεται όταν μια σκνίπα κατά την απομύζηση αίματος από μολυσμένο ξενιστή, προσλάβει τις αμαστιγωτές μορφές της *Leishmania*, οι οποίες θα μεταμορφωθούν ξανά σε προμαστιγωτές μορφές στο έντερό της.



Εικόνα 1.2: Ο κύκλος ζωής του παρασίτου *Leishmania*. Η *Leishmania infantum/donovani* έχει 2 μορφές, την προμαστιγωτή μορφή στην σκνίπα και την αμαστιγωτή μορφή όταν βρίσκεται στα μικροφάγα του ξενιστή. Μετά από έγχυση στο δέρμα των προμαστιγωτών μορφών της *Leishmania* κατά την διάρκεια τσιμπήματος από μολυσμένη σκνίπα, το παράσιτο προσλαμβάνεται από κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος του ξενιστή στο μυελό των οστών, στο σπλήνα, στο ήπαρ και στους λεμφαδένες (Sundar και συν., 2013).

1.4. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η ανθρώπινη λεισμανίαση ενδημεί παγκοσμίως σε 98 χώρες, με εξαίρεση την Αυστραλία και την Ανταρκτική [15]. Οι φτωχές, όμως, περιοχές επηρεάζονται περισσότερο από το νόσημα. Ο αριθμός των κρουσμάτων της σπλαγγχνικής λεισμανίασης υπολογίζεται ότι είναι 0,2 – 0,4 εκατομμύρια κάθε χρόνο. Το 90% των κρουσμάτων καταγράφονται στην Ινδία, το Μπαγκλαντές, το Σουδάν, την Αιθιοπία και τη Βραζιλία [15]. Η θνησιμότητα υπολογίζεται σε ποσοστό 10% - 20%, ειδικά σε φτωχές περιοχές [15]. Υπολογίζεται ότι 0,7 – 1,2 εκατομμύρια κρουσμάτων της δερματικής λεισμανίασης εμφανίζονται στις περιοχές της Μεσογείου, της Αμερικής και της Δυτικής Ασίας. Στη Βραζιλία, τη Συρία και το Αφγανιστάν το ποσοστό των κρουσμάτων φτάνει το 75% [15], ενώ περίπου 35.000 κρούσματα βλεννογονοδερματικής λεισμανίασης καταγράφονται ετήσια, κυρίως, στην Βραζιλία, το Περού και την Βολιβία [15].

Η νοσηρότητα από όλες τις μορφές της λεισμανίασης σε όλες τις ηλικίες έχει υπολογισθεί ότι είναι 3.754.202 DALY (Disability-Adjusted Life Year) [4], [15]

Στις Ευρωπαϊκές χώρες, μόνο δύο είδη του παράσιτου *Leishmania* ενδημούν: η *Leishmania infantum*, η οποία προκαλεί τη σπλαγγχνική μορφή του νοσήματος στην περιοχή της Μεσογείου, όπου ο σκύλος είναι ο φορέας και η *Leishmania tropica*, η οποία προκαλεί τη δερματική μορφή του νοσήματος κυρίως στην Ελλάδα [2]. Οι Ευρωπαϊκές χώρες στις οποίες έχουν καταγραφεί κρούσματα είναι η Πορτογαλία, η Ισπανία, η Γαλλία, η Ιταλία, η Ελλάδα, η Μάλτα, η Κύπρος, η Κροατία, η Αλβανία, η Βουλγαρία και η Τουρκία [15]. Αν και οι περισσότερες περιπτώσεις αφορούν σποραδικά κρούσματα, έγιναν πρόσφατα αναφορές πολλών κρουσμάτων λεισμανίασης στην Ισπανία [16] και την Ιταλία [17]. Η αύξηση των διεθνών ταξιδιών έχει ως αποτέλεσμα τα κρούσματα της λεισμανίασης να καταγραφούν και σε μη ενδημικές χώρες [3]. 2752 κρούσματα έχουν καταγραφεί το 2010 σε χώρες της νότιας Ευρώπης, 2237 από τα οποία ήταν στην Τουρκία [4], [15].

1.5 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΤΗΣ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ

Οι κυριότερες κλινικές μορφές της λεισμανίασης είναι η σπλαγγχνική, η δερματική και η βλεννογονοδερματική λεισμανίαση.

1.5.1 Σπλαγγχνική λεισμανίαση (Visceral Leishmaniasis, VL)

Η περίοδος επώασης για τη σπλαγγχνική λεισμανίαση κυμαίνεται συνήθως από 2 έως 6 μήνες, αλλά μπορεί και να κυμαίνεται από μερικές εβδομάδες έως χρόνια.

Οι ασθενείς παρουσιάζουν πυρετό, απώλεια βάρους, σπληνο- και ηπατομεγαλία που διαρκούν μήνες. [18], [19]. Η λεμφαδενοπάθεια παρατηρείται



Εικόνα 1.6: Ασθενής με σπλαγγχνική λεισμανίαση και σπληνομεγαλία (Sundar και συν.,2013)

στο Σουδάν και είναι σπάνια σε άλλες ενδημικές περιοχές. Η σκούρα απόχρωση του δέρματος παρατηρείται κυρίως στην Νότια Ασία, από όπου πήρε και το όνομα kala-azar (μαύρος πυρετός). Συμπτώματα τα οποία παρατηρούνται συχνά είναι η αναιμία, η θρομβοκυτταροπενία και η ουδετεροπενία. Μπορεί επίσης να εμφανιστεί, ήπια έως μέτρια αύξηση των ηπατικών ενζύμων. Οι ασθενείς μπορεί να γίνουν καχεκτικοί λόγω υπερ-γαμμασφαιριναιμίας ή να παρουσιάσουν καρδιακή ανεπάρκεια λόγω αναιμίας. Μπορεί να υπάρξει αιμορραγία ούλων ή αιμορραγία σε άλλες περιοχές. Η υπατική δυσλειτουργία και ο ίκτερος μπορεί να εμφανιστούν σε προχωρημένη ασθένεια [18], [19]. Οι ασθενείς διατρέχουν υψηλό κίνδυνο πρόσθετων μολύνσεων, όπως η μέση ωτίτιδα, οι γαστρεντερικές λοιμώξεις και η πνευμονία [20], [21].



Εικόνα 1.7: Μετά Καλαά-αζάρ δερματική λεισμανίαση: *porular, nodular αλλοιώσεις (οζώδεις)* (Zijlstra και συν.,2000)

Στον Παλαιό Κόσμο, υπεύθυνα για την νόσο είναι τα είδη *L. donovani* και *L. infantum*, ενώ στον Νέο Κόσμο είναι υπεύθυνο το είδος *L. L. chagasi* [22].

Η μετά καλα-αζάρ δερματική λεισμανίαση, αφορά περίπου το 10% των κρουσμάτων σπλαγγχνικής λεισμανίασης που προκαλούνται από την *L. donovani* στην Ασία (Ινδία, Νεπάλ και Μπαγκλαντές) και το 60% των

κρουσμάτων σπλαγχνικής λεισμανίασης που προκαλούνται από την *L. donovani* στην Δυτική Αφρική (Σουδάν και Αιθιοπία) [23].

Η μετά καλα-αζάρ δερματική λεισμανίαση εμφανίζεται μήνες έως χρόνια μετά την θεραπεία της σπλαγχνικής λεισμανίασης, κατά την διάρκεια της θεραπείας (Σουδάν), ή σε περίοδο που δεν υπάρχει καμία ένδειξη για σπλαγχνική λεισμανίαση. Εκδηλώνεται ως δερματικό εξάνθημα στο πρόσωπο, τον κορμό και τα άκρα [24]. Είναι αποτέλεσμα της ανοσολογικής αντίδρασης στα παράσιτα *Leishmania*, τα οποία παραμένουν στο δέρμα και λειτουργούν ως «δεξαμενή» μετάδοσης [4], [23].

1.5.2 Δερματική λεισμανίαση (Cutaneous Leishmaniasis)

Η δερματική μορφή της λεισμανίασης είναι ο πιο κοινός τύπος του νοσήματος και αφορά το 90% των ασθενών. Μερικές εβδομάδες ή μήνες μετά την μόλυνση, δημιουργείται μια πληγή, η οποία συνεχίζει να αναπτύσσεται για τις επόμενες εβδομάδες με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία έλκους. Τα όρια της αλλοίωσης συχνά ανυψώνονται. Σε ανοσοεπαρκή άτομα η αλλοίωση αυτοϊάται μετά από 6 - 18 μήνες.



Εικόνα 1.3: Δερματική λεισμανίαση με ελκώδη αλλοίωση στον αριστερό καρπό ασθενούς (Kevric και συν.,2015).

Οι περιοχές όπου εμφανίζεται περισσότερο η δερματική λεισμανίαση είναι οι ακάλυπτες περιοχές του δέρματος (πρόσωπο, λαιμός, χέρια, πόδια) [22].

Η δερματική λεισμανίαση χαρακτηρίζεται από μία ή περισσότερες αλλοιώσεις, οι οποίες δημιουργούνται μέσα σε λίγες εβδομάδες έως μήνες μετά από το τσίμπημα. Τα έλκη συχνά δημιουργούν σκλήρυνση των ορίων, ενώ στο εσωτερικό τους δημιουργείται μια κρούστα. Αυτές οι πληγές μπορεί να είναι πολύ επώδυνες εάν μολυνθούν ή καλύψουν μια άρθρωση. Τα έλκη συχνά μπορούν να επουλωθούν αυθόρμητα ξεκινώντας από το κέντρο και μέσα σε περίοδο ενός μήνα να αφήσουν ατροφικές κνησμάδες ουλές [25], [26]. Τα παράσιτα μπορεί



Εικόνα 1.4: Μη ελκώδεις αλλοιώσεις σε ασθενή με διάχυτη δερματική λεισμανίαση

να παραμείνουν σε επούλωμένες ουλές δερματικής λεισμανίασης και στους λεμφαδένες παρά την θεραπεία και πιθανόν αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση τους σε περίοδο ανοσοκαταστολής [27].

Στον Παλαιό Κόσμο υπεύθυνα για την νόσο είναι τα είδη *L. major*, *L. tropical*, *L. infantum*, ενώ στον Νέο Κόσμο ευθύνονται τα είδη *L. L.*

mexicana, *L. L. amazonensis*, *L. L. braziliensis*, *L. L. guyanensis*, *L. L. panamensis* [22]

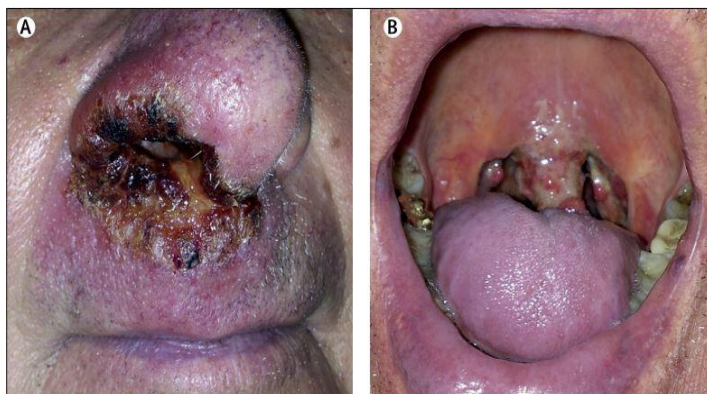
Ένας άλλος τύπος δερματικής λεισμανίασης είναι η διάχυτη δερματική λεισμανίαση. Σε αυτή τη μορφή δερματικής λεισμανίασης, το πρόσωπο (Αφρική) και όλο το σώμα (νότια Αμερική) του ασθενούς, καλύπτεται από αλλοιώσεις οι οποίες μοιάζουν με αυτές της λεπρωματώδους λέπρας.

Στην διάχυτη δερματική λεισμανίαση, όπως αυτή που προκαλείται από την *L. amazonensis*, οι αλλοιώσεις που δημιουργούνται είναι ποικίλων μεγεθών και εμφανίζονται σε διάφορα σημεία, απομακρυσμένα από την περιοχή του τσιμπήματος [28], [29].

Τη διάχυτη δερματική λεισμανίαση προκαλούν τα είδη *L. aethiopica* και *L. major* στον Παλαιό Κόσμο και τα είδη *L. L. mexicana*, *L. L. amazonensis*, *L. L. guyanensis*, *L. L. braziliensis* στον Καινούριο Κόσμο [22].

1.5.3 Βλεννογονοδερματική λεισμανίαση (Mucocutaneous Leishmaniasis,

MC)



Εικόνα 1.5: Βλεννογονοδερματική λεισμανίαση ασθενούς (Burza και συν.,2018)

Η βλεννογονοδερματική λεισμανίαση θεωρείται ως μεταστατική δερματική λεισμανίαση και αναπτύσσεται 1, 2 ή και περισσότερα χρόνια μετά από την κλινική θεραπεία των πρωταρχικών αλλοιώσεων. Σε μολύνσεις του

Παλαιού Κόσμου δεν παρατηρείται βλεννογονοδερματική λείσμανίαση και οι λόγοι για αυτό είναι ακόμα ασαφείς [26], [27], [30].

Στο Νέο Κόσμο, η βλεννογονοδερματική λείσμανίαση επηρεάζει το 5% των ασθενών με λείσμανίαση. Υπεύθυνα για την νόσο είναι τα είδη *L. V. braziliensis*, *L. V. peruvia*, *L. V. guyanensis*, *L. V. panamensis*. Υπάρχουν ενδείξεις ότι συσχετίζεται με ανεπαρκή ή ανύπαρκτη θεραπεία της πρωταρχικής μόλυνσης. Οι άνδρες προσβάλλονται περισσότερο από το νόσημα καθώς εμφανίζουν πολλαπλές πρωταρχικές αλλοιώσεις [22].

Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν επίμονη ρινική συμφόρηση, αιμορραγία και έντονη βραχνάδα. Επίσης, δημιουργούνται οιδήματα, τα οποία εξελίσσονται σε έλκη με εκκρίματα των βλεννογόνων. Οι βλεννογόνοι των ματιών ή των γεννητικών οργάνων σπάνια προσβάλλονται [26], [27], [30]. Μετά από 2 έως 10 χρόνια εμφανίζεται εκτεταμένη καταστροφή των ιστών, η οποία ξεκινάει από το ρινικό διάφραγμα με πιθανή διάτρηση. Ο ρυθμός θνησιμότητας εξαιτίας αυτής της μορφής λείσμανίασης είναι υψηλός λόγω της δυσκολίας κατά την κατάποση και της καχεξίας [22].

1.6 ΚΑΡΔΙΑΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΚΥΛΟΥΣ ΟΙ ΟΠΟΙΟΙ ΕΙΧΑΝ ΜΟΛΥΝΘΕΙ ΜΕ ΤΟ ΠΑΡΑΣΙΤΟ *LEISHMANIA INFANTUM CHAGASI*

Εκτός από τους ανθρώπους, οι σκύλοι αποτελούν ξενιστές του παρασίτου *Leishmania*. Η λείσμανίαση, η οποία προσβάλλει τους σκύλους, μπορεί να είναι υποκλινική ή να εκδηλώνεται ως πολυσυστημική νόσος με κύρια χαρακτηριστικά την απώλεια βάρους, τη μυϊκή ατροφία, την αναιμία, την ηπατοσπληνομεγαλία, και τις δερματικές και ρινικές αλλοιώσεις. Αν και σπάνια αναφέρονται κλινικές ενδείξεις καρδιακής ασθένειας, έχουν γίνει αναφορές για αλλοιώσεις του μυοκαρδίου και εντοπισμό του παρασίτου στον καρδιακό ιστό. Σε έρευνα της Rosa και των συνεργατών της αναφέρεται ότι από τα 30 πειραματόζωα, 27 εμφάνισαν λεμφοπλασματική μυοκαρδίτιδα, 24 μυνέκρωση, 22 αυξημένο ενδιάμεσο κολλαγόνο, 7 κοκκιοματώδη μυοκαρδίτιδα, και 3 αλλαγή των αγγείων [31].

1.7 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΜΑΡΚ

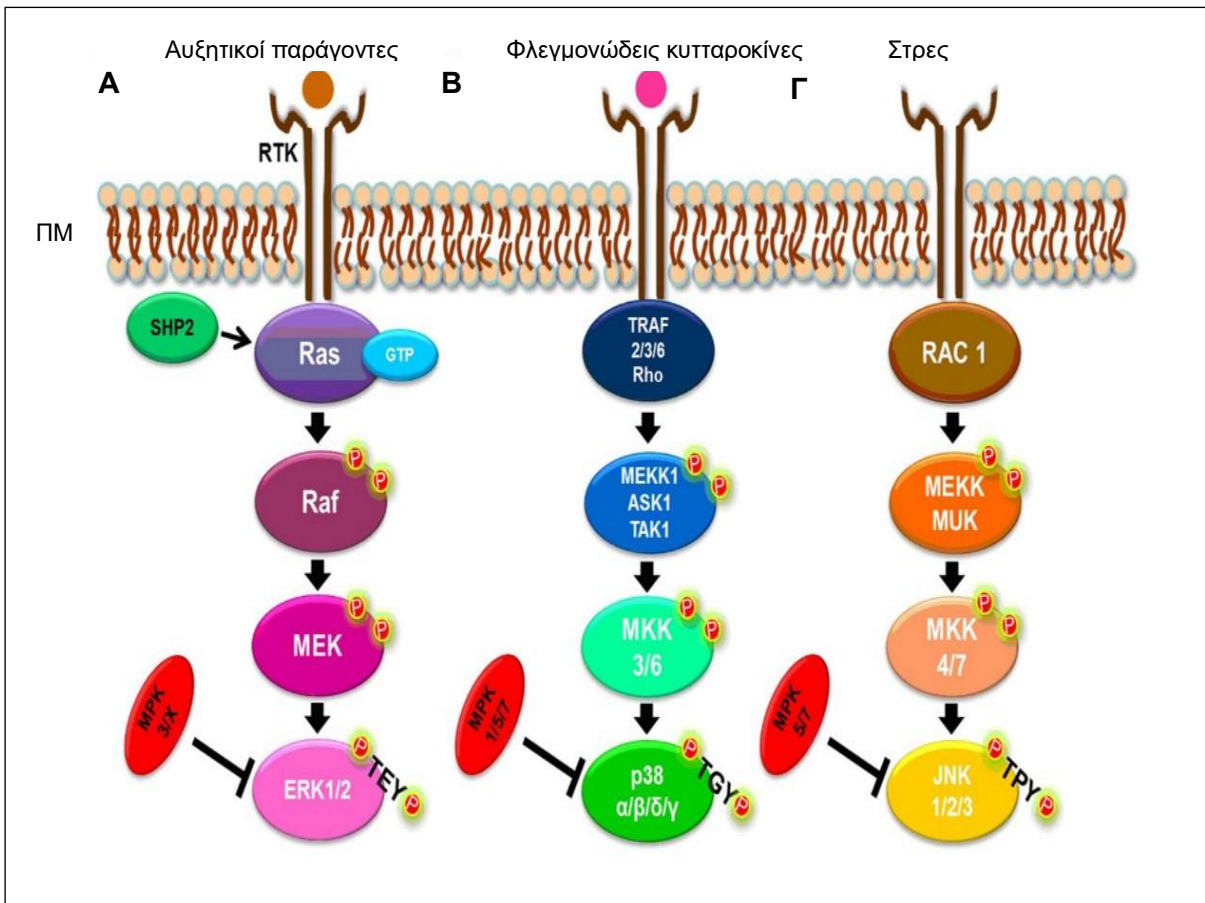
Το 1994 ανακαλύφθηκαν οι πρωτεϊνικές κινάσες που επάγονται από μιτογόνα (Mitogen-Activated Protein Kinases, MAPK), οι οποίες αποτελούν μια οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών

σερίνης/θρεονίνης [32]. Οι κινάσες προσθέτουν φωσφορικές ομάδες σε υποστρώματα-στόχους. Αυτές οι φωσφορικές ομάδες μεταφέρονται από το μόριο της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) και προστίθενται, συνήθως, στην υδροξυλομάδα των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων σερίνη, θρεονίνη και τυροσίνη. Οι κινάσες είναι ειδικές και ρυθμίζουν τη λειτουργία του κυττάρου [33], [34].

Οι MAPK είναι εξελικτικά συντηρημένα ένζυμα, τα οποία συνδέουν τους υποδοχείς, οι οποίοι βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου με ρυθμιστικούς στόχους στο εσωτερικό του κυττάρου. Οι MAPK αποκρίνονται σε χημικό και φυσικό στρες, ελέγχοντας την επιβίωση του κυττάρου και την προσαρμογή του. Μόλις οι MAPK ενεργοποιηθούν ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο, την απόπτωση, τη διαφοροποίηση και τη διαίρεση του κυττάρου [35]. Το μονοπάτι των MAPK αποτελείται από ένα σύστημα 3 σηματοδοτικών μορίων [36], στα οποία η θρεονίνη και η τυροσίνη δημιουργούν μια περιοχή ενεργοποίησης την οποία οι κινάσες μπορούν να φωσφορυλιώσουν [34], [36]. Η δραστηριότητα των MAPK ρυθμίζεται μέσω ενός καταρράκτη που αποτελείται από μια MAPK, μια κινάση των ενεργοποιούμενων από μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών (Mitogen Activated Protein Kinase Kinase, MAPKK, MKK ή MEK) και μια κινάση των κινασών των ενεργοποιούμενων από μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών (Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinases, MAPKKK ή MEKK). Αυτά τα μόρια μπορεί να ενεργοποιηθούν από τις STE20 κινάσες ή από την τριφωσφορική γουανοσίνη (Guanosine Triphosphate, GTP) [35].

Τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος στα οποία συμμετέχουν οι MAPK αποτελούν έναν από τους πιο διαδεδομένους μηχανισμούς ρύθμισης του ευκαρυωτικού κυττάρου [37], [38], [39]. Όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα διαθέτουν ποικίλα μονοπάτια MAPK, κάθε ένα από τα οποία ενεργοποιείται από διαφορετικό ερέθισμα, επιτρέποντας έτσι στο κύτταρο να αποκρίνεται συντονισμένα σε πολλαπλά ερεθίσματα. Η συντονισμένη απόκριση και ενεργοποίηση των MAPK οδηγεί στην ενεργοποίηση ποικίλων μεταγραφικών παραγόντων. Τα μονοπάτια των MAPK στα θηλαστικά μπορούν να ενεργοποιηθούν από μια ποικιλία διαφορετικών ερεθισμάτων μέσω των υποδοχέων, οι οποίοι βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων [40]

Η υπεροικογένεια των MAPK (Εικόνα 1.7.1) αποτελείται από τις εξής 3 μεγάλες οικογένειες: τις ERK1/2, την p38 MAPK και τις JNKs.



Εικόνα 1.7.1: Σχηματική αναπαράσταση των σηματοδοτικών μονοπατιών των MAPK (Α) μονοπάτι των ERK1/2. (Β) μονοπάτι των p38 α, β, γ και δ ισομορφών και (Γ) μονοπάτι των JNK 1,2 και 3. (Soares και συν., 2016)

1.7.1 ERK1/2

Η πρώτη ευρέως μελετημένη οικογένεια MAPK είναι η ρυθμιζόμενη από εξωκυττάριο σήμα κινάση 1 (ERK1) και κινάση 2 (ERK2), οι οποίες είναι ομόλογες, εκφράζονται ταυτόχρονα και το μοριακό τους βάρος είναι 43 και 41 kDa, αντίστοιχα. Οι ERK1/2 ενεργοποιούνται από αυξητικούς παράγοντες, πρωτεΐνες του ορού, εστέρες, υποδοχείς συζευγμένους με G-πρωτεΐνες, κυτταροκίνες, καθώς και από το οσμωτικό και άλλου είδους κυτταρικό στρες. Η ενεργοποίηση των ERK1/2 εμπλέκεται σε διάφορες κυτταρικές αποκρίσεις, όπως είναι η κίνηση, η διαφοροποίηση, η διαίρεση και η επιβίωση του κυττάρου. Οι MAPKs και συγκεκριμένα οι MEK1 και MEK2 είναι υπεύθυνες για την ενεργοποίηση

των ERK1/2 κινασών, καθώς φωσφορυλιώνουν τις ERK1/2. Οι MAP3Ks φωσφορυλιώνουν είτε δύο κατάλοιπα σερίνης, είτε ένα κατάλοιπο σερίνης και ένα κατάλοιπο θρεονίνης στην περιοχή ενεργοποίησης των MAPKKs. Στο σηματοδοτικό μονοπάτι των ERK1/2 τις MAP3Ks αποτελούν η οικογένεια των Raf κινασών [42].

Οι Raf κινάσες έχουν 3 ισομορφές (A-Raf, B-Raf και C-Raf ή Raf-1), οι οποίες είναι οι περισσότερο μελετημένες MAP3Ks και αυτές που ρυθμίζουν με μεγαλύτερη συχνότητα το σηματοδοτικό μονοπάτι των ERK1/2. Ο Raf ενεργοποιείται από ένα συνδυασμό πρόσδεσης μικρών G πρωτεϊνών της Ras οικογένειας στο αμινο-τελικό άκρο και μέσω φωσφορυλίωσης [43], [44].

Τα υποστρώματα των ERK1/2 έχει αποδειχθεί ότι μετατοπίζονται τόσο στο κυτταρόπλασμα, όσο και στον πυρήνα μετά από την φωσφορυλίωση των ERK1/2. Η μετατόπιση των ERK1/2 στον πυρήνα απαιτείται για την σχετική βιολογική απόκριση. Ενώ το σηματοδοτικό μονοπάτι ενεργοποιείται με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω, έχει αποδειχθεί ότι οι ERK1/2 δεν χρειάζονται απαραίτητως τον Ras για να ενεργοποιηθούν και στην πραγματικότητα μπορούν να ενεργοποιηθούν από σχετιζόμενα με παθογόνα μοριακά πρότυπα (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs), από σχετιζόμενα με κίνδυνο μοριακά πρότυπα (Danger Associated Molecular Patterns, DAMPs) και από μια ποικιλία προφλεγμονωδών ερεθισμάτων [33], [34].

1.7.1.1. Τοπολογία του σηματοδοτικού μονοπατιού των ERK1/2

Οι ERK1/2 κατανέμονται σε όλο το κύτταρο, ενώ συνδέονται με τους υποδοχείς της πλασματικής μεμβράνης. Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η ενεργοποίηση των ERK1/2 από αυξητικούς παράγοντες και άλλους συνδέτες (ligands) οδηγεί σε μετατόπιση τους στον πυρήνα. Αυτή η μετατόπιση επιτρέπει στις ERK1/2 την πρόσβαση σε πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες και άλλες πυρηνικές πρωτεΐνες οι οποίες φωσφορυλιώνονται και σταθεροποιούνται, προκαλώντας αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση [44], [45]

Είναι ενδιαφέρον, ότι σε μελέτες έχει αναφερθεί ότι το παράσιτο *L. amazonensis* μετατοπίζεται σε περιοχές γύρω από τον πυρήνα μέσα στο κύτταρο του ξενιστή, επάγοντας την φωσφορυλίωση των ERK1/2. Οι φωσφορυλιωμένες ERK1/2, οι οποίες είναι κοντά στον

πυρήνα επάγουν την ενεργοποίηση των υποστρωμάτων τους, τα οποία είναι απαραίτητα για την επιβίωση του παρασίτου [34], [35]

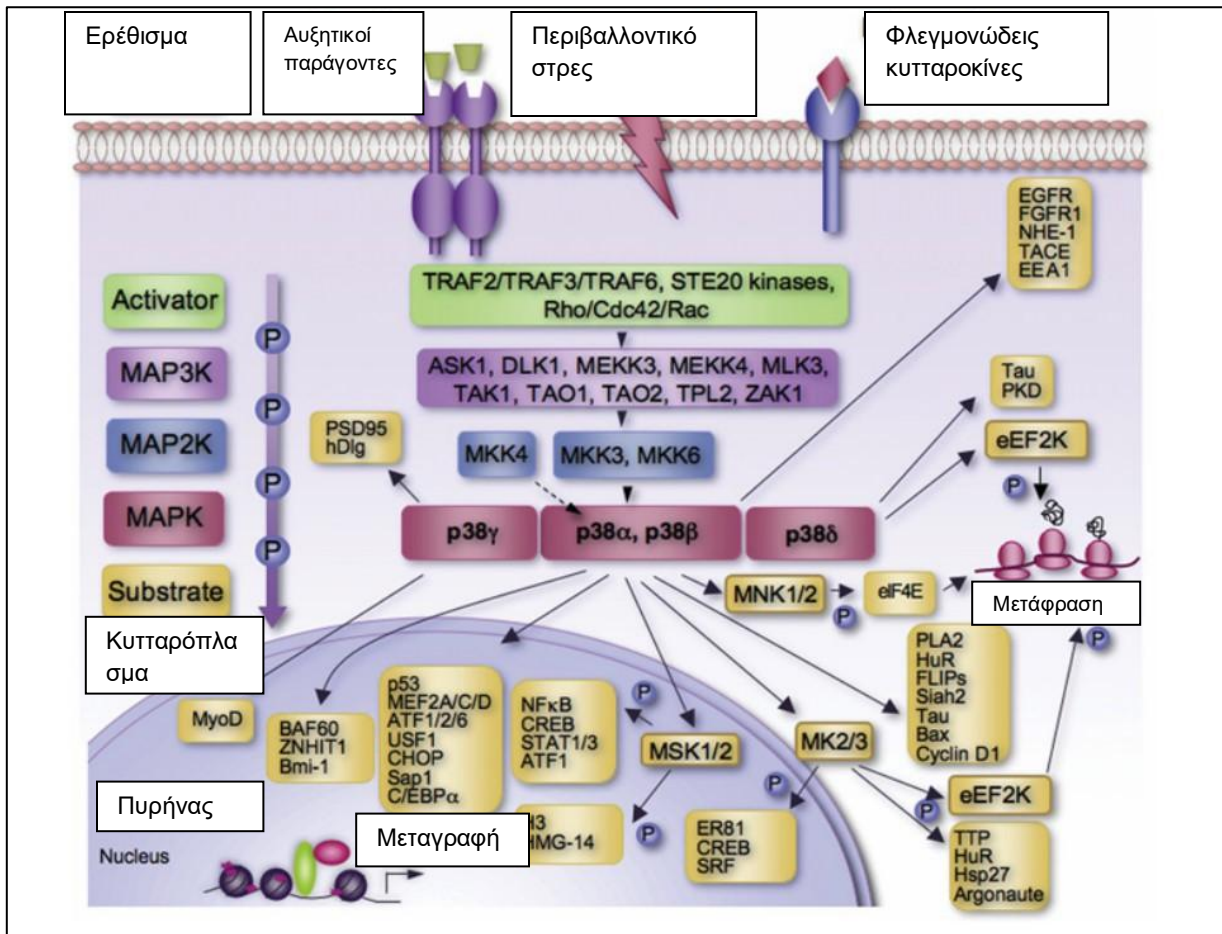
1.7.2 p38-MAPK

Μια άλλη κατηγορία MAPK είναι η p38-MAPK. Αρχικά είχε ταυτοποιηθεί ως ένα πολυπεπίδιο με μοριακό βάρος 38 kDa, το οποίο υφίσταται φωσφορυλίωση σε ένα κατάλοιπο τυροσίνης ως απόκριση στην επίδραση ενδοτοξίνης και ωσμωτικού σοκ [46]. Δύο ανεξάρτητες μεταξύ τους ερευνητικές ομάδες αναγνώρισαν την p38α ως μια κινάση ενεργοποιούμενη από το στρες και από την IL-1, δίνοντας της την δυνατότητα να φωσφορυλιώσει και να ενεργοποιήσει την κινάση σερίνης/θρεονίνης MAPKAPK2, η οποία εμπλέκεται στην φωσφορυλίωση και την επακόλουθη ενεργοποίηση μιας μικρής πρωτεΐνης με μοριακό βάρος 27 kDa, η οποία ονομάζεται πρωτεΐνη θερμικού σοκ (Heat Shock Protein 27, HSP27). Μετά την ταυτοποίηση της p38α, βρέθηκαν και άλλες 3 ισομορφές, οι οποίες κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια. Η p38β, η p38γ (η οποία ονομάζεται και SAPK3 και ERK6) και η p38δ [40], [45], [46].

Οι 4 p38 MAPKs έχουν διαφορετικό μοτίβο έκφρασης ανάλογα με τον ιστό, καθώς η p38α εκφράζεται σε σημαντικά επίπεδα στους περισσότερους τύπους κυττάρων, ενώ οι άλλες φαίνεται να εκφράζονται ιστοειδικά. Συγκεκριμένα, η p38β εκφράζεται στον εγκέφαλο, η p38γ στον σκελετικό μυ και η p38δ στους ενδοκρινείς αδένες [36], [47]

Χαρακτηριστικό γνώρισμα όλων των p38 κινασών είναι η διπλή φωσφορυλίωση στο μοτίβο Thr-Gly-Tyr (TGY) [48]. Υπάρχει ομοιότητα κατά 60% στην αλληλουχία των αμινοξέων μεταξύ των p38 ισομορφών, ενώ η p38 ομάδα έχει κατά 40-45% ίδια αλληλουχία αμινοξέων με τις υπόλοιπες MAPK [49].

Το πρώτο υπόστρωμα της p38α που ταυτοποιήθηκε ήταν η MAPKAPK2/ MK2 και η MK3.



Εικόνα 1.7.2: Διαφορετικά ερεθίσματα όπως, αυξητικοί παράγοντες, φλεγμονώδεις κυτταροκίνες ή στρες μπορούν να ενεργοποιήσουν την p38 MAPK. Απεικονίζονται οι στόχοι καταρροϊκά των p38-MAPK [47].

1.7.3 Σηματοδοτικά μονοπάτια MAPK σε παρασιτική μόλυνση

Τα πρωτόζωα παράσιτα στοχεύουν πολυάριθμα σηματοδοτικά μονοπάτια με σκοπό να αναστείλουν ή να περιορίσουν την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή [50]. Μεταξύ αυτών είναι και οι MAPK με σκοπό να παρέμβουν στην κυτταρική απόκριση και σηματοδότηση [50].

Η *Leishmania spp.* και το *T. cruzi* χρησιμοποιούν διαφορετικές στρατηγικές για την επιβίωση μέσα στα κύτταρα του ξενιστή μετά την μόλυνση. Για παράδειγμα εμπλέκονται στα σηματοδοτικά μονοπάτια των MAPK και τροποποιούν την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή. Ακόμη, μπορεί να έχουν ως στόχο τα μακροφάγα και χρησιμοποιούν τα μόρια του

ξενιστή με σκοπό την πρόοδο της μόλυνσης και της επιβίωσης τους μέσα στα κύτταρα του ξενιστή [51], [52].

Η ενεργοποίηση των ERK1/2 MAPK από το *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) έχει συνδεθεί με την κυτταρική διαίρεση στην κυτταρική σειρά τροφοβλάστη BeWo όπως απέδειξε ο Drogueit και οι συνεργάτες του. Επίσης ο Hassan και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι το *T. cruzi* μπορεί να επάγει την διαίρεση των λείων μυϊκών κυττάρων στο μυοκάρδιο [53]. Επιπρόσθετα έχει μελετηθεί επίσης από τον Bouzahzah και τους συνεργάτες του η επαγωγή διαίρεσης των ηπατοκυττάρων μέσω εναλλακτικής ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού των ERK1/2 MAPK από το *T. cruzi* [53].

Ο Boggiatto και οι συνεργάτες του [54] έδειξαν ότι κατά την μόλυνση δενδριτικών κυττάρων από το παράσιτο *L. amazonensis* προκαλείται φωσφορυλίωση των ERK1/2, η οποία αποτρέπει την έκφραση του συνδιεγερτικού μορίου CD40 στην επιφάνεια των κυττάρων κάτι που αποτρέπει την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων [54]. Η επίδραση με αναστολείς των MEK1/2 επανέφερε την ωρίμανση αυτών των κυττάρων *in vivo* [55], [56]. Επίσης, ο Mukbel και οι συνεργάτες του [57] έδειξαν ότι αναστέλλοντας την ενεργοποίηση των MEK1/2 με τον αναστολέα PD98059 (και επομένως το υπόστρωμα του, τις ERK1/2) το κύτταρο μπορεί να αντιμετωπίσει αποτελεσματικά το παράσιτο μέσω της παραγωγής υπεροξειδίου και NO. Με αυτόν τον τρόπο οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η φωσφορυλίωση των ERK1/2 είναι ένας μηχανισμός μέσω του οποίου το παράσιτο παρεμποδίζει την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή. Ένα από τα πιο ενδιαφέροντα ευρήματα σχετικά με την λειτουργία των ανθρώπινων ουδετερόφιλων είναι η μοναδική μορφή κυτταρικού θανάτου, η οποία συνδέεται με την κοκκιώδη και κυτταροπλασματική απελευθέρωση κοκκίων και πρωτεϊνών οι οποίες παγιδεύουν και σκοτώνουν τα μικρόβια. Ενδιαφέρον είναι ότι η *Leishmania amazonensis* μπορεί να απελευθερώσει εξωκυττάριας παγίδες ουδετερόφιλων. Η επαγόμενη από την *L. amazonensis* δίωξη των ουδετερόφιλων προκαλείται μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού των ERK1/2, στο οποίο η ενεργοποίηση λαμβάνει χώρα μέσω της PI3K και είναι ανεξάρτητη από την AKT και την παραγωγή ROS [58].

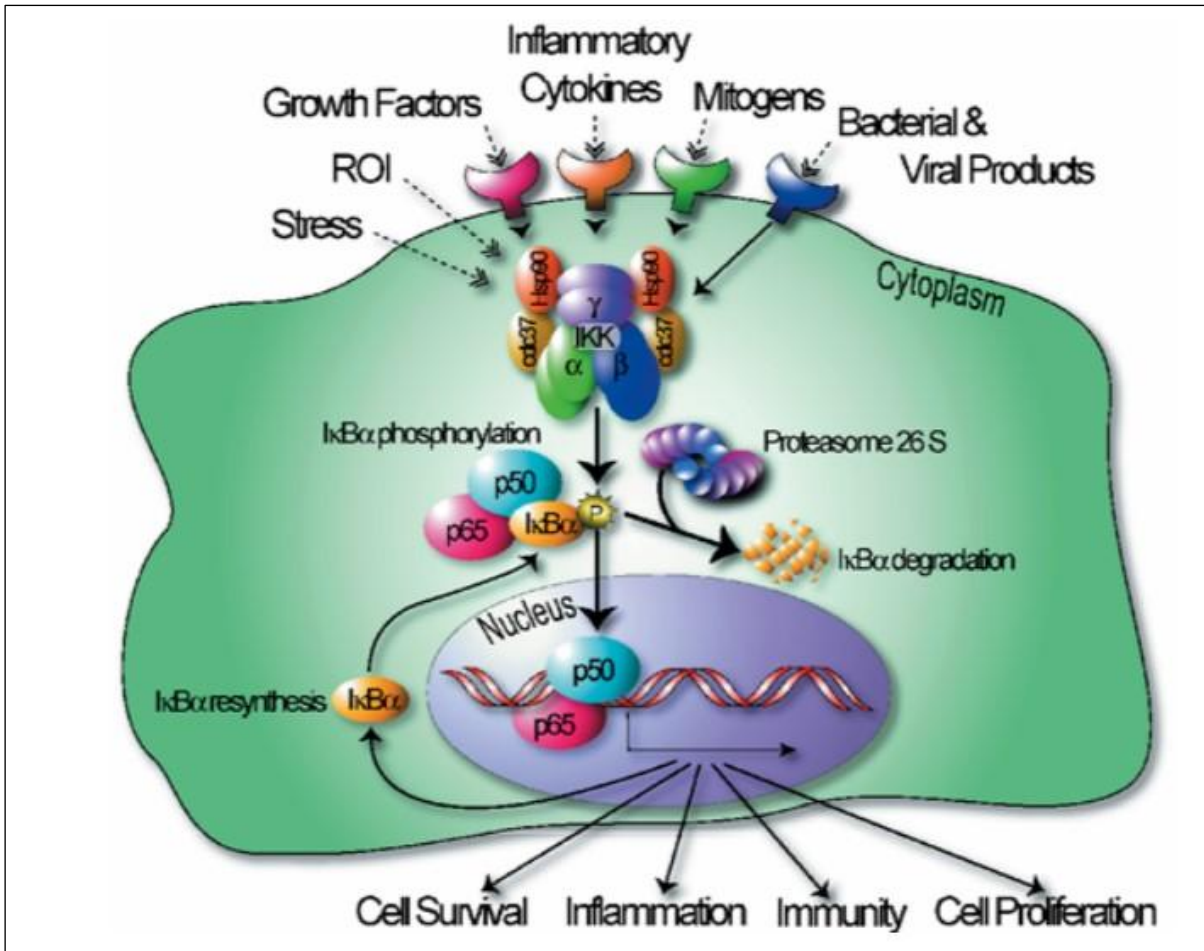
1.8 NF-κB

Ο πυρηνικός παράγοντας κB (NF-κB) είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας και αποτελεί ένα από τα υποστρώματα των MAPK. Ο NF-κB επάγει την έκφραση περισσότερων των 150 γονιδίων τα οποία εμπλέκονται σε ποικίλες κυτταρικές διαδικασίες. Η οικογένεια των NF-κB αποτελείται από 5 μέλη, τις υπομονάδες p50, p52, p65 (RelA), c-Rel και RelB οι οποίες δημιουργούν διάφορα ομοδιμερή και ετεροδιμερή σύμπλοκα, από τα οποία η πιο κοινή μορφή είναι τα ετεροδιμερή p50/RelA και p52/RelA. Τα σύμπλοκα χαρακτηρίζονται από εξειδίκευση πρόσδεσης στο DNA και διαφορετικό δυναμικό ενεργοποίησης. Κάθε μέλος της οικογένειας του NF-κB έχει μια συντηρημένη αμινο-τελική περιοχή, η οποία ονομάζεται Rel-ομόλογη περιοχή και περιέχει την περιοχή δέσμευσης του DNA, την περιοχή μετατόπισης στον πυρήνα και την περιοχή διμερισμού.

Στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους η ανενεργή μορφή των συμπλόκων του NF-κB βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα μέσω της μη ομοιοπολικής αλληλεπίδρασής τους με τις πρωτεΐνες αναστολείς, οι οποίες είναι γνωστές ως IκBs.

Σε απόκριση διαφόρων ερεθισμάτων όπως κυτταροκινών, ικών και βακτηριακών παθογόνων και στρεσογόνων παραγόντων, το ανενεργό κυτταροπλασματικό σύμπλοκο NF-κB / IκBa ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση στα συντηρημένα κατάλοιπα σερίνης στην αμινοτελική περιοχή του IκB. Η φωσφορυλίωση στοχεύει την IκBa για ουβικιτινίωση από το σύμπλοκο SCF-Ουβικιτίνης, το οποίο οδηγεί σε διάσπαση της ανασταλτικής υπομονάδας από το πρωτεάσωμα 26S. Αυτή η διαδικασία ενεργοποιεί τον NF-κB, ο οποίος μετατοπίζεται στον πυρήνα και συνδέεται στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA στον εκκινήτη ορισμένων γονιδίων.

Η ενεργοποίηση του NF-κB αντιπροσωπεύει το τελικό στάδιο του σηματοδοτικού μονοπατιού (signal transduction pathway) από την κυτταρική επιφάνεια στον πυρήνα. Είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί η ενεργοποίηση του NF-κB μέσω της φωσφορυλίωσης των IκBs η οποία πραγματοποιείται από σύμπλοκα τα οποία αναφέρονται ως σύμπλοκο κινάσης IκB (IKK). Το IKK σύμπλοκο αποτελείται από δύο καταλυτικές υπομονάδες (IKK-α και IKK-β) και από τον απαραίτητο ρυθμιστή NEMO/IKK-γ, ο οποίος είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση του NF-κB από διάφορα ερεθίσματα. Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο IKK ενεργοποιεί τις IκB πρωτεΐνες μέσω φωσφορυλίωσης σε κατάλοιπα σερίνης [59].



Εικόνα 1.8: Σηματοδοτικό μονοπάτι του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Τα ετεροδιμερή (p50/RelA) βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και παραμένουν απενεργοποιημένα από τις ανασταλτικές πρωτεΐνες IκBs. Η διέγερση του κυττάρου από διάφορους παράγοντες οδηγεί σε ενεργοποίηση του συμπλόκου IKK. Η φωσφορυλίωση του IκBa από το IKK σύμπλοκο οδηγεί σε ουβικιτινίωση και διάσπαση του IκBa από το πρωτεάσωμα. Ο NF-κB απελευθερώνεται και είναι ελεύθερος να μετατοπιστεί στον πυρήνα, ενεργοποιώντας τη μεταγραφή πολλών γονιδίων, τα οποία εμπλέκονται στον έλεγχο της κυτταρικής διαίρεσης, της επιβίωσης, της φλεγμονής και της ανοσολογικής απόκρισης [59].

1.9 PARP

Η πολυμεράση της ADP-ριβόζης (Poly ADP-Ribose Polymerases, PARP) αποτελεί μέλος μιας οικογένειας ενζύμων η οποία συμμετέχει την μεταφορά της ADP-ριβόζης σε πρωτεΐνες στόχους [60], [61] και χρησιμοποιείται ευρέως σε μελέτες ως δείκτης απόπτωσης. Υπάρχουν τουλάχιστον 18 μέλη της οικογένειας των PARP, τα οποία κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια και είναι ομόλογα στην καταλυτική περιοχή [60]. Αν και κάποιες

ισομορφές, οι οποίες περιλαμβάνουν την PARP1 και PARP2, είναι αρκετά γνωστές για την συμμετοχή τους στην επιδιόρθωση του DNA, είναι γνωστό ότι αυτές και άλλες PARP έχουν έναν πολύ σημαντικό ρόλο σε διάφορες κυτταρικές διαδικασίες συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής διαίρεσης και του κυτταρικού θανάτου [60]. Έχει ταυτοποιηθεί ένας μεγάλος αριθμός κυτταρικών υποστρωμάτων για την PARP και η πλειοψηφία αυτών είναι πυρηνικές πρωτεΐνες, οι οποίες εμπλέκονται στον μεταβολισμό των νουκλεϊκών οξέων, στη ρύθμιση της δομής της χρωματίνης, στη σύνθεση και την επιδιόρθωση του DNA [61]. Επίσης, η PARP μπορεί να τροποποιεί το μόριο της όταν υπάρχουν ασυνέχειες της αλυσίδας DNA και είναι ένας από τους αποδέκτες της πολύ-ADP-ριβόζης *in vivo* [61]. Η PARP1 είναι το πρώτο μέλος που ταυτοποιήθηκε και το περισσότερο μελετημένο από την οικογένεια των PARP. Η PARP2 σχετίζεται περισσότερο με την PARP1 και είναι όμοια κατά 69% στην καταλυτική περιοχή [60].

Η PARP όπως αναφέρθηκε έχει πολύ σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA. Η ακτινοβολία και άλλοι βλαβεροί παράγοντες οι οποίοι οδηγούν σε αλλοιώσεις ή καταστροφή του DNA επάγουν την αύξηση των επιπέδων της PARP στα κύτταρα [62]. Έχει αποδειχθεί ότι το ένζυμο της PARP δεσμεύεται στο σπάσιμο της αλυσίδας του DNA και μετά από αυτό-ριβοζυλίωση, απελευθερώνεται και επιτρέπει την πρόσβαση σε επιδιορθωτικά ένζυμα στο κατεστραμμένο DNA [61], [63], [64].

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Κλινική Βιοχημεία-Μοριακή Διαγνωστική» των τμημάτων Βιολογίας-Χημείας-Νοσηλευτικής και Ιατρικής Σχολής.

Η λείσμανίαση είναι μια πολυσυστημική νόσος, η οποία προσβάλλει πολλά όργανα του οργανισμού-ξενιστή. Τα έως σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν ότι η *Leishmania* προσβάλλει τα κύτταρα της φυσικής ανοσίας (μακροφάγα και δενδριτικά) και έχουν παρατηρηθεί αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου σε διάφορα όργανα, όπως ο μυελός των οστών και το ήπαρ. Δεν είχε αναφερθεί όμως ποτέ έως τώρα η προσβολή του καρδιακού ιστού και η μόλυνση των καρδιακών κυττάρων από το παράσιτο.

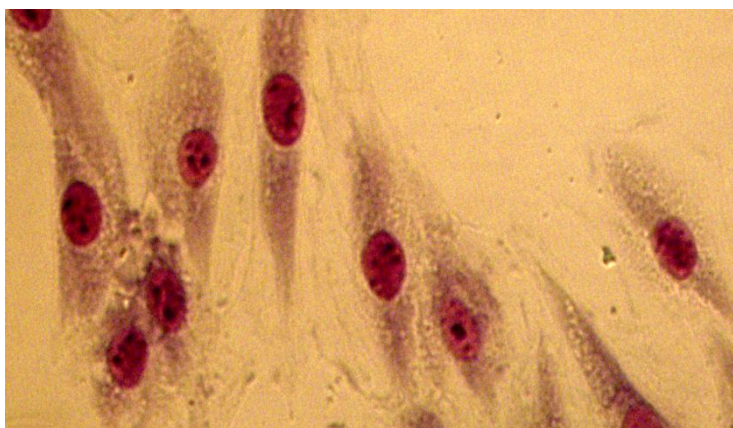
Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν: α) η διερεύνηση της ικανότητας παρασιτικής επιμόλυνσης *in vitro* μιας καρδιακής κυτταρικής σειράς και της δυνατότητας πολλαπλασιασμού του παρασίτου σε αυτή. Για την επιμόλυνση χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος GH8 της *Leishmania infantum* και β) αφού διασαφηνίσθηκε ότι τα κύτταρα μολύνονται η διερεύνηση συγκεκριμένων σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία συμμετέχουν σε συγκεκριμένες διεργασίες του κυττάρου, όπως είναι η επιβίωση σε φυσιολογική κατάσταση του κυττάρου και η απόπτωση σε παθολογική. Τα μονοπάτια αυτά είναι ζωτικής σημασίας για το κύτταρο καθώς συμμετέχουν στην μεταγωγή μηνυμάτων από την επιφάνεια του κυττάρου στον πυρήνα. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία μελετήθηκαν ήταν των MAPK και συγκεκριμένα των p-p38 και ERKs επίσης, μελετήθηκε η ενεργοποίηση της poly-ADP-ριβόζης (PARP), η οποία έχει αναφερθεί ότι είναι ένας αποπτωτικός δείκτης και η μελέτη του μεταγραφικού πυρηνικού παράγοντα κB (NF-κB).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΥΛΙΚΑ

2.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ H9c2

Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά των καρδιακών μυοβλαστών H9c2 [65], η οποία προέρχεται από εμβρυϊκό κόλπο αρουραίου του είδους *Rattus Norvegicus*. Η κυτταρική σειρά H9c2 αποτελεί μια εναλλακτική μέθοδο μελέτης των καρδιακών κυττάρων έναντι των πρωτογενών καρδιακών κυττάρων [66]–[69]. Η χρήση της κυτταρικής σειράς είναι μια αξιόλογη εναλλακτική μέθοδος για μελέτες, οι οποίες αφορούν την καρδιά και παρουσιάζει το πλεονέκτημα της αποφυγής της θυσίας μεγάλου αριθμού πειραματοζώων. Επίσης, ένα άλλο πλεονέκτημα της χρήσης της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς είναι ότι μπορεί να διατηρηθεί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σχέση με την *in vitro* διατήρηση των πρωτογενών καρδιακών κυττάρων.

Τα καρδιακά κύτταρα της κυτταρικής σειράς H9c2 παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες με τα πρωτογενή καρδιακά κύτταρα όσον αφορά την μορφολογία της μεμβράνης, την έκφραση των πρωτεϊνών του g-σηματοδοτικού μονοπατιού και τις ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες. Η κυτταρική σειρά H9c2 έχει την ιδιότητα του πολλαπλασιασμού κάτι που τη διαφοροποιεί από τα πρωτογενή καρδιακά κύτταρα, τα οποία έχουν χάσει την δυνατότητα του πολλαπλασιασμού [70].



ΕΙΚΟΝΑ 2.1: Απεικόνιση της μορφολογίας των H9c2 κυττάρων σε οπτικό μικροσκόπιο μετά από χρώση Giemsa

2.2 ΟΡΓΑΝΑ

Όργανο	Μοντέλο	Εταιρεία
Υδατόλουτρο	Bioline	Scientific
Ηλεκτρικές πιπέτες	Accu-jet pro	Brand
Πιπέτα μεταβλητού όγκου 10 μl		Brand
Πιπέτες μεταβλητού όγκου 1000 μl, 200 μl, 20 μl	Pipetman P1000, P200, P20	Gilson
Ανάστροφο μικροσκόπιο	Tokyo CK	Olympus
Κλίβανος 37° C, 5% CO ₂	New Brunswick Galaxy 170 S CO2	Eppendorf
Κλίβανος 26° C		
Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής		Telstar
Πλάκα μικροσκοπικής αιμοκυτταρομέτρησης Malassez	Wschrech	Hofhein/ts
Επιτραπέζια μικροφυγόκεντρος	Heraeus Biofuge 13 Sepatech	Hyland Scientific
Οπτικό μικροσκόπιο	Leitz Laborlux D	Leitz Wetzlar
Οπτικό μικροσκόπιο	BH	Olympus
Ψυχόμενη επιτραπέζια μικροφυγόκεντρος	5417R	Eppendorf
Ψυχόμενη επιτραπέζια φυγόκεντρος	Jouan BR4i	Thermo Fisher Scientific
Ελαιοκαταδυτικό μικροσκόπιο	Laborlux D	Sony
Αναδευτήρας τύπου Vortex	Heiddph Top-mix	Bioblock

	94323	
Αναδευτήρας τύπου Vortex	MS2	Thermo Fisher Scientific
Ζυγός ακριβείας	KERN 410	KERN
Μικροζυγός ακριβείας	Kern 430-33	Albstadt
Αναλυτικός ζυγός	PM4600	Mettler
Φασματοφωτόμετρο	Ultraspect 2000	Pharmacia Biotech
Υλικά για το στήσιμο της συσκευής / Casting		Bio-Rad
Γυάλινες πλάκες	1653310	Bio-Rad
Συσκευή μικρού μεγέθους για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών	Mini Protean II	Bio-Rad
Τροφοδοτικό	Power Pac 300 και Power Pac 1000	Bio-Rad
Ανακινούμενη πλάκα	Promax 2020	Heidolph
Χαρτιά Whatman 30×60cm		Macherey-nagel
Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με διαστάσεις 0,3×3mm και πόρους 0,45μm	741280	Macherey-nagel
Συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	Trans-blot SD	Bio-Rad
Σακουλοποιός	Severin 3602	
Πεχάμετρο (pH/Mv/Temp Meter)	PL-600	
Πεχάμετρο	Orion 3 Star pH Benchtop Meter	Thermo Fisher Scientific

2.3 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

Αναλώσιμα Υλικά	Εταιρεία
Αντικειμενοφόροι πλάκες	Thermo Fisher Scientific
Γυάλινες λαμέλες	
Γυάλινες πιπέτες Pasteur	
Καλυπτρίδες	Knittel Gluss
Πλάκα καλλιέργειας κυττάρων 24 φρεατίων	Greiner Bio-one
Πλαστικά ακρορύγχια	Greiner Bio-one
Πλαστικά ξύστρα κυττάρων μήκους 28 cm	Greiner Bio-one
Πλαστικά ορολογικά σιφώνια όγκου 2 ml, 5 ml, 10 ml	Greiner Bio-one
Πλαστικές πιπέτες Pasteur	
Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες όγκου 1,5 ml, 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-one
Φιάλες κυτταροκαλλιέργειας εμβαδού 25 cm ² και 75 cm ²	Greiner Bio-one
Parafilm M	Neenah, WI

2.4 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

2.4.1.Θρεπτικά υλικά

- **Θρεπτικό μέσο DMEM 1X** (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (#41966029, Gibco).
- **Ορός εμβρύου βοός** (Fetal Bovine Serum, FBS). Ο ορός FBS πριν χρησιμοποιηθεί αδρανοποιείται για 30 λεπτά στους 56 °C και στη συνέχεια διατηρείται στους -20 °C (Gibco, Invitrogen).
- **Θρεπτικό μέσο RPMI-1640 1X** (Rosewell Park Memorial Institute) (#L0501-100, Biowest).

2.4.2 Χημικά αντιδραστήρια

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων PBS.**
- **Διάλυμα τρυψίνης-EDTA 10%** v/v διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS.
- **Διάλυμα HEPES 1M** (#L0180-100, Biowest).
- **Διάλυμα αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης 100X** (#L0022-020, Biowest).
- **Διάλυμα διμεθυσουλφοξειδίου**, (Dimethyl sulfoxide, DMSO, Applichem GmbH).
- **Φορμαλίνη** (Riedel-deHaen, Sigma-Aldrich).
- **Υδατικό διάλυμα αιθανόλης 70%** v/v. Η αιθανόλη χρησιμοποιείται προκειμένου να αποφευχθούν οι οποιεσδήποτε μολύνσεις στα δείγματα των πειραμάτων και στις φλάσκες στις οποίες διατηρούνται τα κύτταρα και τα παράσιτα.
- **Διάλυμα χρωστικής Giemsa** (Giemsa azur eosin methylene blue solution, (#1092040500, Merck).
- **Πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης ορού βοδιού**, BSA, Bovine Serum Albumin, (#7M007605, Biochemica Applichem).
- **Αντιδραστήριο Bradford** (#A6932005, AppliChem).
- **Πρωτεϊνικοί δείκτες γνωστού μοριακού βάρους** (11-245 kDa, #P77125, BioLabs).
- **Χρωστική Ponceau S** που περιέχει 0,1% w/v Ponceau και 5%(v/v) οξικό οξύ.
- Αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη στιγμιαίας διάλυσης, **Regilait CS.**
- **ECL**, Western Blotting Detection Reagents (#RPN2209GE Healthcare).

- Διάλυμα εμφάνισης φιλμ (#1900943, Kodax GBX).
- Διάλυμα μονιμοποίησης φιλμ (#1901875, Kodax GBX).
- Φωτογραφικό φιλμ (Fuji Medical X-ray Film, super RX 18×24cm) (#4741008389, Kodax GBX).

2.4.3 Αντισώματα

- **Phosho-p44/42 MAPK (ERK1/2)(Thr202/Tyr204) Antibody:** Πολυκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε κουνέλι και αναγνωρίζει την φωσφορυλιωμένη μορφή των ERK1/2, Πιο συγκεκριμένα αναγνωρίζει την p44 και p42 MAP Κινάση (ERK1 και ERK2) όταν είναι φωσφορυλιωμένες είτε μεμονωμένα είτε ταυτόχρονα στα αμινοξέα Thr202 και Tyr204 της ERK1 και Thr185 και Tyr187 της ERK2, (#9101, Cell Signalling).
- **Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) Antibody:** Πολυκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε κουνέλι και αναγνωρίζει την φωσφορυλιωμένη μορφή της p38 (phosho-p38) δηλαδή όταν αυτή είναι φωσφορυλιωμένη στα κατάλοιπα θρεονίνη 180 και τυροσίνη 182, (#9211, Cell Signaling).
- **Phospho-NF-κB p65 (Ser536) Antibody:** Πολυκλωνικό αντίσωμα το οποίο παρασκευάζεται σε κουνέλι και αναγνωρίζει την φωσφορυλιωμένη μορφή του NF-κB. Πιο συγκεκριμένα, αναγνωρίζει την φωσφορυλιωμένη μορφή της υπομονάδας p65 του NF-κB όταν φωσφορυλιωθεί στην σερίνη 536, (#3031, Cell Signalling).
- **PARP Antibody:** Πολυκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε κουνέλι το οποίο αναγνωρίζει την πλήρους μήκους PARP1 (116 kDa), όπως επίσης και το θραύσμα (89kDa) της PARP1 το οποίο προκύπτει από την δράση της κασπάσης, (#9542, Cell Signalling).
- **β-Actin (13E5) Rabbit mAb:** Μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε κουνέλι και αναγνωρίζει την αμινοτελική περιοχή της ακτίνης, (#4970, Cell Signalling).
- **Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP:** Δευτερογενές πολυκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε αίγα έναντι των ανοσοσφαιρινών κουνελιού, συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση του άγριου ραπανιού (#P0448, Dako).

2.5 ΣΥΣΤΑΣΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Πλήρες θρεπτικό μέσο για την καλλιέργεια των κυττάρων-DMEM

- DMEM 1X το οποίο περιέχει 4,5 g/L D-Γλυκόζη, 584 mg/L L-γλουταμίνη και 110 mg/L πυροσταφυλικό
- 100 U/ml πενικιλίνη
- 100 μg/ml στρεπτομυκίνη
- 10 mM HEPES
- 10% (v/v) θερμικά απενεργοποιημένος ορός εμβρύου βοός

Πλήρες θρεπτικό μέσο για την καλλιέργεια των παρασίτων-RPMI

- RPMI-1640 1X
- 2 mM L-γλουταμίνη
- 100 U/ml πενικιλίνη
- 100 μg/ml στρεπτομυκίνη
- 10 mM HEPES
- 10% (v/v) απενεργοποιημένος ορός εμβρύου βοός

Ρυθμιστικό διάλυμα Φωσφορικών αλάτων (PBS) 10X, pH 7,4

- 1,37 mM χλωριούχο νάτριο
- 27 mM χλωριούχο κάλιο
- 43 mM όξινο φωσφορικό νάτριο
- 14 mM δισόξινο φωσφορικό κάλιο

Διάλυμα για τη λύση των κυττάρων (Buffer G)

- 20 mM β-γλυκεροφωσφορικό
- 20 mM Tris-(υδροξυμέθυλο)-αμινομεθάνιο
- 2 mM αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
- 10 mM βενζαμιδίνη

- 20 mM φθοριούχο νάτριο
- 0,2 mM βαναδικό νάτριο

Πριν την χρήση του διαλύματος λύσης προστίθενται οι παρακάτω αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών:

- 200 mM λευπεπτίνη
- 10 mM E-64
- 5 mM διθειοθρεϊτόλη
- 300 mM φαινυλομεθυλοσουλφονυλοφθορίδιο

Τέλος γίνεται η προσθήκη του απορρυπαντικού Triton X-100 σε περιεκτικότητα 0.5% v/v.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

1. Διάλυμα για την παρασκευή πηκτώματος διαχωρισμού 10% v/v σε ακρυλαμίδη

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ
➤ Διάλυμα ακρυλαμιδίου/δισ-ακρυλαμιδίου 10% w/v	3,33ml
➤ Δωδεκακυλο-θειικό νάτριο 10 % w/v	0,1 ml
➤ Tris-(υδροξυμέθυλο)-αμινομεθάνιο 1,5 M, pH 8,8	2,5 ml
➤ υπερθειικό αμμώνιο 0,15% w/v	75 μl
➤ NNN'N'-τετραμέθυλο-αιθυλενοδιαμίνη 0,07% v/v	10 μl
➤ Νερό δισ απεσταγμένο	3,98 ml

2. Διάλυμα για την παρασκευή πηκτώματος επιστοίβαξης 6% v/v σε ακρυλαμίδη

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ
➤ Νερό δισ απεσταγμένο	3,29 ml

➤ Διάλυμα ακρυλαμιδίου/δισ-ακρυλαμιδίου 30% w/v	1 ml
➤ Δωδεκακυλο-θειϊκό νάτριο 10%,	5μl
➤ Tris-(υδροξυμέθυλο)-αμινομεθάνιο 1 M, pH 6,8	0,625 ml
➤ Υπερθειϊκό αμμώνιο	25 μl
➤ NNN'N'-τετραμέθυλο-αιθυλενοδιαμίνη	5 μl

3.Διάλυμα για την παρασκευή πηκτώματος διαχωρισμού 8% v/v σε ακρυλαμίδα

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ
➤ δισ απεσταγμένο νερό	2,33 ml
➤ Διάλυμα ακρυλαμίδης 30% w/v	1,33 ml
➤ δωδεκακυλο-θειϊκό νάτριο	50 μl
➤ Tris-(υδροξυμέθυλο)-αμινομεθάνιο 1,5 M, pH 8,8	1,25 ml
➤ Υπερθειϊκό αμμώνιο	37,5 μl
➤ NNN'N'-τετραμέθυλο-αιθυλενοδιαμίνη	5 μl

4.Διάλυμα για την παρασκευή πηκτώματος επιστοίβαξης 6% v/v σε ακρυλαμίδα

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ
➤ δισ απεσταγμένο νερό	1,647 ml
➤ διαλύματος ακρυλαμίδης 30% w/v	0,5 ml
➤ δωδεκακυλο-θειϊκό νάτριο 10%	0,025 ml
➤ Tris-(υδροξυμέθυλο)-αμινομεθάνιο 1 M, pH 6.8	0,313 ml
➤ N,N,N, N'-τετραμέθυλο-αιθυλενοδιαμίνη	0,002 ml

➤ υπερθειϊκό αμμώνιο	0,012 ml
----------------------	----------

5.Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10X (Running buffer), 1L

- 250 mM Tris-(υδροξυμέθυλο)-αμινομεθάνιο
- 1918 mM γλυκίνη

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X (Running Buffer),1L

- 10 % v/v Running Buffer 10X
- 1 % v/v δωδεκακυλο-θειικό νάτριο

Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών 1X (για πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους, Transfer Buffer), 1L

- 25 mM Tris -(υδροξυμέθυλο)-αμινομεθάνιο
- 192 mM γλυκίνη
- 20% v/v μεθανόλη

Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών pH 9,2 (για πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους, Transfer Buffer), 1L

- 40 mM Tris-(υδροξυμέθυλο)-αμινομεθάνιο, pH 7,6
- 1,3 mM δωδεκακυλο-θειϊκό νάτριο 10%
- 39 mM γλυκίνη
- 20% v/v μεθανόλη

Ρυθμιστικό διάλυμα TBS 10X, pH 7,6 ,1L

- 200 mM Tris
- 1370 mM χλωριούχο νάτριο

Ρυθμιστικό Διάλυμα TBS-Tween 0,05% v/v ,1L

- 0,05% v/v μη ιονικό απορρυπαντικό Tween
- 10% v/v TBS 10X

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

3.1.1 Αποστείρωση

Όλες οι διεργασίες για την διατήρηση της κυτταρικής σειράς H9c2 πραγματοποιούνται σε ειδικούς θαλάμους κάθετης νηματικής ροής επιπέδου ασφαλείας 2, οι οποίοι διατηρούν άσηπτες συνθήκες για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Στον θάλαμο νηματικής ροής επιπέδου 2 υπάρχουν ειδικά φίλτρα HEPA, τα οποία διοχετεύουν τον φιλτραρισμένο αέρα προς κατάλληλες κατευθύνσεις.

Καθημερινά, και προτού πραγματοποιηθεί οποιαδήποτε πειραματική διαδικασία στους θαλάμους νηματικής ροής επιπέδου ασφαλείας 2, καθώς και στο χώρο του εργαστηρίου ενεργοποιείται UV ακτινοβολία, για 15 λεπτά. Αυτό γίνεται, για να πραγματοποιηθεί αποστείρωση του θαλάμου και του εργαστηρίου προκειμένου οι συνθήκες να διατηρηθούν άσηπτες.

Επιπρόσθετα, προκειμένου να αποφευχθεί η πιθανότητα μόλυνσης, οι πιπέτες, τα τρυβλία και τα καλλιεργητικά δοχεία είναι αποστειρωμένα, και προτού τοποθετηθεί οποιοδήποτε αντικείμενο στον θάλαμο νηματικής ροής ψεκάζεται προηγουμένως με αιθανόλη 70% v/v. Αυτό γίνεται και μετά το τέλος κάθε διαδικασίας που εκτελείται στον θάλαμο. Επίσης, το διάλυμα φωσφορικών αλάτων το οποίο χρησιμοποιείται κατά την διαδικασία της διατήρησης των κυττάρων αποστειρώνεται με υγρή θερμότητα με την χρήση του αυτόκαυστου προκειμένου να επιτευχθεί η νέκρωση των περισσότερων μικροοργανισμών.

3.1.2 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς καρδιακών μυοβλαστών H9c2

Η κυτταρική σειρά καρδιακών μυοβλαστών H9c2 με κωδικό CRL-1446 αγοράστηκε από την εταιρεία ATCC (American Type Culture Collection)

Η κυτταρική σειρά H9c2 διατηρείται σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37° C, 5% CO₂. Οι συγκεκριμένες συνθήκες καθώς και η υγρασία η οποία επικρατεί στον κλίβανο επιτρέπουν την προσκόλληση των κυττάρων στον πυθμένα του καλλιεργητικού δοχείου, τον πολλαπλασιασμό τους και την δημιουργία ενός μονοκυτταρικού στρώματος. Η διατήρηση των κυττάρων γίνεται σε φλάσκες επιφάνειας 75 cm².

Ως καλλιεργητικό μέσο ανάπτυξης της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς χρησιμοποιείται το θρεπτικό μέσο DMEM παρουσία 10% v/v θερμικώς απενεργοποιημένου ορού εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum-FBS) και αντιβιοτικών (πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη). Το θρεπτικό υλικό σε συνδυασμό με τον ορό είναι απαραίτητο για την κάλυψη των αναγκών των κυττάρων σε θρεπτικά συστατικά, ενώ τα αντιβιοτικά προστίθεται στο θρεπτικό μέσο προς αποφυγή μολύνσεων.

Η ανακαλλιέργεια των H9c2 κυττάρων γίνεται προτού η πυκνότητα των κυττάρων ξεπεράσει το 60-70 % κάλυψης της επιφάνειας καλλιέργειας καθώς τότε τα κύτταρα σχηματίζουν μυσωλήνες λόγω της υψηλής τους πυκνότητας. Τα H9c2 κύτταρα ελέγχονται στο ανάστροφο μικροσκόπιο σε καθημερινή βάση και η ανακαλλιέργεια των H9c2 κυττάρων γίνεται κάθε 2-3 ημέρες. Η διαίρεση των H9c2 κυττάρων πραγματοποιείται μετά από έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Phosphate Buffer Solution, PBS) προκειμένου να απομακρυνθούν όλα τα υπολείμματα ορού, ο οποίος απενεργοποιεί το ένζυμο της θρυψίνης. Στην συνέχεια προστίθεται διάλυμα θρυψίνης (0,05% v/v EDTA) σε PBS με σκοπό να αποκολληθούν τα H9c2 κύτταρα από τον πυθμένα του καλλιεργητικού μέσου. Ακολουθεί αναμονή 1-2 λεπτά και έλεγχος των H9c2 κυττάρων στο ανάστροφο μικροσκόπιο. Όταν τα H9c2 κύτταρα δεν αποκολλώνται εύκολα, γίνεται χρήση του ειδικού ξύστρου προκειμένου να αποκολληθούν μηχανικά. Τέλος προστίθεται το πλήρες θρεπτικό μέσο για να τερματιστεί η αντίδραση της θρυψίνης και στην συνέχεια το εναιώρημα των H9c2 κυττάρων διαμοιράζεται σε αποστειρωμένη φλάσκα ή τρυβλίο και συμπληρώνεται με πλήρες θρεπτικό μέσο σε κατάλληλο τελικό όγκο.

Η μέτρηση των H9c2 κυττάρων γίνεται σε αιμοκυτταρόμετρο τύπου Malassez. Χρησιμοποιείται αραιώση 1:10 προσθέτοντας 20 μl εναιωρήματος κυττάρων σε 180 μl χρωστικής Trypan Blue. Μετρώνται όλα τα τετράγωνα που υπάρχουν στην αντικειμενοφόρο πλάκα και υπολογίζεται η συγκέντρωση των κυττάρων από τον τύπο:

$$C_{H9c2/ml} = \frac{\text{Αριθμός καρδιακών μυοβλαστών}}{\text{Αριθμός μετρήσιμων τετραγώνων}} \times 10^5 \times \text{Αντίστροφο λόγου αραιώσης}$$

3.1.3 Διατήρηση κυτταρικής σειράς καρδιακών μυοβλαστών H9c2

Η διαδικασία "ψύξης" των H9c2 κυττάρων είναι απαραίτητη για την διατήρησή τους για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Για τον σκοπό αυτό αρχικά προστίθεται θρυψίνη με σκοπό

την επίτευξη αποκόλλησης των H9c2 κυττάρων. Στην συνέχεια προστίθεται πλήρες θρεπτικό μέσο (90% v/v DMEM, 10% v/v FBS) στο εναιώρημα των H9c2 κυττάρων το οποίο φυγοκεντρείται στις 1300 rpm, για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία 25° C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται ενώ το ίζημα που προκύπτει επαναιωρείται σε θρεπτικό μέσο για την διατήρηση των H9c2 κυττάρων στο υγρό N₂ το οποίο περιέχει 5 % v/v DMSO και 95% v/v FBS. Στην συνέχεια προστίθεται 1 ml σε κάθε κρυοφιαλίδιο και μεταφέρονται σε ειδικό δοχείο το οποίο επιτρέπει την σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας. Την επόμενη μέρα τα κρυοφιαλίδια μεταφέρονται στην ειδική φιάλη υγρού αζώτου, όπου και διατηρούνται. Η αλλαγή της θερμοκρασίας γίνεται σταδιακά.

Η διαδικασία της "απόψυξης" των H9c2 κυττάρων σε αντίθεση με την διαδικασία της "ψύξης" απαιτεί απότομη αλλαγή της θερμοκρασίας. Το κρυοφιαλίδιο το οποίο περιέχει τα παγωμένα H9c2 κύτταρα τοποθετείται στους 37°C στο υδατόλουτρο. Στην συνέχεια το περιεχόμενο της αμπούλας τοποθετείται σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου falcon χωρητικότητας 15 ml στον οποίο έχουν προστεθεί 7 ml πλήρους θρεπτικού μέσου (10% v/v FBS, 90% v/v DMEM). Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 25°C, για 10 λεπτά, στις 1300 rpm . Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναιωρείται σε πλήρες θρεπτικό μέσο (15% v/v FBS, 85% v/v DMEM) και μεταφέρεται σε καλλιεργητικό δοχείο επιφάνειας 75 cm² και τοποθετείται στον επωαστικό κλίβανο. Την επόμενη ημέρα γίνεται αλλαγή του πλήρους θρεπτικού μέσου (10% v/v FBS, 90% v/v DMEM).

3.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ

3.2.1 Παράσιτο *Leishmania Infantum* (στέλεχος GH8)

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος MHOM/GR/2001/GH8 που ανήκει στο είδος *Leishmania infantum*, ζυμόδεμα MON-1. Το στέλεχος GH8 είχε απομονωθεί στην Ελλάδα από ανθρώπινο ξενιστή και εμφάνισε ανθεκτικότητα σε φαρμακευτική αγωγή.

3.2.1.1 Καλλιέργεια παρασίτου *Leishmania infantum*

Οι προμαστιγώτες της *Leishmania infantum* διατηρούνται σε επωαστικό κλίβανο, σταθερής θερμοκρασίας 25° C, απουσία CO₂.

Ως καλλιεργητικό μέσο ανάπτυξης χρησιμοποιείται το θρεπτικό μέσο Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640, Biowest) το οποίο εμπλουτίζεται με 10% v/v θερμικός απενεργοποιημένου ορού βοδιού, αντιβιοτικά (πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη) και το ρυθμιστικό διάλυμα HEPES. Η διατήρηση των παρασίτων γίνεται σε αποστειρωμένες καλλιεργητικές φιάλες εμβαδού 25 cm².

Τα παράσιτα επωάζονται για 4-5 ημέρες στον επωαστικό κλίβανο ανάλογα με την αρχική συγκέντρωση της καλλιέργειας (συνήθως 3×10⁶ παράσιτα/ml) και την επιθυμητή ημέρα πειραματικής μόλυνσης. Μετά το πέρας του κατάλληλου χρονικού διαστήματος, οι προμαστιγώτες, οι οποίοι βρίσκονται σε στατική φάση ανάπτυξης εμβολιάζονται υπό άσηπτες συνθήκες σε νέα αποστειρωμένη καλλιεργητική φιάλη, η οποία περιέχει κατάλληλο όγκο πλήρους θρεπτικού μέσου.

Προκειμένου να προσδιοριστεί τόσο η συγκέντρωση της καλλιέργειας, όσο και ο αριθμός των αμαστιγωτών μορφών της *Leishmania*, ο οποίος θα πρέπει να εμβολιαστεί στο πλήρες θρεπτικό μέσο, θα πρέπει η παρασιτική καλλιέργεια να μετρηθεί σε αιμοκυτταρόμετρο Malassez. Για να γίνει η μέτρηση των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *Leishmania infantum* προστίθενται σε πλαστικό σωλήνα τύπου erpendorf διάλυμα τελικού όγκου 0,2 ml το οποίο περιέχει 185 μl χρωστικής trypan blue προκειμένου να διαχωριστούν τα νεκρά από τα ζωντανά παράσιτα, καθώς η χρωστική trypan blue έχει την ικανότητα να χρωματίζει τα νεκρά παράσιτα με σκούρο μπλε χρώμα, 5 μl φορμαλίνης προκειμένου να ακινητοποιηθούν τα παράσιτα, καθώς και 10 μl από το εναιώρημα που βρίσκεται στην φλάσκα. Η αραιώση που χρησιμοποιείται είναι 1:20. Στην συνέχεια, γίνεται προσεκτική ανάδευση του δείγματος και 15 μl προστίθενται ανάμεσα από την καλυπτρίδα και την πλάκα του αιμοκυτταρόμετρου. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία φυσαλίδων. Επίσης, είναι αναγκαία η ομοιόμορφη κατανομή του δείγματος στο αιματοκυτταρόμετρο προς αποφυγή σφαλμάτων.

Οι προμαστιγωτές μορφές της *Leishmania* μετρώνται σε 10 τετράγωνα του αιματοκυτταρόμετρου και προσδιορίζεται η συγκέντρωση της καλλιέργειας με τον εξής τύπο:

$$C_{\text{παρασίτου/mL}} = \frac{\text{Αριθμός μετρούμενων παρασίων}}{\text{Αριθμός Τετραγώνων}} \times \text{Αντίστροφο Λόγου Αραίωσης} \times 10^5$$

Μετά το πέρας 8 ανακαλλιέργειών, το παράσιτο απορρίπτεται, καθώς όπως έχει αποδειχθεί από προηγούμενες μελέτες στο Εργαστήριο Ανοσολογίας Λοιμώξεων του Ε.Ι.Π., οι προμαστιγώτες δεν καθίσταται μολυσματικοί πέραν αυτού του διαστήματος.

Η απόρριψη της καλλιέργειας του παρασίτου πραγματοποιείται μετά από προσθήκη αραιωμένης χλωρίνης στο καλλιεργητικό δοχείο. Μετά από την πάροδο 20 λεπτών, το παράσιτο το οποίο έχει θανατωθεί απορρίπτεται στον νεροχύτη υπό τρεχούμενο νερό.

Όλες οι πειραματικές διαδικασίες γίνονται σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής προκειμένου να διατηρούνται οι άσηπτες συνθήκες και να μην υπάρχουν επιμολύνσεις των παρασιτικών καλλιεργειών.

3.2.1.2 Προσδιορισμός στατικής φάσης καλλιέργειας

Ο σχεδιασμός της καμπύλης ανάπτυξης είναι ένα αναγκαίο βήμα για τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού των παρασίτων αλλά και της βιωσιμότητάς τους. Σε όλα τα πειράματα μόλυνσης της παρούσας έρευνας χρησιμοποιήθηκαν προμαστιγώτες της *Leishmania infantum*, οι οποίοι βρίσκονται στην στατική φάση, καθώς τότε υπάρχουν οι περισσότερες μετακυκλικές μορφές του παρασίτου, οι οποίες είναι οι μολυσματικές μορφές. Προκειμένου να προσδιορισθεί η ημέρα κατά την οποία το παράσιτο *Leishmania infantum* εξέρχεται από την εκθετική φάση και εισέρχεται στην στατική φάση της καλλιέργειας κατασκευάζεται η καμπύλη ανάπτυξης. Πραγματοποιείται καλλιέργεια του παρασίτου με αρχική συγκέντρωση 3×10^6 *Leishmania/ml* ή $3,5 \times 10^6$ *Leishmania/ml* και υπολογίζεται η συγκέντρωση του παρασίτου καθημερινά έως ότου σταθεροποιηθεί. Σχεδιάζεται η καμπύλη ανάπτυξης.

3.2.1.3 Διατήρηση παρασίτου *Leishmania Infantum*

Στο Εργαστήριο Ανοσολογίας Λοιμώξεων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ είχαν απομονωθεί και διατηρηθεί σε φιάλες υγρού αζώτου στελέχη GH8 του παρασίτου *Leishmania infantum*.

Για την απόψυξη του στελέχους GH8 της *Leishmania infantum* το κρυοφυσάλιο τοποθετείται για 1-2 λεπτά στο υδατόλουτρο. Ακολούθως, το περιεχόμενο της αμπούλας προστίθεται σε 10 ml πλήρους θρεπτικού μέσου (RPMI 90% v/v, FBS 10% v/v) σε

δοκιμαστικό σωλήνα τύπου falcon και επωάζεται για μία ώρα στον κλίβανο σε συνθήκες θερμοκρασίας 27°C, απουσίας CO₂. Το παρασιτικό εναιώρημα φυγοκεντρείται στις 1500 rpm, σε θερμοκρασία 25° C, για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα που προκύπτει επαναιωρείται σε καινούριο θρεπτικό μέσο (90% v/v RPMI, 10% v/v FBS), ώστε να γίνει έκπλυση του DMSO το οποίο είναι κυτταροτοξικό. Τέλος προστίθεται σε νέα αποστειρωμένη καλλιεργητική φιάλη εμβαδού 25 cm² και τοποθετείται στον κλίβανο προς επώαση.

Οι προμαστιγώτες της *Leishmania infantum* μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε ειδικές φιάλες-τανκ οι οποίες περιέχουν υγρό άζωτο.

Αρχικά 10 ml καλλιέργειας η οποία βρίσκεται στην στατική φάση φυγοκεντρώνται στις 1600 rpm, για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία 25°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα που προκύπτει, επαναιωρείται σε 2 ml ειδικού κρυοπροστατευτικού διαλύματος (70% v/v RPMI-1640, 20% v/v FBS, 10% v/v DMSO). Το κρυοπροστατευτικό μέσο προστατεύει τα παράσιτα από καταστροφή λόγω της κρυστάλλωσης του νερού. Στην συνέχεια το εναιώρημα των παρασίτων με το κρυοπροστατευτικό διάλυμα μεταφέρεται σε κρυοφιαλίδια τα οποία τοποθετούνται σε θερμοκρασία -80°C για 24 ώρες στο ειδικό δοχείο Mr. Frosty το οποίο επιτρέπει την σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας. Πιο συγκεκριμένα η θερμοκρασία μειώνεται κατά 1° C ανά λεπτό. Την επόμενη ημέρα τα κρυοφιαλίδια τοποθετούνται σε κάνιστρα που βρίσκονται μέσα στο ειδικό τανκ που περιέχει το υγρό άζωτο έτσι ώστε να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα.

3.3 ΜΟΛΥΝΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ H9c2 ΜΕ ΤΟ ΠΑΡΑΣΙΤΟ LEISHMANIA INFANTUM

3.3.1 Προσδιορισμός βέλτιστης αναλογίας μόλυνσης (κύτταρα/παράσιτα)

Καθώς δεν είχε μελετηθεί ως τώρα η μόλυνση των H9c2 κυττάρων με το παράσιτο *L.infantum*, δεν υπήρχε κάποιο πρωτόκολλο για πειραματική μόλυνση του συγκεκριμένου τύπου κυττάρων σε βιβλιογραφικές αναφορές. Γι' αυτό τον λόγο το πρωτόκολλο, το οποίο εφαρμόσαμε ήταν το πρωτόκολλο μόλυνσης των μακροφάγων και των δενδριτικών κυττάρων με την *L.infantum*, το οποίο είχε χρησιμοποιηθεί σε παλαιότερες έρευνες στο Εργαστήριο Ανοσολογίας Λοιμώξεων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ.

Για την εκτίμηση της πορείας της μόλυνσης των H9c2 κυττάρων, τον προσδιορισμό του παρασιτικού φορτίου και την παρακολούθηση της κινητικής της μόλυνσης έγινε εφαρμογή του παρακάτω πειραματικού πρωτοκόλλου.

Τα H9c2 κύτταρα επιστρώνονται σε καλλιεργητικές πλάκες 24 φρεατίων και καλλιεργούνται σε 0,5 ml θρεπτικού μέσου DMEM, σε συγκέντρωση 4×10^5 κύτταρα/ml. Στα φρεάτια των καλλιεργητικών πλακών έχουν τοποθετηθεί αποστειρωμένες λαμέλες. Τα H9c2 κύτταρα επωάζονται για 2 ώρες σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37° C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ και 95% O₂, προκειμένου να επιτευχθεί προσκόλληση στον πυθμένα των φρεατίων. Στην συνέχεια τα H9c2 κύτταρα εκτίθενται για 3 ώρες σε προμαστιγωτές μορφές της *L. Infantum*, οι οποίες βρίσκονται στην στατική φάση, σε αναλογία παρασίτων:κυττάρων 5:1, 10:1, 20:1. Ακολούθως, το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο απορρίπτεται, τα H9c2 κύτταρα υφίστανται 2 εκπλύσεις με πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM προκειμένου να απομακρυνθούν οι *L. Infantum*, οι οποίες δεν έχουν εισέλθει στα κύτταρα. Η επώαση των H9c2 κυττάρων με το παράσιτο διαρκεί 24 ώρες.

Μετά το πέρας της επώασης τα μολυσμένα κύτταρα υφίστανται χρώση με την χρωστική Giemsa. Η χρώση Giemsa θεωρείται μια πρότυπη διαγνωστική τεχνική. Η χρώση Giemsa πραγματοποιείται για την εκτίμηση της πειραματικής μόλυνσης και την μικροσκοπική ανίχνευσης των αμαστιγωτών μορφών της *L. infantum* στο κυτταρόπλασμα των καρδιακών μυοβλαστών της κυτταρικής σειράς H9c2. Η χρώση Giemsa χρησιμοποιήθηκε στην Ιστολογία λόγω της υψηλής ποιότητας απεικόνισης της χρωματίνης και των πυρηνικών μεμβρανών όλων των κυττάρων. Η συγκεκριμένη μέθοδος προσδίδει διαφορετικά χρώματα σε διαφορετικά μέρη του κυττάρου και επιτρέπει την αναγνώριση διαφορετικών τύπων κοκκιοκυττάρων και άλλων τύπων κυττάρων του αίματος, παρέχοντας λεπτομέρειες του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος των λεμφοειδών και μυελοειδών κυττάρων [71].

Για την χρώση Giemsa, πραγματοποιούνται 2 εκπλύσεις με PBS, το οποίο έχει θερμανθεί σε υδατόλουτρο προς αποφυγή αποκόλλησης των κυττάρων. Στην συνέχεια, προστίθεται καθαρή μεθανόλη για 10 λεπτά προκειμένου να μονιμοποιηθούν τα παρασκευάσματα. Η μεθανόλη απομακρύνεται και τα παρασκευάσματα, στεγνώνονται και προστίθεται υδατικό διάλυμα χρωστικής Giemsa σε κάθε φρεάτιο της καλλιεργητικής πλάκας. Η χρώση διαρκεί 20 λεπτά. Τέλος, πραγματοποιούνται 2 εκπλύσεις με απιονισμένο νερό και οι λαμέλες τοποθετούνται ανάποδα σε ειδικές αντικειμενοφόρους πλάκες. Η καταμέτρηση

των μολυσμένων κυττάρων γίνεται σε ελαιοκαταδυτικό μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 100X. Ως βέλτιστη αναλογία προσδιορίστηκε η 20:1 και χρησιμοποιείται στους υπόλοιπους πειραματισμούς.

3.3.2 Μελέτη κινητικής χρόνου της μόλυνσης των H9c2 κυττάρων με το παράσιτο *L.infantum*

Για τη μελέτη της κινητικής χρόνου της μόλυνσης τα H9c2 κύτταρα επιστρώνονται ως ανωτέρω σε καλλιεργητικές πλάκες 24 φρεατίων και καλλιεργούνται για 2 ώρες σε επωαστικό κλίβανο. Στην συνέχεια, εκτίθενται για 3 ώρες σε προμαστιγώτες της *L. infantum*. Ακολουθούν 2 εκπλύσεις με θερμό DMEM και καλλιέργεια για 24, 48 και 72 ώρες. Πραγματοποιείται χρώση Giemsa και μετρώνται τουλάχιστον 100 πεδία.

3.3.3 Μόλυνση των H9c2 κυττάρων με *L. infantum* για την απομόνωση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών.

Για την απομόνωση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών τα H9c2 κύτταρα επιστρώνονται σε καλλιεργητικά τρυβλία διαμέτρου 60 mm και επωάζονται σε επωαστικό κλίβανο έως ότου η πυκνότητα τους είναι αρκετά υψηλή (κάλυψη 80-90% της συνολικής επιφάνειας). Τα H9c2 κύτταρα καλλιεργούνται σε 4 ml πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM. Στην συνέχεια, γίνεται στέρηση ορού και τα κύτταρα καλλιεργούνται για 18 ώρες. Ακολουθεί έκθεση των H9c2 κυττάρων για 3 ώρες σε προμαστιγώτες της *L.infantum*. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και πραγματοποιούνται 2 εκπλύσεις με θερμό θρεπτικό μέσο DMEM. Τα κύτταρα επωάζονται περαιτέρω για 1, 3, 6, 12, 24, 48 και 72 ώρες. Μετά το πέρας των συγκεκριμένων χρονικών σημείων πραγματοποιείται λύση των κυττάρων με σκοπό την απομόνωση των πρωτεϊνών.

3.4 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της μόλυνσης με το παράσιτο *Leishmania infantum* στους καρδιακούς μυοβλάστες H9c2 και συγκεκριμένα στα σηματοδοτικά μονοπάτια των MAP Κινασών, του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB αλλά και της πολύ-

ADP-ριβόζης, ήταν αναγκαία η λύση των H9c2 κυττάρων και η απομόνωση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών με απώτερο στόχο την ηλεκτροφόρηση και τον διαχωρισμό με βάση το μοριακό τους βάρος και την ανοσοσύτρωση τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με την τεχνική κατά Western.

Η λύση των κυττάρων είναι μια μέθοδος με την οποία η κυτταρική μεμβράνη καταστρέφεται προκειμένου να απελευθερωθούν το DNA, το RNA, οι πρωτεΐνες ή τα οργανίδια ενός κυττάρου. Αποτελεί μια πάρα πολύ σημαντική μέθοδος για την μελέτη της δομής και της λειτουργίας των πρωτεϊνών και γίνεται με διάφορες τεχνικές, είτε μηχανικές, είτε μη μηχανικές.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε η λύση με μη μηχανική τεχνική και πιο συγκεκριμένα με τη χρήση απορρυπαντικών. Τα απορρυπαντικά έχουν την ικανότητα να διαταράσσουν τις υδρόφιλες και τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Η κυτταρική μεμβράνη αποτελείται από μια διπλοστοιβάδα λιπιδίων, η οποία συνίσταται από υδρόφιλα και υδρόφοβα μόρια. Τα απορρυπαντικά χρησιμοποιούνται για να διασπάσουν τη διπλοστοιβάδα. Τα απορρυπαντικά είναι ικανά να διασπάσουν τις αλληλεπιδράσεις λιπιδίου-λιπιδίου, λιπιδίου-πρωτεΐνης, καθώς και πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Βάση της χωρητικότητας του φορτίου μπορούμε να τα κατατάξουμε σε κατιονικά, ανιονικά, και μη ιονικά απορρυπαντικά. Τα απορρυπαντικά χρησιμοποιούνται ευρέως για τη λύση των κυττάρων των θηλαστικών. Από τους τρεις τύπους απορρυπαντικών τα μη ιονικά απορρυπαντικά χρησιμοποιούνται συχνότερα, καθώς δεν προκαλούν καταστροφή στις κυτταρικές πρωτεΐνες και τα ένζυμα (Aaron T,2017).

Στην παρούσα μελέτη για τη λύση της κυτταρικής σειράς H9c2 χρησιμοποιήθηκε ως απορρυπαντικό κατά την ομογενοποίηση, το Triton-X-100, το οποίο είναι μη ιονικό απορρυπαντικό.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ομογενοποίηση γίνεται με σκοπό την απομόνωση και μελέτη των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών των καρδιακών μυοβλαστών H9c2 και γι' αυτόν τον λόγο χρησιμοποιήθηκε το Buffer G. Στο διάλυμα προστίθεται αναστολείς ενζύμων και συγκεκριμένα αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών. Οι αναστολείς, οι οποίοι προστίθεται είναι η λευπεπτίνη, η οποία αναστέλει το λυσόσωμα, το αινυλομεθυλοσουλφονυλοφθορίδιο (PMSF), το οποίο είναι αναστολέας σερίνης και κυστεΐνης και η διθειοτριτόλη (DTT).

3.4.1 Εκχύλιση πρωτεϊνών από κύτταρα κυτταρικής σειράς H9c2

Το πρωτόκολλο, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση των πρωτεϊνών εφαρμόζεται στο εργαστήριο Φυσιολογίας του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η λύση των H9c2 κυττάρων γίνεται στον πάγο, στους 4 °C προκειμένου να παρεμποδιστεί η αλλοίωση της δομής των πρωτεϊνών. Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από το τρυβλίο και στη συνέχεια τα κύτταρα εκπλένονται 2 φορές με PBS. Προστίθεται 100 μl Buffer G στο οποίο έχουν προστεθεί αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών αλλά και το απορρυπαντικό Triton X-100. Με τη βοήθεια ειδικού ξύστρου, τα H9c2 κύτταρα αποκολλώνται από τον πυθμένα του τρυβλίου και κατευθύνονται προσεκτικά σε μια πλευρά του. Πραγματοποιούνται αρκετές ήπιες αναδεύσεις ούτως ώστε να σπάσουν τα συσσωματώματα. Το εναιώρημα των κυττάρων συλλέγεται σε σωλήνα τύπου Eppendorf και ακολουθεί παραμονή στον πάγο για 10 λεπτά. Ενδιάμεσα πραγματοποιούνται 2 έντονες αναδεύσεις με τη βοήθεια αναδευτήρα τύπου Vortex. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται (10.000 rpm, για 5 λεπτά, θερμοκρασία 4 °C). Το ίζημα που προκύπτει περιέχει κυτταρικές μεμβράνες και άθικτα κύτταρα και απορρίπτεται. Από το υπερκείμενο προστίθεται 5μl σε 95 μl νερού προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μέθοδος Bradford και ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα. Στο υπόλοιπο υπερκείμενο που προκύπτει μετά την φυγοκέντρωση προστίθεται διάλυμα κατεργασίας δειγμάτων έτσι ώστε να υπάρχει τελικά 1 μέρος Sample Buffer και 3 μέρη δείγματος σε κάθε Eppendorf. Το κάθε δείγμα βράζεται για 3 λεπτά και φυλάσσεται στην κατάψυξη (-20 °C).

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι ο ορός εμβρύου βοδιού περιέχει πολλά συστατικά, τα οποία μπορούν να επηρεάσουν την ενεργοποίηση των κινασών. Πριν από οποιαδήποτε επίδραση στους καρδιακούς μυοβλάστες, πραγματοποιείται στέρηση του ορού για 18 ώρες.

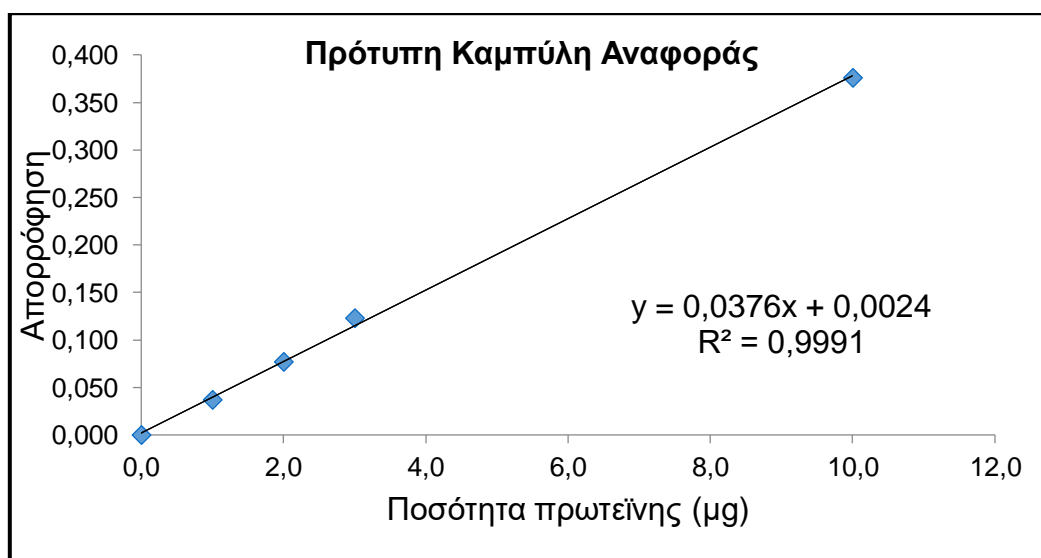
3.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

3.5.1 Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος Bradford είναι μια απλή, γρήγορη, αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδος για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεϊνών. Η μέθοδος περιγράφηκε αρχικά από τον Bradford [72] και βασίζεται στη σύνδεση της χρωστικής Coomassie blue G250. Η κατιονική μορφή της χρωστικής, η οποία κυριαρχεί σε ένα όξινο αντιδραστήριο έχει λ_{\max} στα 470 nm. Αντίθετα, η ανιονική μορφή της χρωστικής, η οποία συνδέεται με την πρωτεΐνη έχει λ_{\max} στα

595 nm [73]. Έτσι η ποσότητα της χρωστικής που συνδέεται με την πρωτεΐνη μπορεί να ποσοτικοποιηθεί μετρώντας την απορρόφηση του διαλύματος στα 595 nm [74].

Μετά την ομογενοποίηση, 5 μl από το κάθε δείγμα προστίθεται σε 95 μl νερό. Ταυτόχρονα προετοιμάζονται και δείγματα με γνωστές ποσότητες αλβουμίνης από ορό βοδιού (BSA) 0, 1, 2, 3, και 10 μg. Έπειτα προστίθεται σε όλα τα δείγματα 1 ml αντιδραστηρίου Bradford. Αφήνονται για 5 λεπτά και φωτομετρούνται στα 595 nm. Κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς και από την εξίσωση που προκύπτει προσδιορίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης κάθε δείγματος και ο όγκος του δείγματος που θα πρέπει να φορτωθεί κατά την ηλεκτροφόρηση προκειμένου κάθε δείγμα να περιέχει την ίδια ποσότητα πρωτεΐνης και με αυτόν τον τρόπο να μπορεί να γίνει η σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων.



Εικόνα 3.1: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς με τη μέθοδο Bradford. Απεικονίζει την πρότυπη καμπύλη αναφοράς με την οποία προσδιορίζεται η ποσότητα της πρωτεΐνης στα άγνωστα δείγματα.

Η εξίσωση της ευθείας είναι της μορφής $y=ax+\beta$, όπου το y είναι η απορρόφηση και το x είναι η ποσότητα της πρωτεΐνης (μg). Έτσι μπορεί να υπολογισθεί η ποσότητα της πρωτεΐνης στα άγνωστα δείγματα λαμβάνοντας υπόψη ότι προσθέσαμε 5μl δείγματος. Ανάλογα με την ποσότητα που θέλουμε να προσθέσουμε κάθε φορά κάνουμε τους υπολογισμούς και την απαραίτητη αναγωγή και τέλος πολλαπλασιάζουμε με 1.33 (1+1/3) λόγω της αραίωσης με το Sample Buffer.

3.6 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Για τον βέλτιστο διαχωρισμό των πρωτεϊνών είναι πολύ σημαντικό να προσδιοριστεί η ιδανική αναλογία δισακρυλαμίδης/ακρυλαμίδης πριν από την ηλεκτροφόρηση. Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται σε ένα πήκτωμα ηλεκτροφόρησης. Οι πρωτεΐνες μπορεί να διαχωριστούν με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο, το μοριακό τους βάρος, το ηλεκτρικό φορτίο ή έναν συνδυασμό αυτών. Η πιο κοινή μέθοδος ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιεί πηκτώματα πολυακρυλαμίδης και ρυθμιστικά διαλύματα που περιέχουν SDS.

3.6.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Η διαδικασία της SDS ηλεκτροφόρησης βασίζεται στα χαρακτηριστικά του SDS. Το SDS (Sodium Dodecyl Sulphate, δωδεκακυλο-θειϊκό νάτριο) είναι ένα ισχυρώς ανιονικό απορρυπαντικό. Επειδή οι πρωτεΐνες δεν έχουν όλες το ίδιο ηλεκτρικό φορτίο, το δείγμα υφίσταται επεξεργασία με SDS και αποκτά αρνητικό φορτίο. Οι πρωτεΐνες κινούνται προς το θετικό ηλεκτρόδιο και ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το μοριακό βάρος. Η επεξεργασία με αναγωγικό παράγοντα για την απομάκρυνση των δισουλφιδικών δεσμών, καθώς και ο βρασμός των δειγμάτων μπορεί να διευκολύνει της αποδιάταξη των πρωτεϊνών [75]. Η κινητικότητα μέσα στην πηκτή μπορεί να επηρεαστεί από την κατάσταση της πρωτεΐνης (π.χ. φωσφορυλίωση και παρουσία πολυμερών) [76].

Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης αποτελείται από μονομερή ακρυλαμίδιου, τα οποία έχουν πολυμεριστεί και συνδέονται μεταξύ τους με μονομερή N,N'-Μεθυλενο-δισακρυλαμίδης (Raymond & Weintrau, 2017).

Αυτά δημιουργούν πόρους ίδιου μεγέθους, το μέγεθος των οποίων εξαρτάται από την συγκέντρωση των μονομερών και από τη διασύνδεση. Όταν ηλεκτρικό ρεύμα διαπερνά το πήκτωμα οι πρωτεΐνες μετακινούνται διαμέσου των πόρων. Αλλάζοντας τη συγκέντρωση της δις-ακρυλαμίδης ρυθμίζεται το μέγεθος των πόρων και η δυνατότητα των μεγαλύτερων σε μέγεθος πρωτεϊνών να μετακινούνται δια μέσου του πηκτώματος. Πηκτώματα με μεγαλύτερη συγκέντρωση ακρυλαμίδης (π.χ. 20%) επιτρέπουν την κίνηση μεγαλύτερων πρωτεϊνών σε σχέση με μικρότερου μοριακού βάρους πρωτεΐνες αλλά διαχωρίζουν καλύτερα εκείνες μικρότερου μοριακού βάρους. Παρόμοια αν ο στόχος είναι η ηλεκτροφόρηση πρωτεΐνης

μεγάλου μοριακού βάρους πρέπει να επιλεγεί ένα μικρότερης συγκέντρωσης πήκτωμα, καθώς επιτρέπει καλύτερο διαχωρισμό. Πηκτώματα με διαβάθμιση συγκέντρωσης παρέχουν ομοιόμορφο διαχωρισμό σε όλο το φάσμα των μοριακών βαρών (Rath et al.,2013).

Το σύστημα SDS-PAGE του Laemmli είναι ένα μη συνεχές πήκτωμα με ένα πήκτωμα επιστοίβαξης στο επάνω μέρος και ένα πήκτωμα διαχωρισμού στο κάτω μέρος τα οποία έχουν διαφορετικές τιμές pH και διαφορετικές συγκεντρώσεις πολυακρυλαμίδης. Το πήκτωμα επιστοίβαξης είναι ελαφρώς όξινο (pH 6,8), ενώ το πήκτωμα διαχωρισμού είναι βασικό με pH 8,8. Το πήκτωμα επιστοίβαξης έχει χαμηλότερο ποσοστό πολυακρυλαμίδης επιτρέποντας στις πρωτεΐνες να μετακινούνται διαμέσου αυτού γρήγορα και να στοιβάζονται σε μια ζώνη προτού εισέλθουν στο πήκτωμα διαχωρισμού, το οποίο περιέχει υψηλότερο ποσοστό πολυακρυλαμίδης. Τα ποσοστά της πολυακρυλαμίδης μπορούν να βελτιστοποιηθούν ανάλογα με το μέγεθος των μορίων που πρέπει να προσδιορισθούν [78].

Το Sample Buffer, το οποίο προστίθεται μετά τη διαδικασία της ομογενοποίησης στα δείγματα, περιέχει το ανιονικό απορρυπαντικό SDS, το οποίο έχει την ικανότητα να αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες. Μετά την προσθήκη του Sample Buffer τα δείγματα βράζονται για 3 λεπτά στους 100 °C. Ο βρασμός βοηθάει στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Το Sample Buffer περιέχει β-μερκαπτοεθανόλη, η οποία μειώνει τους δισουλφιδικούς δεσμούς κάτι το οποίο είναι απαραίτητο για το διαχωρισμό με βάση το μέγεθος. Για να είναι εύκολη η παρατήρηση της μετακίνησης των πρωτεϊνών δια μέσου του πηκτώματος προστίθεται ένα ανιονικό μόριο χρωστικής στο Sample Buffer (π.χ. μπλε της βρωμοφαινόλης). Η χρωστική είναι ανιονική και μικρού μεγέθους και μετακινείται πιο γρήγορα από κάθε άλλο συστατικό το οποίο πρόκειται να διαχωριστεί παρέχοντας τη δυνατότητα παρακολούθησης της διαδικασίας του διαχωρισμού.

Η ηλεκτροφόρηση ξεκινά με το στήσιμο του εξοπλισμού. Τα υάλινα τζάμια, τα οποία χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία του πηκτώματος καθαρίζονται καλά με μεθανόλη για να απομακρυνθούν υπολείμματα παλιών πηκτωμάτων και να αποφευχθεί η δημιουργία κακής ποιότητας πηκτώματος. Τα υάλινα τζάμια τοποθετούνται προσεκτικά στη βάση και στερεώνονται στο στατό. Στην συνέχεια, προετοιμάζονται τα διαλύματα των πηκτωμάτων διαχωρισμού (resolution gel) και επιστοίβαξης (stacking gel).

Γίνεται ταυτόχρονα η παρασκευή των δύο πηκτωμάτων (επιστοίβαξης και διαχωρισμού) προσθέτοντας ακρυλαμίδα, SDS, νερό και Tris-HCl (pH 6,8 και 8,8). Το υπερθειικό αμμώνιο

(APS-ammonium Persulfate) και η N, N, N', N' τετραμεθυλενο-1,2-αιθυλενοδιαμίνη (TEMED) θα προστεθούν σε κάθε πήκτωμα ξεχωριστά. Πρόκειται για καταλύτες, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για τον πολυμερισμό του πηκτώματος της πολυακρυλαμίδης. Πρώτα προστίθεται με γρήγορες κινήσεις στο πήκτωμα διαχωρισμού. Στην συνέχεια, με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur πραγματοποιείται γρήγορη και προσεκτική ανάδευση και το πήκτωμα διαχωρισμού τοποθετείται στη συσκευή ανάμεσα από τα δύο υάλινα τζάμια με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur. Αφήνεται ένα με δύο εκατοστά περιθώριο προκειμένου να υπάρξει χώρος για την προσθήκη του διαλύματος επιστοιβάξης. Στην συνέχεια, προστίθεται από πάνω νερό και το πήκτωμα διαχωρισμού αφήνεται για πολυμερισμό για 10-20 λεπτά. Μετά το πέρας του χρόνου το νερό αποχύνεται προσεκτικά και τοποθετούνται διηθητικά χαρτιά Whatman προκειμένου να απομακρυνθούν υπολείμματα νερού. Η κατάλληλη ποσότητα APS και TEMED προστίθεται στο διάλυμα επιστοιβάξης και ακολουθεί προσεκτική ανάδευση με πιπέτα Pasteur και προσθήκη του πηκτώματος επιστοιβάξης πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού. Αμέσως προστίθεται το ειδικό χτενάκι 0.75mm 10 θέσεων. Το πήκτωμα αφήνεται για πολυμερισμό για 10-20 λεπτά. Τα δείγματα και τα πρότυπα μοριακά βάρη που θα χρησιμοποιηθούν θερμαίνονται σε βραστό νερό για 3 λεπτά πριν τοποθετηθούν στο πήκτωμα. Τα πρότυπα μοριακά βάρη χρησιμοποιούνται για να γίνει προσδιορισμός του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών. Όταν το πήκτωμα πήξει, τα τζάμια αποσυνδέονται προσεκτικά από τη συσκευή και προστίθεται μέσα στην ειδική θήκη ηλεκτροφόρησης. Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) προστίθεται στο εσωτερικό της συσκευής και στην συνέχεια αφαιρείται προσεκτικά το χτενάκι από το πήκτωμα επιστοιβάξης. Το Running Buffer είναι απαραίτητο προκειμένου να δημιουργηθεί κλειστό κύκλωμα για τη συνεχή κίνηση του ρεύματος.

Τα δείγματα προστίθεται σε κάθε θέση ανάλογα με την ποσότητα που είχε προσδιοριστεί με την μέθοδο Bradford, έτσι ώστε κάθε δείγμα να περιέχει την ίδια ποσότητα πρωτεΐνης για να μπορεί στην συνέχεια να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων μέσω πυκνομέτρησης. Τέλος εφαρμόζεται ρεύμα τάσης 190-200V και η συσκευή τίθεται σε λειτουργία. Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί περίπου μια ώρα όπου στο ενδιάμεσο διάστημα γίνεται η παρακολούθηση των δειγμάτων μέσω της χρωστικής. Η ηλεκτροφόρηση διακόπτεται μόλις το ενιαίο μέτωπο της χρωστικής διαχυθεί στο Running Buffer. Στην συνέχεια, αφού διακοπεί η παροχή ρεύματος, η συσκευή αποσυνδέεται και από το πήκτωμα, το οποίο βρίσκεται μεταξύ

των δύο υάλινων τζαμιών απομακρύνεται και απορρίπτεται το πήκτωμα επιστοίβαξης με τη βοήθεια ειδικής σπάτουλας. Το πήκτωμα διαχωρισμού σημαδεύεται κόβοντας μια γωνία έτσι ώστε να καθίσταται γνωστή η σειρά τοποθέτησης των δειγμάτων.

Τα πρωτεϊνικά δείγματα για τη μελέτη των MAP Κινασών (ERK1/2, p38 MAPK) και του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα περιεκτικότητας 10% (w/v) σε πολυακρυλαμίδη. Τα πρωτεϊνικά δείγματα για τη μελέτη της PARP διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα περιεκτικότητας 8% (w/v) σε πολυακρυλαμίδη.

Επίσης, θα πρέπει να σημειωθεί ότι για τη μελέτη της PARP και του NF-κΒ κατά την ηλεκτροφόρηση ήταν απαραίτητη η προσθήκη ποσότητας 40 μg από κάθε δείγμα, ενώ για την μελέτη των MAPK προστέθηκαν 20 μg δειγμάτων για κάθε πειραματισμό.

3.7 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN

Η τεχνική Western Blot είναι ένα πολύτιμο εργαλείο για την ανάλυση των πρωτεϊνών, οι οποίες έχουν διαχωριστεί με βάση το μοριακό τους βάρος σε ηλεκτροφόρηση με SDS gel. Η μέθοδος Western Blot είναι μια πολύ ευαίσθητη μέθοδος για την οπτικοποίηση ειδικών πρωτεϊνών, οι οποίες βρίσκονται σε ένα πολύπλοκο αντιγονικό μείγμα [79].

3.7.1 Ημι-στεγνή μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Για την ημί-στεγνή μεταφορά η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, το πήκτωμα και τα διηθητικά χαρτιά Whatman τοποθετούνται ανάμεσα από ηλεκτρόδια πλάκας άνθρακα. Η ημί-στεγνή μεταφορά χρησιμοποιεί δύο ηλεκτρόδια, τα οποία βρίσκονται ενσωματωμένα σε πλάκες ανοξείδωτου χάλυβα ή γραφίτη/άνθρακα, οι οποίες δημιουργούν ομοιόμορφο ηλεκτρικό πεδίο μεταξύ των διηθητικών χαρτιών Whatman, του πηκτώματος και της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης, τα οποία είναι όλα εμποτισμένα με το διάλυμα μεταφοράς [80].

Πιο συγκεκριμένα, 8 διηθητικά χαρτιά Whatman και η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης τοποθετούνται για 15 λεπτά υπό ανάδευση στο διάλυμα μεταφοράς. Το πήκτωμα τοποθετείται για 5 λεπτά υπό ανάδευση στο διάλυμα μεταφοράς. Στην συνέχεια 4 διηθητικά χαρτιά τοποθετούνται το ένα πάνω από το άλλο πάνω στην πλάκα της συσκευής μεταφοράς.

Ακολούθως, προστίθεται η νιτροκυτταρίνη, το πήκτωμα και τα άλλα 4 διηθητικά χαρτιά. Πρέπει να αποφευχθεί η δημιουργία φυσαλίδων προκειμένου να γίνει σωστά η μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης. Αφού διαβραχεί και το σημείο επάνω στο καπάκι με διάλυμα μεταφοράς, η συσκευή τίθεται σε λειτουργία. Η μεταφορά των πρωτεϊνών συνήθως γίνεται ρυθμίζοντας την συσκευή στα 12 V και έχει διάρκεια 60 λεπτά για μια νιτροκυτταρίνη, ενώ αν υπάρχουν δύο νιτροκυτταρίνες η συσκευή ρυθμίζεται στα 14 V για 60 λεπτά. Αν το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης είναι πολύ μεγάλο τότε τροποποιείτε ανάλογα ο χρόνος μεταφοράς αυξάνοντας τον στα 120 λεπτά. Ακόμη γίνεται χρήση ειδικού διαλύματος μεταφοράς, το οποίο είναι ειδικό για πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους.

3.7.2 Αντιστρεπτή χρώση των μεταφερόμενων πρωτεϊνών με Ponceau-S

Για την επαλήθευση της αποτελεσματικής μεταφοράς σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης χρησιμοποιείται η ειδική χρώση Ponceau S. Η Ponceau S εμφανίζει τις μεταφερθείσες πρωτεΐνες ως κόκκινες ζώνες σε ροζ φόντο. Η χρώση Ponceau S έχει αρκετά πλεονεκτήματα όπως ότι είναι απλή, γρήγορη και εύκολα αναστρέψιμη [81]. Μπορεί να απομακρυνθεί από την νιτροκυτταρίνη με εκπλύσεις με διάλυμα TBS-Tween υπό ανάδευση.

3.7.3 Ανοσοεντόπιση των πρωτεϊνών στην μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης

Η δέσμευση των μη ειδικών θέσεων είναι ένα πάρα πολύ σημαντικό βήμα, καθώς αποτρέπεται η μη ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων στην μεμβράνη. Το διάλυμα που χρησιμοποιείται περιέχει 5% w/v άπαχο γάλα σε σκόνη σε TBS-Tween. Η νιτροκυτταρίνη επωάζεται με το διάλυμα δέσμευσης μη ειδικών θέσεων για μισή ώρα υπό ανάδευση και εκπλένεται 3 φορές με TBS-Tween.

Αφού ολοκληρωθεί η δέσμευση των μη ειδικών θέσεων πραγματοποιείται η επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα. Το πρωτογενές αντίσωμα αναγνωρίζει την πρωτεΐνη-στόχο ως αντιγόνο και συνδέεται με συγκεκριμένους επιτόπους της. Αυτό επιτρέπει την ανίχνευση της πρωτεΐνης και στη συνέχεια την ποσοτικοποίηση της. Το πρωτογενές αντίσωμα προστίθεται σε διάλυμα, το οποίο περιέχει 5% w/v BSA σε TBS-Tween. Η αραίωση που χρησιμοποιείται για το αντίσωμα δίνεται από την εταιρεία την οποία αγοράστηκε. Ακολουθεί ολονύχτια

επώαση της νιτροκυτταρίνης με το πρωτογενές αντίσωμα στους 4 °C. Η νιτροκυτταρίνη ξεπλένεται με TBS-Tween για να απομακρυνθεί το πλεονάζον πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο δεν έχει δεσμευθεί με την πρωτεΐνη-στόχο.

Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η επώαση της νιτροκυτταρίνης με το δευτερογενές αντίσωμα. Το δευτερογενές αντίσωμα προστίθεται σε διάλυμα, το οποίο περιέχει 1% w/v γάλα σε σκόνη σε TBS-Tween. Η αραιώση που χρησιμοποιείται είναι 1:5000. Η νιτροκυτταρίνη επώαζεται με το δευτερογενές αντίσωμα για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση. Στην συνέχεια, πραγματοποιούνται εκπλύσεις με TBS-Tween και πραγματοποιείται η τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας.

3.7.4 Ανίχνευση των ανοσοσυμπλόκων με την τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced ChemiLuminescence, ECL)

Η τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας έχει πολλά πλεονεκτήματα μεταξύ των οποίων είναι η ευαισθησία, η ταχύτητα (το σήμα παράγεται σε μερικά δευτερόλεπτα και παραμένει για αρκετές ώρες) και η χρήση μη επικίνδυνων υλικών. Η ενισχυμένη χημειοφωταύγεια χρησιμοποιεί το ένζυμο της υπεροξειδάσης του άγριου ραπανιού, καθώς και ένα μείγμα λουμινόλης και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι ειδικό για το πρωτογενές αντίσωμα δεσμεύεται με αυτό και παράλληλα είναι προσδεμένη σε αυτό το ένζυμο υπεροξειδάση του άγριου ραπανιού, horseradish peroxidase (HRP). Όταν προστεθεί το κατάλληλο υπόστρωμα του ενζύμου καταλύεται η αντίδραση έκλυσης φωτός και με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του παραχθέντος σήματος. Η τεχνική αυτή ονομάζεται χημειοφωταύγεια. Το υπόστρωμα του ενζύμου της υπεροξειδάσης είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂).

Στην αντίδραση της χημειοφωταύγειας, η χημική ενέργεια που παράγεται είναι ένα αποτέλεσμα της διάσπασης ενός δεσμού, η οποία παράγει ένα ενδιάμεσο προϊόν ενδιάμεσης κατάστασης, το οποίο επιστρέφει στην θεμελιώδη κατάσταση εκπέμποντας φως. Η υπεροξειδάση του άγριου ραπανιού καταλύει την οξειδωση της λουμινόλης από το H₂O₂. Συνήθως, 2 έως 30 λεπτά μετά από την έναρξη της αντίδρασης γίνεται η μέτρηση της έντασης του φωτός [82].

Η νιτροκυτταρίνη τοποθετείται σε απορροφητικό χαρτί και στη συνέχεια προστίθενται σε αυτή ίσες ποσότητες από τα 2 αντιδραστήρια του ECL. Επωάζεται για 1 λεπτό με το μίγμα του ECL σε σκοτάδι καλύπτοντας με ένα κουτί, τοποθετείται σε απορροφητικό χαρτί και στην συνέχεια προστίθεται στην ειδική κασετίνα. Όλα τα υπόλοιπα βήματα της διαδικασίας γίνονται στον ειδικό σκοτεινό θάλαμο και με αρκετά γρήγορες κινήσεις. Αρχικά, τοποθετείται ένα κομμάτι φιλμ στο μέγεθος της νιτροκυτταρίνης, μέσα στην κασετίνα πάνω από την νιτροκυτταρίνη. Το φιλμ έχει κοπεί σε μία γωνία έτσι ώστε να είναι γνωστή η αρχή του. Στην συνέχεια, αφήνεται για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα ανάλογα με το αντίσωμα που έχει χρησιμοποιηθεί. Τέλος το φιλμ τοποθετείται σε εμφανιστικό διάλυμα (Developer) για ανάπτυξη του σήματος, ξεπλένεται με νερό και τοποθετείται σε σταθεροποιητικό διάλυμα (Fixer). Τέλος, το φιλμ ξεπλένεται πάλι με νερό και αφήνεται να στεγνώσει. Σημειώνονται οι markers στην άκρη του κάθε φιλμ αφού τοποθετηθεί πάνω στην νιτροκυτταρίνη. Το φιλμ στη συνέχεια πυκνομετρείται με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού προγράμματος (Image J).

3.8 ΛΟΓΙΣΜΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- Adobe Photoshop CS
Χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των εικόνων.
- Image J
Χρησιμοποιήθηκε για τη σάρωση των πηκτωμάτων και των ανοσοστυπωμάτων και την πυκνομέτρηση των ζωνών.
- Graph Pad Software, Graph Pad Prism 7
Χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.
- Microsoft Office Excel 2007
Χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.
- Microsoft Office Word 2007
Χρησιμοποιήθηκε για τη συγγραφή του κειμένου.
- Microsoft Office PowerPoint 2007
Χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία της παρουσίασης της εργασίας.

3.9 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

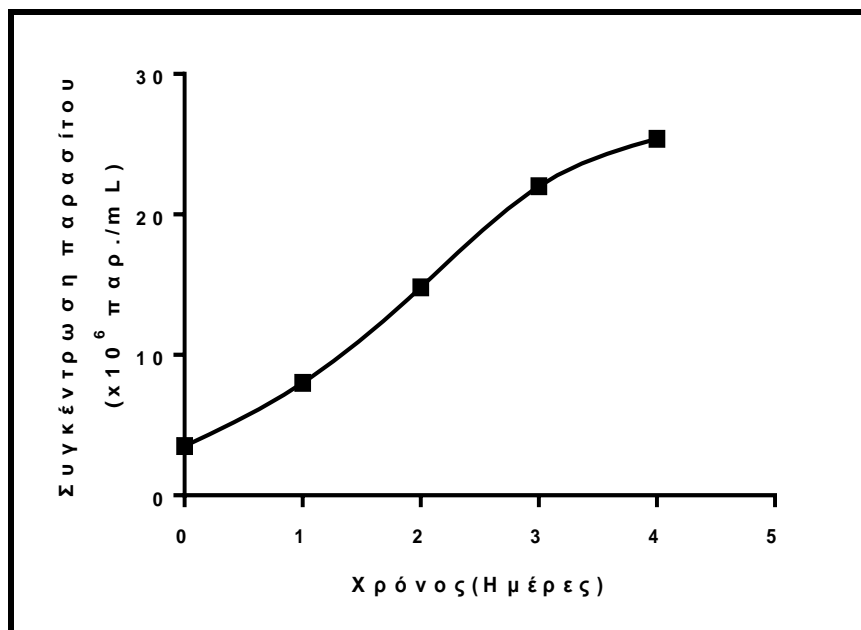
Οι *in vitro* μολύνσεις πραγματοποιούνται εις διπλούν για 2 τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα. Τα αποτελέσματα παρατίθενται ως μέσος όρος τυπική απόκλιση (mean \pm SD). Η στατιστική ανάλυση επετεύχθη χρησιμοποιώντας το ανεξάρτητο t-test (Student's unpaired *t*-test) (Graph Pad Prism Software). Τιμή με $P < 0.05$ θεωρείται στατιστικώς σημαντική.

Η δοκιμασία Western επαναλαμβάνεται για τρία ανεξάρτητα πειράματα. Τα αποτελέσματα παρατίθενται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα (mean \pm S.E.M.). Η στατιστική ανάλυση επετεύχθη χρησιμοποιώντας το ανεξάρτητο t-test (Student's unpaired *t*-test) (Graph Pad Prism Software). Τιμή με $P < 0.05$ θεωρείται στατιστικώς σημαντική. Έγινε κανονικοποίηση όλων των τιμών σε σχέση με τα αντίστοιχα ολικά επίπεδα πρωτεΐνης. Η ανίχνευση της φωσφορυλίωσης των p-38 MAPK, ERK1/2, NF- κ B, όπως επίσης και του θραύσματος της PARP εκφράζεται σε αυθαίρετες μονάδες, ως «φορές ενεργοποίησης» σε σχέση με τον μάρτυρα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ

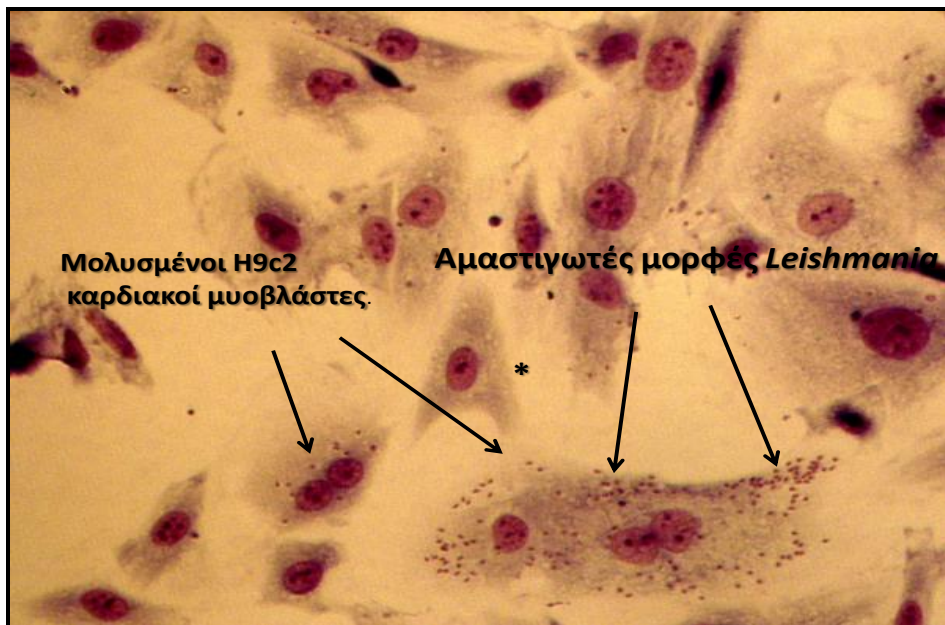
Η μελέτη της καμπύλης ανάπτυξης του παρασίτου *Leishmania infantum*, πραγματοποιείται προκειμένου να προσδιοριστεί το σημείο έναρξης της στατικής φάσης και να γίνει ο κατάλληλος χρονικός προγραμματισμός των πειραματισμών μόλυνσης. Η στατική φάση, είναι η φάση κατά την οποία ο πληθυσμός των παρασίτων έχει τις περισσότερες μετακυκλικές μορφές, οι οποίες είναι οι μολυσματικές μορφές του παρασίτου. Εκτελούνται μετρήσεις της συγκέντρωσης του παρασίτου κάθε 24 ώρες, έως ότου η συγκέντρωση σταθεροποιηθεί και σχεδιάζεται η καμπύλη ανάπτυξης. Μετά την 3^η ημέρα καλλιέργειας, ο πληθυσμός των παρασίτων *L.infantum* μεταβαίνει από τη λογαριθμική φάση ανάπτυξης στη στατική φάση. Σύμφωνα με την καμπύλη ανάπτυξης, ο πληθυσμός των παρασίτων εισέρχεται στην στατική φάση μετά την 4^η ημέρα της καλλιέργειας.



Εικόνα 4.1: Καμπύλη ανάπτυξης παρασίτου *L. infantum*. Καλλιέργεια *Leishmania* με αρχική συγκέντρωση $3,5 \times 10^6$ προμαστιγωτών μορφών /ml Η συγκέντρωση του παρασίτου προσδιορίζεται κάθε 24 ώρες.

4.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΕΛΤΙΣΤΗΣ ΑΝΑΛΟΓΙΑΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ

Οι αμαστιγωτές μορφές της *Leishmania infantum* αποτελούν την ενδοκυττάρια μορφή του παρασίτου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *Leishmania infantum* εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα των H9c2 κυττάρων (Εικόνα 4.2). Επομένως, είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον το γεγονός ότι το παράσιτο *L.infantum* μολύνει την κυτταρική σειρά καρδιακών μυοβλαστών H9c.



Εικόνα 4.2: Μικροσκοπική απεικόνιση μολυσμένων καρδιακών μυοβλαστών H9c2 μετά από χρώση Giemsa. Οι αμαστιγωτές μορφές της *L.infantum*, καθώς και τα μολυσμένα H9c2 κύτταρα υποδεικνύονται με βέλη. Με τον αστερίσκο υποδεικνύεται ένα μη μολυσμένο H9c2 κύτταρο (μάρτυρας).

Ακολούθως, γίνεται διερεύνηση προσδιορισμού της βέλτιστης αναλογίας μόλυνσης της κυτταρικής σειράς H9c2 με το παράσιτο *L.infantum*. Οι αναλογίες, οι οποίες μελετήθηκαν ήταν οι εξής: 5:1, 10:1, 20:1 (παρασίτα:κύτταρο). Ο προσδιορισμός του παρασιτικού φορτίου πραγματοποιείται με τη χρώση Giemsa.

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα (Πίνακας 4.1) κατά την αύξηση του αριθμού των παρασίτων (αναλογία μόλυνσης), παρατηρείται αύξηση του ποσοστού των μολυσμένων H9c2 κυττάρων, καθώς και αύξηση του μέσου περιεχόμενου αριθμού των αμαστιγωτών μορφών της *L.infantum* ανά H9c2 κύτταρο. Ειδικότερα, στην αναλογία 5:1 το ποσοστό των μολυσμένων H9c2 κυττάρων είναι $24,8 \pm 5,8\%$. Στην αναλογία μόλυνσης 10:1, παρατηρείται μικρή

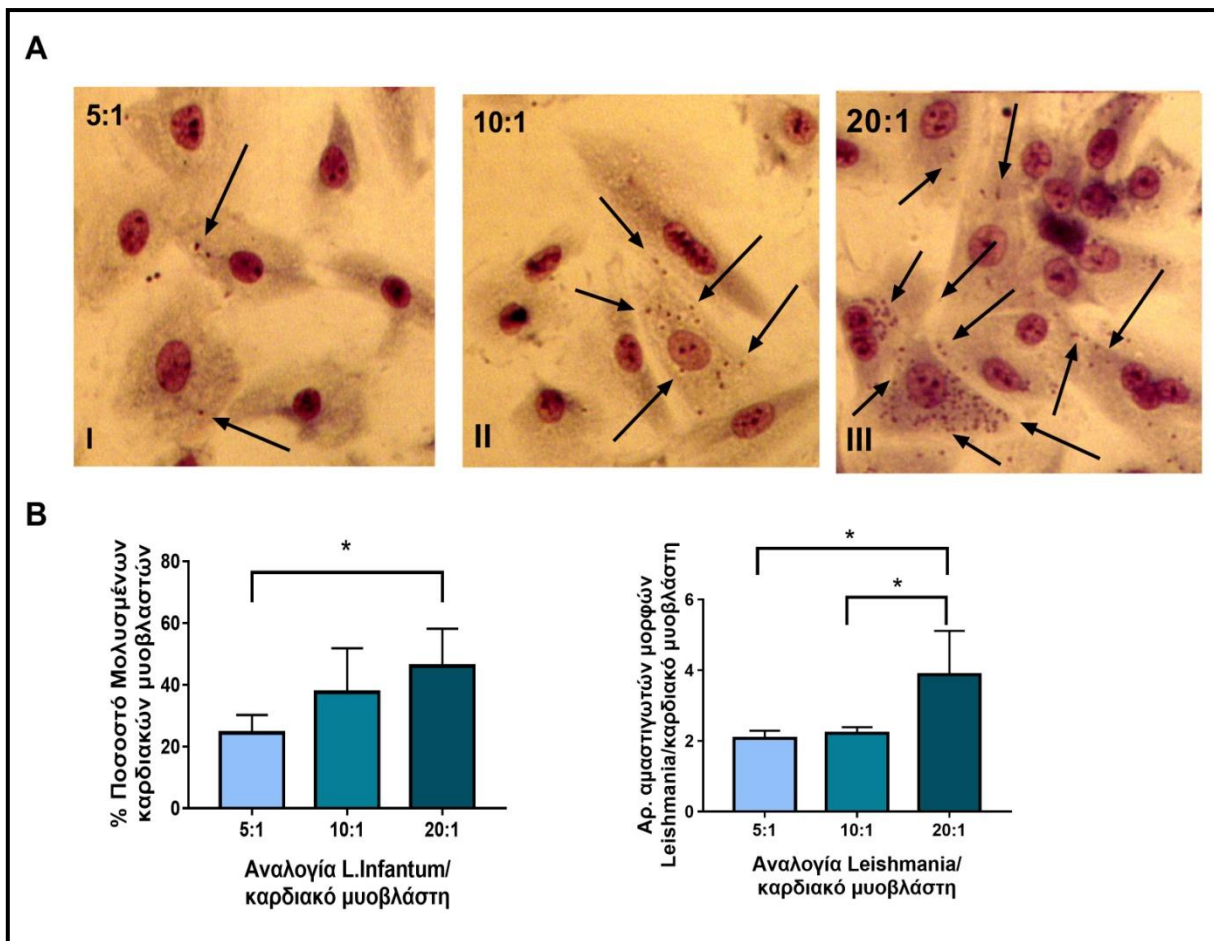
αύξηση του ποσοστού των μολυσμένων κυττάρων ($38,1 \pm 14\%$), χωρίς όμως να διαπιστώνεται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο αναλογιών. Η αναλογία 20:1, παρουσιάζει διπλάσιο ποσοστό μολυσμένων H9c2 κυττάρων σε σχέση με την αναλογία 5:1, το οποίο φθάνει το $46,8 \pm 12\%$ σημειώνοντας στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0,05$).

Παράλληλα έγινε προσδιορισμός του μέσου περιεχόμενου αριθμού των αμαστιγωτών μορφών της *L.infantum* ανά H9c2 κύτταρο. Πιο συγκεκριμένα, οι αναλογίες 5:1 και 10:1 περιέχουν $2,09 \pm 0,22$ και $2,22 \pm 0,18$ αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου ανά κύτταρο, αντίστοιχα. Οι δύο αναλογίες, δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά στο μέσο περιεχόμενο αριθμό αμαστιγωτών μορφών *Leishmania*. Η αναλογία 20:1, εμφανίζει μέγιστο μέσο περιεχόμενο αριθμό παρασίτων ανά κύτταρο ($4,04 \pm 1,2$). Θα πρέπει να αναφερθεί ότι εμφανίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της αναλογίας 20:1 και των άλλων δύο μελετούμενων αναλογιών ($P < 0,05$).

Συμπερασματικά, η αναλογία 20:1 είναι η βέλτιστη, καθώς μεγιστοποιεί το ποσοστό των μολυσμένων H9c2 κυττάρων, το οποίο φθάνει το $46,8 \pm 12\%$ και περιέχει $4,04 \pm 1,2$ αμαστιγωτές μορφές παρασίτου κατά μέσο όρο ανά κύτταρο. Συνεπώς, η αναλογία μόλυνσης 20:1 χρησιμοποιείται σε όλους τους ακόλουθους πειραματισμούς, καθώς δημιουργεί έναν ομοιογενή πληθυσμό μολυσμένων H9c2 κυττάρων, ο οποίος είναι αναγκαία συνθήκη.

Πίνακας 4.1: Ποσοστά μολυσμένων H9c2 κυττάρων και μέσος όρος αμαστιγωτών μορφών *L.infantum*/H9c2 κύτταρο. Τα δεδομένα είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραματισμών.

Αναλογία <i>L.infantum</i> /H9c2	% Ποσοστό μολυσμένων κυττάρων H9c2	Μέσος περιεχόμενος αριθμός αμαστιγωτών μορφών <i>L.infantum</i> /H9c2
5:1	$24,8 \pm 5,8$	$2,09 \pm 0,22$
10:1	$38,1 \pm 14$	$2,22 \pm 0,18$
20:1	$46,8 \pm 12$	$4,04 \pm 1,2$



Εικόνα 4.3.: Έκθεση των H9c2 κυττάρων στο παράσιτο *Leishmania infantum* σε διάφορες αναλογίες (A) Χρώση Giemsa των H9c2 κυττάρων και της *L. infantum* σε αναλογίες *L. infantum*/H9c2 5:1 (I), 10:1 (II), 20:1 (III). Τα βέλη υποδεικνύουν τις αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου. Παρατήρηση σε μεγέθυνση 20X. (B) Γραφικές παραστάσεις που απεικονίζουν το εκατοστιαίο ποσοστό μόλυνσης των καρδιακών μυοβλαστών σε σχέση με την αναλογία μόλυνσης και το μέσο όρο των αμαστιγωτών μορφών της *L. infantum* για τις διαφορετικές αναλογίες μόλυνσης. Τα αποτελέσματα αποτελούν μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραματισμών. Όπου (*): $P < 0,05$, δηλαδή οι διαφορές μεταξύ των μετρήσεων θεωρούνται στατιστικά σημαντικές. Οι τιμές P value προκύπτουν μετά από αξιολόγηση με t -test.

4.3 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΤΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΤΩΝ H9c2 ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΟ ΠΑΡΑΣΙΤΟ *L. INFANTUM*

Η μελέτη της πορείας της μόλυνσης σε σχέση με το χρόνο ήταν αναγκαία προκειμένου να διασαφηνισθεί το χρονο-εξαρτώμενο πρότυπο της κινητικής της μόλυνσης και η

εγκατάσταση της μόλυνσης στα H9c2 κύτταρα. Τα H9c2 κύτταρα εκτίθενται για 3 ώρες σε εναιώρημα παρασίτου *L.infantum* σε αναλογία 20:1 και καλλιεργούνται με το παράσιτο για 24, 48 και 72 ώρες. Πραγματοποιείται χρώση Giemsa των μικροσκοπικών παρασκευασμάτων και οι αμαστιγωτές μορφές της *Leishmania* καταμετρώνται. Ακολούθως προσδιορίζεται το ποσοστό των μολυσμένων H9c2 κυττάρων και ο μέσος περιεχόμενος αριθμός παρασίτων ανά κύτταρο για κάθε χρονικό σημείο.

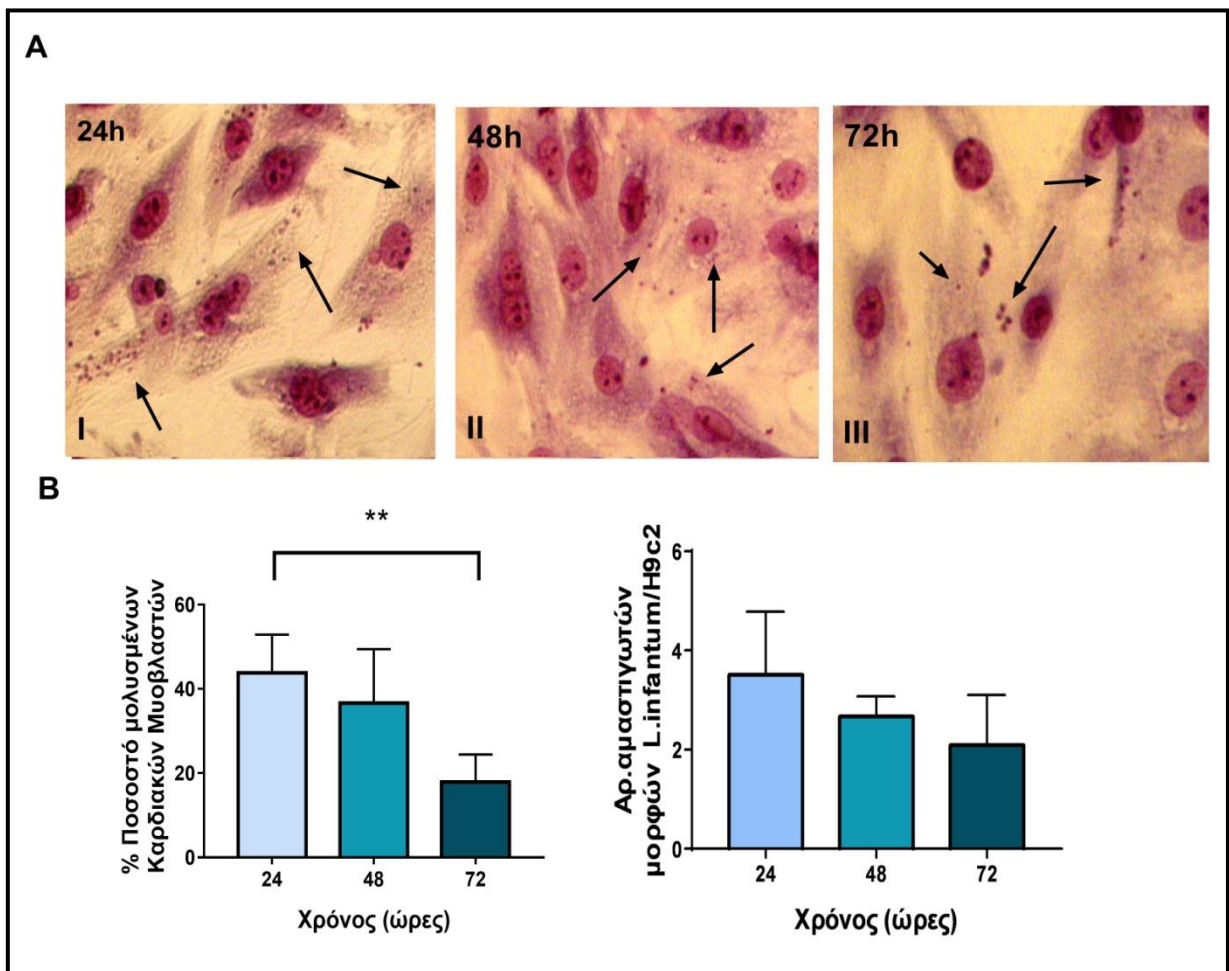
Πίνακας 4.2: % Ποσοστά μολυσμένων H9c2 κυττάρων και μέσος περιεχόμενος αριθμός αμαστιγωτών *Leishmania* ανά H9c2 κύτταρο για 24, 48 και 72 ώρες επώασης με *L.infantum* σε αναλογία μόλυνσης 20:1. Τα δεδομένα είναι αντιπροσωπευτικά τεσσάρων ανεξάρτητων πειραματισμών

Χρόνος (ώρες)	% Ποσοστό μολυσμένων κυττάρων H9c2	Μέσος περιεχόμενος αριθμός αμαστιγωτών μορφών <i>Leishmania</i> ανά H9c2 κύτταρο
24	43,8 ± 9,1	3,53 ± 1,3
48	36,6 ± 13	2,69 ± 0,39
72	17,9 ± 6,5	2,09 ± 1,0

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.4 το ποσοστό των μολυσμένων H9c2 κυττάρων και ο μέσος περιεχόμενος αριθμός των παρασίτων *L.infantum* μειώνονται όσο αυξάνεται η διάρκεια της επώασης. Πιο συγκεκριμένα στις 24 ώρες καλλιέργειας το ποσοστό των μολυσμένων κυττάρων αποκτά μέγιστη τιμή ίση με 43,8 ± 9,1 %. Στις 72 ώρες επώασης παρατηρείται σημαντική μείωση του ποσοστού των μολυσμένων κυττάρων, το οποίο είναι ίσο με 17,9 ± 6,5% και πρέπει να σημειωθεί ότι μειώνεται κατά 50% σε σχέση με το αντίστοιχο ποσοστό μολυσμένων κυττάρων, το οποίο βρέθηκε μετά τις 24 ώρες επώασης με το παράσιτο ($P < 0,01$).

Κατ' αντιστοιχία εμφανίζεται μείωση του μέσου περιεχόμενου αριθμού των αμαστιγωτών μορφών της *L.infantum* ανά κύτταρο. Πιο συγκεκριμένα, στις 24 ώρες καλλιέργειας με την *L.infantum* περιέχονται 3,53 ± 1,3 αμαστιγωτές μορφές της *Leishmania* ανά H9c2 κύτταρο κατά μέσο όρο, ενώ στις 48 και τις 72 ώρες επώασης περιέχονται 2,69 ± 0,39 και 2,09 ± 1,0 αμαστιγώτες ανά H9c2 κύτταρο αντίστοιχα, χωρίς όμως να

διαπιστώνονται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών χρονικών σημείων.



Εικόνα 4.4: Έκθεση των H9c2 κυττάρων στο παράσιτο *L. infantum* για 24 (I), 48 (II) και 72 (III) ώρες. (A) Χρώση Giemsa H9c2 κυττάρων και *L. infantum* σε αναλογία μόλυνσης 20:1 και καλλιέργεια για 24 (I), 48 (II), 72 (III) ώρες. Τα βέλη υποδεικνύουν τις αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου. Παρατήρηση σε μεγέθυνση 20X. (B) Γραφικές παραστάσεις που απεικονίζουν το εκατοστιαίο ποσοστό μόλυνσης των H9c2 κυττάρων σε σχέση με το χρόνο επώασης (ώρες) και το μέσο όρο των αμαστιγωτών μορφών της *L. infantum* για τους διαφορετικούς χρόνους καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα αποτελούν μέσο όρο τεσσάρων ανεξάρτητων πειραματισμών. Όπου (**): $P < 0,01$, δηλαδή οι διαφορές μεταξύ των μετρήσεων θεωρούνται στατιστικά σημαντικές. Οι τιμές *P* value προκύπτουν μετά από αξιολόγηση με *t*-test.

4.4 ΜΟΛΥΝΣΗ ΚΑΡΔΙΑΚΩΝ ΜΥΟΒΛΑΣΤΩΝ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ H9c2 ΜΕ *L. INFANTUM* ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΣΤΕΡΗΣΗΣ ΟΡΟΥ.

Για τη βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου μόλυνσης των H9c2 κυττάρων με το παράσιτο *L.infantum*, προτού εκτεθούν στο παράσιτο καλλιεργούνται απουσία ορού. Η αναλογία μόλυνσης που επιλέχθηκε μέχρι την ολοκλήρωση όλων των πειραματισμών είναι η προσδιοριζόμενη ως βέλτιστη αναλογία, 20:1 (παράσιτα : κύτταρο).

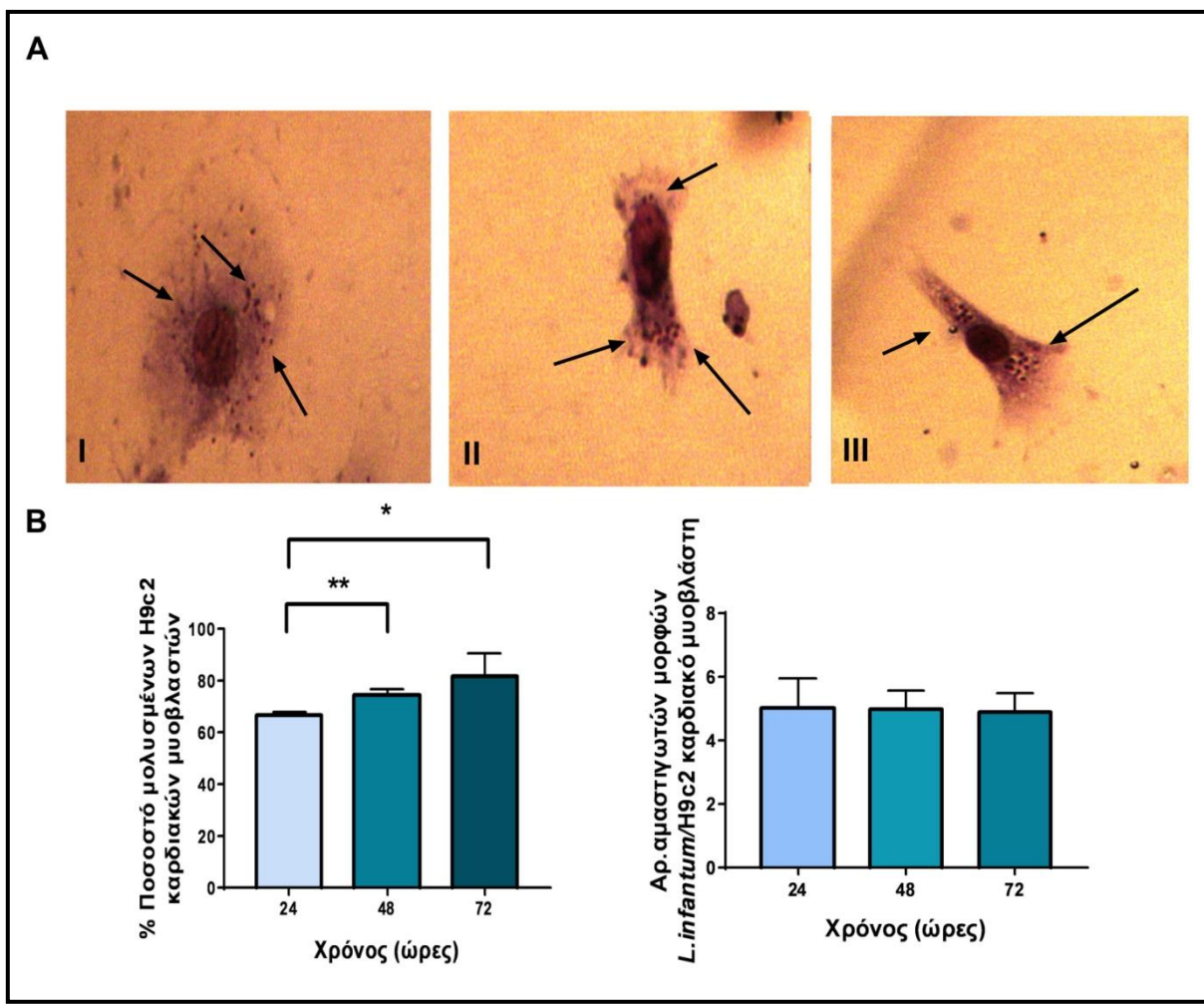
Πίνακας 4.3: Ποσοστά μολυσμένων κυττάρων και μέσος όρος αμαστιγωτών *Leishmania* /καρδιακό μυοβλάστη H9c2 για 24, 48 και 72 ώρες επώασης με το παράσιτο *L.infantum*. Τα δεδομένα είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραματισμών.

Χρόνος (ώρες)	% Ποσοστό μολυσμένων κυττάρων H9c2	Μέσος περιεχόμενος αριθμός αμαστιγωτών μορφών <i>Leishmania</i> /H9c2
24	67 ± 1,1	5,01 ± 0,93
48	75,0 ± 2,0	4,98 ± 0,59
72	82,2 ± 8,5	4,88 ± 0,59

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.3 και στην Εικόνα 4.5, παρουσιάζεται αύξηση του ποσοστού των μολυσμένων H9c2 κυττάρων κατά την αυξανόμενη διάρκεια έκθεσης στο παράσιτο *L.infantum*. Στις 72 ώρες καλλιέργειας το ποσοστό των μολυσμένων κυττάρων μεγιστοποιείται φθάνοντας το 82,2 ± 8,5 % και σημειώνεται στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τις 24 ώρες καλλιέργειας με το παράσιτο (67 ± 1,1%, $P < 0,05$). Επίσης παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ποσοστών των μολυσμένων κυττάρων κατά τις 24 και τις 48 ώρες καλλιέργειας (74,99 ± 1,98% , $P < 0,01$) με το παράσιτο *L.infantum*.

Όσον αφορά τον μέσο όρο των αμαστιγωτών μορφών της *Leishmania* ανά κύτταρο δεν παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών χρονικών σημείων έκθεσης και ο μέσος περιεχόμενος αριθμός των αμαστιγωτών μορφών της *Leishmania* είναι σταθερός και ίσος με 5 αμαστιγωτές μορφές *L.infantum* ανά H9c2 κύτταρο. Συνεπώς οι συγκεκριμένες

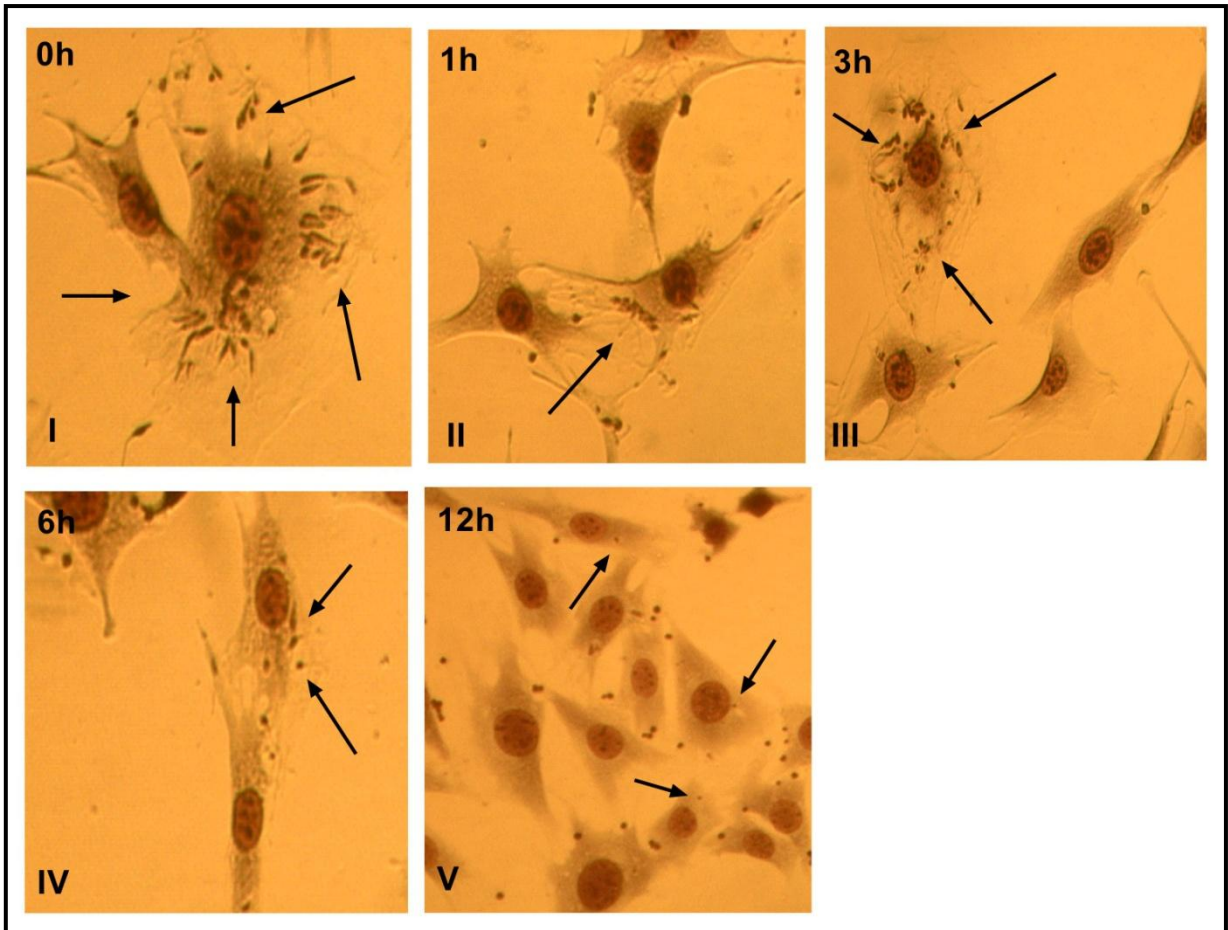
συνθήκες μόλυνσης έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού των μολυσμένων H9c2 κυττάρων δημιουργώντας έναν ομοιογενή πληθυσμό μολυσμένων κυττάρων ο οποίος είναι απαραίτητος για τα πειράματα της μελέτης των πρωτεϊνών.



Εικόνα 4.5: Έκθεση των καρδιακών μυοβλαστών στο παράσιτο για 24 (I), 48 (II) και 72 (III) ώρες υπό στέρηση ορού FBS. (A) Χρώση Giemsa καρδιακών μυοβλαστών H9c2 και *L. infantum* σε αναλογία μόλυνσης 20:1 και καλλιέργεια για 24 (I), 48 (II), 72 (III) ώρες. Τα βέλη υποδεικνύουν τις αμαστιγιωτές μορφές του παρασίτου. Παρατήρηση σε μεγέθυνση 20X. (B) Γραφικές παραστάσεις που απεικονίζουν το εκατοστιαίο ποσοστό μόλυνσης των καρδιακών μυοβλαστών σε σχέση με τον χρόνο επώασης (ώρες) και τον μέσο όρο των αμαστιγιωτών μορφών της *L. infantum* για τους διαφορετικούς χρόνους καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα αποτελούν μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραματισμών. Όπου (*): $P < 0.05$, (**): $P < 0.01$, δηλαδή οι διαφορές μεταξύ των μετρήσεων θεωρούνται στατιστικά σημαντικές. Οι τιμές P value προκύπτουν μετά από αξιολόγηση με *t-test*.

Επιπρόσθετα, έγινε η διερεύνηση περισσότερων χρονικών σημείων κατά τη μελέτη της κινητικής της μόλυνσης. Τα σημεία που προστέθηκαν στο νέο πρωτόκολλο είναι τα εξής: 1 ώρα, 3, 6 και 12 ώρες καλλιέργειας των H9c2 κυττάρων με το παράσιτο *L. Infantum*. Τρεις ώρες μετά την έκθεση στο παράσιτο *L. infantum* παρατηρούνται προσκολλημένες προμαστιγωτές μορφές της *Leishmania* στο κυτταρόπλασμα των H9c2 κυττάρων (Εικόνα 4.5, I). Το παράσιτο *L. infantum* δεν έχει εισέλθει ακόμη στα κύτταρα και είναι προσκολλημένο στην επιφάνεια τους έως και τις 12 ώρες επώασης. Επομένως έως και τις 12 ώρες καλλιέργειας δεν έχει γίνει εγκατάσταση της μόλυνσης στα H9c2 κύτταρα. Μετά τις 24 ώρες καλλιέργειας το παράσιτο *L. infantum* μετατρέπεται στην αμαστιγωτή του μορφή αφού έχει εισέλθει στα κύτταρα ξενιστές και εγκαθιστά τη μόλυνση.

Συμπερασματικά, η εγκατάσταση της μόλυνσης είναι βέβαιη λόγω του εντοπισμού των αμαστιγωτών μορφών της *L. infantum* στο κυτταρόπλασμα των H9c2, του διαρκώς αυξημένου ποσοστού μολυσμένων H9c2 καρδιακών μυοβλαστών, καθώς και του αυξημένου μέσου περιεχόμενου αριθμού αμαστιγωτών μορφών *Leishmania* ανά κύτταρο.



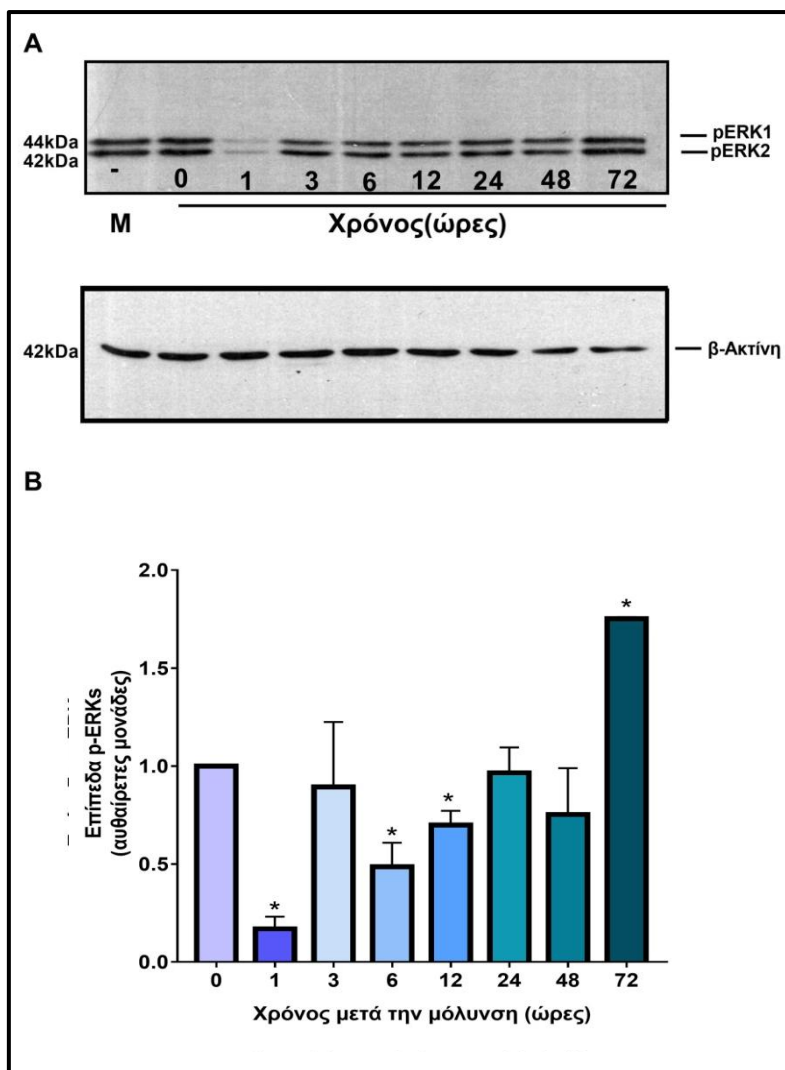
Εικόνα 4.6: Έκθεση των H9c2 κυττάρων στο παράσιτο για 0 (I), 1 (II) και 3 (III) 6 (IV) και 12 (V) ώρες. Χρώση Giemsa καρδιακών μυοβλαστών H9c2 και *L. infantum* σε αναλογία μόλυνσης 20:1 και καλλιέργεια για 0 (I), 1 (II), 3 (III), 6 (IV) και 12 (V) ώρες. Τα βέλη υποδεικνύουν τις προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου.

4.5.1 Επίπτωση της μόλυνσης καρδιακών μυοβλαστών H9c2 με το παράσιτο *L.infantum* στη φωσφορυλίωση των ERK1/2

Οι παθογόνοι οργανισμοί, όπως είναι η *Leishmania*, στοχεύουν ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια προκειμένου να αναστείλουν την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή. Εκτός των άλλων τρόπων διαφυγής της ανοσολογικής απόκρισης, τα παθογόνα τροποποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια μεταξύ των οποίων και το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAPK. Ως εκ τούτου, είχε μεγάλο ενδιαφέρον η διερεύνηση της επίπτωσης της μόλυνσης στην ενεργοποίηση των MAPK.

Αρχικά, διερευνήθηκε η επίδραση της μόλυνσης με το παράσιτο *Leishmania* στη φωσφορυλίωση των ERK1/2 συναρτήσει του χρόνου. Για να μελετηθεί το χρονο-εξαρτώμενο πρότυπο φωσφορυλίωσης των ERK1/2, τα H9c2 κύτταρα εκτίθενται για 3 ώρες στο παράσιτο *L.infantum*, σε αναλογία μόλυνσης 20:1 και στη συνέχεια επωάζονται για 1 ώρα έως 72 ώρες. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα εξής χρονικά σημεία: 1 ώρα, 3, 6, 12, 24, 48 και 72 ώρες καλλιέργειας με το παράσιτο. Ο έλεγχος της ενεργοποίησης των ERK1/2 πραγματοποιήθηκε με ανάλυση κατά Western. Για την μελέτη των ERK1/2 έγιναν 3 ανεξάρτητες μεταξύ τους επαναλήψεις του ίδιου πειράματος.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.7, η μόλυνση με *Leishmania* προκαλεί αρχικά την αποφωσφορυλίωση των ERK1/2 μετά από 1 ώρα καλλιέργειας. Πρέπει να αναφερθεί ότι σύμφωνα με τα αποτελέσματα στην 1 ώρα καλλιέργειας, η *L.infantum* βρίσκεται προσκολλημένη στη μεμβράνη των H9c2 κυττάρων κάτι το οποίο δηλώνει ότι δεν έχει μολύνει ακόμη τα κύτταρα. Από τις 6 ως τις 24 ώρες επώασης παρατηρείται αύξηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης των ERK1/2 τα οποία όμως εξακολουθούν να είναι μειωμένα σε σχέση με τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του μάρτυρα. Στην παρούσα έρευνα ως μάρτυρα χρησιμοποιήσαμε H9c2 κύτταρα τα οποία εκτέθηκαν για τρεις ώρες στο παράσιτο *L.infantum* και χαρακτηρίζονται ως χρονικό σημείο 0 (Lane 0). Μετά από 1 ώρα έκθεσης στο παράσιτο παρατηρείται σημαντική μείωση των επιπέδων των ERK1/2 καθώς εμφανίζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά με τα επίπεδα του χρονικού σημείου 0 ($0,17 \pm 0,027$ σε σχέση με το μηδενικό χρονικό σημείο, $P < 0,05$). Μετά από 72 ώρες επώασης με το παράσιτο *L.infantum* παρουσιάζεται μέγιστο της ενεργοποίησης των ERK1/2 το οποίο διαφέρει σημαντικά από την ενεργοποίηση του χρονικού σημείου 0 ($1,75 \pm 0,0055$ φορές σε σχέση με το μηδενικό χρονικό σημείο, $P < 0,05$).

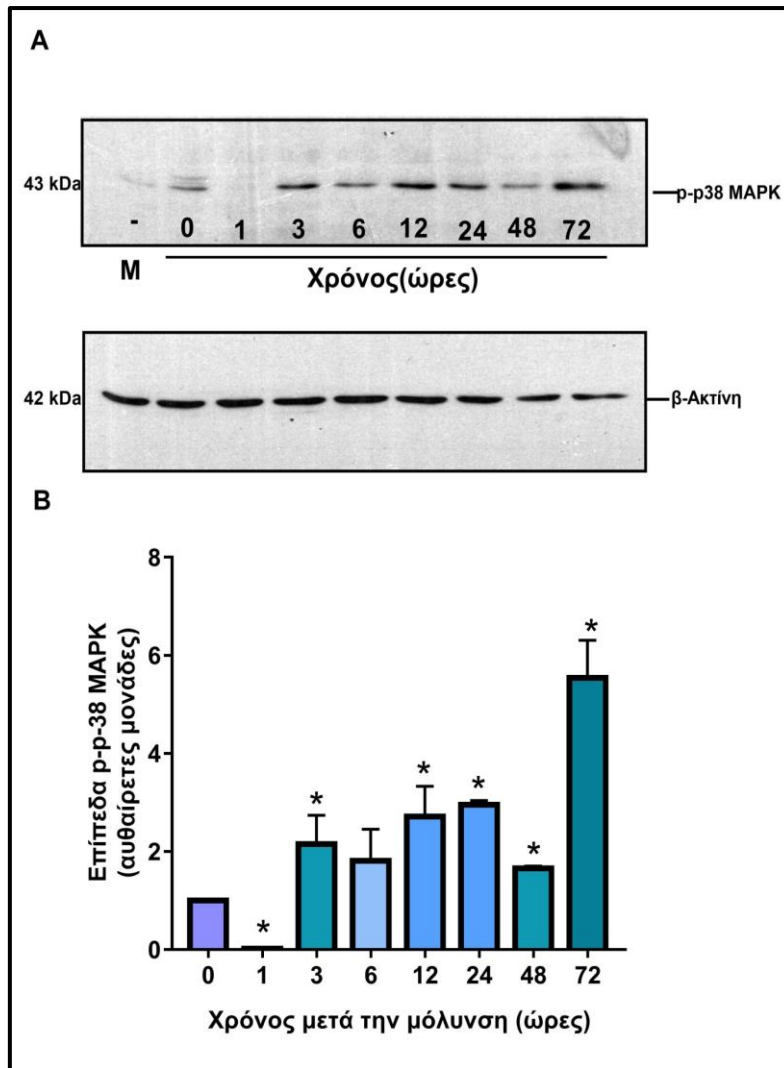


Εικόνα 4.7: Κινητική φωσφορύλιωσης των ERK1/2 σε H9c2 κύτταρα που είχαν εκτεθεί στο παράσιτο. Τα H9c2 κύτταρα εκτέθηκαν για 3 ώρες στο παράσιτο *L. Infantium* και περισυλλέγησαν στους χρόνους 0-72 ώρες. Τα αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα (20μg) διαχωρίστηκαν με 10% SDS-PAGE και ακολούθησε ανάλυση κατά Western με τη χρησιμοποίηση αντισώματος κατά των φωσφορυλιωμένων ERK1/2 (1^ο στάπωμα) και αντίσωμα κατά των ολικών επίπεδων της ακτίνης (2^ο στάπωμα) (A). Η μεταβολή της ενεργοποίησης των ERK1/2 εκφράστηκε ως φορές αύξησης της σχετικής ενεργοποίησης τους μετά την έκθεση τους στο παράσιτο σε σύγκριση με τη σχετική ενεργοποίησή τους στο στάδιο ηρεμίας (0'λεπτά της ώρας). Το ραβδόγραμμα παρουσιάζει την μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα των πυκνομετρήσεων των 3 πειραματισμών. Όπου (*): $P < 0,05$. Οι τιμές P value προκύπτουν μετά από αξιολόγηση με t-test (B). Οι εικόνες είναι αντιπροσωπευτικές τριών πειραματισμών.

4.5.2 Επίπτωση της μόλυνσης καρδιακών μυοβλαστών H9c2 με το παράσιτο *L.infantum* στη φωσφορυλίωση της p-38 MAPK

Παράλληλα με τη μελέτη της χρονοεξαρτώμενης ενεργοποίησης της φωσφορυλίωσης των ERK1/2 ήταν αναγκαία η μελέτη μιας άλλης υπερ-οικογένειας των MAPK, της p-38 MAPK. Πιο συγκεκριμένα διερευνήθηκε η μεταβολή στα επίπεδα της φωσφορυλίωσης της p-38 MAPK συναρτήσει του χρόνου κατά τη μόλυνση των H9c2 κυττάρων με *L.infantum*. Για να μελετηθεί το χρονο-εξαρτώμενο πρότυπο φωσφορυλίωσης της p-38 MAPK τα H9c2 κύτταρα εκτέθηκαν σε εναιώρημα προμαστιγωτών μορφών *Leishmania Infantum* για 3 ώρες και στη συνέχεια επώασθηκαν για αυξανόμενα χρονικά διαστήματα από 1 ώρα έως 72 ώρες. Πιο συγκεκριμένα τα χρονικά σημεία που μελετήθηκαν είναι τα εξής: 1 ώρα, 3, 6, 12, 24, 48, 72 ώρες μετά τη μόλυνση. Ο έλεγχος της ενεργοποίησης της p-38 MAP κινάσης πραγματοποιήθηκε με ανάλυση κατά Western. Για τη μελέτη της p-38 έγιναν 3 ανεξάρτητες μεταξύ τους επαναλήψεις του ίδιου πειράματος.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.8 τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μόλυνση των H9c2 κυττάρων με το παράσιτο *L.infantum* οδηγεί σε πλήρη αποφωσφορυλίωση της p-38 MAPK στην 1 ώρα καλλιέργειας ($0,018 \pm 0,0021$ σε σχέση με το μηδενικό χρονικό σημείο, $P < 0,05$), ενώ για τις επόμενες 47 ώρες παρουσιάζονται ιδιαίτερος αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης της p-38 MAPK σε σχέση με το μάρτυρα. Ο μάρτυρας στην συγκεκριμένη έρευνα είναι κύτταρα H9c2 τα οποία θεωρούνται ότι βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας καθώς εκτέθηκαν για 3 ώρες στο παράσιτο *L.Infantum* (χρονικό σημείο 0). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι παρουσιάζεται μέγιστο των επιπέδων ενεργοποίησης της p38 MAPK μετά από 72 ώρες καλλιέργειας με το παράσιτο ($5,54 \pm 0,54$ φορές σε σχέση με το μηδενικό χρονικό σημείο, $P < 0,05$).

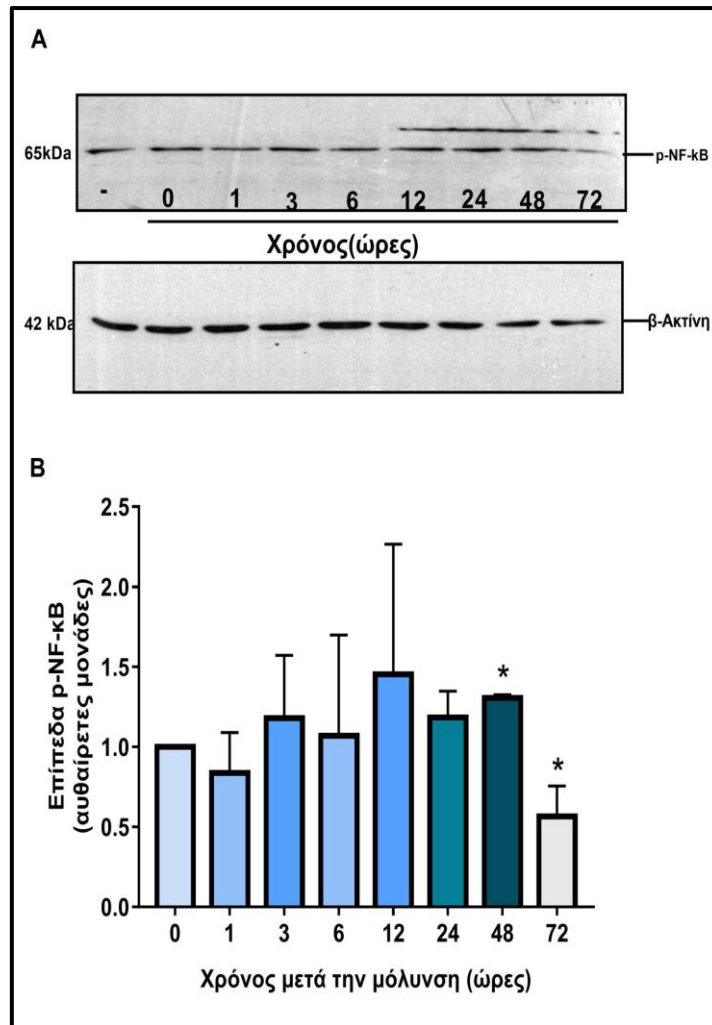


Εικόνα 4.8: Κινητική φωσφορυλίωσης της p-38 MAP κινάσης σε H9c2 κύτταρα που είχαν εκτεθεί στο παράσιτο. Τα H9c2 κύτταρα εκτέθηκαν για 3 ώρες στο παράσιτο *L. Infantum* και περισυλλέγησαν στους χρόνους 0-72 ώρες. Τα αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα (20μg) διαχωρίστηκαν με 10% SDS-PAGE και ακολούθησε ανάλυση κατά Western με τη χρησιμοποίηση αντισώματος κατά της φωσφορυλιωμένης μορφής της p-38 (1^ο στόπωμα) και αντίσωμα κατά των ολικών επιπέδων της ακτίνης (2^ο στόπωμα) (A). Η μεταβολή της ενεργοποίησης της p-38 εκφράστηκε ως φορές αύξησης της σχετικής ενεργοποίησης της μετά την έκθεση τους στο παράσιτο σε σύγκριση με τη σχετική ενεργοποίηση τους στο στάδιο ηρεμίας (0'λεπτά της ώρας) Το ραβδόγραμμα παρουσιάζει την μέση τιμή ± τυπική απόκλιση των πυκνομετρήσεων των 3 πειραματισμών. Όπου (*) : $P < 0,05$. Οι τιμές P value προκύπτουν μετά από αξιολόγηση με t-test (B). Οι εικόνες είναι αντιπροσωπευτικές τριών πειραματισμών.

4.5.3 Επίπτωση της μόλυνσης καρδιακών μυοβλαστών H9c2 με το παράσιτο *L.infantum* στη φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB

Η ενεργοποίηση των MAPK έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση πολλών μεταγραφικών παραγόντων καταρροϊκά του σηματοδοτικού μονοπατιού των MAPK. Ένας από αυτούς τους μεταγραφικούς παράγοντες, ο οποίος ενεργοποιείται από τις MAPK είναι ο πυρηνικός παράγοντας κB (NF-κB) η ενεργοποίηση του οποίου μελετήθηκε στην παρούσα εργασία. Όπως παραπάνω, διερευνήθηκε το χρονοεξαρτώμενο πρότυπο ενεργοποίησης του NF-κB μετά από τρεις ώρες έκθεσης των H9c2 κυττάρων σε εναιώρημα προμαστιγωτών μορφών της *L.infantum*. Τα χρονικά σημεία που μελετήθηκαν ήταν τα 1 ώρα 3, 6, 12, 24, 48 και 72 ώρες μετά την μόλυνση. Ο έλεγχος της ενεργοποίησης του NF-κB πραγματοποιήθηκε με ανάλυση κατά Western. Για τη μελέτη του NF-κB έγιναν 3 ανεξάρτητες μεταξύ τους επαναλήψεις του ίδιου πειράματος.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μέχρι και τις 24 ώρες μετά την μόλυνση δεν παρουσιάζονται αξιοσημείωτες μεταβολές των επιπέδων φωσφορυλίωσης της p65 υπομονάδας του NF-κB σε σχέση με τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του μάρτυρα. Στις 48 ώρες καλλιέργειας με την *L.infantum* παρουσιάζεται σημαντική αύξηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της p65 υπομονάδας ($1,31 \pm 0,015$ φορές σε σχέση με το μηδενικό χρονικό σημείο, $P < 0,05$). Τα επίπεδα της ενεργοποίησης στις 72 ώρες επώασης με το παράσιτο εμφανίζουν σημαντική μείωση ($0,567 \pm 0,133$ σε σχέση με τα επίπεδα ενεργοποίησης του χρονικού σημείου μηδέν, $P < 0,05$).

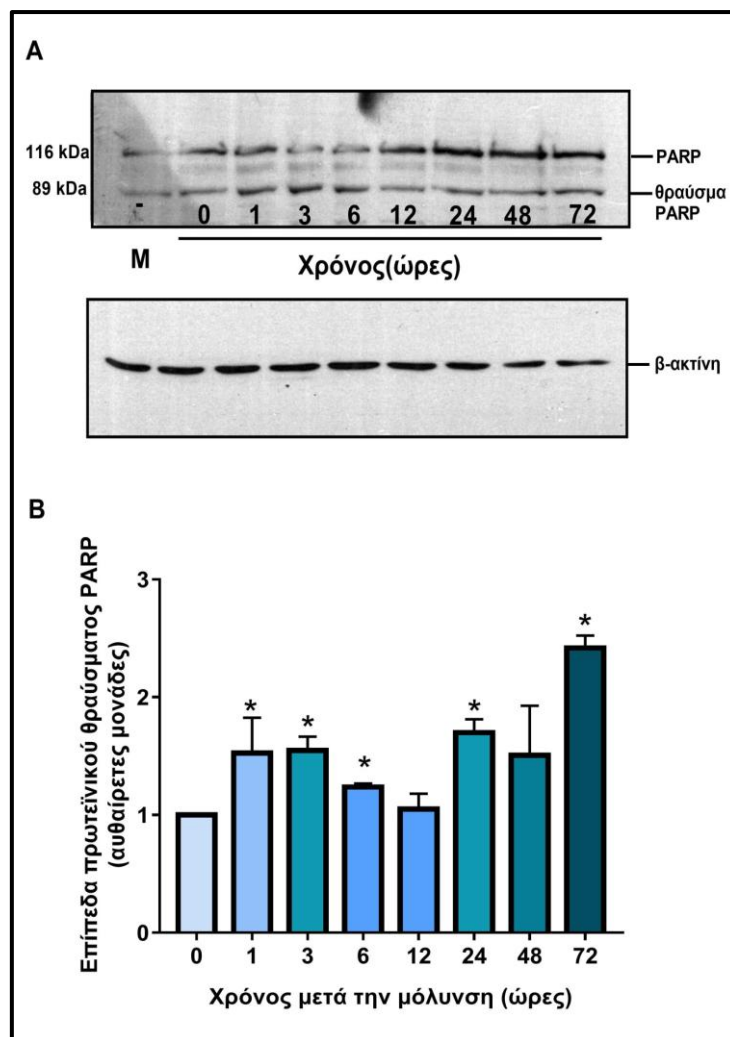


Εικόνα 4.9: Κινητική φωσφορυλίωσης του NF-κB σε H9c2 κύτταρα που είχαν εκτεθεί στο παράσιτο. Τα H9c2 κύτταρα εκτέθηκαν για 3 ώρες στο παράσιτο *L. infantum* και περισυλλέγησαν στους χρόνους 0-72 ώρες. Τα αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα (40μg) διαχωρίστηκαν με 10% SDS-PAGE και ακολούθησε ανάλυση κατά Western με τη χρησιμοποίηση αντισώματος κατά της φωσφορυλιωμένης μορφής του NF-κB (1^ο στύπωμα) και αντίσωμα κατά των ολικών επίπεδων της ακτίνης (2^ο στύπωμα) (A). Η μεταβολή της ενεργοποίησης του NF-κB εκφράστηκε ως φορές αύξησης της σχετικής ενεργοποίησης της μετά την έκθεση τους στο παράσιτο σε σύγκριση με τη σχετική ενεργοποίησή τους στο στάδιο ηρεμίας (0' λεπτά της ώρας). Το ραβδόγραμμα παρουσιάζει την μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα των πυκνομετρήσεων των 3 πειραματισμών. Όπου (*) : $P < 0,05$. Οι τιμές P value προκύπτουν μετά από αξιολόγηση με t-test (B). Οι εικόνες είναι αντιπροσωπευτικές τριών πειραματισμών.

4.5.4 Διερεύνηση της πρωτεόλυσης της PARP κατά την μόλυνση της κυτταρικής σειράς των καρδιακών μυοβλαστών H9c2 με το παράσιτο *L.infantum*

Για να μελετηθεί το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των παραπάνω κυτταρικών μηχανισμών έγινε διερεύνηση της απόπτωσης, μέσω της ανίχνευσης του θραύσματος της PARP. Ο έλεγχος της ενεργοποίησης του θραύσματος της PARP πραγματοποιήθηκε με ανάλυση κατά Western.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (Εικόνα 4.10), μέχρι τις 6 ώρες καλλιέργειας των H9c2 κυττάρων με το παράσιτο, εμφανίζεται αύξηση των επιπέδων ενεργοποίησης του θραύσματος, καθώς αυτά διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με το μηδενικό χρονικό σημείο. Κατά τις 24 ώρες καλλιέργειας με το παράσιτο παρουσιάζεται σημαντική αύξηση των επιπέδων ενεργοποίησης του θραύσματος της PARP σε σχέση με το μηδενικό χρονικό σημείο ($1,69 \pm 0,08$ φορές σε σχέση με το μηδενικό χρονικό σημείο, $P < 0,05$). Επιπρόσθετα στις 72 ώρες καλλιέργειας το επίπεδο του θραύσματος της PARP εμφανίζει μέγιστο της ενεργοποίησης του ($2,42 \pm 0,074$ φορές σε σχέση με το μηδενικό χρονικό σημείο, $P < 0,05$). Όπως αναφέρθηκε στα αποτελέσματα προηγούμενης ενότητας, η εγκατάσταση της μόλυνσης πραγματοποιείται μετά τις 24 ώρες καλλιέργειας με το παράσιτο *L.infantum* καθώς τότε είναι ορατές οι αμαστιγωτές μορφές της *Leishmania* στο κυτταρόπλασμα των H9c2 κυττάρων. Επομένως είναι λογικό τα επίπεδα της ενεργοποίησης του θραύσματος να είναι αυξημένα κατά τις 24, 48 και 72 ώρες επώασης με το παράσιτο.



4.10: Κινητική φωσφορύλιωσης του θραύσματος της PARP σε H9c2 κύτταρα που είχαν εκτεθεί στο παράσιτο. Τα H9c2 κύτταρα εκτέθηκαν για 3 ώρες στο παράσιτο *L. infantum* και περισυλλέγησαν στους χρόνους 0-72 ώρες. Τα αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα (40μg) διαχωρίστηκαν με 8% SDS-PAGE και ακολούθησε ανάλυση κατά Western με τη χρησιμοποίηση αντισώματος κατά της φωσφορυλιωμένης μορφής της PARP (1^ο στύπωμα) και αντίσωμα κατά των ολικών επιπέδων της ακτίνης (2^ο στύπωμα) (A). Η μεταβολή της ενεργοποίησης του NF-κB εκφράστηκε ως φορές αύξησης της σχετικής ενεργοποίησης της μετά την έκθεση τους στο παράσιτο σε σύγκριση με τη σχετική ενεργοποίησή τους στο στάδιο ηρεμίας (0 λεπτά της ώρας) (B). Οι εικόνες είναι αντιπροσωπευτικές τριών πειραματισμών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η λεισμανίαση είναι μια πολυσυστημική νόσος, η οποία εκδηλώνεται με τρεις κλινικές μορφές την σπλαγχνική, την βλεννογονοδερματική και τη δερματική λεισμανίαση. Η σπλαγχνική μορφή της λεισμανίασης είναι η πιο σοβαρή μορφή της νόσου και μπορεί να είναι θανατηφόρος, εάν δεν αντιμετωπισθεί έγκαιρα με κατάλληλη θεραπεία. Τα εσωτερικά όργανα τα οποία προσβάλλει το παράσιτο είναι ο σπλήνας, το ήπαρ και ο μυελός των οστών και οι τύποι κυττάρων, οι οποίοι έχουν καταγραφεί ως κύτταρα-ξενιστές της *Leishmania* είναι τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα και τα δενδριτικά κύτταρα.

Έως σήμερα υπάρχουν καταγεγραμμένες βιβλιογραφικές αναφορές για αλλοιώσεις στο μυοκάρδιο σκύλων, οι οποίοι έχουν μολυνθεί με *Leishmania infantum*. Συγκεκριμένα σε σχετικά πρόσφατη έρευνα του Costagliola και της ομάδας του έχουν καταγραφεί νέκρωση και εκφυλισμός των καρδιομυοκυττάρων. Στην εν λόγω μελέτη πραγματοποιήθηκε η τεχνική της ανοσοϊστοχημείας αφού τα δείγματα εξετάσθηκαν ιστοπαθολογικά για να γίνει τελικά η διάγνωση μυοκαρδίτιδας [83].

Σε παλαιότερη έρευνα της Rosa και των συνεργατών της, εντοπίστηκαν μολυσμένα μακροφάγα με μικρό παρασιτικό φορτίο *Leishmania infantum chagasi*, τα οποία ανιχνεύθηκαν σε καρδιακούς ιστούς μολυσμένων σκύλων. Το ενδιαφέρον είναι ότι κανένας από τους σκύλους δεν εμφάνιζε κλινικές ενδείξεις καρδιακών ασθενειών ή αρρυθμιών. Πραγματοποιήθηκε ιστολογική και ανοσοϊστοχημική μέθοδος προκειμένου να απεικονιστούν οι αλλοιώσεις και τα παράσιτα στην καρδιά των μολυσμένων με *Leishmania infantum chagasi* σκύλων [31].

Για την μελέτη της καρδιακής λειτουργίας, καθώς και καρδιακών ασθενειών χρησιμοποιείται η κυτταρική σειρά καρδιακών μυοβλαστών H9c2, η οποία προέρχεται από εμβρυϊκό κόλπο αρουραίου. Η κυτταρική σειρά καρδιακών μυοβλαστών H9c2 παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με τα πρωτογενή καρδιομυοκύτταρα. Η κυριότερη παρόλα αυτά, διαφορά τους είναι ότι τα πρωτογενή καρδιακά κύτταρα δεν έχουν την ικανότητα της διαίρεσης. Η κυτταρική σειρά H9c2 προτιμάται έναντι της χρήσης πειραματοζώων, καθώς παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα.

Έως σήμερα δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα, τα οποία να αναφέρονται στην *in vitro* μόλυνση καρδιακών μυοβλαστών της κυτταρικής σειράς H9c2 με το παράσιτο

Leishmania. Πρώτος στόχος της συγκεκριμένης ερευνητικής μελέτης ήταν η διερεύνηση της δυνατότητας μόλυνσης των καρδιακών μυοβλαστών της κυτταρικής σειράς H9c2 με το παράσιτο *Leishmania infantum*. Αρχικά εφαρμόσαμε το πρωτόκολλο μόλυνσης των μακροφάγων και δενδριτικών κυττάρων, το οποίο χρησιμοποιείται στο εργαστήριο Ανοσολογίας Λοιμώξεων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, στον συγκεκριμένο τύπο κυτταρικής σειράς για να διασαφηνισθεί αρχικά εάν οι καρδιακοί μυοβλάστες μολύνονται. Η διαπίστωση ότι η κυτταρική σειρά H9c2 μολύνεται από το GH8 στέλεχος του παρασίτου *Leishmania infantum* έκανε επιτακτική την περαιτέρω μελέτη της πορείας της μόλυνσης. Δεύτερος στόχος της διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της δυνατότητας του παρασίτου να διαφοροποιείται και να πολλαπλασιάζεται μέσα στα κύτταρα, καθώς και της επίδρασής του στα σηματοδοτικά μονοπάτια των MAPK και η διερεύνηση της ενεργοποίησης μορίων καταρροϊκά του μονοπατιού των MAPK. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Τέλος, διερευνήθηκε η διάσπαση της πολύ-ADP-ριβόζης (PARP), η οποία αποτελεί έναν ευρέως μελετημένο δείκτη απόπτωσης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, είναι ιδιαίτερος ενδιαφέρον το γεγονός ότι το παράσιτο *L.infantum* εγκαθιστά μόλυνση στα H9c2 κύτταρα, καθώς δεν υπήρχαν βιβλιογραφικά δεδομένα τα οποία να παρουσιάζουν τον συγκεκριμένο τύπο κυττάρου ως ξενιστή του παρασίτου. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω τα κύτταρα στα οποία έχει εντοπιστεί το παράσιτο είναι τα μακροφάγα[52][84][22][27], τα δενδριτικά κύτταρα[55][85][86] και τα ουδετερόφιλα[85][58][22][52].

Το *Trypanosoma cruzi* είναι ένα άλλο υποχρεωτικά ενδοκυττάριο παράσιτο που ανήκει στην τάξη των Kinetoplastida μαζί με την *Leishmania spp.* Έρευνες, οι οποίες έχουν πραγματοποιηθεί σε καρδιομυοκύτταρα, τα οποία μολύνονται με *T.cruzi* προσπάθησαν να αποσαφηνίσουν τον τρόπο δράσης του συγκεκριμένου παρασίτου στην καρδιακή λειτουργία. Το *Trypanosoma cruzi* προκαλεί την ασθένεια Chagas, η οποία είναι γνωστή και ως αμερικανική Τρυπανοσωμίαση. Η ασθένεια Chagas είναι μια πολυσυστημική νόσος, η οποία επηρεάζει το καρδιαγγειακό, το νευρικό, και το πεπτικό σύστημα. Η καρδιομυοπάθεια είναι η κυριότερη αιτία θνησιμότητας για τους ασθενείς με Chagas. Η καρδιομυοπάθεια Chagas σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εγκεφαλικού [87][88].

Σε άλλη έρευνα, ο Hernandez και οι συνεργάτες του, θέλησαν να διερευνήσουν εάν η κουργκουμίνη, η οποία είναι ευρέως γνωστή για τις καρδιοπροστατευτικές και

αντιφλεγμονώδεις δράσεις της, δρα προστατευτικά σε περιπτώσεις μυοκαρδίτιδας, η οποία προκαλείται από την ασθένεια Chagas. Οι ερευνητές απέδειξαν ότι η δια του στόματος χορήγηση κουρκουμίνης σε δόση 100mg/kg/μέρα σε BALB/c ποντίκια, τα οποία είχαν μολυνθεί ενδοπεριτοναϊκά με τρυπομαστιγώτες *T. cruzi*, οδήγησε σε μειωμένη θνησιμότητα δρώντας καρδιοπροστατευτικά, περιορίζοντας την καρδιακή φλεγμονή. Εν συνεχεία, στην συγκεκριμένη έρευνα, χρησιμοποιώντας την κυτταρική σειρά καρδιομυοκυττάρων HL-1 την οποία μόλυναν in vitro με *T. cruzi* και στην οποία χορήγησαν κουρκουμίνη, παρατήρησαν μειωμένα επίπεδα προφλεγμονώδους προσταγλανδίνης E2 (PGE2), η οποία είναι αυξημένη σε περιπτώσεις μολυσμένου ιστού μυοκαρδίου. Πιο συγκεκριμένα τα HL-1 κύτταρα επώαστηκαν για 2 ώρες με 0.3 nM ενδοθηλίνης-1 και στην συνέχεια μολύνθηκαν με τρυπομαστιγώτες *T. cruzi*, για 3 ή 24 ώρες, παρουσία και απουσία κουρκουμίνης στις εξής συγκεντρώσεις 0, 13.5 και 27 μM. Η αναλογία μόλυνσης που επιλέχθηκε είναι η 5:1 (παράσιτα:κύτταρο). Παράλληλα απομόνωσαν πρωτογενή καρδιομυοκύτταρα από ενήλικα BALB/c ποντίκια. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Western, μέθοδος ELISA και Real-time RT-PCR ανάλυση. [89].

Σε άλλη έρευνα των Cevey και των συνεργατών του, οι οποίοι χρησιμοποίησαν 2 διαφορετικά στελέχη *Trypanosoma cruzi* [K-98 (TcI) και RA (TcVI)] και μόλυναν BALB/c ποντίκια, δημιουργώντας ένα μοντέλο που προσομοιάζει την χρόνια ασθένεια Chagas, διαπιστώθηκε ότι η χορήγηση της φαινοφιβράτης (Fenofibrate), η οποία έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες βελτιώνει την καρδιακή λειτουργία, αποτρέποντας την καταστροφή του μυοκαρδίου και οδηγεί σε εύρυθμη κολπική λειτουργία. Οι ερευνητές χορήγησαν in vitro φαινοφιβράτη σε καρδιομυοκύτταρα νεογνών ποντικών στελέχους CF-1, τα οποία είχαν μολύνει με *T. cruzi* και επιβεβαίωσαν την αντιφλεγμονώδη δράση της καθώς κατέγραψαν μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης NOS2 και μειωμένα επίπεδα μονοξειδίου του αζώτου (NO). Πιο συγκεκριμένα τα BALB/c ποντίκια μολύνθηκαν για 6 εβδομάδες ενδοπεριτοναϊκά με 1×10^5 τρυπομαστιγώτες (K-98) και στην συνέχεια μολύνθηκαν για 4 εβδομάδες με το στέλεχος TcVI. Η φαινοφιβράτη χορηγήθηκε για 30 συνεχόμενες ημέρες σε δόση 100mg/kg/ημέρα, ενώ η βενζιδαζόλη χορηγήθηκε σε δόση 25mg/kg/ημέρα για 15 συνεχόμενες ημέρες. Για την in vitro μελέτη τα καρδιακά κύτταρα απομονώθηκαν από ποντίκια CF-1 και εκτέθηκαν στο παράσιτο *T. cruzi* για 3 ώρες σε αναλογία μόλυνσης 5:1. Τα κύτταρα προτού εκτεθούν στην μόλυνση επώαστηκαν για 30 λεπτά της ώρας με 50, 100 ή 150

μM φαινοφιβράτης. Οι ερευνητές πραγματοποίησαν τεχνική κατά Western για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των NO, NOS2, IκBα [90].

Ο Hovsepian και οι συνεργάτες του μελέτησαν τον ρόλο της IL-10 σε πρωτογενή καρδιομυοκύτταρα CF-1 εμβρύων ποντικών, τα οποία μόλυναν με RA στέλεχος *T. cruzi* και δημιούργησαν *in vivo* πειραματικά μοντέλα μόλυνσης. Η αναλογία μόλυνσης που χρησιμοποίησαν στη συγκεκριμένη έρευνα ήταν η 5:1 (παράσιτα : κύτταρο). Μετά από 3 ώρες επώασης με το παράσιτο πραγματοποίησαν εκπλύσεις με DMEM στο οποίο προστέθηκε 1% FCS και πραγματοποίησαν επώασεις για 24, 48 και 72 ώρες. Ακολούθως πραγματοποίησαν ανάλυση κατά Western. Διαπίστωσαν ότι χορηγώντας εξωγενώς IL-10, αναστέλλεται η έκφραση των NOS2, TNF-α και IL-6, επίσης, παρατήρησαν μικρότερη διάσπαση του κυτταροπλασματικού IκB-α και κατά συνέπεια μειωμένη μετατόπιση στον πυρήνα της p65 υπομονάδας του NF-κB σε μολυσμένα καρδιομυοκύτταρα σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Η μόλυνση με *T. cruzi* προάγει επίσης την ενεργοποίηση των ERK1/2 [91].

Το παράσιτο *Leishmania* έχει αναπτύξει διάφορους τρόπους διαφυγής του ανοσοποιητικού συστήματος, επιβιώνοντας στα κύτταρα-ξενιστές και στην συνέχεια μολύνοντας παρακείμενα κύτταρα. Ένας από τους σημαντικότερους στόχους διαφυγής του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η τροποποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών των MAPK. Οι μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα. Το παράσιτο *Leishmania* έχει διαπιστωθεί ότι τροποποιώντας τα σηματοδοτικά μονοπάτια των MAPK, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή IL-12 (p-38) και IL-10 (ERK 1/2) σε μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα, κατορθώνει και επιβιώνει. Το παράσιτο *Leishmania* επιδιώκει την αποτροπή της Th-1 ανοσολογικής απόκρισης, προάγοντας την Th-2 απόκριση, μέσω της μείωσης της IL-12 και αύξησης της παραγωγής της IL-10, η οποία οδηγεί στην επιβίωση του μέσα στα κύτταρα-ξενιστές. Η *L. amazonensis* έχει την ικανότητα να διαφεύγει της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή. Το μονοπάτι των ERK1/2 τροποποιείται από την *L. amazonensis* ούτως ώστε να ευνοείται η επιβίωση στα κύτταρα του ξενιστή.

Σε έρευνα της Boggiatto και των συνεργατών της όπου μελετήθηκε η μόλυνση δενδριτικών κυττάρων με *L. amazonensis* παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης των ERK1/2 και αναστολή της ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα για την *in vitro* μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δενδριτικά κύτταρα τα οποία επώαστηκαν για 24 ώρες με αμαστιγώτες *L. amazonensis* ή *L. mazor* σε αναλογία μόλυνσης 1:3. Οι ερευνητές

πραγματοποίησαν ανάλυση κατά Western, κυτταρομετρία ροής και δοκιμή ανοσοφθορισμού. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας, η έκθεση σε αμαστιγώτες της *L. amazonensis* οδήγησε σε ταχεία αύξηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης των ERK1/2 λίγα λεπτά μετά την έκθεση στο παράσιτο. Αντίθετα, η μόλυνση με προμαστιγώτες της *L. amazonensis*, οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης των ERK1/2 αρκετά αργότερα δηλαδή μετά από 3 ώρες έκθεσης στο παράσιτο. Δεν υπήρξε φωσφορυλίωση των άλλων MAPK δηλαδή των p38 και των JNK. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία με την δική μας μελέτη καθώς και εμείς δεν παρατηρήσαμε αύξηση στα επίπεδα ενεργοποίησης των JNKs (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται στην διπλωματική). [54]. Πάραυτα τα αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης των ERK1/2 κατά τις 72 ώρες έκθεσης των H9c2 κυττάρων στην *L. infantum* συνηγορούν στο συμπέρασμα ότι η *Leishmania* παρεμβαίνει στα σηματοδοτικά μονοπάτια των MAPK τροποποιώντας τα. Οι ερευνητές στην συγκεκριμένη έρευνα υποστήριξαν ότι η καθυστερημένη χρονικά αύξηση στην φωσφορυλίωση των ERK1/2 MAPK (μετά της 3 ώρες έκθεσης) είναι πιθανό να οφείλεται στην μετατροπή της προμαστιγώτης μορφής της *Leishmania* στην αμαστιγώτη ενδοκυττάρια μορφή του παρασίτου.

Σε εργασία των Othman και συν. οι ερευνητές απέδειξαν ότι η *L. donovani* και η *L. major* επάγουν ταχεία φωσφορυλίωση των p-38 και ERK1/2 MAPK με την ίδια ένταση. Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά μακροφάγων Raw264.7. Τα κύτταρα μολύνθηκαν με προμαστιγώτες *L. major* σε αναλογία μόλυνσης 10:1 και επώαστηκαν για 5, 15, 30 και 60 λεπτά της ώρας. Τα μέγιστα επίπεδα της φωσφορυλίωσης των MAPK κατά την μόλυνση με *L. donovani* και *L. major* παρατηρήθηκαν μετά από 15 και 30 λεπτά έκθεσης αντίστοιχα. Η κινητική της φωσφορυλίωσης των κινασών διέφερε μεταξύ των 2 ειδών. Η μόλυνση με *L. major* επέφερε μεγαλύτερης διάρκειας ενεργοποίηση, η οποία ανιχνεύεται ακόμη και 1 ώρα μετά την φαγοκυττάρωση των παρασίτων από τα Raw264.7 [92]. Στην έρευνα που πραγματοποιήσαμε 1 ώρα μετά έκθεση στο παράσιτο παρατηρήθηκε πλήρης αποφωσφορυλίωση των p-38 και ERK1/2 MAPK. Ακολούθως καταγράφηκε αύξηση των επιπέδων της ενεργοποίησης της p38 MAPK και των ERK1/2 με μέγιστο στις 72 ώρες επώασης. Η διαφορά αυτή με το αποτέλεσμα της έρευνας των Othman και συνεργατών μπορεί να οφείλεται στο διαφορετικό στέλεχος παρασίτου και στο διαφορετικό τύπο κυτταρικής σειράς, η οποία πυροδοτεί διαφορετική απόκριση. Η λιποφωσφογλυκάνη της *L. mexicana*

ενεργοποιεί τις ERK1/2 και την p-38 MAPK σε μακροφάγα και οδηγεί σε παραγωγή TNF-IL-1 β , IL-12p70 και IL-10.

Σε έρευνα των Ζηκάκη και συνεργατών, η οποία έγινε με σκοπό την αποσαφήνιση των μοριακών μηχανισμών, οι οποίοι πυροδοτούνται από την επίδραση της κουρκουμίνης στα H9c2 κύτταρα, παρατηρήθηκε ενεργοποίηση της p38-MAPK σε δόσο- & χρονο-εξαρτώμενο τρόπο. Στην συγκεκριμένη έρευνα πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Western για να προσδιοριστεί το πρότυπο ενεργοποίησης της p38-MAPK, η οποία έχει πολύ σημαντικό ρόλο στις βιολογικές διαδικασίες, καθώς οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο ή επιβίωση. Τα H9c2 κύτταρα επώαστηκαν για 2 ώρες με κουρκουμίνη σε συγκεντρώσεις 5, 10, 20 και 40 μ M. Τα μέγιστα επίπεδα της φωσφορυλίωσης της p38-MAPK παρατηρήθηκαν κατά την χορήγηση 20 μ M κουρκουμίνης επομένως οι ερευνητές χρησιμοποιώντας αυτήν την συγκέντρωση εξέτασαν το χρονο-εξαρτώμενο πρότυπο της ενεργοποίησης της p38-MAPK επώζοντας τα κύτταρα για 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 16 και 24 ώρες. Η p38-MAPK μεγιστοποιείται μετά από 4 ώρες επώασης με την κουρκουμίνη. Μελετήθηκε το υπόστρωμα της p38-MAPK η Hsp27 το οποίο παρουσίαζε ενεργοποίηση για 1 ώρα έως 6 ώρες επώασης με την κουρκουμίνη. Επομένως, η επίδραση με κουρκουμίνη στα H9c2 κύτταρα ενεργοποιεί την p38-MAPK, η οποία ενεργοποιεί τα υποστρώματα της Hsp27 και MSK1 [93].

Είναι γνωστό ότι η ενεργοποίηση των MAPK οδηγεί σε ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων όπως είναι ο NF- κ B. Ο NF- κ B κατά την μόλυνση με *L. infantum* ρυθμίζει την έκφραση χημειοκινών, κυτταροκινών, μορίων προσκόλλησης και ενζύμων, "ενορχηστρώνοντας" την κυτταρική ανοσολογική απόκριση εναντίον του παρασίτου. Ο Borghi και οι συνεργάτες του διαπίστωσαν ότι η μόλυνση με *L. amazonensis* σε BALB/c ποντίκια οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα έκφρασης του TNF α mRNA στο νωτιαίο μυελό των μολυσμένων ποντικών. Ο TNF α κατέχει πολύ σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του πόνου επάγοντας μηχανική και θερμική υπεραλγησία μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού των MAPK. Η ενεργοποίηση του NF- κ B επάγει την μεταγραφή του γονιδίου του TNF α . Οι ερευνητές στην παρούσα εργασία χορήγησαν αναστολέα του NF- κ B (PDTC) στα BALB/c ποντίκια και παρατήρησαν ότι τα επίπεδα του TNF α στο νωτιαίο μυελό μειώνονται. Οι θεραπείες που στοχεύουν τον NF- κ B του νωτιαίου μυελού και/ή τον TNF α είναι αποτελεσματικές και μπορούν να ελέγξουν τον πόνο που προκαλείται από την μόλυνση με *L. amazonensis* [94].

Η *L.amazonensis* προκαλεί τη δερματική κλινική μορφή της λειψμανίασης και ενεργοποιεί ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια προκειμένου να διαφύγει την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή, η οποία έχει ως στόχο τον περιορισμό ή και την εξάλειψη της μόλυνσης. Ένα από αυτά τα σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία ενεργοποιεί η *L.amazonensis* είναι το μονοπάτι του NF-κΒ, το οποίο ρυθμίζει την TH1 ανοσολογική απόκριση. Κατά την διάρκεια της μόλυνσης τα επίπεδα του NF-κΒ μειώνονται, οδηγώντας σε επικράτηση του παρασίτου στα μακροφάγα. Σε έρευνα τους ο Macedo και οι συνεργάτες του χορήγησαν πεντασθενές αντιμόνιο σε συνδυασμό με αναστολέα του NF-κΒ και του TNF-α (QNZ), διερευνώντας αν ο συνδυασμός αυτός οδηγεί σε διαφορετική ανοσολογική απόκριση με προστατευτικό χαρακτήρα. Οι ερευνητές μόλυναν μακροφάγα με *L.amazonensis* (*in vitro* μοντέλο), καθώς και BALB/c ποντίκια (*in vivo* μοντέλο) και χορήγησαν σε αυτά τις επιδράσεις (πεντασθενές αντιμόνιο και αναστολέα). Από τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας προέκυψε ότι η συγκεκριμένη χορήγηση οδήγησε σε μειωμένη παραγωγή TNF-α, μειωμένο παρασιτικό φορτίο και εν κατακλείδι διατηρήθηκε προστατευτική ανοσολογική απόκριση, η οποία περιόρισε την μόλυνση [95].

Σε έρευνα του Othman και των συνεργατών του υπέδειξαν ότι η μόλυνση με *Leishmania* σε κυτταρική σειρά μακροφάγων Raw οδηγεί σε πλήρη αναστολή της μεταγραφής του NF-κΒ. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η επίδραση στον NF-κΒ κατά την μόλυνση των μακροφάγων με *Leishmania* δεν εξαρτάται από το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAPK. Αυτό διαπίστωσαν χρησιμοποιώντας αναστολείς ειδικούς για τις ERK1/2 και την p-38 MAPK. Η ενεργοποίηση του NF-κΒ δεν αναστέλλεται μετά την προσθήκη των αναστολέων, καθώς εξακολουθούν να παρουσιάζονται αυξημένα επίπεδα NF-κΒ, ενώ η ταυτόχρονη χορήγηση των δύο αναστολέων πριν την μόλυνση οδήγησε σε μέγιστα επίπεδα ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα κΒ [92]. Η πλήρης αναστολή του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ είναι σε συμφωνία με το αποτέλεσμα μας καθώς στις 72 ώρες επώασης με το παράσιτο φαίνεται πλήρης απενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ.

Είναι γνωστό ότι τα μολυσμένα μακροφάγα στην προσπάθειά τους να αντιμετωπίσουν τα παράσιτα απελευθερώνουν δραστικές ρίζες οξυγόνου, όπως είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂). Το H₂O₂ μπορεί να επάγει το θάνατο των παρασίτων. Η έρευνα της Das και των συνεργατών της επικεντρώθηκε στην αποσαφήνιση του μηχανισμού με τον οποίο επέρχεται ο θάνατος των προμαστιγωτών μορφών της *Leishmania donovani* και τα κοινά

σημεία με την απόπτωση των ευκαρυωτικών κυττάρων. Οι ερευνητές μελέτησαν την κινητικότητα και την βιωσιμότητα των παρασίτων μετά από χορήγηση H_2O_2 σε συγκεντρώσεις σε εύρος 0.1 έως 8 mM. Συμπέραναν ότι η χορήγηση δόσης H_2O_2 υψηλότερης των 4 mM, οδηγεί τους προμαστιγώτες σε νέκρωση, ενώ η έκθεση σε δόσεις H_2O_2 μικρότερες των 4 mM οδηγεί τους προμαστιγώτες σε απόπτωση, η οποία έχει πολλές ομοιότητες με την απόπτωση των ευκαρυωτικών κυττάρων. Οι ερευνητές πραγματοποίησαν ανάλυση κατά Western με σκοπό τη μελέτη του χρονο-εξαρτώμενο πρότυπο ενεργοποίησης της PARP μετά από 0, 1, 2, 4 και 6 ώρες έκθεσης σε 4 mM H_2O_2 . Διαπίστωσαν ότι μετά από 2 ώρες έκθεσης στο H_2O_2 υπάρχει σημαντική αύξηση του θραύσματος με μοριακό βάρος 63 kDa, το οποίο είναι διαφορετικό από το μοριακό βάρος του θραύσματος, το οποίο συναντάται στα θηλαστικά [96].

Σε πρόσφατη έρευνα, η Ζηκάκη και συνεργάτες μελέτησαν το δοσο-εξαρτώμενο και χρονο-εξαρτώμενο πρότυπο δράσης της κουρκουμίνης την οποία χορήγησαν στην κυτταρική σειρά καρδιακών μυοβλαστών H9c2, σε μια προσπάθεια αποσαφήνισης του τρόπου δράσης της στα σηματοδοτικά μονοπάτια και τον ρόλο της στην επιβίωση ή την απόπτωση. Στην συγκεκριμένη έρευνα τα κύτταρα επώαστηκαν με 20 μ M κουρκουμίνης για 0.5, 1, 2, 4, 6 και 16 ώρες και πραγματοποιήθηκε μελέτη κατά Western για τη διερεύνηση της πρωτεόλυσης της PARP. Τα αποτελέσματα υπέδειξαν αύξηση του θραύσματος της PARP (89 kDa) μετά από 6 ώρες επώασης. Η κουρκουμίνη επομένως οδηγεί σε πρωτεόλυση της PARP, δημιουργώντας θραύσμα μοριακού βάρους 89 kDa. Η διάσπαση αυτή συνηγορεί στο γεγονός ότι υπάρχει απόπτωση, καθώς η πρωτεόλυση της PARP θεωρείται δείκτης της απόπτωσης [93].

Βάσει όλων των ανωτέρω και δεδομένης της έλλειψης βιβλιογραφικών στοιχείων με τα οποία θα μπορούσαν άμεσα τα αποτελέσματά μας να συγκριθούν καταλήγουμε στις ακόλουθες διαπιστώσεις:

A) τα καρδιακά μυοκύτταρα H9c2 μολύνονται με την προμαστιγώτη μορφή του σπλαχνικού στελέχους της *Leishmania* GH8 με τρόπο ανάλογο των μακροφάγων και των δενδριτικών κυττάρων που αποτελούν τους φυσικούς ξενιστές του παρασίτου. Μέσα στο κυτταρόπλασμα των H9c2 τα παράσιτα μετασχηματίζονται σε αμαστιγώτες και πολλαπλασιάζονται με ένα χαμηλό ρυθμό διπλασιασμού.

Β) Η μόλυνση των καρδιακών μυοκυττάρων H9c2 με το παράσιτο επιφέρει τροποποίηση στο πρότυπο φωσφορυλίωσης των ERK1/2 και p38 MAPK, γεγονός που επιβεβαιώνει την παρέμβαση του παρασίτου στη λειτουργία των κυττάρων προς διασφάλιση της επιβίωσής του.

Γ) Η τροποποίηση των προτύπου φωσφορυλίωσης των ανωτέρω αναφερόμενων MAPK δεν φαίνεται να επηρεάζει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, ενώ μετά από 3 ημέρες παρασιτικής επιβάρυνσης τα κύτταρα φαίνεται να ωθούνται σε αποπτωτική διεργασία, καθόσον παρατηρείται αύξηση του θραύσματος της PARP.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] World Health Organization, “Leishmaniasis,” *WHO*, 2016. [Online]. Available: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/. [Accessed: 10-Jun-2019].
- [2] R. P.D., “Leishmaniasis emergence in Europe,” *Eurosurveillance*, vol. 15, no. 10, pp. 29–39, 2010.
- [3] V. Field *et al.*, “Travel and migration associated infectious diseases morbidity in Europe, 2008,” *BMC Infect. Dis.*, vol. 10, no. 1, p. 330, 2010.
- [4] D. Pace, “Leishmaniasis www.elsevierhealth.com/journals/jinf,” pp. 10–18, 2014.
- [5] C. Aleman, “Finestructure of cultured *Leishmania brasiliensis*,” *Exp. Parasitol.*, vol. 24, no. 2, pp. 259–264, 1969.
- [6] R. J. Wheeler, J. D. Sunter, and K. Gull, “Flagellar pocket restructuring through the *Leishmania* life cycle involves a discrete flagellum attachment zone,” *J. Cell Sci.*, vol. 129, no. 4, pp. 854–867, 2016.
- [7] F. Tamariz, Elise, Grinnell, “Modulation of Fibroblast Morphology and Adhesion during Collagen Matrix Remodeling,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 13, no. November, pp. 3915–3929, 2002.
- [8] S. Lacomble *et al.*, “Three-dimensional cellular architecture of the flagellar pocket and associated cytoskeleton in trypanosomes revealed by electron microscope tomography,” *J. Cell Sci.*, vol. 122, no. 8, pp. 1081–1090, 2009.
- [9] P. Hayes, V. Varga, S. Olego-Fernandez, J. Sunter, M. L. Ginger, and K. Gull, “Modulation of a cytoskeletal calpain-like protein induces major transitions in trypanosome morphology,” *J. Cell Biol.*, vol. 206, no. 3, pp. 377–384, 2014.
- [10] J. D. Sunter and K. Gull, “The Flagellum Attachment Zone: ‘The Cellular Ruler’ of Trypanosome Morphology,” *Trends Parasitol.*, vol. 32, no. 4, pp. 309–324, 2016.
- [11] A. Cuvillier, J. C. Miranda, A. Ambit, A. Barral, and G. Merlin, “Abortive infection of *Lutzomyia longipalpis* insect vectors by aflagellated LdARL-3A-Q70L overexpressing *Leishmania amazonensis* parasites,” *Cell. Microbiol.*, vol. 5, no. 10, pp. 717–728, 2003.

- [12] E. Gluenz, J. L. Höög, A. E. Smith, H. R. Dawe, M. K. Shaw, and K. Gull, “Beyond 9+0: noncanonical axoneme structures characterize sensory cilia from protists to humans,” *FASEB J.*, vol. 24, no. 9, pp. 3117–3121, 2010.
- [13] R. J. Wheeler, E. Gluenz, and K. Gull, “Basal body multipotency and axonemal remodelling are two pathways to a 9+0 flagellum,” *Nat. Commun.*, vol. 6, pp. 1–12, 2015.
- [14] J. Sunter and K. Gull, “Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding,” *Open Biol.*, vol. 7, no. 9, 2017.
- [15] World Health Organization, “Leishmaniasis: epidemiology and access to medicines,” 2012. [Online]. Available: www.who.int/leishmaniasis/resources/Leishmaniasis_worldwide_epidemiological_and_drug_access_update.pdf.
- [16] A. Arce *et al.*, “Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012,” pp. 1–9, 2013.
- [17] S. Varani *et al.*, “Ongoing outbreak of visceral leishmaniasis in Bologna Province, Italy, November 2012 to May 2013,” *Eurosurveillance*, vol. 18, no. 29, pp. 1–4, 2013.
- [18] B. L. Herwaldt, “Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999; 354 : 1191-9,” vol. 354, pp. 1191–1199, 1999.
- [19] H. W. Murray, J. D. Berman, C. R. Davies, and N. G. Saravia, “Advances in leishmaniasis. [Review] [199 refs],” *Lancet*, vol. 366, no. 9496, pp. 1561–1577, 9496.
- [20] J. Alvar *et al.*, “The relationship between leishmaniasis and AIDS: The second 10 years,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 21, no. 2, pp. 334–359, 2008.
- [21] S. Sundar and J. Chakravarty, “Visceral leishmaniasis,” *Drug Resist. Leishmania Parasites Consequences, Mol. Mech. Possible Treat.*, vol. 26, no. 2, pp. 183–198, 2013.
- [22] S. Burza, S. L. Croft, and M. Boelaert, “Leishmaniasis,” *Lancet*, vol. 392, no. 10151, pp. 951–970, 2018.
- [23] P. Desjeux, R. S. Ghosh, P. Dhalaria, N. Strub-Wourgaft, and E. E. Zijlstra, “Report of the post Kala-Azar dermal leishmaniasis (PKDL) consortium meeting, New Delhi, India, 27-29 June 2012,” *Parasites and Vectors*, vol. 6, no. 1, p. 1, 2013.

- [24] E. E. Zijlstra, E. A. G. Khalil, P. A. Kager, and A. M. El-Hassan, "Post-kala-azar dermal leishmaniasis in the Sudan: Clinical presentation and differential diagnosis," *Br. J. Dermatol.*, vol. 143, no. 1, pp. 136–143, 2000.
- [25] O. E. Akilov, A. Khachemoune, and T. Hasan, "Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis," 2007.
- [26] E. Schwartz, C. Hatz, and J. Blum, "New world cutaneous leishmaniasis in travellers," vol. 6, no. June, 2006.
- [27] I. Kevric, M. A. Cappel, and J. H. Keeling, "New World and Old World Leishmania Infections," *Dermatol. Clin.*, vol. 33, no. 3, pp. 579–593, 2015.
- [28] A. I. Disease, L. Angeles, and L. Angeles, "Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis," vol. 22, pp. 491–502, 2009.
- [29] B. S. Mcgwire and A. R. Satoskar, "Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment," *Qjm*, vol. 107, no. 1, pp. 7–14, 2014.
- [30] O. Lupi *et al.*, "Tropical dermatology: Tropical diseases caused by protozoa," *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 60, no. 6, pp. 897–925, 2009.
- [31] F. A. Rosa *et al.*, "Cardiac Lesions in 30 Dogs Naturally Infected With *Leishmania infantum chagasi*," *Vet. Pathol.*, vol. 51, no. 3, pp. 603–606, 2014.
- [32] J. Avruch, "MAP kinase pathways: The first twenty years," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1773, no. 8, pp. 1150–1160, 2007.
- [33] J. M. Kyriakis and J. Avruch, "Mammalian MAPK Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation: A 10-Year Update," *Physiol. Rev.*, vol. 92, no. 2, pp. 689–737, 2012.
- [34] P. A. Martinez and C. A. Petersen, "Chronic infection by *Leishmania amazonensis* mediated through MAPK ERK mechanisms," *Immunol. Res.*, vol. 59, no. 1–3, pp. 153–165, 2014.
- [35] L. Chang and M. Karin, "Mammalian MAP kinase signalling cascades," *Nature*, vol. 410, no. 6824, pp. 37–40, 2001.
- [36] A. Cuenda and S. Rousseau, "p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role

- in human diseases,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1773, no. 8, pp. 1358–1375, 2007.
- [37] C. J. Marshall, “Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: Transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation,” *Cell*, vol. 80, no. 2, pp. 179–185, 1995.
- [38] J. Brognard and P. A. Dennis, “Variable apoptotic response of NSCLC cells to inhibition of the MEK/ERK pathway by small molecules or dominant negative mutants,” *Cell Death Differ.*, vol. 9, no. 9, pp. 893–904, 2002.
- [39] I. Herskowitz, E. Shim, and S. H. Park, “MAP Kinase Pathways in Yeast: Review For Mating and More,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 80, no. 1, pp. 252–258, 2014.
- [40] J. M. Kyriakis and J. Avruch, “Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation.,” *Physiol. Rev.*, vol. 81, no. 2, pp. 807–69, 2001.
- [41] M. Soares-Silva, F. F. Diniz, G. N. Gomes, and D. Bahia, “The mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway: Role in immune evasion by trypanosomatids,” *Front. Microbiol.*, vol. 7, no. FEB, pp. 1–9, 2016.
- [42] A. Clerk, T. J. Kemp, J. G. Harrison, F. H. Pham, and P. H. Sugden, “Integration of protein kinase signaling pathways in cardiac myocytes: Signaling to and from the extracellular signal-regulated kinases,” *Adv. Enzyme Regul.*, vol. 44, no. 1, pp. 233–248, 2004.
- [43] U. R. Rapp, R. Götz, and S. Albert, “BuCy RAFs drive cells into MEK addiction,” *Cancer Cell*, vol. 9, no. 1, pp. 9–12, 2006.
- [44] M. Raman, W. Chen, and M. H. Cobb, “Differential regulation and properties of MAPKs,” *Oncogene*, vol. 26, no. 22, pp. 3100–3112, 2007.
- [45] M. Adachi, M. Fukuda, and E. Nishida, “Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism,” *J. Cell Biol.*, vol. 148, no. 5, pp. 849–856, 2000.

- [46] J. Han and J. Ulevitch, "Targeted by," *Science* (80-.), vol. 2, pp. 1–4, 1994.
- [47] A. Cuadrado and A. R. Nebreda, "Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling," *Biochem. J.*, vol. 429, no. 3, pp. 403–417, 2010.
- [48] S. K. Hanrahan and T. Hunter, "The eukaryotic protein kinase superfamily : (catalytic) domain structure and classification of the," *FASEB J.*, 1988.
- [49] T. Zarubin and J. Han, "Zarubin and Han_Activation and signaling of the p38 MAP Kinase signaling," vol. 15, no. 1, pp. 11–18, 2005.
- [50] C. R. Roy and E. S. Mocarski, "Pathogen subversion of cell-intrinsic innate immunity," *Nat. Immunol.*, vol. 8, no. 11, pp. 1179–1187, 2007.
- [51] E. Pellegrini *et al.*, "Structural Basis for the Subversion of MAP Kinase Signaling by an Intrinsically Disordered Parasite Secreted Agonist," *Structure*, vol. 25, no. 1, pp. 16–26, 2017.
- [52] Y. Zhao, W. Gui, F. Niu, and S. Chong, "The MAPK Signaling Pathways as a Novel Way in Regulation and Treatment of Parasitic Diseases," *Diseases*, vol. 7, no. 1, p. 9, 2019.
- [53] B. Bouzahzah *et al.*, "Cell cycle regulatory proteins in the liver in murine *Trypanosoma cruzi* infection," *Cell Cycle*, vol. 5, no. 20, pp. 2396–2400, 2006.
- [54] P. M. Boggiatto *et al.*, "Targeted extracellular signal-regulated kinase activation mediated by *Leishmania amazonensis* requires MP1 scaffold," *Microbes Infect.*, vol. 16, no. 4, pp. 328–336, 2014.
- [55] P. M. Boggiatto *et al.*, "Altered dendritic cell phenotype in response to *Leishmania amazonensis* amastigote infection is mediated by MAP kinase, ERK," *Am. J. Pathol.*, vol. 174, no. 5, pp. 1818–1826, 2009.
- [56] G. Manley, "Public Access NIH Public Access," vol. 71, no. 2, pp. 233–236, 2013.
- [57] C. PETERSEN, M. GHOSH, K. GIBSON, C. PATTEN, R. M. MUKBEL, and D. E. JONES, "Macrophage Killing of *Leishmania Amazonensis* Amastigotes Requires Both Nitric Oxide and Superoxide," *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 76, no. 4, pp. 669–675, 2018.

- [58] T. DeSouza-Vieira *et al.*, “ Neutrophil extracellular traps release induced by Leishmania : role of PI3K γ , ERK, PI3K σ , PKC, and [Ca²⁺],” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 100, no. 4, pp. 801–810, 2016.
- [59] A. Kumar, Y. Takada, A. Boriek, and B. Aggarwal, “Nuclear factor- κ B: its role in health and disease,” *J. Mol. Med.*, vol. 82, no. 7, pp. 434–448, 2004.
- [60] J. C. Amé, C. Spenlehauer, and G. De Murcia, “The PARP superfamily,” *BioEssays*, vol. 26, no. 8, pp. 882–893, 2004.
- [61] D. D’Amours, S. Desnoyers, I. D’Silva, and G. G. Poirier, “Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions,” *Biochem. J.*, vol. 342 (Pt 2, pp. 249–68, 1999.
- [62] C. J. SKIDMORE *et al.*, “The Involvement of Poly(ADP-ribose) Polymerase in the Degradation of NAD Caused by gamma-Radiation and N-Methyl-N-Nitrosourea,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 101, no. 1, pp. 135–142, 2005.
- [63] J. S. Kresge, C. T., Leonowicz, M. E., Roth, W. J., Vartuli, J. C., Beck, “²»ÉØÍ,ÐÔµÄ © 19 9 2 Nature Publishing Group,” *Nature*, vol. 359, pp. 710–713, 1992.
- [64] J. C. Morales *et al.*, ““Action and rationale for targeting in cancer and other diseases,”” *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, vol. 24, no. 1, pp. 15–28, 2014.
- [65] B. W. Kimes and B. L. Brandt, “Properties of a clonal muscle cell line from rat heart,” *Exp. Cell Res.*, vol. 98, no. 2, pp. 367–381, 1976.
- [66] C. Y. Huang *et al.*, “ZAK re-programs atrial natriuretic factor expression and induces hypertrophic growth in H9c2 cardiomyoblast cells,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 324, no. 3, pp. 973–980, 2004.
- [67] C. Y. Huang, W. W. Kuo, P. J. Chueh, C. T. Tseng, M. Y. Chou, and J. J. Yang, “Transforming growth factor- β induces the expression of ANF and hypertrophic growth in cultured cardiomyoblast cells through ZAK,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 324, no. 1, pp. 424–431, 2004.
- [68] S. J. Watkins, L. Jonker, and H. M. Arthur, “A direct interaction between TGF β activated kinase 1 and the TGF β type II receptor: Implications for TGF β signalling and

- cardiac hypertrophy,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 69, no. 2, pp. 432–439, 2006.
- [69] A. L. Koekemoer, N. W. Chong, A. H. Goodall, and N. J. Samani, “Myocyte stress 1 plays an important role in cellular hypertrophy and protection against apoptosis,” *FEBS Lett.*, vol. 583, no. 17, pp. 2964–2967, 2009.
- [70] S. J. Watkins, G. M. Borthwick, and H. M. Arthur, “The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro,” *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.*, vol. 47, no. 2, pp. 125–131, 2011.
- [71] T. G. Stain and I. History, “International Journal of Surgical Pathology,” *Int. J. Surg. Pathol.*, 2007.
- [72] A. M. Ismail, “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,” *Anal. Biochem.*, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254, 1976.
- [73] S. J. Compton and C. G. Jones, “Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay,” *Anal. Biochem.*, vol. 151, no. 2, pp. 369–374, 1985.
- [74] N. J. Kruger, “The Bradford Method for Protein Quantitation,” *Protein Protoc. Handb.*, vol. 32, pp. 15–20, 2008.
- [75] J. EC, “The basics of western blotting. Anat Rec (Hoboken),” vol. 371, pp. 369–371, 2012.
- [76] L. Ornstein, “DISC ELECTROPHORESIS - I BACKGROUND AND THEORY* Leonard Ornstein,” *Ann. New York Acad. Sci.*, vol. 121, pp. 321–349, 1962.
- [77] S. RAYMOND and S. R. L. WEINTRAU, “Medium for Zone Electrophoresis Mechanism of Enzymatic Oxidation of Purines,” no. 9, p. 711, 2017.
- [78] J. L. Brunelle and R. Green, *One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE)*, 1st ed., vol. 541. Elsevier Inc., 2014.
- [79] Y. A. Andreev *et al.*, “A source of high-power pulses of elliptically polarized ultrawideband radiation,” *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 85, no. 10, pp. 195–203, 2014.
- [80] B. T. Kurien and R. H. Scofield, “Protein blotting: a review,” *J. Immunol. Methods*, vol. 274, no. 1–2, pp. 1–15, 2003.

- [81] A. Goldman, S. Harper, and D. W. Speicher, "Detection of proteins on blot membranes," *Curr. Protoc. Protein Sci.*, vol. 2016, no. November, p. 10.8.1-10.8.11, 2016.
- [82] L. J. Kricka, "Chemiluminescent and bioluminescent techniques," *Clin. Chem.*, vol. 37, no. 9, pp. 1472–1481, 1991.
- [83] A. Costagliola *et al.*, "Immunopathological Features of Canine Myocarditis Associated with *Leishmania infantum* Infection," *Biomed Res. Int.*, vol. 2016, pp. 1–6, 2016.
- [84] A. Descoteaux and M. Podinovskaia, "Leishmania and the macrophage: A multifaceted interaction," *Future Microbiol.*, vol. 10, no. January, pp. 111–129, 2015.
- [85] R. Vázquez-López, J. Argueta-Donohué, A. Wilkins-Rodríguez, A. Escalona-Montaño, M. Aguirre-García, and L. Gutiérrez-Kobeh, "Leishmania mexicana amastigotes inhibit p38 and JNK and activate PI3K/AKT: Role in the inhibition of apoptosis of dendritic cells," *Parasite Immunol.*, vol. 37, no. 11, pp. 579–589, 2015.
- [86] B. M. Neves *et al.*, "Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/akt and impairment of nuclear factor- κ B: Molecular mechanisms behind the arrested maturation/activation state of leishmania infantum-infected dendritic cells," *Am. J. Pathol.*, vol. 177, no. 6, pp. 2898–2911, 2010.
- [87] L. E. Echeverria and C. A. Morillo, "American Trypanosomiasis (Chagas Disease)," *Infect. Dis. Clin. North Am.*, vol. 33, no. 1, pp. 119–134, 2019.
- [88] L. H. Malik, G. D. Singh, and E. A. Amsterdam, "Chagas Heart Disease: An Update," *Am. J. Med.*, vol. 128, no. 11, p. 1251.e7-1251.e9, 2015.
- [89] M. Hernández, S. Wicz, and R. S. Corral, "Cardioprotective actions of curcumin on the pathogenic NFAT/COX-2/prostaglandin E2 pathway induced during *Trypanosoma cruzi* infection," *Phytomedicine*, vol. 23, no. 12, pp. 1392–1400, 2016.
- [90] Á. C. Cevey *et al.*, "Treatment with Fenofibrate plus a low dose of Benznidazole attenuates cardiac dysfunction in experimental Chagas disease," *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.*, vol. 7, no. 3, pp. 378–387, 2017.
- [91] E. Hovsepián, F. Penas, S. Siffo, G. A. Mirkin, and N. B. Goren, "IL-10 inhibits the

NF- κ B and ERK/MAPK-mediated production of pro-inflammatory mediators by up-regulation of SOCS-3 in Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes,” *PLoS One*, vol. 8, no. 11, 2013.

- [92] R. Ben-Othman, L. Guizani-Tabbane, and K. Dellagi, “Leishmania initially activates but subsequently down-regulates intracellular mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B signaling in macrophages,” *Mol. Immunol.*, vol. 45, no. 11, pp. 3222–3229, 2008.
- [93] K. Zikaki, I. K. Aggeli, C. Gaitanaki, and I. Beis, “Curcumin induces the apoptotic intrinsic pathway via upregulation of reactive oxygen species and JNKs in H9c2 cardiac myoblasts,” *Apoptosis*, vol. 19, no. 6, pp. 958–974, 2014.
- [94] S. M. Borghi *et al.*, “Leishmania (L). amazonensis induces hyperalgesia in balb/c mice: Contribution of endogenous spinal cord TNF α and NF κ B activation,” *Chem. Biol. Interact.*, vol. 268, pp. 1–12, 2017.
- [95] S. R. A. Macedo, L. D. De Figueiredo Nicolete, A. D. S. Ferreira, N. B. De Barros, and R. Nicolete, “The pentavalent antimonial therapy against experimental Leishmania amazonensis infection is more effective under the inhibition of the NF- κ B pathway,” *Int. Immunopharmacol.*, vol. 28, no. 1, pp. 554–559, 2015.
- [96] M. Das, S. B. Mukherjee, and C. Shaha, “Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in Leishmania donovani promastigotes,” *J. Cell Sci.*, vol. 114, no. 13, pp. 2461–2469, 2001.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελέτη της επίδρασης ενδοκυττάρων παρασίτων στα σηματοδοτικά μονοπάτια των καρδιακών H9c2 μυοβλαστών

Διονυσία Τομαρά

Διπλωματική εργασία, 2019

Η λεισμανίαση είναι μια σοβαρή παρασιτική νόσος, η οποία προκαλείται από το πρωτόζωο παράσιτο του γένους *Leishmania*. Υπάρχουν τρεις κύριες μορφές εκδήλωσης η δερματική, η βλενογονοδερματική και η σπλαγχνική. Η σπλαγχνική μορφή λεισμανίασης αποτελεί την πιο σοβαρή κλινική μορφή της νόσου. Αξίζει να σημειωθεί ότι η σπλαγχνική λεισμανίαση αποτελεί ένα πολυσυστημικό νόσημα, καθώς προκαλεί βλάβες σε πολυάριθμα όργανα του ξενιστή όπως είναι ο σπλήνας, ο μυελός των οστών και τα νεφρά. Πρόσφατες έρευνες ανέφεραν αλλοιώσεις στον καρδιακό ιστό μολυσμένων σκύλων. Το ερώτημα το οποίο τέθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι αν το παράσιτο *Leishmania* μολύνει τα καρδιακά κύτταρα και ακολούθως διερευνήθηκε ο τρόπος με τον οποίο παρεμβαίνει η *Leishmania* στα σηματοδοτικά μονοπάτια των συγκεκριμένων κυττάρων.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία διερευνήθηκε για πρώτη φορά η μόλυνση της κυτταρικής σειράς H9c2 με το παράσιτο *Leishmania infantum* α) σε διάφορες αναλογίες μόλυνσης (1:5, 1:10, 1:20) και β) σε διαφορετικά χρονικά σημεία προκειμένου να ευρεθεί η βέλτιστη αναλογία μόλυνσης και να μελετηθεί η κινητική της μόλυνσης.

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχει η υπερ-οικογένεια των ενεργοποιούμενων από μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών, εμπλέκονται σε απόκριση σε στρεσογόνα ερεθίσματα και πολυάριθμες έρευνες υποδεικνύουν τροποποίηση των συγκεκριμένων μονοπατιών με σκοπό την επιβίωση του παρασίτου στο κύτταρο-ξενιστή.

Συμπερασματικά, η διερεύνηση της ενεργοποίησης των MAPK (p-38, ERK1/2) παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Παράλληλα μελετήθηκε η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, ο οποίος ενεργοποιείται καταρροϊκά του σηματοδοτικού μονοπατιού των

MAPK. Επιπρόσθετα, ερευνήθηκε η θραύση της PARP στην προσπάθεια μας να εκτιμήσουμε την πιθανότητα ανάπτυξης αποπτωτικών διεργασιών.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, η μόλυνση εγκαταστάθηκε επιτυχώς στους καρδιακούς μυοβλάστες της κυτταρικής σειράς H9c2. Παράλληλα, μελετήθηκε το χρονο-εξαρτώμενο πρότυπο φωσφορυλίωσης των p-38 και ERK1/2 MAPK, όπου διαπιστώθηκε παρόμοιο χρονικό πρότυπο ενεργοποίησης. Πρέπει να αναφερθεί ότι έγινε μελέτη του χρονο-εξαρτώμενου πρότυπου ενεργοποίησης του άλλου μέλους της υπερ-οικογένειας των MAPK και πιο συγκεκριμένα έγινε μελέτη των JNKs χωρίς όμως να παρουσιαστεί αύξηση των επιπέδων τους. Γι αυτό το λόγο τα αποτελέσματα δεν παρατεθήκαν στη διπλωματική εργασία. Κατά τη διερεύνηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB δεν υπήρξε σημαντική ενεργοποίηση και τα επίπεδα του ήταν όμοια με τα επίπεδα ενεργοποίησης του μάρτυρα. Επιπρόσθετα, κατά τη μελέτη της θραύσης της PARP παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα του θραύσματος της PARP με μοριακό βάρος 89 kDa.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, διαφαίνεται η τροποποίηση διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών στα H9c2 κύτταρα κατά την μόλυνση με *L.infantum*. Επομένως, μελλοντικά θα μπορούσαν να μελετηθούν περισσότερα μόρια των σηματοδοτικών μονοπατιών, καθώς και θα μπορούσε να γίνει χρήση αναστολέων των ERK-1/2 και p-38 MAPK, όπως επίσης και χρήση αντιοξειδωτικών όπως η κουρκουμίνη για να διερευνηθεί η επίδραση τους στη μόλυνση με *Leishmania infantum*. Τέλος, θα ήταν σκόπιμο να γίνει *in vivo* μελέτη σε πρωτογενή καρδιακά κύτταρα από μολυσμένα BALB/c ποντίκια.

ABSTRACT

Study of effect of intracellular parasites in signal transduction pathways of H9c2 cardiac myoblasts

Dionysia Tomara

Master's thesis, 2019

Leishmaniasis is a serious parasitic disease and is caused by the protozoan parasites of the genus *Leishmania*. There are three major forms of leishmaniasis: cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis. Visceral leishmaniasis is the most serious form of the disease. Visceral leishmaniasis is a polysystemic disease affecting internal organs such as the spleen, the bone marrow and the liver. Recent studies reported lesion in the cardiac tissue of infected dogs. The question which is raised in this Master's Thesis is if *Leishmania* parasites infect cardiac cells and the way parasites interfere with host cell signaling pathways.

In the present study, we investigated for the first time the infection of H9c2 cardiac myoblasts with *L. infantum* parasite. For this purpose cardiac myoblasts of H9c2 cell line were exposed to parasite *L. infantum* a) in different infection ratios (1:5, 1:10, 1:20) and b) in different time points, in order to find the optimal ratio infection, as well as, we wanted to investigate infection kinetics.

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) is a superfamily of kinases that is implicated in response of stimulus stress and many studies have indicated the subversion of these pathways in favor of parasite resistance in host cell.

The investigation of MAPK activation (p-38 and ERK1/2) was mandatory. In addition we investigated NF- κ B signal transduction pathway. We also investigated PARP cleavage and more particular the activation of PARP fragment in an attempt to elucidate the possibility of apoptosis.

According to the results of this thesis, the infection was successfully installed in the H9c2 cardiac myoblasts. In parallel, we studied the pattern of time dependent activation of ERK1/2 and p-38 MAPK, where a similar time-dependent pattern was reported. We have to mention that we studied the time-dependent pattern of JNKs, which is the third member of MAPK superfamily, but there where no significant increase in their levels. We investigated the activation of NF-kB but there were no significant increase also in NF-kB levels. We also studied the cleavage of PARP and we investigated increased levels of PARP fragment with molecular weight 89 kDa.

According to the results, *Leishmania infantum* subverts the signaling pathways of H9c2 cardiac myoblasts. Therefore in the future it is mandatory to investigate more the signaling transduction. The effect of inhibitors of ERK1/2 and p-38 MAPK could be an option for further research in the infection of H9c2 cell line with *L.infantum* parasite.