



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
Κατεύθυνση Ιατρικών Εργαστηρίων



ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ρόλος των ρυθμιστικών miRNA's στην ασθένεια της λεισμανίασης

GRADUATE THESIS

Role of regulatory miRNAs in leishmaniasis



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

Κοκοκύρη Καλλιόπη/Kokokiri Kalliopi (Α.Μ. 19678117)

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Δρ. Ευσταθίου Αντωνία, Εργαστήριο μοριακής μικροβιολογίας, ΠΑΔΑ/Dr.

Efstathiou Antonia

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2024



Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences



GRADUATE THESIS

Role of regulatory miRNAs in leishmaniasis



NAME OF STUDENT

Kokokiri Kalliopi (R.N. 19678117)

kalliopikokokiri@gmail.com

NAME OF THE SUPERVISOR

Dr. Efstathiou Antonia

AIGALEO 2024

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

	ΟΝΟΜΑΤΑ ΕΞΕΤΑΣΤΩΝ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1^{ος} ΕΞΕΤΑΣΤΗΣ	Ευσταθίου Αντωνία	
2^{ος} ΕΞΕΤΑΣΤΗΣ	Βογιατζάκη Χρυσάνθη	
3^{ος} ΕΞΕΤΑΣΤΗΣ	Μπέη Θάλεια	

Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Κοκοκύρη Καλλιόπη του Αναστασίου, με αριθμό μητρώου 19678117 φοιτήτρια του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

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

Κοκοκύρη Καλλιόπη

Υπογραφή



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΤΗΣ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ	15
1.1.1 ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ	19
1.1.2 ΒΛΕΝΝΟΓΟΝΟΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ	21
1.1.3 ΣΠΛΑΧΝΙΚΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ.....	23
1.2 ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ <i>LEISHMANIA</i>	25
1.3 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ <i>LEISHMANIA</i>	25
1.3.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ <i>LEISHMANIA</i>	25
1.3.2 ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ <i>LEISHMANIA</i>	28
1.4 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ <i>LEISHMANIA</i>	28
1.5 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ ΣΕ ΛΟΙΜΩΞΗ ΑΠΟ <i>LEISHMANIA</i>	30
1.5.1 ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ.....	31
1.5.2 ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ.....	31
1.5.3 ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	32
1.5.4 ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	32
1.6 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ	35
1.6.1 ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	35
1.6.2 ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΤΟΠΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ	36
1.6.3 ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ(PDT).....	36
1.6.4 ΚΡΥΟΘΕΡΑΠΕΙΑ	36
1.6.5 ΘΕΡΜΟΘΕΡΑΠΕΙΑ	37
1.6.6 ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΕΜΒΟΛΙΑ.....	37
1.6.7 ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΕΣ (IFN) ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΕΣ	37
1.6.8 ΕΜΒΟΛΙΟ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ	37
1.6.9 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ ΣΚΥΛΩΝ (CANINE LEISHMANIASIS).....	38
1.7 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ	39
1.7.1 ΑΜΕΣΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΗΣΗ, ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ.....	39
1.7.2 ΕΜΜΕΣΕΣ ΟΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	40
1.7.3 ΕΝΔΟΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ.....	40
1.7.4 ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ.....	40
2. miRNA's.....	41
2.1.1 miRNAs ΕΙΣΑΓΩΓΗ	41
2.1.2 ΤΡΟΠΟΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΩΝ miRNA	42

2.1.2.1 ΚΑΝΟΝΙΚΟΣ ΤΡΟΠΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ miRNA	42
2.1.2.2 ΜΗ ΚΑΝΟΝΙΚΟΣ ΤΡΟΠΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ miRNA	42
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ miRNA's	44
2.2.3 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.....	46
3.ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNA.....	47
3.1 ΓΕΝΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNA	47
3.2 ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNA ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ (ΟΠΩΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ)	48
3.2.1 ΑΜΕΣΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ miRNA:miRNA.....	48
3.2.2 ΕΜΜΕΣΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ miRNA:miRNA.....	49
3.2.3 ΚΑΘΟΛΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ miRNA:miRNA	52
3.3 ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNA ΣΤΙΣ ΤΡΥΠΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΕΣ	53
4. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	54
4.1 ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ	54
5.ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNA ΣΕ ΠΑΡΑΣΙΤΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ.....	54
6.ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNA ΣΤΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ.....	55
6.1 ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ ΣΕ ΣΚΥΛΟΥΣ (CANINE LEISHMANIASIS)	55
6.1.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΡΕΥΝΑΣ ΣΕ ΣΚΥΛΟΥΣ ΜΕ ΛΟΙΜΩΞΗ ΑΠΟ <i>LEISHMANIA</i>	56
6.1.3 ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ miR-21 ΣΕ ΣΚΥΛΟΥΣ ΜΕ ΛΟΙΜΩΞΗ ΑΠΟ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑ.....	60
6.2 ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΠΟΝΤΙΚΩΝ	60
6.3 ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ.....	61
7.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	62
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	65

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας εκπονήθηκε με τη βοήθεια της Δρ. Ευσταθίου Αντωνία από το εργαστήριο μοριακής μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής και του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ και οφείλω να την ευχαριστήσω για την καθοδήγησή της σε όλη τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας.

Επιπλέον, οφείλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου Δημητρίου Ιωάννα και Κοκοκύρη Αναστάσιο, καθώς και τα υπόλοιπα στενά μέλη της οικογένειάς μου, αλλά και τους φίλους μου που με στήριξαν σε όλη τη διάρκεια των προπτυχιακών σπουδών μου, καθώς και σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας.

Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη θεία μου Μαρία Δημητρίου, η οποία με στήριζε συνεχώς και μου έδινε κίνητρο να συνεχίσω και να ολοκληρώσω την παρούσα πτυχιακή εργασία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η λείσμανίαση είναι μία ζωοανθρωπονόσος που εντοπίζεται κυρίως με 3 κλινικές μορφές, ανάλογα με το είδος του παρασίτου *Leishmania* που προκάλεσε τη λοίμωξη και οι μορφές αυτές περιλαμβάνουν τη δερματική, τη βλεννογονοδερματική και τη σπλαχνική λείσμανίαση. Μετά τη λοίμωξη πυροδοτούνται στον ξενιστή διάφορες ανοσολογικές αποκρίσεις στις οποίες συμμετέχουν τόσο τα κύτταρα του έμφυτου όσο και του προσαρμοστικού ανοσολογικού συστήματος. Για τη θεραπεία της λείσμανίασης έχουν δοκιμαστεί διάφορες φαρμακευτικές ενώσεις, όμως είναι επιτακτική ανάγκη η ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού εμβολίου για την πρόληψη της λοίμωξης. Μετά από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές μακροφάγων και σε πειραματικά μοντέλα ποντικών και σκύλων, έχει βρεθεί πως τα παράσιτα του γένους *Leishmania* έχουν αναπτύξει στρατηγικές που τους επιτρέπουν να απενεργοποιούν τα μακροφάγα του ξενιστή τους, ώστε να προάγουν την επιβίωσή τους. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός πως τα miRNAs έχουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση των έμφυτων και των προσαρμοστικών ανοσολογικών αποκρίσεων έναντι των παθογόνων, τα παράσιτα του γένους *Leishmania* φαίνεται να έχουν αναπτύξει την ικανότητα να ρυθμίζουν την έκφραση των miRNA των μακροφάγων του ξενιστή. Πιο συγκεκριμένα, σε πειραματικά μοντέλα σκύλων, τα miRNA που παρουσίασαν αύξηση έκφρασης ήταν τα miR-7, miR-21, miR-148a, miR-615, miR-194, miR-424, miR-451, miR-192, miR-371 και miR-503, ενώ μείωση έκφρασης παρουσίασαν τα miR-150, miR-574, miR-125a και miR-125b. Στα πειραματικά μοντέλα ποντικών δείχνουν οι έρευνες πως τα miR-155, miR-181c, miR-9 και miR-31 έχουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των T-κυττάρων. Καταληκτικά, στα πειραματικά μοντέλα ανθρώπινων μακροφάγων αποδείχθηκε πως τα μολυσμένα κύτταρα παρουσιάζουν ελάττωση του ρυθμού παραγωγής των επιπέδων των pri-miRNA και των προ-miRNA, το οποίο οδηγεί σε ελαττωμένο ρυθμό μεταγραφής των pri-miRNA και συνεπώς σε απορρύθμιση όλου του γονιδιώματος των ώριμων miRNA, λόγω του μεταγραφικού παράγοντα c-Myc.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a human and zoonotic disease that is mainly found in 3 clinical forms, depending on the species of *Leishmania* parasite that caused the infection and these forms include cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis. Following infection, various immune responses are triggered in the host involving both innate and adaptive immune cells. Various pharmaceutical compounds have been tried for the treatment of leishmaniasis, but it is imperative to develop an effective vaccine to prevent infection. Following studies carried out on human macrophage cell lines and experimental mouse and dog models, it has been found that since *Leishmania* parasites have developed strategies that allow them to inactivate their host macrophages, to promote their survival, and in line with the fact that miRNAs have an important role in modulating innate and adaptive immune responses against pathogens, these parasites have developed the ability to regulate the expression of host macrophage miRNAs. More specifically, in experimental dog models, the miRNAs that showed an increase were miR-7, miR-21, miR-148a, miR-615, miR-194, miR-424, miR-451, miR-192, miR-371 and miR-503 while a decrease was observed in miR-150, miR-574, miR-125a and miR-125b. In experimental mouse models, studies show that miR-155, miR-181c, miR-9 and miR-31 have important roles in T-cell activation. In conclusion, in experimental models of human macrophages it was shown that in infected cells there is a decrease in the rate of production of pri-miRNA and pre-miRNA levels, leading to a decreased rate of transcription of pri-miRNAs and consequently to a deregulation of the entire mature miRNA genome due to the transcription factor c-Myc.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η λεισμανίαση είναι μία πρωτοζωική λοίμωξη που προκαλείται από είδη του μαστιγοφόρου παρασίτου του γένους *Leishmania* και μεταδίδεται με φλεβοτόμους [21]. Αποτελεί μία νόσο η οποία εμφανίζεται με 2 κύριες κλινικές μορφές, τη σπλαχνική λεισμανίαση (Visceral Leishmaniasis-VL) και τη δερματική λεισμανίαση (Cutaneous Leishmaniasis-CL). Επιπλέον, μπορεί να εμφανιστεί και με τη μορφή βλεννογονοδερματικής λεισμανίασης (Mucocutaneous Leishmaniasis-MCL), με τη μορφή διάχυτης δερματικής λεισμανίασης (Diffuse Cutaneous Leishmaniasis-DCL) και με τη μορφή λεισμανίασης μετά το Kala-azar (Post Kala-azar Leishmaniasis-PKDL). Τόσο η σπλαχνική όσο και η δερματική λεισμανίαση εμφανίζουν ενδημική εξάπλωση σε παραπάνω από 100 χώρες, όμως γίνεται μία συλλογική προσπάθεια εξάλειψης των κρουσμάτων με την εισαγωγή ενός περιφερειακού προγράμματος εξάλειψης το οποίο ξεκίνησε το 2005 και στοχεύει στη βελτιωμένη πρόσβαση στη διάγνωση της θεραπείας. Ο αριθμός των δυνητικά θανατηφόρων κρουσμάτων έχει μειωθεί την τελευταία δεκαετία με τις Βραζιλία, Αιθιοπία, Ινδία, Κένυα, Σομαλία, Νότιο Σουδάν και Σουδάν να έχουν τη μεγαλύτερη επιβάρυνση. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας εκτιμά πως εμφανίζονται 200.000-400.000 νέα κρούσματα ετησίως, εκ των οποίων το 90% εμφανίζεται στην Ινδία, στο Μπαγκλαντές, στο Σουδάν, στο Νότιο Σουδάν, στην Αιθιοπία και στη Βραζιλία[36]. Διαφορετικά είδη του παρασίτου *Leishmania* ευθύνονται για τις ποικίλες κλινικές εκδηλώσεις που δημιουργούνται από την αλληλεπίδραση του παρασίτου, του ξενιστή και του φορέα και τοποθετούνται σε ένα φάσμα με την πιο ήπια εκδοχή να συμπεριλαμβάνει την ασυμπτωματική λεισμανίαση και αμέσως μετά τις αυτοϊάσιμες δερματικές αλλοιώσεις και την πιο σοβαρή εκδοχή να συμπεριλαμβάνει δυνητικά θανατηφόρες σπλαχνικές αλλοιώσεις[34]. Η ανοσολογική απάντηση του ξενιστή στη λοίμωξη εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, η αντιγονικότητα της λοίμωξης και το παρασιτικό φορτίο. Μετά τον εμβολιασμό του παρασίτου από τον φορέα στον ξενιστή, εκείνο επωφελείται από το προφλεγμονώδες περιβάλλον που προκαλείται από την ενδοκυτταρική μόλυνση μέσω του σάλιου του φορέα. Η χημειοπροσέλκυση που προκαλείται σε αυτό το προφλεγμονώδες περιβάλλον προσελκύει τα φαγοκύτταρα στο σημείο της μόλυνσης και πιο συγκεκριμένα τα πρώτα που φτάνουν στο σημείο αυτό και ξεκινούν να φαγοκυτταρώνουν τις προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου είναι τα ουδετερόφιλα. Έπειτα, τα μακροφάγα μπορούν και περιορίζουν τις

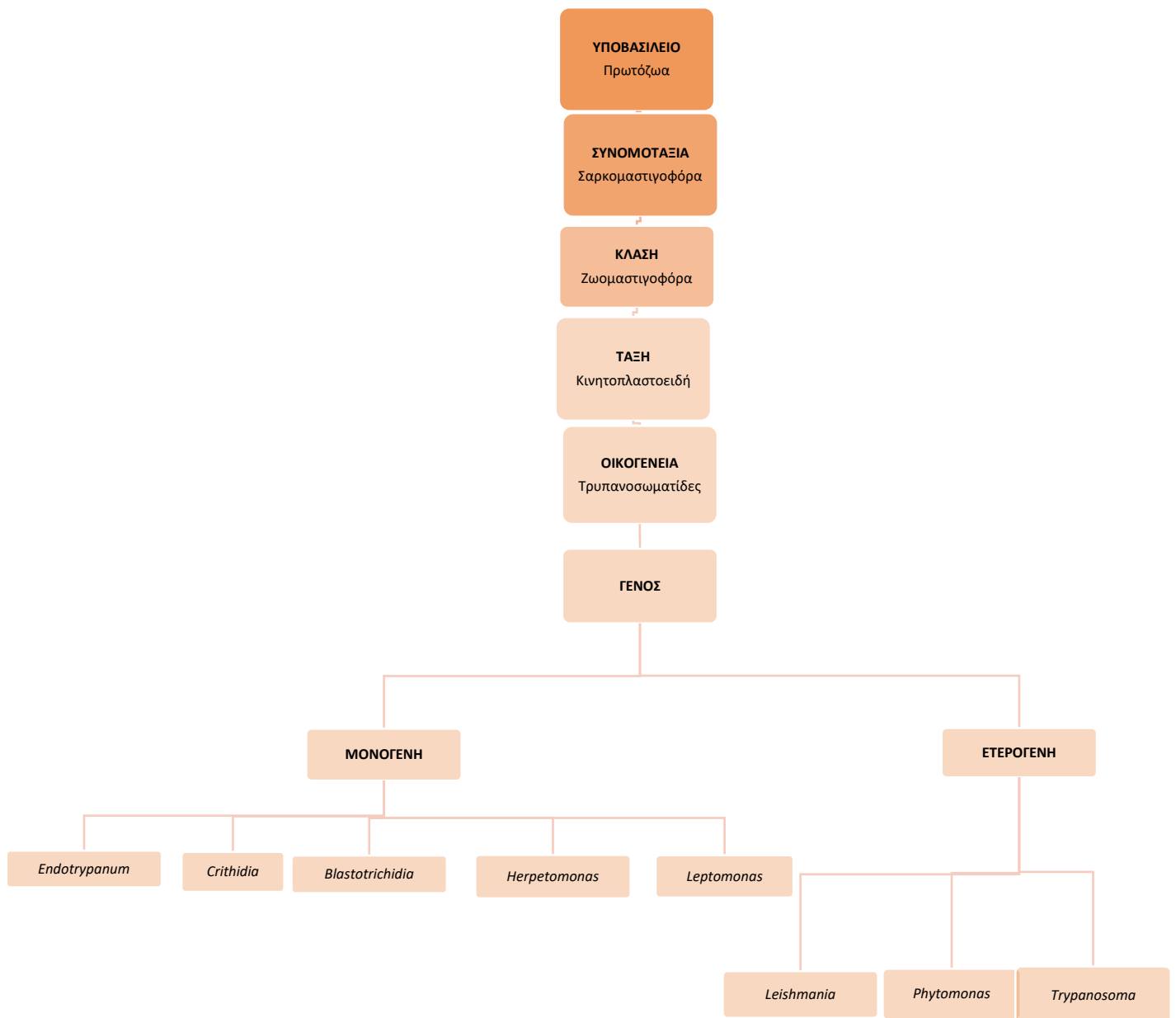
φαγοκυτταρωμένες μορφές του παρασίτου *Leishmania* σε ένα φαγολυσόσωμα, το οποίο μέσω των χαμηλών τιμών ΡΗ και των λυτικών ενζύμων περιορίζει την εγκατάσταση της λοίμωξης εξαλείφοντας το παράσιτο χωρίς να υπάρξει βλάβη στα κύτταρα του ξενιστή [35].

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει αναφερθεί εκθετική αύξηση του επιδημιολογικού φορτίου της λεισμανίασης και σχετίζεται κυρίως με την απορία και τις κακές συνθήκες υγιεινής, με αποτέλεσμα να αποτελεί την τέταρτη πιο διαδεδομένη τροπική λοίμωξη και να κατατάσσεται στη δεύτερη θέση σύμφωνα με τα ποσοστά θνησιμότητας. Η νόσος ενδημεί σε 98 χώρες και πλήττει περίπου 12 εκατομμύρια ανθρώπους. Συνολικά διατρέχουν κίνδυνο μόλυνσης περίπου 350 εκατομμύρια άνθρωποι, με ετήσια επίπτωση σε περίπου 2 εκατομμύρια ανθρώπους [38].

Η πρόληψη, η θεραπεία και ο έλεγχος της λεισμανίασης μπορούν να επιτευχθούν με τα φάρμακα, τα διαγνωστικά εργαλεία και τα εμβόλια, όμως η πολυπλοκότητα και η ποικιλομορφία των ανοσολογικών αποκρίσεων και της ανοσοπαθολογίας της νόσου έχουν αντίκτυπο στην αποτελεσματικότητα αυτών των μέσων [34]. Με το σύνθημα «Μικρό δάγκωμα, μεγάλη απειλή» ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (Π.Ο.Υ.) ξεκίνησε το 2014 την πρωτοβουλία για την καταπολέμηση της αναδυόμενης απειλής των ασθενειών που μεταδίδονται με διαβιβαστές, συμπεριλαμβανομένης της λεισμανίασης καθώς τη θεωρεί μία αναδυόμενη, ανεξέλεγκτη και σοβαρά παραμελημένη ασθένεια [41].

ΤΡΥΠΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΕΣ

Η οικογένεια *Trypanosomatidae* συμπεριλαμβάνει υποχρεωτικά παρασιτικά πρωτόζωα της τάξης *Kinetoplastida*, μερικά από τα οποία είναι υπεύθυνα για παρασιτικές λοιμώξεις τόσο ανθρώπινου όσο και κτηνιατρικού ενδιαφέροντος. Το *Trypanosoma* είναι γένος της οικογένειας *Trypanosomatidae*. Αντιπροσωπευτικά της οικογένειας *Trypanosomatidae* είναι τα είδη *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* και *Leishmania* που είναι υπεύθυνα για τη νόσο Chagas, την Αφρικανική Τρυπανοσωμίαση και τη Λεισμανίαση αντίστοιχα [18].



Εικόνα 1. Συστηματική κατάταξη των τρυπανοσωματίδων (πηγή: Ευσταθίου Αντωνία (2014). Μελέτη μορίων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των πρωτόζων *Leishmania* και *Trypanosoma* [τροποποιημένο])

ΤΡΥΠΑΝΟΣΩΜΑΤΑ

Το τρυπανόσωμα είναι ένα μαστιγοφόρο που παρουσιάζει φυλογενετική συγγένεια με τα είδη της *Leishmania* και προκαλεί δύο τύπους νόσου, την Αφρικανική τρυπανοσωμίαση και την Αμερικανική τρυπανοσωμίαση [16]. Η Αφρικανική τρυπανοσωμίαση ή νόσος του ύπνου, οφείλεται στα είδη *Trypanosoma brucei gambiense* και *Trypanosoma brucei rhodesiense* και μεταδίδεται με τη μύγα τσε-τσε. Το είδος *T. brucei gambiense* συναντάται σε περιοχές γύρω από τους ποταμούς της δυτικής και κεντρικής Αφρικής και το *T. brucei rhodesiense* βρίσκεται στις σαβάνες της ανατολικής Αφρικής. Η Αμερικανική τρυπανοσωμίαση ή νόσος του Chagas, οφείλεται στο είδος *Trypanosoma cruzi* και μεταδίδεται με κοριοούς [12]. Οι νόσοι διαφέρουν ανάλογα με τη φύση του εντόμου-φορέα, των κυττάρων που κατοικεί το παράσιτο και των αποτελεσμάτων του ανοσοποιητικού συστήματος [13].

ΑΦΡΙΚΑΝΙΚΗ ΤΡΥΠΑΝΟΣΩΜΙΑΣΗ

Η Αφρικανική τρυπανοσωμίαση ή Αμερικανική νόσος του ύπνου προκαλείται από υποείδη του γένους *Trypanosoma brucei*. Το έντομο-φορέας της νόσου είναι η μύγα τσε-τσε (*Glossina*) και αποτελεί σημαντικό αίτιο της νόσου nagana των βοοειδών στην τροπική Αφρική. Το *T. brucei gambiense* προσβάλλει τον άνθρωπο και το *T. brucei rhodesiense* προσβάλλει τα βοοειδή και τις άγριες αντιλόπες, τα οποία λειτουργούν ως αποθηκευτικοί ξενιστές της λοίμωξης [14]. Η Αφρικανική τρυπανοσωμίαση του ανθρώπου (HAT) περιορίζεται στην υποσαχάρα και αναφέρεται ως ασθένεια του ύπνου λόγω της λόγω της κλινικής έκβασης του σταδίου της μηνιγγοεγκεφαλίτιδας. Η τρυπανοσωμίαση των ζώων (AAT) απαντάται σε ζώα που βρίσκονται στη Νότια Αμερική, την Αφρική, την Ασία, την Ωκεανία και περιστασιακά στην Ευρώπη. Η HAT που προκαλείται από το *Trypanosoma brucei gambiense* είναι μία ανθρωπογενής νόσος που αφορά κυρίως τη μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο, ενώ η HAT που προκαλείται από το *Trypanosoma brucei rhodesiense* είναι μία ζωονοσογόνος λοίμωξη που μεταδίδεται από τα ζώα στον άνθρωπο. Επιπλέον τρυπανοσώματα που μολύνουν ζώα στην Αφρική είναι τα *T. evansi*, *T. vivax*, *T. congolense* και *T. equiperdum* [15].

Ο κύκλος ζωής του *Trypanosoma brucei* ξεκινάει μετά από δάγμα της μύγας τσε-τσε στο θηλαστικό ξενιστή για γεύμα αίματος. Η μολυσματική μετακυκλική μορφή του τρυπομαστιγωτού απελευθερώνεται από τους σιελογόνους αδένες της μύγας και εισέρχεται στον ξενιστή. Αρχικά, αναπτύσσεται στη σημείο του δείγματος και έπειτα μεταφέρεται στην

κυκλοφορία του αίματος. Οι λεπτές μορφές του παρασίτου πολλαπλασιάζονται ώστε να διατηρείται υψηλή παρασιταϊμία και να αποκίζουν στη λέμφο και σε διάφορα όργανα του κεντρικού νευρικού συστήματος. Λόγω της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή παρατηρείται αρχικά σημαντική μείωση του αριθμού των παρασίτων και έπειτα παρατηρείται ξανά υψηλή παρασιταϊμία, χαρακτηριστικό γνώρισμα λοίμωξης από *Trypanosoma brucei*. Έπειτα, μία επόμενη μύγα τσε-τσε επιμολύνεται με *Trypanosoma brucei* μέσω δήγματος μολυσμένου ξενιστή. Πιο συγκεκριμένα, τα τρυπομαστιγωτά που υπάρχουν στην κυκλοφορία του αίματος του ξενιστή μεταφέρονται στο έντερο του εντόμου όπου μετατρέπονται σε προκυκλικά τρυπομαστιγωτά και πολλαπλασιάζονται. Εάν αναπτυχθεί η λοίμωξη, τα προκυκλικά τρυπομαστιγωτά μετατρέπονται σε μεσοκυκλικά τρυπομαστιγωτά και μεταφέρονται στο πρόσθιο άκρο του πεπτικού σωλήνα του εντόμου. Στη συνέχεια, τα παράσιτα εισχωρούν στον πεπτικό σωλήνα όπου μετατρέπονται σε επιμαστιγωτά, που είναι πολλαπλασιαστικές μορφές. Τα πιο κινητικά επιμαστιγωτά καταφέρνουν να αποικίσουν στους σιελογόνους αδένες προσκολλώντας στα επιθηλιακά τους κύτταρα. Τέλος, εκεί τα επιμαστιγωτά μετατρέπονται σε τρυπομαστιγωτά που θα μετατραπούν σε μετακυκλικά τρυπομαστιγωτά και θα μολύνουν το επόμενο θηλαστικό-ξενιστή [16].

ΑΜΕΡΙΚΑΝΙΚΗ ΤΡΥΠΑΝΟΣΩΜΙΑΣΗ

Η αμερικανική τρυπανοσωμίαση ή αλλιώς νόσος του Chagas, προκαλείται από το *Trypanosoma cruzi* και είναι μία πολυσυστηματική διαταραχή η οποία μπορεί να επηρεάσει το καρδιαγγειακό, το ανοσολογικό, το πεπτικό και το κεντρικό νευρικό σύστημα. Μεταδίδεται με κοριούς και εντοπίζεται κυρίως σε ενδημικές περιοχές της Λατινικής Αμερικής. Επιπλέον πηγές μετάδοσης αποτελούν η μετάγγιση αίματος, η μεταμόσχευση οργάνων, η κατάποση από το στόμα, οι κοινόχρηστες ενδοφλέβιες βελόνες, η κάθετη μετάδοση από τη μητέρα στο παιδί κατά τη διάρκεια της κύησης ή του τοκετού και τα εργαστηριακά ατυχήματα. Έχει βρεθεί και μετάδοση μέσω σεξουαλικής επαφής σε *in vivo* μελέτες σε ποντίκια, αλλά δεν έχει αναφερθεί στους ανθρώπους αυτός ο τρόπος μετάδοσης. Η μετάδοση γίνεται όταν τα μετακυκλικά τρυπομαστιγωτά του παρασίτου εισέρχονται στον άνθρωπο μέσω τριατόμων. Οι τριατόμοι καθώς τρέφονται με αίμα παράλληλα αφοδεύουν εισβάλλοντας με τον τρόπο αυτό το παράσιτο στον ξενιστή μέσω ρηγμάτων στο δέρμα του ξενιστή που έχουν προκληθεί από το δάγκωμα των τριατόμων ή από το ξύσιμο και μέσω των

μεμβρανών του βλεννογόνου. Στη συνέχεια, το παράσιτο εισβάλλει στο ήπαρ, στο σπλήνα, στο έντερο, στα λεμφικά γάγγλια, στον καρδιακό μυ, στους σκελετικούς μυς και στο κεντρικό νευρικό σύστημα, όπου διαφοροποιείται στην αμαστιγωτή μορφή του και πολλαπλασιάζεται. Μόλις οι ιστοί αυτοί γεμίσουν με αμαστιγωτά, τα παράσιτα μετατρέπονται ξανά στη μαστιγωτή μολυσματική μορφή τους και λύουν τα κύτταρα με σκοπό να εισβάλλουν στους παρακείμενους ιστούς και να εξαπλωθούν στην κυκλοφορία του αίματος μέσω του λεμφικού συστήματος. Τα τρυπομαστιγωτά διαφοροποιούνται σε επιμαστιγωτά στον πεπτικό σωλήνα των τριατόμων και πολλαπλασιάζονται. Έπειτα, διαφοροποιούνται ξανά σε τρυπομαστιγωτά που είναι η μολυσματική τους μορφή και εξέρχονται μέσω των περιττωμάτων, ολοκληρώνοντας έτσι τον κύκλο ζωής τους [20].

1.1 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΤΗΣ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ

Η λεισμανία είναι ένα παράσιτο το οποίο μεταδίδεται μέσω της θηλυκής φλεβοτόμου. Η λοίμωξη που προκαλεί στον άνθρωπο διακρίνεται κυρίως σε 3 κλινικές μορφές, οι οποίες περιλαμβάνουν τη δερματική λεισμανίαση (CL), τη βλεννογονοδερματική λεισμανίαση (MCL) και τη σπλαχνική λεισμανίαση (VL), ανάλογα με τα όργανα που εντοπίζεται η λοίμωξη. Η κλινική έκβαση των ασθενών με λεισμανίαση σχετίζεται άμεσα με την εκάστοτε κλινική μορφή της και εμφανίζεται ένα φάσμα κλινικών συμπτωμάτων από δερματικές αυτοπεριοριζόμενες βλάβες έως και σπλαχνικές θανατηφόρες βλάβες, σε περίπτωση που δε ληφθεί η κατάλληλη θεραπεία.

Αναλόγως του είδους του ξενιστή που εμφανίζεται η νόσος, διαχωρίζεται σε 3 κατηγορίες οι οποίες συμπεριλαμβάνουν την ανθρωπονόσο, στην οποία η λοίμωξη μεταδίδεται από άνθρωπο σε άνθρωπο έχοντας το φλεβοτόμο ως ενδιάμεσο ξενιστή και η μοναδική δεξαμενή του παρασίτου είναι ο άνθρωπος. Έπειτα, συμπεριλαμβάνουν τη ζωνόσο, στην οποία η λοίμωξη μεταδίδεται από ζώο σε ζώο έχοντας ως ενδιάμεσο ξενιστή το φλεβοτόμο και η δεξαμενή του παρασίτου είναι τα ζώα. Τέλος, συμπεριλαμβάνεται η ανθρωποζωνόσος, στην οποία η λοίμωξη μεταδίδεται από τα ζώα στον άνθρωπο έχοντας ως ενδιάμεσο ξενιστή το φλεβοτόμο και κύρια δεξαμενή αποτελούν τα θηλαστικά τα οποία δευτερογενώς μολύνουν τον άνθρωπο.

Η δερματική λεισμανίαση προκαλείται από λοίμωξη με τα παρακάτω:

- *L. major*
- *L. tropica*
- *L. aethiopica*
- *L. infantum*
- *L. chagasi*
- *L. amazonensis*
- *L. mexicana*
- *L. braziliensis*
- *L. panamensis*
- *L. peruviana*
- *L. guayanensis*

Η βλεννογονοδερματική λεισμανίαση προκαλείται από λοίμωξη με τα παρακάτω:

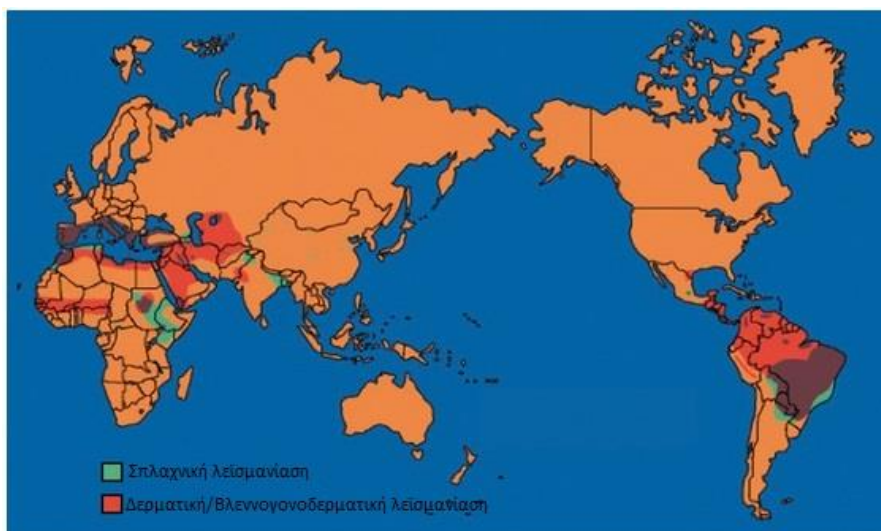
- *L. braziliensis*
- *L. panamensis*
- *L. guyanensis* (Νέος Κόσμος)
- *L. infantum* (Παλιός κόσμος)
- *L. donovanni* (Παλιός Κόσμος)

Η σπλαχνική λεισμανίαση προκαλείται από λοίμωξη με τα παρακάτω:

- *L. donovanni*
- *L. infantum*
- *L. chagasi*

Υπάρχει και μία τέταρτη μορφή λεισμανίασης, η οποία ονομάζεται διάχυτη δερματική λεισμανίαση (DCL) [6] και προκαλείται από λοίμωξη με τα παρακάτω:

- *L. amazonensis*
- *L. Aethiopica* [27]



Εικόνα 2. Παγκόσμια γεωγραφική κατανομή των κλινικών μορφών της λείσμανίασης (πηγή: Bhargava, P., & Singh, R. (2012). *Developments in diagnosis and antileishmanial drugs. Interdisciplinary perspectives on infectious diseases, 2012*)

Εκδηλώσεις της νόσου και μετάδοση των κυρίαρχων ειδών λείσμανίασης που απαντώνται στο νέο και στον παλαιό κόσμο				
Είδη <i>Leishmania</i> [L.]	Είδη φορέων φλεβοτόμων(<i>Phlebotomus</i> [P] ή <i>Lutzomyia</i> [L])	Κύριες επηρεαζόμενες περιοχές	Δεξαμενές αποθήκευσης παρασίτου	Εκδηλώσεις της νόσου
<i>L. aethiopica</i>	<i>P. longipes</i> <i>P. pedifer</i>	Αιθιοπία, Κένυα	Ύρακες	Δερματική, διάχυτη δερματική, βλεννογονοδερματική
<i>L. amazonensis</i>	<i>L. flaviscutellata</i>	Ανατολικές Άνδεις	Τρωκτικά	Δερματική, διάχυτη δερματική
<i>L. braziliensis</i>	<i>L. ovallesi</i> <i>L. welcomei</i> <i>L. neivai</i> <i>L. whitmani</i>	Ανατολικές και Δυτικές Άνδεις	Τρωκτικά, μαρσιποφόρα, σκύλοι	Δερματική, βλεννογονοδερματική
<i>L. donovani</i>	<i>P. argentipes</i> <i>P. martini</i> <i>P. orientalis</i>	Ινδία, Μπαγκλαντές, Νεπάλ Μπουτάν	Άνθρωπος	Σπλαχνική

<i>L. guyanensis</i>	<i>L. umbratilis</i>	Ανατολικές Άνδεις	Δενδρόβια θηλαστικά	Δερματική, βλεννογονο δερματική
<i>L. infantum</i> (στο νέο κόσμο ίδιο με το <i>L. chagasi</i>)	<i>P. ariasi</i> <i>P. perniciosus</i> <i>L. longipalpis</i>	Περιοχή της Μεσογείου	Σκύλοι	Σπλαχνική, δερματική
<i>L. major</i>	<i>P. duboscqi</i> <i>P. rapatasi</i>	Λατινική Αμερική, Υποσαχάρια Αφρική, Νότια Αφρική, Μέση Ανατολή, Ιράν, Πακιστάν, Ινδία	Τρωκτικά	Δερματική
<i>L. mexicana</i>	<i>L. olmeca olmeca</i>	Δυτικές Άνδεις	Τρωκτικά, μαρσιποφόρα	Δερματική, διάχυτη δερματική, βλεννογονο δερματική
<i>L. panamensis</i>	Δεν έχει αποδειχθεί	Δυτικές Άνδεις	Δενδρόβια θηλαστικά,	Δερματική, βλεννογονο δερματική
<i>L. peruviana</i>	Δεν έχει αποδειχθεί	Περου	Τρωκτικά, μαρσιποφόρα, σκύλοι	Δερματική, βλεννογονο δερματική
<i>L. tropica</i>	<i>P. sergenti</i> <i>P. arabicus</i> <i>P. guggisbergi</i>	Νότια Αφρική, Μέση Ανατολή, Ιράν, Αφγανιστάν, Νότια και Υποσαχάρια Αφρική	Ύρακες	Δερματική ⁱ

Πίνακας 1. Εκδηλώσεις της νόσου και μετάδοση των κυρίαρχων ειδών λείσμανίας που απαντώνται στον νέο και στον παλιό κόσμο [πηγή: (Pace D. (2014). Leishmaniasis. *The Journal of infection*, 2014) τροποποιημένο]

1.1.1 ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ

Η δερματική λειψμανίαση προκαλείται από συγκεκριμένα είδη του παρασίτου *Leishmania* και χαρακτηρίζεται από έντονες δερματικές αλλοιώσεις. Μεταδίδεται με είδη του φλεβοτόμου *Phlebotomus spp* και *Lutzomyia* στον Παλαιό και στο Νέο Κόσμο αντίστοιχα και την προκαλούν κυρίως τα είδη *L. major*, *L. tropica* και *L. aethiopica* στον Παλαιό Κόσμο και *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis* και *L. peruviana* στο Νέο Κόσμο. Επίσης, έχουν αναφερθεί και λοιμώξεις από *L. infantum* στον Παλαιό Κόσμο. Αυτή η παρασιτική λοίμωξη προκαλεί χρόνιες δερματικές βλάβες που επουλώνονται με ουλές, αφήνοντας συνήθως κάποια παραμόρφωση. Η βλάβη είναι συχνά μία ανώδυνη πυώδης έκκριση που εντοπίζεται σε εκτεθειμένες περιοχές όπως το πρόσωπο και τα άνω και κάτω άκρα. Επιπλέον, μπορεί να εμφανιστεί έλκος με μορφή εσχάρας ή εξιδρώματος και οζίδια. Τέλος, οι αλλοιώσεις μπορούν να έχουν επίσης και σποροτριοειδή, βερρουκώδη, ζωστηριοειδή, ψωριασικά, εκζεματοειδή και ερυσιπελοειδή χαρακτηριστικά. Στη δερματική λειψμανίαση τα παράσιτα βρίσκονται στην επιδερμίδα και στα ανώτερα επίπεδα του δέρματος και είναι αρκετά επιφανειακά. Ο μεγαλύτερος αριθμός παρασίτων βρίσκεται στις ελκωτικές αλλοιώσεις, από τις οποίες μπορεί να συλλεχθεί δείγμα για να χρησιμοποιηθεί σε ιστολογικές τεχνικές και τεχνικές όπως η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), ώστε να γίνει η διάγνωση της λοίμωξης [21]. Η θεραπεία της δερματικής λειψμανίασης στοχεύει στην αποφυγή διασποράς στους βλεννογόνους. Οι δερματικές αλλοιώσεις συνήθως είναι αυτοϊάσιμες και δε χρειάζονται κάποια ειδική θεραπεία, εκτός των περιπτώσεων βλαβών ανησυχητικών για τον ασθενή που θα μπορούσαν να εξελιχθούν και σε βλεννογονική νόσο, όπου η θεραπεία κρίνεται απαραίτητη. Οι θεραπείες που διατίθενται δεν είναι συγκεκριμένες και επιλέγονται ανάλογα με το είδος *Leishmania* που έχει προκαλέσει τη λοίμωξη, τη γεωγραφική κατανομή και την ανοσολογική ικανότητα του ασθενή. Τα φάρμακα που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι τα πεντασθενή αντιμικροβιακά (sbV), η μιλτεφοσίνη, οι αζόλες, η λιποσωμική αμφοτερικίνη Β (L-amB) και η πενταμιδίνη. Παρ'όλα αυτά, τα πεντασθενή αντιμικροβιακά δεν είναι εγκεκριμένα από τον εθνικό οργανισμό φαρμάκων (FDA), καθώς εμφανίζουν αυξημένη τοξικότητα και αντοχή, και μπορούν να αποκτηθούν μόνο μέσω των Κέντρων Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDC) υπό την αιγίδα του ερευνητικού πρωτοκόλλου νέου φαρμάκου (IND) και μόνο για ενδοφλέβια χρήση (IV). Αντιθέτως, η μιλτεφοσίνη έχει εγκριθεί από τον FDA και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία δερματικής λειψμανίασης που έχει προκληθεί από τα είδη *L. braziliensis*, *L.*

guyanensis και *L. rapanensis*. Τέλος, για απλές επιφανειακές δερματικές βλάβες μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και τεχνικές όπως κρυοθεραπεία, θερμοθεραπεία, τοπικές αλοιφές και ενδοδερμικά φάρμακα (IL) [22].



Εικόνα 3. Ελκώδης δερματική αλλοίωση που έχει προκληθεί από *L. major* στο Μαρόκο (πηγή: Aronson, N. E., & Joga, C. A. (2019). *Cutaneous Leishmaniasis: Updates in Diagnosis and Management. Infectious disease clinics of North America*)



Εικόνα 4. Διάχυτη δερματική λεισμανίαση (πηγή: Mokni, M. (2019). *Leishmanioses cutanées. Annales de Dermatologie et de Vénérologie*)

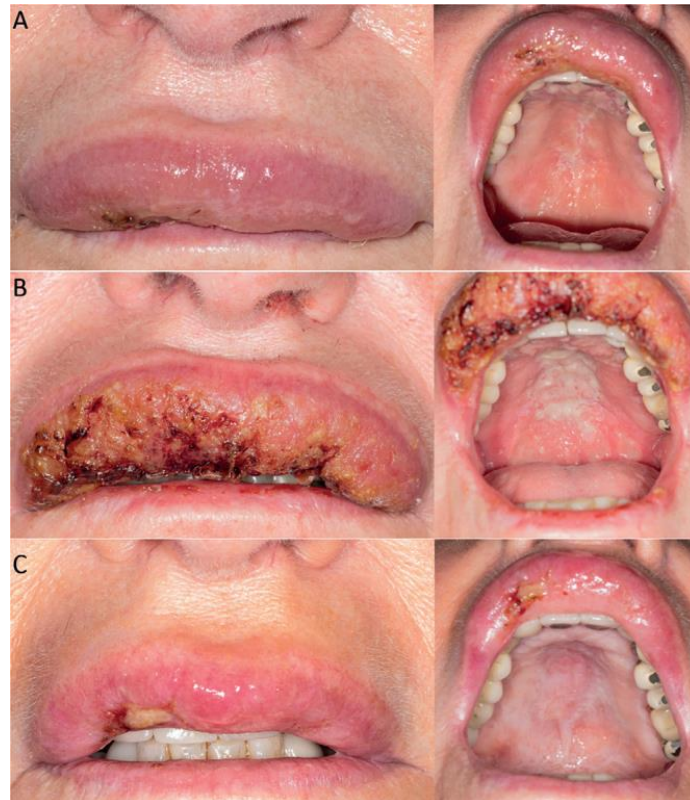


Εικόνα 5. Ελκώδης βλάβη που έχει προκληθεί από *L. panamensis* (πηγή: Aronson, N. E., & Joya, C. A. (2019). *Cutaneous Leishmaniasis: Updates in Diagnosis and Management. Infectious disease clinics of North America*

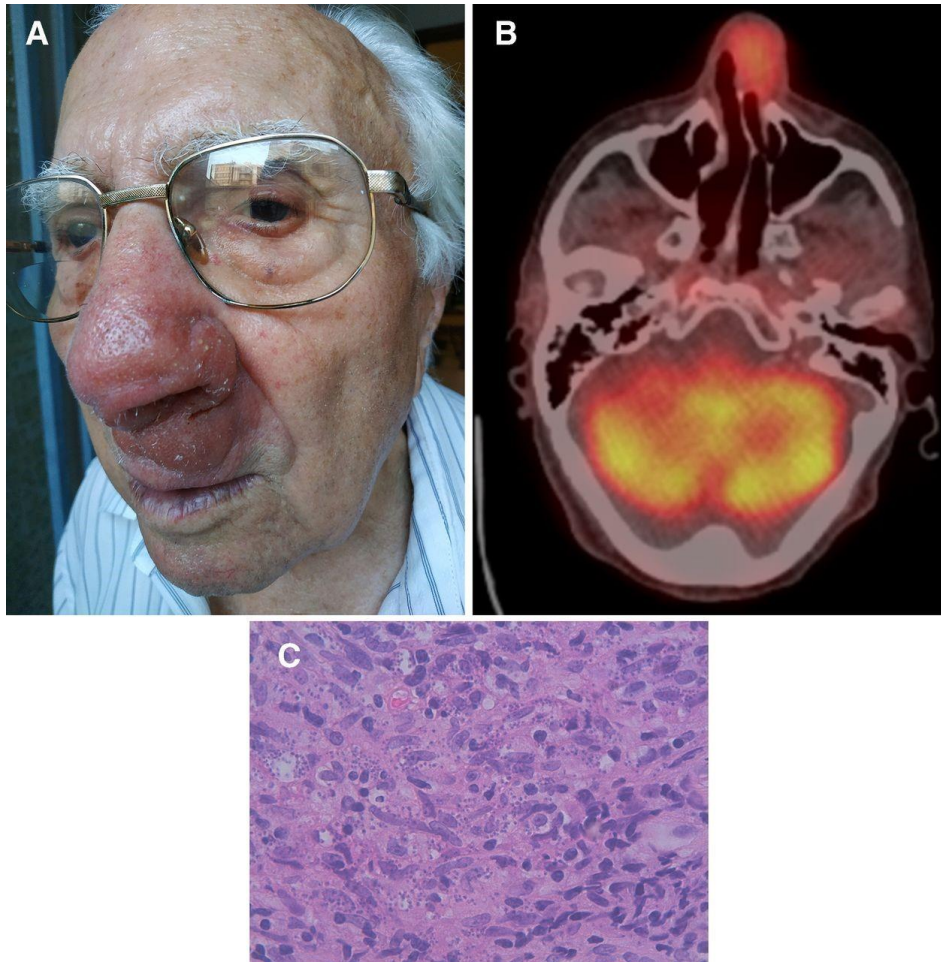
1.1.2 ΒΛΕΝΝΟΓΟΝΟΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ

Η βλεννογονοδερματική λεισμανίαση είναι μία λιγότερο συχνή μορφή λεισμανίασης και μπορεί να εμφανιστεί μέχρι και δεκαετίες έπειτα από την υποχώρηση της δερματικής λεισμανίασης και μεταδίδεται κυρίως μέσω αιματογενούς ή λεμφικής διασποράς των αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου από το δέρμα στους βλεννογόνους. Επιπλέον, μπορεί να διαδοθεί με άμεση εξάπλωση της τοπικής δερματικής λοίμωξης ή ακόμα και με άμεσο δάγκωμα από το φλεβοτόμο. Το είδος του παρασίτου στο Νέο Κόσμο που ενοχοποιείται για τη μετάδοση της βλεννογονοδερματικής λεισμανίασης είναι το *L. braziliensis*, ενώ στον Παλαιό Κόσμο ενοχοποιούνται κυρίως τα είδη *L. major*, *L. tropica* και *L. infantum*. Επιπλέον, υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές που αναφέρονται στη μετάδοση της βλεννογονοδερματικής λεισμανίασης από τα είδη *L. major* και *L. tropica* στην Τυνησία, στο Πακιστάν, στη Σαουδική Αραβία και στο Σουδάν και από *L. infantum* στην Ευρώπη, στην Τυνησία, στο Σουδάν και στο Ιράν. Οι περιοχές του σώματος που προσβάλλονται είναι κυρίως ο ρινικός βλεννογόνος, ο στοματικός βλεννογόνος, οι ανώτεροι αεραγωγοί και ο πεπτικός σωλήνας. Πιο συγκεκριμένα παρατηρούνται αλλοιώσεις στη μύτη, στα ούλα, στο μαλακό και σκληρό ουρανίσκο, στα χείλια, στην επιγλωττίδα και στο λάρυγγα. Σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα παρατηρούνται εκτεταμένες ουλώδεις και διάχυτες δερματικές αλλοιώσεις, καθώς και συνλοίμωξη ιικών και παρασιτικών λοιμώξεων, όπως για παράδειγμα συνλοίμωξη *HIV* και *Leishmania* σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς με AIDS. Τα κλινικά συμπτώματα ποικίλουν ανάμεσα στους ασθενείς και είναι ανάλογα της παθογένειας του είδους που προκάλεσε τη λοίμωξη, της ανοσολογικής ικανότητας του ξενιστή και της ικανότητας της εισβολής του παρασίτου. Η αρχή της λοίμωξης μπορεί να εμφανιστεί με μη

ειδικά σημάδια φλεγμονής όπως ρινική συμφόρηση και απόφραξη, αιμορραγία από τη μύτη, ερύθημα και ρινόρροια. Στη συνέχεια, επεκτείνονται προς το στόμα, τα χείλη, το φάρυγγα, τον ουρανίσκο, το λάρυγγα και τα μάγουλα. Αυτά έχουν ως συνέπεια την πρόκληση δυσφαγίας, απώλειας δοντιών, δυσφωνίας, δυσκολίας στη σίτιση, αναπνευστικής απόφραξης και δύσπνοιας. Η μορφή των αλλοιώσεων είναι λευκωπά/ερυθρωπά/ιώδη οζίδια ή πολυποειδείς μάζες που αναπτύσσονται σε διογκωμένο βλεννογόνο [28].



Εικόνα 6. Οίδημα και έλκος του άνω χείλους και της σκληρής υπερώας. (Α) Αρχική παρουσίαση (Β) 12 εβδομάδες μετά την αρχική παρουσίαση (C) 4 μήνες μετά το τέλος της θεραπείας με λιποσωμική αμφοτερικίνη Β (πηγή: Linse, K. P., Bogdan, C., Haenssle, H. A., & Toberer

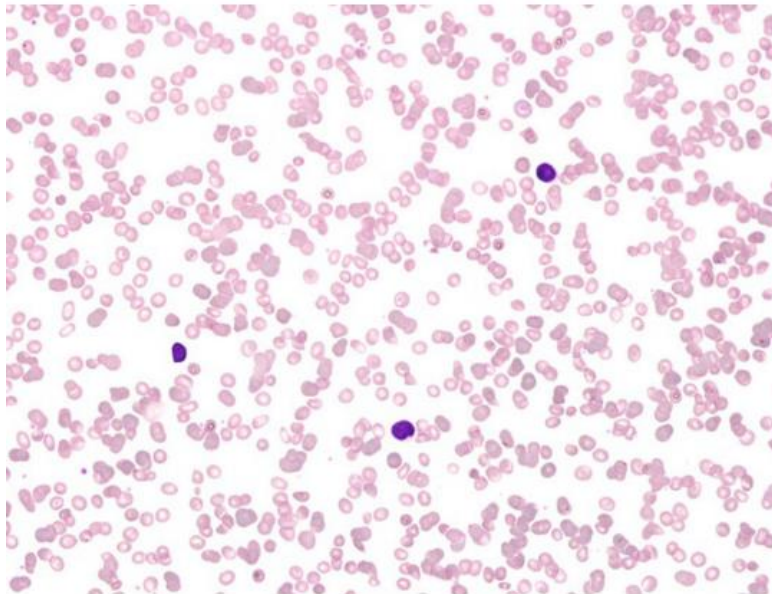


Εικόνα 7. (Α) Αργά αναπτυσσόμενη φλεγμονώδης βλάβη στην αριστερή ρινοπαραρριχική περιοχή. (Β) Αξονική τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων που αναδεικνύει υπερμεταβολισμό στην προσβεβλημένη περιοχή. (C) Βιοψία που αποκαλύπτει αμασιγωτά παράσιτα *Leishmania* sp. (πηγή: Roca, B., & Roca, M. (2020). *Mucocutaneous leishmaniasis (espondia)*. *Postgraduate medical journal*)

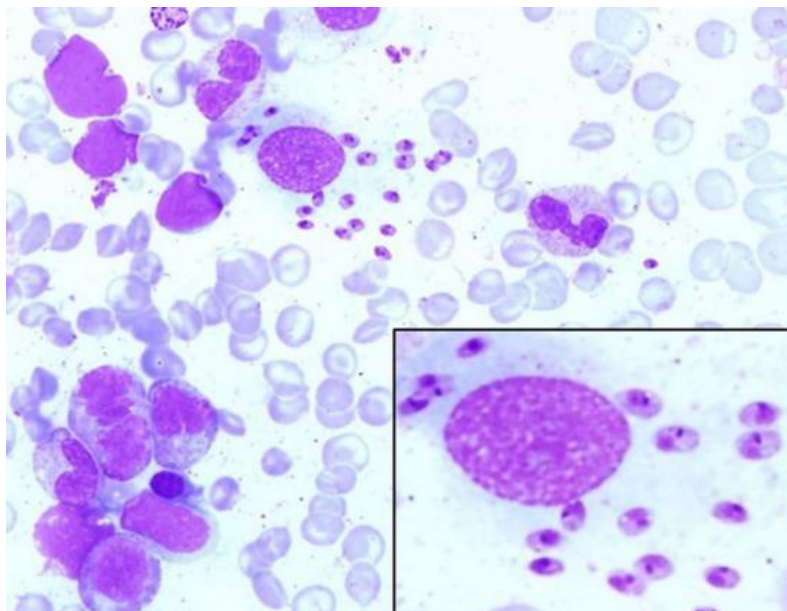
1.1.3 ΣΠΛΑΧΝΙΚΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ

Η σπλαχνική λείσμανίαση μπορεί να προκληθεί από περαιτέρω εξέλιξη της δερματικής και της βλεννογονοδερματικής μορφής λείσμανίασης, συνήθως λόγω ατελής θεραπείας, και εκτός από τη μορφή που εντοπίζεται στον άνθρωπο εντοπίζεται και ως ζωνοσός [25, 30]. Το παράσιτο μπορεί και μεταναστεύει στα δικτυοενδοθηλιακά κύτταρα των σπλαχνικών οργάνων όπως το ήπαρ, ο σπλήνας και ο μυελός των οστών προκαλώντας προοδευτική κυτταρική ανοσοκαταστολή και θεωρείται πως είναι η πιο θανατηφόρα μορφή λείσμανίασης [26]. Το είδος *Leishmania* που ενοχοποιείται για τη σπλαχνική λείσμανίαση στον άνθρωπο είναι το *L. donovani*, ενώ εκείνο που προκαλεί την ίδια μορφή λείσμανίασης στα ζώα είναι το *L. infantum* με τους σκύλους να αποτελούν την κύρια δεξαμενή της νόσου [29]. Η ασθένεια αυτή μπορεί να γίνει ιδιαίτερα καταστροφική για τους ανοσοκατεσταλμένους, όπως

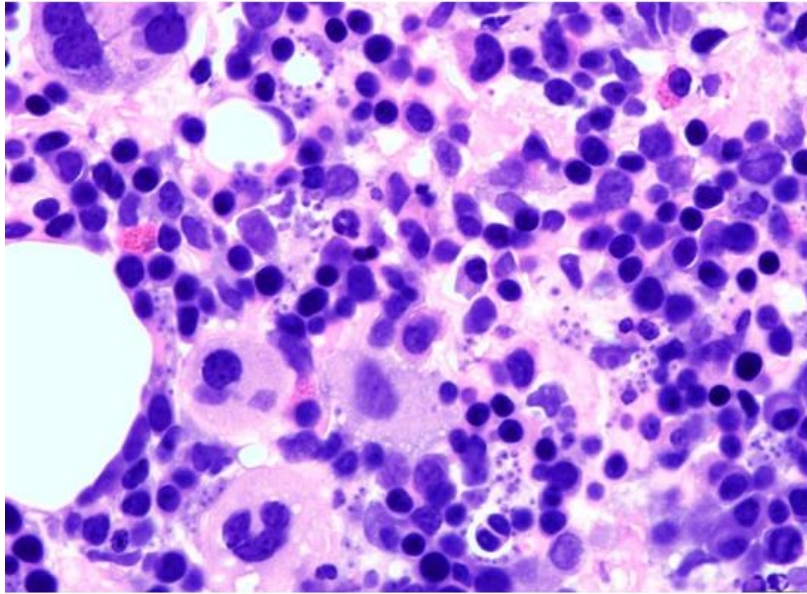
ασθενείς με HIV, καθώς τα παράσιτα μεταφέρονται στα σπλαχνικά όργανα μέσω των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων [30]. Η σπλαχνική λεισμανίαση χαρακτηρίζεται από πυρετό, απώλεια βάρους, επίσταξη, πανκυτταροπενία, ανορεξία, κοιλιακό άλγος, βήχα, διάρροια, ναυτία, έμετο, αδυναμία, κόπωση, σπληνομεγαλία, ηπατομεγαλία και λεμφαδενοπάθεια [36].



Εικόνα 8. Επίχρισμα περιφερικού αίματος που αναδεικνύει συγγενή επικράτηση λεμφοκυττάρων [(χρώση Giemsa × 400)
πηγή: Safani, M., Eshaghi, H., & Hajihassani, Z. (2021). Visceral Leishmaniasis: Kala-azar. Diagnostic cytopathology]



Εικόνα 9. Φαγοκύτταρο που περιέχει αμαστιγωτά του παρασίτου *Leishmania* σε επίχρισμα μυελού των οστών [(χρώση Wright και Giemsa ×1000) πηγή: Safani, M., Eshaghi, H., & Hajihassani, Z. (2021). Visceral Leishmaniasis: Kala-azar. Diagnostic cytopathology]



Εικόνα 10. Βιοψία μυελού των οστών που αναδεικνύει μεγάλο αριθμό εξωκυτταρικών και ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *Leishmania* [(χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης) πηγή: Safani, M., Eshaghi, H., & Hajihassani, Z. (2021). *Visceral Leishmaniasis: Kala-azar, Diagnostic cytopathology*]

1.2 ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ *LEISHMANIA*

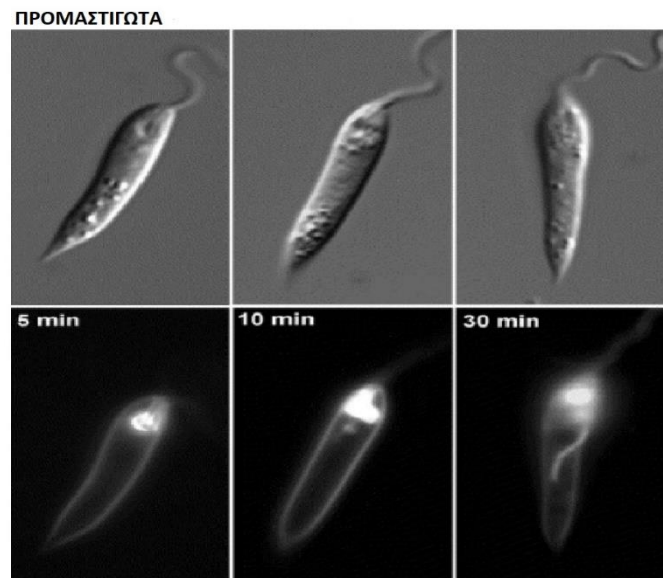
Η θηλυκή σκνίπα που μεταφέρει τα παράσιτα της λεισμανίασης και εντοπίζεται σε Ευρώπη, Ασία και Αφρική (Παλιός Κόσμος) είναι του γένους *Phlebotomus spp* και εκείνη που εντοπίζεται στην Αμερική (Νέος Κόσμος) είναι του γένους *Lytzomyia*. Στην Ελλάδα οι κύριοι φορείς είναι οι *Phlebotomus* και *Sergentomyia* και πιο συγκεκριμένα η *Phlebotomus neglectus* είναι φορέας του παρασίτου *L. Infantum* [27].

1.3 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ *LEISHMANIA*

1.3.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ *LEISHMANIA*

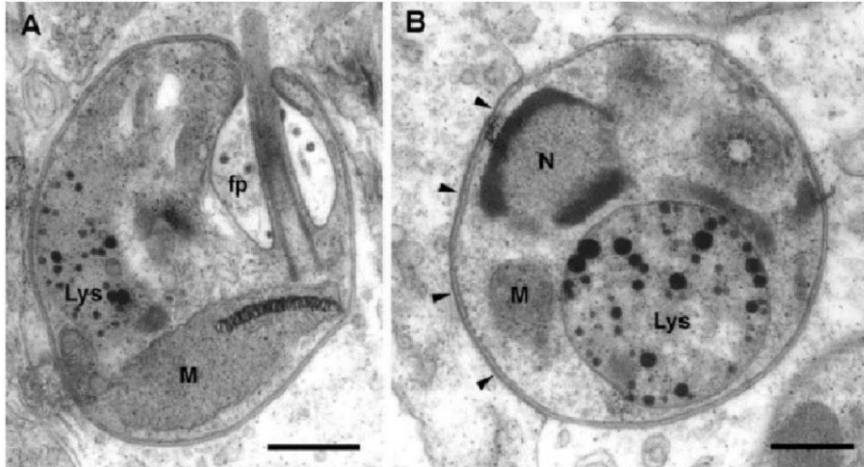
Το παράσιτο της λεισμανίασης ανευρίσκεται σε 3 μορφές, εμφανίζεται ως αμαστιγωτό παράσιτο, ως προκυκλικό μαστιγωτό παράσιτο και ως μετακυκλικό προμαστιγωτό παράσιτο. Στον ασπόνδυλο ξενιστή (φλεβοτόμος) ανευρίσκεται στην προμαστιγωτή του φάση, ενώ στους σπονδυλωτούς ξενιστές (θηλαστικά) ανευρίσκεται στη μαστιγωτή του φάση. Η προμαστιγωτή φάση δεν είναι λοιμώδης, εκεί τα παράσιτα έχουν επίμηκες σχήμα και μακριά μαστίγια που έχουν μήκος έως και 20 μm και αναδύονται από μία θήκη. Η διάμετρός τους είναι 5-20 μm × 1-4 μm, είναι διακριτά και έχουν προωστική δύναμη. Η μαστιγωτή φάση είναι λοιμώδης, εκεί τα παράσιτα έχουν οωειδές σχήμα και δυσδιάκριτα μαστίγια που

αναδύονται ενδοπλασματικά. Η διάμετρός τους είναι 2,5 μm-5 μm και έχουν αισθητηριακές λειτουργίες. Τέλος, η αμαστιγωτή φάση είναι λοιμώδης, εκεί τα παράσιτα έχουν οειδές σχήμα και ενδοπλασματικά μαστίγια. Η διάμετρός τους είναι 2-6 μm × 1,5-2 μm, φέρουν έκκεντρο πυρήνα με πυρηνίσκο και κινητοβλάστη και βρίσκονται εντός των φαγολυσσοσωμάτων των μονοπύρηνων/μακροφάγων του τελικού ξενιστή [27].

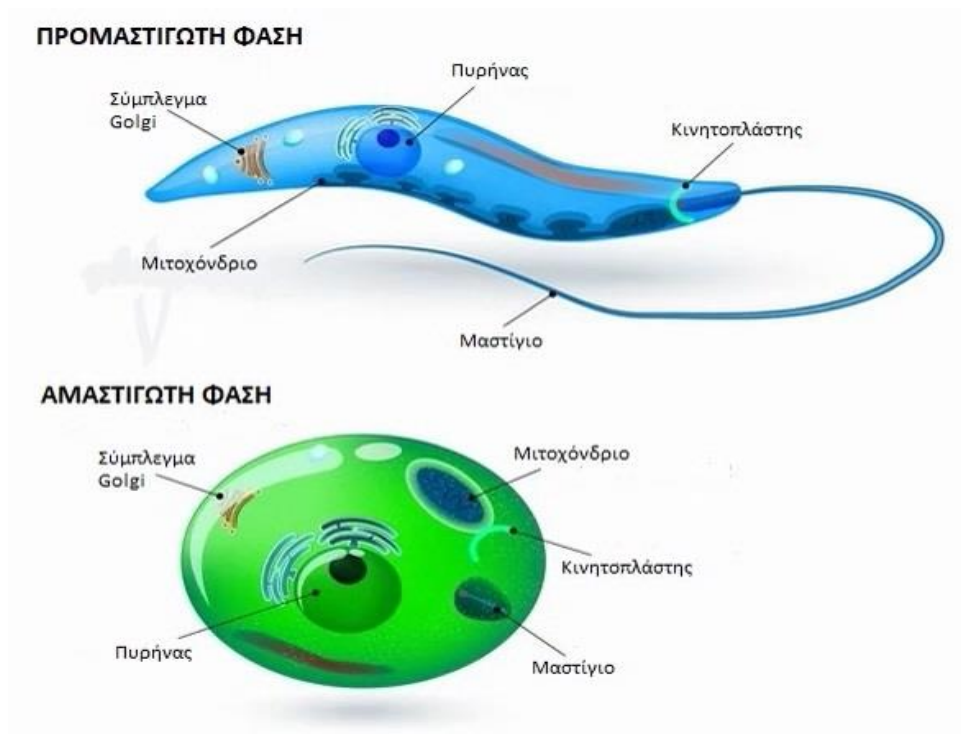


Εικόνα 11. Οριοθέτηση των ενδοκυτταρικών και λυσοσωματικών διαμερισμάτων σε ζωντανά προμαστιγωτά *Leishmania mexicana* που έχουν χρωματιστεί με FM 4-64. Τα προμαστιγωτά επισημάνθηκαν με τη χρωστική για 5, 10 και 30 λεπτά. Η χρωστική αρχικά συσσωρεύεται στο θύλακα του μαστιγίου όπου προσλαμβάνεται στα πρώιμα ενδοσώματα. Με την πάροδο του χρόνου χρωματίζεται ως τελικό διαμέρισμα της ενδοκυτταρικής οδού το MVT-λυσόσωμα. Παρουσιάζονται εικόνες φθορισμού και αντίθεσης διαφορικής παρεμβολής των ίδιων κυττάρων. (πηγή: Waller, R. F., & McConville, M. J., 2002 [τροποποιημένο])

ΑΜΑΣΤΙΓΩΤΑ



Εικόνα 12. Υπερδομή των μεγασωμάτων στα αμαστιγωτά της *Leishmania mexicana*. Οι θλάδες των ποντικών BALB/c που περιείχαν μολυσμένα μακροφάγα σταθεροποιήθηκαν σε γλουταραλδεΐδη και όσμιο και αναλύθηκαν λεπτές τομές με ΗΜ. Στις εικόνες φαίνεται πως τα λυσοσώματα (Lys) καταλαμβάνουν ένα σημαντικό ποσοστό του κυτταροπλάσματος, ενώ τα οργανίδια της εκκριτικής οδού είναι λιγότερο εμφανή. Το μαστίγιο του αμαστιγωτού αναδύεται από μία θήκη. Το οπίσθιο άκρο των αμαστιγωτών είναι συχνά στενά συνδεδεμένο με τη μεμβράνη του φαγολυσσοσωματικού διαμερίσματος των μακροφάγων. (πηγή: Waller, R. F., & McConville, M. J., 2002 [τροποποιημένο] N: Πυρήνας, M: Μιτοχόνδριο



Εικόνα 13. Προμαστιγωτή και αμαστιγωτή μορφή του παρασίτου *Leishmania* (πηγή: Εικόνα που υπάρχει στη βάση δεδομένων της Google [τροποποιημένο])

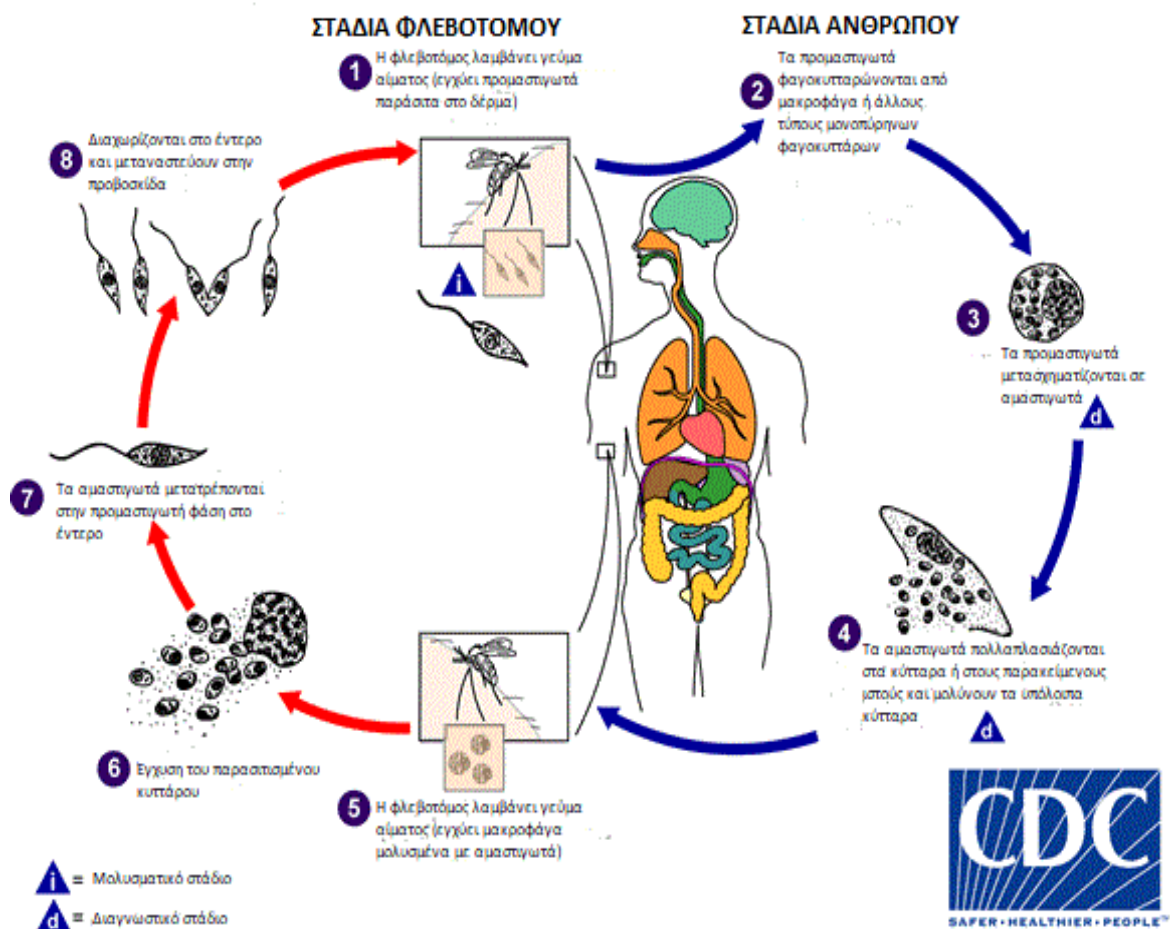
1.3.2 ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ *LEISHMANIA*

Ο εντοπισμός των γενετικών παραγόντων κινδύνου για παρασιτικές λοιμώξεις όπως η λείσμανίαση, θα μπορούσε να προσφέρει σημαντικά στοιχεία για τη βελτίωση των θεραπειών και των εμβολίων. Τα παράσιτα *Leishmania* ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων τους σε μεγάλο βαθμό μετα-μεταγραφικά, λόγω της διάταξης των κωδικών γονιδίων τους σε πολυκιστρονικές μεταγραφικές μονάδες που μπορεί να περιέχουν εκατοντάδες γονίδια. Ωστόσο, είναι ικανά για ταχείες και ευαίσθητες αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση σε απαιτητικά περιβάλλοντα, που συνήθως σχετίζονται με δυναμικές αλλαγές στη σύνθεση του γονιδιώματός τους. Οι αλλαγές αυτές μπορεί να αφορούν σε μεταβολές του αριθμού των χρωμοσωμάτων και των γονιδίων και στη δημιουργία εξωχρωμοσωμικού DNA και συνεπώς στη συσσώρευση σημειακών μεταλλάξεων. Στο γονιδίωμα των παρασίτων υπάρχουν περίπου 2000 άμεσες επαναλήψεις χαμηλής πολυπλοκότητας (DRs) και ανεστραμμένες επαναλήψεις (IRs). Από αυτές τις επαναλήψεις DNA εκτιμάται πως προκύπτουν 3000-4000 εξωχρωμοσωμικά κυκλικά ή γραμμικά αμπλικόνια, τα οποία προέρχονται από το γονιδίωμα και φέρουν πιθανά χαρακτηριστικά που ενισχύουν την καταλληλότητα. Η ενίσχυση αυτή πραγματοποιείται με αλλαγές στα αμπλικόνια, τα οποία οδηγούν σε μεταβολές των επιπέδων του RNA σε στρεσογόνα περιβάλλοντα, όπως για παράδειγμα μετά από έκθεση σε φάρμακα. Οι θέσεις χαμηλής πολυπλοκότητας και των ανεστραμμένων επαναλήψεων είναι σύνθετες στα διαφορετικά είδη *Leishmania* και οι περισσότερες ανήκουν σε μία οικογένεια εξαφανισμένων μεταθετικών στοιχείων γνωστών και ως Short Interspersed Degenerate Retroposons (SIDERs) που επεκτάθηκαν στα παράσιτα *Leishmania*. Τα στοιχεία SIDER μπορούν να αποσταθεροποιούν το mRNA, ενδέχεται να επιτελούν ευρύτερες λειτουργίες που σχετίζονται με τη ρύθμιση των τριών πρώτων αμετάφραστων περιοχών (3' UTRs) ενώ έχουν περιγραφεί δύο υποοικογένειες των στοιχείων SIDER στα παράσιτα, η SIDER1 και η SIDER2 [37].

1.4 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ *LEISHMANIA*

Ο κύκλος ζωής ξεκινάει με μία θηλυκή φλεβοτόμο να προσλαμβάνει, μέσω δήγματος για τροφή αίματος, παράσιτα σε αμαστιγωτή μορφή. Έπειτα, τα παράσιτα περνούν στο μεσεντέριο της φλεβοτόμου και μετατρέπονται σε προκυκλικά προμαστιγωτά, τα οποία δεν είναι μολυσματικά. Στη συνέχεια, μετά από βιοχημικές και μορφολογικές τροποποιήσεις,

μετατρέπονται σε μετακυκλικά προμαστιγωτά, τα οποία είναι μολυσματικά. Αφού εισέλθουν τα μολυσματικά μετακυκλικά παράσιτα στον ξενιστή, ενεργοποιούνται τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα και τα δενδριτικά κύτταρα τα οποία και φαγοκυτταρώνουν τα παράσιτα. Μέσα στο φαγολυσόσωμα του μακροφάγου τα παράσιτα μετατρέπονται σε αμαστιγωτά και πολλαπλασιάζονται με διχοτόμηση. Το κύτταρο διαρρηθνύεται όταν ο αριθμός των παρασίτων ξεπεράσει τα 16-32 παράσιτα ανά κύτταρο και τα παράσιτα απελευθερώνονται στον ιστικό χώρο και μολύνουν τα γειτονικά μακροφάγα. Τέλος, όταν μία μολυσμένη φλεβοτόμος τρέφεται με το αίμα του ξενιστή που περιέχει είτε μολυσμένα φαγοκύτταρα είτε παράσιτα σε αμαστιγωτή μορφή, ο κύκλος ζωής του παρασίτου ολοκληρώνεται [27].



Εικόνα 14. Κύκλος ζωής της λείσμανιάσης στους ανθρώπους (πηγή: Center for Disease Control and Prevention, CDC, DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern, (2012) [τροποποιημένο])

1.5 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ ΣΕ ΛΟΙΜΩΞΗ ΑΠΟ *LEISHMANIA*

Ο λειτουργικός ρόλος του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος είναι η γρήγορη και αποτελεσματική απόκριση στη μόλυνση που προκαλείται από τα παθογόνα. Το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα προσφέρει μη ειδική απάντηση στα παθογόνα, ενώ τα προσαρμοστικά ανοσοποιητικά κύτταρα παρέχουν μία εξαιρετικά ειδική απάντηση στα παθογόνα. Στη λοίμωξη από *Leishmania*, τα κύτταρα του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος που συμμετέχουν είναι τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα μαστοκύτταρα, τα βασεόφιλα, τα ηωσινόφιλα, και τα κύτταρα φυσικοί φονείς, ενώ τα κύτταρα του προσαρμοστικού συστήματος είναι τα Τ-λεμφοκύτταρα και τα Β-λεμφοκύτταρα. Τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα αποτελούν τα σημαντικότερα λειτουργικά κύτταρα της έμφυτης ανοσίας και παράγουν κυτταροκίνες όπως η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ), η ιντερλευκίνη-12 (IL-12) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (TNF-α) [38].

Η εξέλιξη της λεισμανίασης εξαρτάται από τον πολλαπλασιασμό των παρασίτων ενδοκυτταρικά στον ξενιστή. Το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα χρησιμοποιεί υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (PRR), όπως υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like receptors), υποδοχείς μαννόζης των μακροφάγων (MMR) και υποδοχείς τύπου NOD (NLR) που εκφράζονται στα αντιγονοπαραρυσιαστικά κύτταρα (APC) για την αρχική αναγνώριση των παρασίτων που σχετίζονται με παθογόνα μοριακά πρότυπα (PAMP). Οι πρώτοι υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων που αναγνωρίζουν τα παθογόνα μοριακά μονοπάτια των παρασίτων *Leishmania* είναι οι υποδοχείς τύπου Toll. Η σηματοδότηση των υποδοχέων αναγνώρισης εκκινεί διάφορες έμφυτες ανοσολογικές αποκρίσεις, όπως η ενεργοποίηση των καταρρακτών συμπληρώματος, η επαγωγή της φαγοκυττάρωσης και η παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Σε απάντηση στην ανοσολογική απόκριση του ξενιστή, τα παράσιτα *Leishmania* έχουν την ικανότητα να αποφεύγουν ή να καταστέλλουν τους αντιμικροβιακούς παράγοντες που παράγονται από τα κύτταρα του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. Τα ενδοκυτταρικά προμαστιγωτά του παρασίτου μπορούν να αναδιαμορφώνουν το φαγοσωμικό διαμέρισμα παρεμβαίνοντας έτσι στα σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν στην παρασιτική κάθαρση. Επίσης, μπορούν να επιβιώνουν στα κύτταρα του ξενιστή παρεμβαίνοντας στα σηματοδοτικά μονοπάτια των υποδοχέων τύπου Toll, διαταράσσοντας

έτσι την ανοσολογική ομοιόσταση ή καθιστώντας ανενεργά τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος [38].

1.5.1 ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΙΑ

Τα ουδετερόφιλα αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των παρασίτων *Leishmania*, καθώς είναι η πρώτη σειρά ανοσοποιητικών κυττάρων που φθάνει στο σημείο της λοίμωξης εντός των πρώτων ωρών. Μπορούν και διευκολύνουν την ανοσολογική απόκριση με την απορρόφηση των προμαστιγωτών μορφών του παρασίτου και με την παραγωγή διάφορων συστοιχίων αντιμικροβιακών παραγόντων όπως οι εξωκυτταρικές παγίδες των ουδετερόφιλων (NETs), τα λυτικά ένζυμα, οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και η διαφορική παραγωγή κυτταροκινών. Οι ανοσολογικές αποκρίσεις των ουδετερόφιλων διαμορφώνονται από τους υποδοχείς τύπου Toll (TLRs), οι οποίοι συμβάλλουν στην κατάλληλη στρατολόγηση των ουδετερόφιλων στο σημείο της λοίμωξης, στην ενεργοποίησή τους και στην απόπτωσή τους. Η συμμετοχή των ουδετερόφιλων δεν περιορίζεται στην προμαστιγωτή φάση της λοίμωξης, αλλά επεκτείνεται και στη μετέπειτα φάση, έτσι η ισχύς τους έναντι των παρασίτων *Leishmania* είναι ενδεικτική της φάσης που βρίσκεται η λοίμωξη. Επιπλέον, τα ουδετερόφιλα έχουν την ικανότητα να στρατολογούνται στη σημείο της λοίμωξης χωρίς να ενεργοποιούν τους αντιμικροβιακούς παράγοντές τους, οδηγώντας τα προμαστιγωτά ή αμαστιγωτά μολυσματικά παράσιτα στα μακροφάγα [38].

1.5.2 ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

Τα μακροφάγα αποτελούν την επόμενη γραμμή άμυνας έναντι των παρασίτων *Leishmania* μετά τη διήθηση από τα ουδετερόφιλα, προκαλώντας την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως η ιντερλευκίνη-1 (IL-1), η ιντερλευκίνη-6 (IL-6), η ιντερλευκίνη-12 (IL-12) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF) και επιπλέον προκαλώντας την έκκριση οξειδίων του αζώτου. Η φαγοκυττάρωση των προμαστιγωτών παρασίτων από τα μακροφάγα είναι μία διαδικασία στην οποία λαμβάνουν μέρος οι υποδοχείς τύπου Toll (TLRs), οι υποδοχείς του συμπληρώματος (CR), οι κινάσες και κάποιοι μεταγραφικοί παράγοντες. Οι υποδοχείς επιφανείας του αντιγόνου αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς αναγνώρισης παθογόνων του ξενιστή και κυρίως από τους υποδοχείς τύπου Toll, οι οποίοι επάγουν την έμφυτη ανοσολογική απόκριση. Για παράδειγμα, οι Toll-like υποδοχείς στα μακροφάγα

αναγνωρίζουν τη λιποφωσφογλυκάνη (LPG) των παρασίτων *L. infantum* και *L. braziliensis*, επάγοντας έτσι την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) [38].

1.5.3 ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

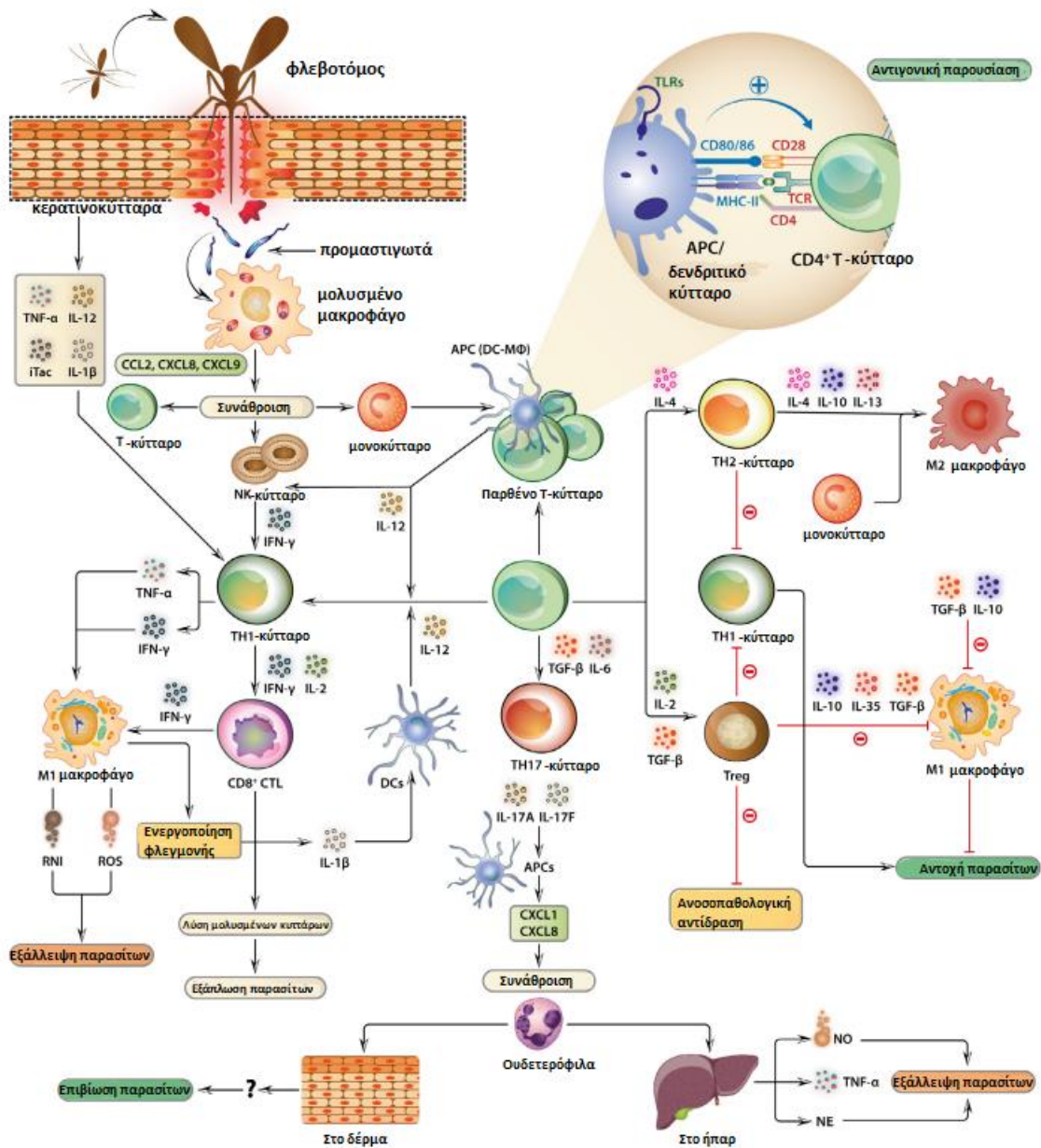
Τα δενδριτικά κύτταρα είναι τα πιο αποτελεσματικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος στην παρουσίαση αντιγόνων και στην απόκριση σε λοιμώξεις, καθώς κατευθύνουν τα Τ-βοηθητικά (CD4) και τα Τ-κυτταροτοξικά (CD8) κύτταρα [39]. Η ενεργοποίηση και ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων πυροδοτούνται μετά την αναγνώριση των μοριακών προτύπων που σχετίζονται με τα παθογόνα (PAMPs) από τους υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (PRR) και λειτουργούν ως σήματα κινδύνου. Οι υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων είναι οι υποδοχείς τύπου Toll (TLRs) και η λεκτίνη τύπου C, οι οποίοι οδηγούν ταυτόχρονα σε αυξημένη έκκριση κυτταροκινών και στην ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων, ώστε να φαγοκυτταρωθούν τα παθογόνα. Η έναρξη της ανοσολογικής απάντησης έναντι των παρασίτων εξαρτάται από την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων, η οποία χαρακτηρίζεται από την έκφραση των CD40, CD80, CD86 και από την παραγωγή της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-12. Η αλληλεπίδραση των δενδριτικών κυττάρων με τα παράσιτα *Leishmania* εξαρτάται από το είδος *Leishmania*, από τη μορφολογική κατάσταση του παρασίτου και από τον τύπο και την κατάσταση του ξενιστή [38].

1.5.4 ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Τα Τ-λεμφοκύτταρα παράγονται στο μυελό των οστών και ωριμάζουν στο θύμο αδένα. Μπορούν να αναγνωρίζουν ξένα αντιγόνα στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APCs) μέσω των κυτταρικών υποδοχέων τους (TCRs). Υπάρχουν τέσσερις διαφορετικοί τύποι Τ-κυττάρων, τα Τ-βοηθητικά (CD4), τα Τ-κυτταροτοξικά (CD8), τα Τ-κύτταρα μνήμης και τα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK) και διαχωρίζονται στους συγκεκριμένους υποτύπους ανάλογα με την ικανότητά τους να παράγουν συγκεκριμένες κυτταροκίνες. Τα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK) συνδέουν το προσαρμοστικό με το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα εκτελώντας ίδιες λειτουργίες με τα CD4 και τα CD8 κύτταρα, μεσολαβώντας στην άμεση λύση των παρασίτων. Η λιποφωσφογλυκάνη των παρασίτων ενεργοποιεί έμμεσα τα κύτταρα φυσικούς φονείς (NK) διεγείροντας τον υποδοχέα τύπου Toll-2 (TLR2) στα δενδριτικά κύτταρα (DCs) ενεργοποιώντας την έκφραση του MHC-II και του

CD86, τα οποία με τη σειρά τους προάγουν την παραγωγή της ιντερλευκίνης 12p70 (IL-12p70) η οποία στη συνέχεια οδηγεί στην παραγωγή της ιντερφερόνης-γ (IFN-γ) [39].

Τα Β-λεμφοκύτταρα είναι ένας πληθυσμός ετερογενών κυττάρων που βρίσκονται εντός των θυλακίων του σπληνός και των λεμφαδένων. Στα όργανα αυτά, τα Β-λεμφοκύτταρα μπορούν να αναγνωρίζουν ξένα αντιγόνα μέσω του επιφανειακού τους υποδοχέα (BCR). Μετά την ενεργοποίηση και τη διαφοροποίησή τους, τα Β-λεμφοκύτταρα πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα που παράγουν ειδικά αντισώματα έναντι των παρασίτων *Leishmania*. Σήμερα γνωρίζουμε πως τα αντισώματα IgG1 μπορούν να αναγνωρίζουν τα φωσφολιπίδια γλυκοϊνοσιτόλης (GPIs) στην επιφάνεια των παρασίτων *Leishmania* και δεσμεύονται στα παράσιτα ευνοώντας την εσωτερικευσή τους στα κύτταρα των ξενιστών όπως τα δενδριτικά κύτταρα και τα μακροφάγα. Ταυτόχρονα όμως, η ενδοκυτταρική επιβίωση των παρασίτων επάγει την παραγωγή της ιντερλευκίνης-10 (IL-10) και δημιουργεί ένα κατασταλτικό περιβάλλον που ευνοεί την περαιτέρω επιβίωσή τους.



Εικόνα 15. Ανοσολογικές αντιδράσεις κατά τη διάρκεια της λοίμωξης από *Leishmania*. Οι χημειοκίνες που παράγονται από τα μακροφάγα οδηγούν στη συσσώρευση λευκοκυττάρων όπως τα κύτταρα φυσικοί φονείς, τα μονοκύτταρα και τα T-κύτταρα στην περιοχή της λοίμωξης. Τα αντιγόνα των παρασίτων παρουσιάζονται στα παρθένα CD4+ T-κύτταρα από τα αντιγόνοπαρουσιαστικά κύτταρα όπως τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα. Η διαφοροποίηση των παρθένων T-κυττάρων επηρεάζει την κλινική έκβαση της λοίμωξης. Η διαφοροποίηση των παρθένων T-κυττάρων επηρεάζει την κλινική έκβαση της λοίμωξης. Οι Th1 και οι CTL- σχετιζόμενες ανοσολογικές αποκρίσεις περιορίζουν την ανάπτυξη των παρασίτων, ενώ οι Th2 και T-reg κυτταρικές ανοσολογικές αποκρίσεις προάγουν την ανάπτυξη των παρασίτων. Οι μεσολαβούμενες αποκρίσεις από Th17 κύτταρα μπορεί να είναι προστατευτικές ή μη προστατευτικές στο ήπαρ και στο δέρμα αντίστοιχα. Οι κυτταροκίνες που προέρχονται από τα κερατινοκύτταρα ενισχύουν τις μεσολαβούμενες από Th1 κύτταρα κυτταρικές αποκρίσεις (πηγή: Εικόνα που υπάρχει στη βάση δεδομένων της Google).

1.6 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ

Οι διαφορετικοί τύποι της λεισμανίασης (δερματική, σπλαχνική και βλεννογονοδερματική) απαιτούν και την ανάλογη θεραπευτική προσέγγιση. Παρ' όλο που η θεραπεία της λεισμανίασης αποτελεί πρόκληση, υπάρχουν συμβατικές θεραπευτικές προσεγγίσεις και η αναζήτηση για νέες μεθόδους θεραπειών, όπως η ανοσοθεραπεία και η ανοσοχημειοθεραπεία, και η αναζήτηση νέων φαρμάκων συνεχίζεται [17].

1.6.1 ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Ως φαρμακευτική θεραπεία πρώτης γραμμής χρησιμοποιήθηκε αρχικά το πεντασθενές αντιμόνιο και έπειτα ως θεραπεία δεύτερης γραμμής επιλέχθηκε η αμφοτερικίνη Β και η μιλτεφοσίνη. Ωστόσο, αυτές οι δυο φαρμακευτικές ενώσεις μπορούν να προκαλέσουν τόσο καρδιοτοξικότητα, κίρρωση και τοξικότητα του παγκρέατος και κίνδυνο ανάπτυξης αντοχής όσο και τερατογένεση και αντίσταση στα φάρμακα αντίστοιχα. Σήμερα ως θεραπευτική αγωγή έναντι της λεισμανίασης χρησιμοποιούνται κυρίως η αμφοτερικίνη Β, η μιλτεφοσίνη, η παρομομυκίνη και η πενταμιδίνη. Επιπλέον, φαίνονται αποτελεσματικά τα αντιμυκητιασικά της αζόλης, όπως η ιτρακοναζόλη, η κετοконаζόλη και η φλουκοναζόλη, με την ιτρακοναζόλη να είναι πιο ισχυρός ανασταλτικός παράγοντας της ανάπτυξης στελεχών *Leishmania* [17].

ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ					
Φάρμακο	Οδός χορήγησης	Δοσολογία	Παρενέργειες	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Πεντασθενές αντιμόνιο	IM, IV or IL	20 mg/kg/ημέρα για 28-30 μέρες	Καρδιοτοξικότητα, παγκρεατίτιδα, νεφροτοξικότητα, ηπατοτοξικότητα	Εύκολη διαθεσιμότητα (σε ενδημικές περιοχές), χαμηλό κόστος	Παρατεταμένη διάρκεια θεραπείας, πόνος κατά τη διάρκεια της έγχυσης, τοξικές παρενέργειες, αντοχή στο φάρμακο
Αμφοτερικίνη Β	IV	0,75-1 mg/kg/ημέρα για 15-20 μέρες καθημερινά ή μέρα παρά μέρα	Νεφροτοξικότητα, αντιδράσεις σχετιζόμενες με την έγχυση	Η πρωτογενής αντίσταση δεν είναι συνηθής	Απαιτείται νοσηλεία για τη χορήγηση του φαρμάκου, νεφροτοξικότητα, εξάψεις, αστάθεια
Λιποσωμική αμφοτερικίνη Β	IV	10-30 mg/kg συνολική δόση (μονή δόση 3-5 mg/kg/δόση)	Ρίγη και ακαμψία κατά την έγχυση, ήπια νεφροτοξικότητα	Υψηλή αποτελεσματικότητα, χαμηλή τοξικότητα	Υψηλό κόστος, ανάγκη για αργή έγχυση IV
Μιλτεφοσίνη	Στοματική	100-150 mg/ημέρα για 28 ημέρες	Γαστρεντερικές παρενέργειες, νεφρική και ηπατική τοξικότητα, τερατογένεση	Αποτελεσματικό	Υψηλό κόστος, πιθανή τερατογένεση, αντοχή στο φάρμακο, ανεπαρκής συμβατότητα
Παρομομυκίνη	IM (VL) ή τοπική (CL)	15 mg/ημέρα για 21 ημέρες ή 20 mg/kg για 17 ημέρες	Νεφρική, ακουστική και ηπατική τοξικότητα	Αποτελεσματικό, σχετικά οικονομικό	Ποικίλη αποτελεσματικότητα αναλόγως της γεωγραφικής περιοχής, πιθανότητα ανάπτυξης αντοχής
Πενταμιδίνη	IM	3 mg/kg/ημέρα IM μέρα παρά μέρα για 4 εγχύσεις	Υπεργλυκαμία, υπόταση, ταχυκαρδία, ηλεκτροκαρδιογραφικές μεταβολές	Απαιτείται σύντομος κύκλος θεραπειών	Ποικίλη αποτελεσματικότητα ανάλογα με τα είδη <i>Leishmania</i>

CL: Δερματική λεισμανίαση, IL: Ενδοθηλιακά, IM: Ενδομυϊκά, IV: Ενδοφλέβια, VL: Σπλαχνική λεισμανίαση

Εικόνα 16. Θεραπευτικοί στόχοι για τη λεισμανίαση (πηγή: Pradhan, S., Schwartz, R. A., Patil, A., Grabbe, S., & Goldust, M. (2022). Treatment options for leishmaniasis. *Clinical and experimental dermatology*, 47(3), 516–521 [τροποποιημένο])

1.6.2 ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΤΟΠΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

Η συνδυαστική χημειοθεραπεία συμπεριλαμβάνει συνδυασμό των φαρμακευτικών ενώσεων που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της λείσμανίασης, με σκοπό τη μείωση του κόστους και της χρονικής διάρκειας της θεραπείας και την πρόληψη ανάπτυξης αντοχής. Οι τρέχουσες συνδυαστικές χημειοθεραπείες συμπεριλαμβάνουν τη λιποσωμική αμφοτερικίνη Β με τη μιλτεφοσίνη, τη λιποσωμική αμφοτερικίνη Β με την παρομομυκίνη, τη μιλτεφοσίνη με την παρομομυκίνη και το στιβογλουκονικό νάτριο (αντιμονική μεγλουμίνη) με την παρομομυκίνη [17].

Επιπλέον, έχουν χρησιμοποιηθεί και τοπικές θεραπείες όπως φωτοδυναμική θεραπεία (PDT), κρυοθεραπεία και θερμοθεραπεία, για την αποφυγή της τοξικότητας που προκαλείται από τη συστηματική χρήση των φαρμάκων [17].

1.6.3 ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ(PDT)

Στη φωτοδυναμική θεραπεία έναντι της δερματικής λείσμανίασης, χρησιμοποιείται είτε το αμινολεβουλινικό οξύ (ALA) είτε το μεθυλο-αμινολεβουλινικό οξύ. Τα δύο αυτά οξέα εφαρμόζονται στο δέρμα και έπειτα ακολούθως εφαρμόζεται είτε ακτινοβολία με λέιζερ είτε παλμικό φως. Παρότι σε μηχανιστικές και *in vitro* μελέτες η εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας δεν ανέδειξε κάποιο αποτέλεσμα, σε *in vivo* μελέτες φάνηκε πως μπορεί να προκαλέσει εκτεταμένη βλάβη των ιστών και σημαντική μείωση του παρασιτικού φορτίου. Επιπλέον, φάνηκε πως στο μολυσμένο δέρμα μειώθηκε ο αριθμός των μακροφάγων και τα επίπεδα της ιντερλευκίνης-6, μπορεί να λειτουργήσει δηλαδή η δράση της θανατώνοντας τα κύτταρα του ξενιστή. Ωστόσο, λόγω έλλειψης ερευνητικών δεδομένων, η πρακτική αυτή δε συνίσταται να εφαρμοστεί στην κλινική πρακτική [17].

1.6.4 ΚΡΥΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Κατά την εφαρμογή της κρυοθεραπείας, δηλαδή την τοπική εφαρμογή θερμοκρασίας κάτω του μηδενός στο μολυσμένο σημείο του ξενιστή, σχηματίζονται ενδοκυτταρικοί και εξωκυτταρικοί παγοκρύσταλλοι προκαλώντας αλλαγές στην κυτταρική μεμβράνη και οδηγώντας τελικά σε βλάβη των μολυσμένων κυττάρων και συνεπώς σε καταστροφή των αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου. Η εφαρμογή της κρυοθεραπείας δείχνει καλή ανταπόκριση σε ασθενείς με δερματικές βλάβες μεγέθους 10-30 mm, βλάβες μικρότερου αριθμού και βλάβες που έχουν αναπτυχθεί λιγότερο από 3 μήνες προηγουμένως. Επιπλέον,

χρησιμοποιείται συνδυασμός της κρυοθεραπείας με στυβογλουκονικό νάτριο, καθώς και με ιτρακοναζόλη, για καλύτερη αποτελεσματικότητα της θεραπείας [17].

1.6.5 ΘΕΡΜΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Τα είδη *Leishmania* που προκαλούν δερματική νόσο είναι ευαίσθητα σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 39°C και δεν μπορούν να επιβιώσουν, επομένως η θερμοθεραπεία αποτελεί μία εναλλακτική επιλογή χρήσης χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Η θεραπεία με ραδιοσυχνότητες (RF) έχει χρησιμοποιηθεί ως μία μορφή θερμοθεραπείας, διεισδύοντας θερμότητα στο δέρμα σε βάθος 4 mm, θανατώνοντας έτσι τις αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου που βρίσκονται στο χώριο, χωρίς να βλάπτει το υπόλοιπο δέρμα [17].

1.6.6 ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΕΜΒΟΛΙΑ

Στην ανοσοθεραπεία συμπεριλαμβάνονται τα εμβόλια, η χρήση ιντερφερονών, καθώς και οι πρωτεϊνικοί ανοσοτροποποιητές. Η ανοσοθεραπεία στοχεύει στη βελτίωση της φυσικής άμυνας του ξενιστή αποκαθιστώντας την ανοσολογική του απόκριση. Τα εμβόλια που έχουν αναπτυχθεί περιλαμβάνουν ολόκληρα θανατωμένα ή εξασθενημένα παράσιτα *Leishmania*, πρωτεϊνικά αντιγόνα του παρασίτου και ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες. Τα εμβόλια τρίτης γενιάς βρίσκονται σε ερευνητικό στάδιο [17].

1.6.7 ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΕΣ (IFN) ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΕΣ

Οι κυτταροκίνες έχουν ανοσοκατασταλτικές δράσεις και πιο συγκεκριμένα η IFN-γ έχει την ικανότητα να επάγει τα μακροφάγα να εξοντώσουν τα ενδοκυτταρικά παράσιτα *Leishmania*. Ως θεραπευτικό μοντέλο χορηγείται η IFN-γ-1b συνδυαστικά με γλυκονικό αντιμονικό νάτριο. Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ανοσοτροποποιητές, όπως πρωτεϊνικό συσσωμάτωμα ανυδρίτη φωσφολινολεϊνικού-παλμιτολεϊνικού αμμωνίου-μαγνησίου, οι οποίοι έχει βρεθεί ότι μειώνουν σημαντικά τα κλινικά συμπτώματα και το παρασιτικό φορτίο σε δέρμα σκύλων. Τέλος, μπορεί να χορηγηθεί συνδυαστικά χημειοθεραπεία και ανοσοθεραπεία, για συνδυαστική δράση ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος και άμεσης δράσης των φαρμακευτικών ουσιών στο μολυσματικό παράγοντα [17].

1.6.8 ΕΜΒΟΛΙΟ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ

Παρότι έχει γίνει εκτεταμένη έρευνα τις τελευταίες δεκαετίες για την ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού εμβολίου και έχουν κυκλοφορήσει και στο εμπόριο ορισμένα εμβόλια για τη σπλαχνική λεϊσμανίαση των σκύλων (CVL), δεν υπάρχει ακόμα διαθέσιμο αποτελεσματικό

εμβόλιο για την ανθρωπογενή σπλαχνική λεισμανίαση. Η βάση του εμβολίου πρώτης γενιάς συμπεριλαμβάνει ολόκληρο το παράσιτο, το οποίο μπορεί να είναι είτε εξασθενημένο είτε θανατωμένο, ενώ οι περισσότεροι εμβολιασμοί έχουν στηριχθεί σε εμβόλια δεύτερης γενιάς που στηρίζονται στον εμβολιασμό ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών του παρασίτου. Πιο συγκεκριμένα, τα αντιγόνα που έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες σε ζωικά μοντέλα συμπεριλαμβάνουν το *L. infantum* heat shock (HSP)-70, την πρωτεΐνη παραφλαγγέλων ράβδων (PFR)-2, τη μεμβρανική πρωτεΐνη-11 του κινητοπλαστιδίου (KMP-11), την ειδική πρωτεΐνη του αμαστιγωτού A2, την 24-c-μεθυλοτρανσφεράση της στερόλης (SMT), την υδροφιλική ακυλιωμένη επιφανειακή πρωτεΐνη B1 (HASPB) και το αντιγόνο της λεισμανίασης ORFF. Τέλος, έχουν δοκιμαστεί και εμβόλια τρίτης γενιάς που αποτελούνται από εμβόλια DNA όπως τα *Leishmania* homologue of mammalian RACKs (LACK), NH36, ORFF, KMP11 και πρωτεΐνάσες κυστεΐνης [48].

1.6.9 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ ΣΚΥΛΩΝ (CANINE LEISHMANIASIS)

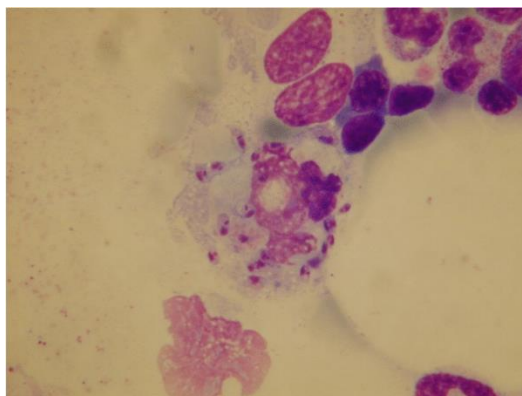
Στόχος της θεραπείας της λεισμανίασης των σκύλων είναι η καταπολέμηση των κλινικών συμπτωμάτων, η βελτίωση της κυτταρικής ανοσίας των σκύλων, η αποφυγή υποτροπών, η μείωση του παρασιτικού φορτίου και ο περιορισμός της μετάδοσης στο φορέα. Στη Λατινική Αμερική οι σκύλοι θανατώνονται μόλις γίνει διάγνωση της λεισμανίασης, επομένως δε χρησιμοποιείται θεραπεία. Πιο συγκεκριμένα στη Βραζιλία οι σκύλοι με λεισμανίαση θανατώνονταν μέχρι και το 2017 όπου άρχισε να χρησιμοποιείται η μιλτεφοσίνη ως θεραπευτικό μέσο. Η νόσος χωρίζεται σε 4 στάδια, ανάλογα με τη βαρύτητά της. Το στάδιο I αναφέρεται σε ασυμπτωματική έως και ήπια νόσο και οι σκύλοι μπορούν να μείνουν χωρίς θεραπεία ή να χορηγηθεί αλλοπουρινόλη, ενώ συνίσταται και η χορήγηση συνδυασμών αλλοπουρινόλης με αντιμονιακά ή μιλτεφοσίνη. Το στάδιο II αναφέρεται στη μέτρια νόσο και το στάδιο III αναφέρεται σε σοβαρή νόσο που σχετίζεται με χρόνια νεφρική νόσο. Και στα δύο αυτά στάδια χορηγούνται συνδυασμοί αλλοπουρινόλης με αντιμονιακά ή μιλτεφοσίνη. Τέλος, το στάδιο IV αναφέρεται σε πολύ σοβαρή νόσο που περιλαμβάνει νεφρωσικό σύνδρομο και χορηγείται μόνο αλλοπουρινόλη στοχεύοντας στην αποφυγή περαιτέρω νεφρικής βλάβης. Η αλλοπουρινόλη είναι ανάλογο της υποξανθίνης, λειτουργεί εμποδίζοντας την οξειδωση της ξανθίνης, διαταράσσοντας έτσι το μεταβολισμό των πουρινών και έχει ως μόνη παρενέργεια την ουρολιθίαση [19].

1.7 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ

Ένα από τα κυριότερα προβλήματα για τη διάγνωση της λεισμανίασης στις ενδημικές χώρες είναι πως τα περισσότερα άτομα που έχουν μολυνθεί είναι ασυμπτωματικά, γεγονός που καθιστά πιο δύσκολη τη διάγνωση. Επιπλέον, τα ασυμπτωματικά άτομα αποτελούν σημαντική δεξαμενή της ανθρωπογενούς λοίμωξης, συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση του παθογόνου στην ενδημική περιοχή. Η έγκαιρη διάγνωση της λεισμανίασης και πιο συγκεκριμένα της σπλαχνικής λεισμανίασης σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, όπως ασθενείς με HIV, είναι καίριας σημασίας για την έναρξη ενός κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος με σκοπό την ελαχιστοποίηση των υποτροπών και της εξέλιξης της κλινικής πορείας της νόσου. Η γρήγορη και ακριβής διάγνωση είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό της ενεργού νόσου, για την παρακολούθηση των ασθενών μετά τη θεραπευτική αγωγή, για την παροχή επιδημιολογικά ακριβούς διάγνωσης που δε διασταυρώνεται με άλλες νόσους η αντιδραστικότητά της, για τη μείωση της σοβαρότητας της νόσου και για την παρακολούθηση των ενδημικών περιοχών [40].

1.7.1 ΑΜΕΣΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΗΣΗ, ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Η άμεση παρασιτολογική διάγνωση πραγματοποιείται είτε με ιστοπαθολογική ανάλυση ιστού ενσωματωμένου σε φορμόλη είτε με *in vitro* καλλιέργεια παρασίτων σε δείγματα με ύποπτες βλάβες. Μετά από χρώση Giemsa στο φωτονικό μικροσκόπιο τα αμαστιγωτά του παρασίτου εμφανίζονται ως στρογγυλά ή οειδή σωματίδια διαμέτρου 2-4μm, με πυρήνες και κινητοπλάστες. Οι αμαστιγωτές μορφές των παρασίτων ανιχνεύονται ευκολότερα με τη βοήθεια ανοσοϊστοχημικής χρώσης, στην οποία χρησιμοποιούνται τα αντισώματα CD1a [41].



Εικόνα 17. Βιοψία δέρματος στην οποία απεικονίζονται αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *Leishmania* και διαφαίνονται ως κυκλικές ή οειδείς δομές με διάμετρο 2-4 μm και χαρακτηριστικά πυρήνων και κινητοπλαστιδίων [πηγή: de Vries, H. J. C., & Schallig, H. D. (2022)]

1.7.2 ΕΜΜΕΣΕΣ ΟΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

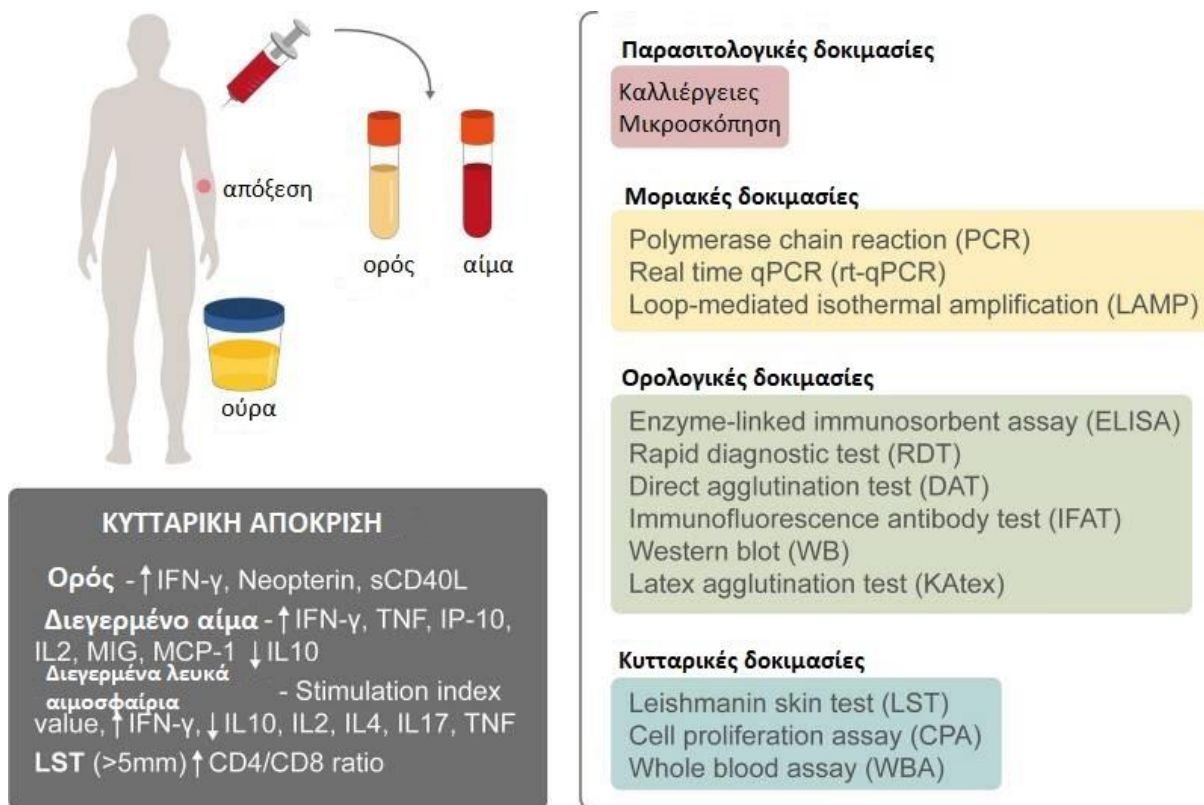
Οι βασικές ορολογικές δοκιμασίες για τη διάγνωση της λεισμανίασης είναι ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (IFA), η ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA, η ανοσοαποτύπωση (Western blot) και η ανοσοχρωματογραφία. Σε μία προσπάθεια βελτίωσης των ορολογικών τεχνικών, χρησιμοποιούνται ακατέργαστα αντιγόνα που προέρχονται από τα αμαστιγωτά των ενδημικών στελεχών *Leishmania*, όμως έχει αποκαλυφθεί πως μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα δείχνουν τα πιο ειδικά ανασυνδυασμένα αντιγόνα [41].

1.7.3 ΕΝΔΟΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ

Η ενδοδερματική δοκιμασία *Leishmania* (Intradermal Skin Test-LST) είναι δείκτης της κυτταρικής ανοσολογικής απόκρισης και χρησιμοποιείται για την έμμεση διάγνωση της σπλαχνικής λεισμανίασης. Η δοκιμασία αυτή βασίζεται στην ενδοδερμική έγχυση εκχυλισμάτων από *Leishmania*, προκαλώντας δερματική αντίδραση. Εάν η δερματική αντίδραση ξεπερνά τα 5 mm η εξέταση θεωρείται θετική, ενώ εάν είναι μικρότερη από 5 mm εξέταση θεωρείται αρνητική [41].

1.7.4 ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Αρχικά, η κύρια δοκιμασία ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων που χρησιμοποιείται για τη διάγνωση της λεισμανίασης είναι η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR). Οι αλληλουχίες PCR που έχουν χρησιμοποιηθεί στοχεύουν είτε στο ριβοσωμικό DNA είτε στο DNA των κινητοπλαστιδίων (kDNA) των παρασίτων *Leishmania*. Επιπλέον, η ποσοτικοποιημένη PCR (qPCR) προτείνεται για την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία σε ασθενείς με δερματική λεισμανίαση [41].



Εικόνα 18. Γραφική απεικόνιση δοκιμασιών διάγνωσης λείσμανιάσης [πηγή: Ibarra-Meneses, A.V., Corbeil, A., Wagner, V. et al. Identification of asymptomatic Leishmania infections: a scoping review. Parasites Vectors 15, 5 (2022)]

2. miRNA's

2.1.1 miRNAs ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα miRNAs είναι μικρά τμήματα RNA (micro-RNAs) με μέγεθος 20-30 νουκλεοτίδια, τα οποία παράγονται στο κύτταρο, αλλά δε μεταφράζονται και επομένως δεν έχουν την ικανότητα παραγωγής πρωτεϊνών. Ανήκουν στην ομάδα των μικρών RNA, στην οποία ανήκουν και τα siRNA (short interfering RNAs) και τα piRNAs (piwi-interacting RNAs). Παράγονται κατά τη διαδικασία της μεταγραφής από ειδικές αλληλουχίες οι οποίες είναι απομακρυσμένες από τα υπόλοιπα γονίδια του γονιδιώματος που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και μικρό ποσοστό αυτών παράγεται από τα ιντρόνια. Ο προσανατολισμός τους είναι ίδιος με τα mRNA, γεγονός που υποδεικνύει πως η μεταγραφή τους ελέγχεται από τους υποκινητές του γονιδίου. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα μόρια miRNA βρίσκονται συσσωρευμένα σε περιοχές του γονιδιώματος, το οποίο δείχνει πως μεταγράφονται συντονισμένα, άρα είναι μέρος κιστρονίου. Τέλος, η δράση τους σχετίζεται άμεσα από το γονίδιο του mRNA από το οποίο αποκόπτεται.

2.1.2 ΤΡΟΠΟΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΩΝ miRNA

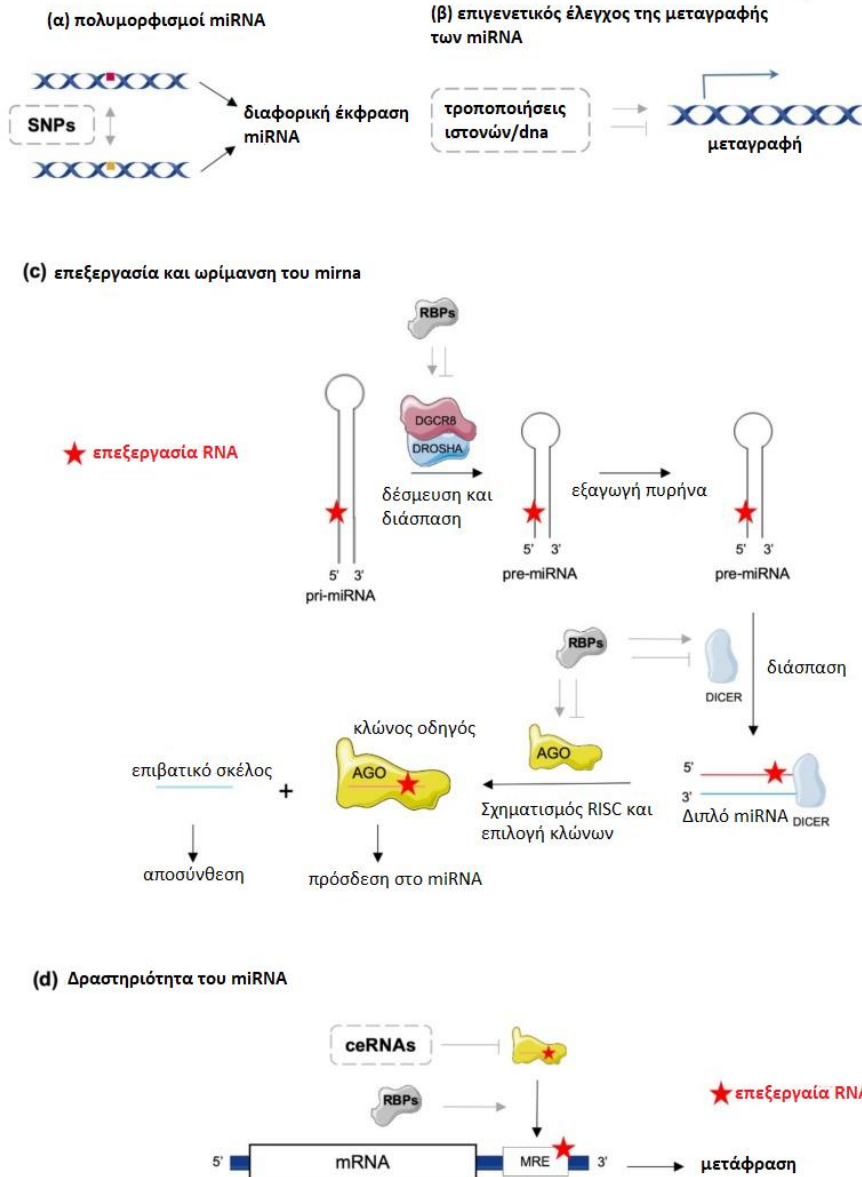
Η βιογένεση των miRNA μπορεί να γίνει με κανονικό τρόπο, ο οποίος είναι ο πιο διαδεδομένος, και με μη κανονικό τρόπο.

2.1.2.1 ΚΑΝΟΝΙΚΟΣ ΤΡΟΠΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ miRNA

Αρχικά, κατά τη διαδικασία της μεταγραφής παράγονται πρόδρομα μόρια των miRNA τα οποία ονομάζονται pri-miRNAs. Τα pri-miRNA είναι πολύ μεγαλύτερα από τα miRNA με μέγεθος έως και 1000 βάσεις. Το ένζυμο που πραγματοποιεί τη μεταγραφή είναι η DNA πολυμεράση II. Έπειτα, τα pri-miRNA υφίστανται μία διαδικασία ωρίμανσης, η οποία πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο πραγματοποιείται στον πυρήνα και περιλαμβάνει τη διάσπαση του pri-miRNA, κατά την οποία απελευθερώνεται το πρόδρομο προ-miRNA με τη μορφή ενός ενδιάμεσου βρόγχου 60-70 νουκλεοτιδίων. Η δημιουργία του βρόγχου πραγματοποιείται με τη βοήθεια του μονόκλωνου μορίου RNA και του ενζύμου Drosha/DGCR8. Το ένζυμο DGCR8 αναγνωρίζει μία περιοχή του μονόκλωνου RNA και αποκόπτει τα 2 άκρα του, δρώντας ως περιοριστική ενδονουκλεάση, και απελευθερώνει τον βρόγχο. Το δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα, όπου μεταφέρεται το πρόδρομο miRNA με τη βοήθεια της εξπορτίνης 5 και της πρωτεΐνης Ran-GTP και υφίσταται περαιτέρω τροποποιήσεις από το ένζυμο Dicer. Το ένζυμο Dicer, με τη βοήθεια των πρωτεϊνών PACT και TRBP προσδένεται σε μονόκλωνη περιοχή του 3' άκρου του RNA και το διασπά. Έτσι δημιουργείται το ώριμο πλέον miRNA. Τέλος, το miRNA προσδένεται σε ειδικές ριβοπρωτεΐνες Ago, σχηματίζοντας το σύμπλεγμα RNA-Induced Silencing Complex (RISC) και είναι έτοιμο να επιτελέσει τις λειτουργίες του.

2.1.2.2 ΜΗ ΚΑΝΟΝΙΚΟΣ ΤΡΟΠΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ miRNA

Με τον μη κανονικό τρόπο παραγωγής παράγονται πολλά μικρά RNA όμοια τόσο δομικά όσο και λειτουργικά με τα miRNA. Δρουν διάφορες από τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην κανονική οδό, όπως οι Drosha, Dicer, AGO και Exp-5, αλλά είτε υπολείπονται βήματα της κανονικής οδού είτε προσθέτονται βήματα στη διαδικασία της ωρίμανσης του miRNA. Ο μη κανονικός τρόπος παραγωγής διαχωρίζεται σε Drosha/DGCR8- ανεξάρτητος, Dicer- ανεξάρτητος και εξαρτώμενος από τις τερματικές ουριδυλοτοτρανσφεράσες [4].



Εικόνα 19. Μοριακοί μηχανισμοί που ελέγχουν τη βιογένεση και τη δραστηριότητα του *microRNA*. (α) Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) σε γονιδιωματικές περιοχές που κωδικοποιούν τα *miRNAs*, μπορούν να επηρεάσουν την επεξεργασία και την ωρίμανσή τους, έχον (β) Η επεξεργασία RNA (κόκκινα αστέρια) και οι πρωτεΐνες δέσμευσης RNA (RBPs) μπορούν να επηρεάσουν την επεξεργασία και την ωρίμανση του *miRNA* επηρεάζοντας τη δραστηριότητα DGCR8/DROSHA, την πυρηνική εξαγωγή των *pre-miRNAs*, τη διάσπαση του *pro-miRNA* από το DICER και την ενσωμάτωση ώριμου *miRNA* τας ως αποτέλεσμα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης μεταξύ των παραλλαγών. (γ) Επιγενετικές τροποποιήσεις όπως η ακετυλίωση ιστόνης ή η μεθυλίωση του DNA μπορούν να ρυθμίσουν την αποτελεσματικότητα της μεταγραφής των *miRNAs* στο συγκρότημα RISC (AGO). (δ) Η ώριμη δραστηριότητα *miRNA* μπορεί να ρυθμιστεί με εναλλακτικούς μηχανισμούς που περιλαμβάνουν (i) ανταγωνισμό με RBPs για την ίδια θέση δέσμευσης σε ένα mRNA στόχο, (ii) αποπλάνηση του συμπλέγματος *miRNA-RISC* από *ceRNA* και (iii) επεξεργασία του RNA από *miRNA* στοιχεία απόκρισης (MREs) σε mRNA-στόχους. Τα διεγερτικά και ανασταλτικά αποτελέσματα ενδείκνυνται από τα μυτερά και τα αμβλεία γκρι βέλη αντίστοιχα. (πηγή: Correia de Sousa, M., Gjorgjieva, M., Dolicka, D., Sobolewski, C., & Foti, M., 2019 [τροποποιημένο])

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ miRNA's

Τα miRNA είναι μικρά μη κωδικοποιημένα RNA που ρυθμίζουν την παραγωγή πρωτεϊνών και για το λόγο αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες ασθενειών, αφού αποτελούν βασικούς παράγοντες ρύθμισης της κυτταρικής λειτουργίας. Τα ελεύθερα miRNA απομονώνονται από δείγματα πλάσματος, καθώς τα δείγματα αυτά είναι εύκολα προσβάσιμα και μπορούν να μελετηθούν σε κλινικές δοκιμές. Οι *in vivo* και *in vitro* προσεγγίσεις αποσκοπούν στη συσχέτιση του αντικτύπου των miRNA στις κυτταρικές διεργασίες. Για την ποσοτικοποίηση των miRNA σε πολυάριθμα δείγματα πλάσματος χρησιμοποιούνται τεχνικές εκχύλισης και καθαρισμού, καθώς και διαδικασίες κανονικοποίησης. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται εργαλεία βιοπληροφορικής για τον εντοπισμό των miRNA, τα οποία στη συνέχεια επικυρώνονται με τις προαναφερθείσες τεχνικές. Έχει βρεθεί πως περισσότερα από 500 miRNA βρίσκονται στα αιμοπετάλια των θηλαστικών συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων. Τα miRNA παραμένουν σταθερά στα βιολογικά δείγματα με την πάροδο του χρόνου, όμως το χαμηλό επίπεδο έκφρασής τους καθιστά περιοριστική την ποσοτικοποίησή τους και για το λόγο αυτό, μεταβλητές όπως η ποσότητα του δείγματος, η διαδικασία συλλογής του δείγματος, η αποθήκευση και η απομόνωση του miRNA και η αντίστροφη μεταγραφή του μπορούν να επηρεάσουν την ποσότητα του miRNA που προσμετράται. Η τεχνική που προτιμάται είναι η χρήση στηλών καθαρισμού και στη συνέχεια η χρήση qPCR με βάση την Taqman σε συμπληρωματικό DNA (cDNA). Επειδή η ποσότητα των miRNA είναι χαμηλή στα κύτταρα, προηγείται της qPCR ένα βήμα προενίσχυσης, με το οποίο αυξάνεται η ποσότητα του cDNA που είναι διαθέσιμη για την qPCR και μειώνονται οι τιμές Ct, διευκολύνοντας έτσι την ανάλυση χωρίς να επηρεάζεται η ευαισθησία της διαδικασίας [33].

Τα miRNA μπορούν να παραμένουν σταθερά στα βιολογικά δείγματα με την πάροδο του χρόνου, όμως η ποσοτικοποίησή τους δεν είναι εύκολη, καθώς το χαμηλό επίπεδο της έκφρασής τους αποτελεί σημαντικό περιορισμό. Η διαθέσιμη ποσότητα δείγματος, η διαδικασία συλλογής και η αντίστροφη μεταγραφή του miRNA μπορούν να επηρεάσουν την ποσότητα miRNA που απομονώνεται. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιείται η qPCR με βάση την Taqman σε συμπληρωματικό cDNA, καθώς χαρακτηρίζεται από την εξειδίκευση και την υψηλή ευαισθησία της. Πριν τη χρήση της qPCR προηγείται ένα βήμα προενίσχυσης, το οποίο αυξάνει την ποσότητα του cDNA που θα είναι μετέπειτα διαθέσιμο για την qPCR και

μειώνει τις τιμές Ct, διευκολύνοντας έτσι την ανάλυση χωρίς να επηρεάζεται η ευαισθησία. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται τεχνικές όπως το προσαρμοσμένο κλειδωμένο νουκλεϊκό οξύ (LNA), οι τεχνολογίες Nanostring και η αλληλούχιση μικρών RNA (sRNAseq). Τέλος, χρησιμοποιείται η τεχνική “spike-in” ώστε να διασφαλιστεί πως δεν επηρεάζεται η ποσοτικοποίηση του miRNA από τις προαναφερθείσες μεταβλητές. Κατά την τεχνική “spike-in” ένα συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο, για παράδειγμα το UniSP650 ή το cel-miR-3944, χρησιμοποιείται ως εξωγενής στόχος εξομάλυνσης και προστίθεται σε γνωστή συγκέντρωση πριν από το δείγμα RNA κατά τη διαδικασία της εκχύλισης. Η μέτρηση ενός σταθερού miRNA που χρησιμοποιείται ως στόχος αναφοράς αποτελεί το βέλτιστο τρόπο αξιολόγησης της σχετικής ποσότητας του miRNA ενδιαφέροντος, όμως δεν υπολογίζονται οι άλλοι τρόποι μεταβλητότητας, όπως η ποιότητα του δείγματος ή η συνολική συγκέντρωση των miRNA. Η επιλογή του ενδογενούς miRNA εξαρτάται από το δείγμα. Για δείγμα πλάσματος χρησιμοποιούνται τα miR638, miR-93 και miR-48453-55, για δείγμα ορού χρησιμοποιούνται τα miR-23a, let7a, miR-126046, miR-126056 και miR-126057 και για δείγμα αιμοπεταλίων χρησιμοποιούνται τα miR-28, miR29c, miR-15157 και miR-15158. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν αλγόριθμοι όπως το geNorm και το NormFinder για τον εντοπισμό των πιο σταθερών ενδογενών miRNA μεταξύ των πιθανών miRNA αναφοράς [33].

Διατίθενται τεχνικές υψηλής απόδοσης για την ανίχνευση των αλληλεπιδράσεων των miRNA και των mRNA στα κύτταρα και στους ιστούς. Οι τεχνικές αυτές μπορούν και εκμεταλλεύονται στο σύμπλοκο RISC, το οποίο σχηματίζεται από τη σύνδεση ενός miRNA στο mRNA-στόχο και σταθεροποιείται από την πρωτεΐνη Ago2. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες στο RISC ανιχνεύονται μέσω ανοσοκατακρήμνισης αυτού του συμπλόκου ακολουθούμενη από qPCR ή RNAseq, επιτρέποντας με τον τρόπο αυτό την ταυτοποίηση του ζεύγους miRNA:mRNA.

Αναφορές	Χρονιά	Δείγματα	Περιβάλλον έρευνας	Θεραπεία	Ποσοτικοποίηση miRNA	Αποτέλεσμα	miRNA συσχετιζόμενο με το αποτέλεσμα	miRNA μη συσχετιζόμενο με το αποτέλεσμα
Kondkar et al	2010	Πλάσμα	Υγιείς εθελοντές	N/A	Μικροσωτοιχίες	LTA με επινεφρίνη 0.5 μM	miR-96	
Zampetaki et al	2012	Πλάσμα	Πληθυσμιακή έρευνα	Χωρίς θεραπεία, DAPT ή ασπιρίνη	qPCR	Μυοκαρδιακή προσβολή	miR-126 miR-223 miR-197	
Willeit et al	2013	Αιμοπετάλια, MV, PRP, PPP, Ορός	Υγιείς εθελοντές, ασθενείς με διαβήτη ή συμπτωματική καρωτιδική αθηροσκλήρωση	Κανένα ή διάφορα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα	qPCR	Τροποποιημένο LTA σε πλάκα 96 πηγαδίων χρησιμοποιώντας διάφορους αγωνιστές και συγκεντρώσεις, δοκιμασία ορού TBX2 και δοκιμασία VerifyNow	miR-223 miR-191 miR-126 miR-150	
Shi et al	2013	Αιμοπετάλια	Οξύ στεφανιαίο σύνδρομο	Κλοπιδογρέλη μαζί με ασπιρίνη	qPCR	LTA με ADP 10μM, VASP	miR-223	miR-96
Zufferey et al	2016	Αιμοπετάλια	Σταθεροί καρδιαγγειακοί ασθενείς	Ασπιρίνη	Μικροσωτοιχίες	LTA με επινεφρίνη 0.4-10 μM, AA 1 mM, ADP 2 και 10 μM και κολλαγόνο 1 μg/mL	miR-135 miR-204	
Kaudewitz et al	2016	Πλάσμα	Οξύ στεφανιαίο σύνδρομο	DAPT ή ασπιρίνη	qPCR	LTA με ADP 20 μM, VerifyNow	miR-126 miR-223 miR-24 miR-191	
Witkowski et al	2016	Πλάσμα	Σακχαρώδης διαβήτης	N/A	qPCR	Θρομβογένεση με μεσολάβηση TF	miR-126	
Peng et al	2017	Αιμοπετάλια	Οξύ στεφανιαίο σύνδρομο	Κλοπιδογρέλη μαζί με ασπιρίνη	qPCR	LTA με ADP 20 μM	miR-223 miR-221 miR-21	
Ding et al	2019	Αιμοπετάλια	Οξύ στεφανιαίο σύνδρομο	Κλοπιδογρέλη μαζί με ασπιρίνη	qPCR	LTA με AA 500 μg/mL και ADP 5 μM	miR-204	
Tang et al	2019	Πλάσμα	Σταθερή στεφανιαία αρτηριακή νόσος	Κλοπιδογρέλη μαζί με ασπιρίνη	Αλληλούχηση υψηλής απόδοσης ακολοθούμενη από επικύρωση με PCR	Κλινικά αποτελέσματα	miR-142	
Liu et al	2020	Αιμοπετάλια	Οξύ στεφανιαίο σύνδρομο	Κλοπιδογρέλη μαζί με ασπιρίνη	qPCR	Θρομβοελαστογραφία	miR-126 miR-223 miR-150 miR-130	miR-21 miR-96 miR-331 miR-326

Εικόνα 20. Επιλεγμένες μελέτες συσχέτισης που αφορούν τα miRNA σε υγιείς εθελοντές και καρδιαγγειακούς ασθενείς (πηγή: Garcia, Alix; Dunoyer-Geindre, Sylvie; Fish, Richard J.; Neerman-Arbez, Marguerite; Reny, Jean-Luc; Fontana, Pierre (2020). *Methods to Investigate miRNA function: Focus on Platelet Reactivity. Thrombosis and Haemostasis* [τροποποιημένο]) AA: Αραχιδονικό οξύ, ADP: Διφωσφορική αδενοσίνη, DAPT: Διπλή αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία, LTA: Αθροιστική μέτρηση μετάδοσης φωτός, MV: Μικροκυψελίδες, PPP: Πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια, PRP: Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, qPCR: Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, TF: Ιστικός παράγοντας, TXB₂: Θρομβοξάνη B₂, VASP: Δοκιμασία φωσφορυλίωσης φωσφοπρωτεϊνών διεγερμένων από αγγειοδιασταλτικό παράγοντα

2.2.3 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Ως δείγματα για την απομόνωση miRNAs έχουν χρησιμοποιηθεί αιμοπετάλια, ορός και πλάσμα με διαφορετικά αντιπηκτικά και διαφορετικά πρωτόκολλα φυγοκέντρησης. Από το πλάσμα μπορεί να απομονωθεί το miRNA που κυκλοφορεί σε σταθερή κατάσταση, ενώ από τον ορό μπορούμε εκτός από το σταθερό miRNA που κυκλοφορεί, να απομονώσουμε και το miRNA που βρίσκεται μέσα στα αιμοπετάλια και σε άλλα κύτταρα που ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της πήξης. Κατά τη χρήση πλάσματος αποφεύγεται η ηπαρίνη, καθώς παρεμβαίνει στις διαδικασίες ενίσχυσης των νουκλεϊκών οξέων. Προτιμάται η χρήση

EDTA, όμως μπορεί να αναστείλει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων που συμβαίνει κατά τη συλλογική διαδικασία, καθώς σχετίζεται με χαμηλή περιεκτικότητα σε ασβέστιο. Η παρασκευή πλάσματος φτωχού σε αιμοπετάλια απαιτεί ένα στάδιο διπλής φυγοκέντρησης για την αποφυγή υπολειμμάτων αιμοπεταλίων, τα οποία θα απελευθερώνονταν κατά τη διαδικασία κατάψυξης και απόψυξης των δειγμάτων και θα οδηγούσαν σε απελευθέρωση miRNA από τα αιμοπετάλια στο πλάσμα. Τα αιμοπετάλια και τα λευκοκύτταρα στα δείγματα πλάσματος αξιολογούνται με qPCR ή western blot χρησιμοποιώντας ειδικούς δείκτες όπως ITGA2B για τα αιμοπετάλια και CD45 για τα λευκοκύτταρα. Για τη διερεύνηση των miRNA απευθείας από τα αιμοπετάλια, αυτά απομονώνονται και πλένονται σε ρυθμιστικό διάλυμα HEPES συμπληρωματικά με απουράση και PGI2, ώστε να αποτραπεί η ενεργοποίησή τους κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Η καθαρότητα των δειγμάτων αιμοπεταλίων αυξάνεται με την απομάκρυνση των ερυθροκυττάρων και των λευκοκυττάρων και για το λόγο αυτό, σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια προστίθενται πριν από την πλύση μαγνητικά σφαιρίδια σημασμένα με anti-CD45 και anti-CD235a και στη συνέχεια μεταφέρονται σε στήλη που απομακρύνει τα ερυθροκύτταρα και τα λευκοκύτταρα που είναι συνδεδεμένα στα μαγνητικά σφαιρίδια [33].

3. ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNA

3.1 ΓΕΝΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNA

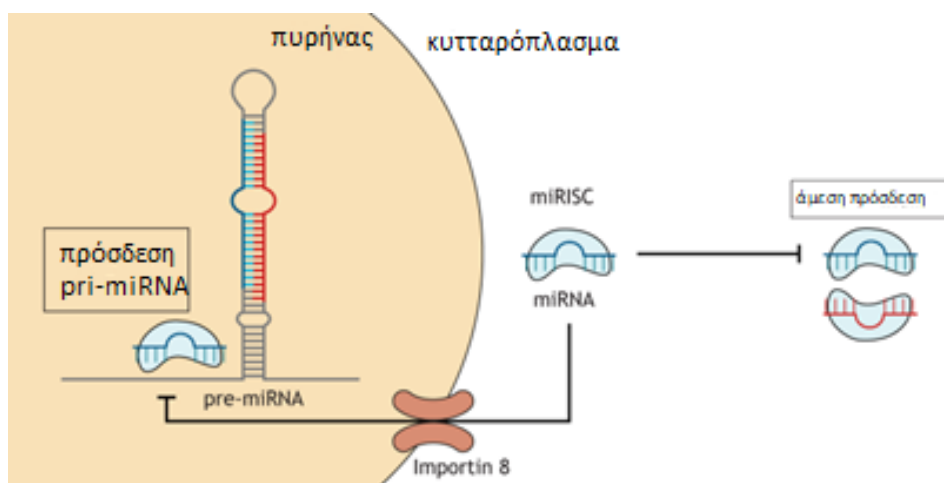
Τα miRNA έχουν ρυθμιστικό και λειτουργικό ρόλο στο κύτταρο. Μπορούν να αναστείλουν τη μετάφραση με δύο τρόπους. Αρχικά, μπορούν να καταστρέψουν το ώριμο miRNA που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Αφού δημιουργηθεί το σύμπλεγμα RISC, το miRNA μπορεί να προσδεθεί λόγω συμπληρωματικότητας στο αντίστοιχο μόριο RNA και να το διασπάσει σε μικρότερα τμήματα, διακόπτοντας τη λειτουργικότητά του. Επίσης, μπορούν να παρεμποδίσουν τη μετάφραση του μορίου RNA. Αυτό συμβαίνει όταν το σύμπλεγμα RISC δεν είναι απόλυτα συμπληρωματικό με τμήματα του RNA, όμως παραμένει συνδεδεμένο πάνω του λόγω της μερικής συμπληρωματικότητας των βάσεων τους. Η θέση όμως που έχει προσδεθεί καταλαμβάνει τη θέση πρόσδεσης των ριβοσωμάτων, εμποδίζοντας με τον τρόπο αυτό τη μετάφραση του RNA, δηλαδή παρεμποδίζεται η παραγωγή των πρωτεϊνών που κωδικοποιεί.

3.2 ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNA ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ (ΟΠΩΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ)

Τα miRNA παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη βιοϊατρική έρευνα κυρίως λόγω της ικανότητάς τους να επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση και λόγω της δυνατότητας χρήσης τους ως βιοδείκτες ασθενειών. Τα miRNA μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση του mRNA στοχεύοντας στην 3' αμετάφραστη περιοχή του (UTR), η οποία εξασφαλίζει τη σταθερότητά του. Επομένως, αλλαγές στην έκφραση των miRNA μπορούν να επηρεάσουν τη ρύθμιση του mRNA και συνεπώς να επηρεαστεί και η ομοιόσταση των κυττάρων. Για το λόγο αυτό, τα επίπεδα των miRNA έχουν σημαντικό ρόλο τόσο στην καρκινογένεση όσο και σε άλλες ασθένειες. Εκτός από τη μετα-μεταγραφική γονιδιακή ρύθμιση, έχει βρεθεί πως τα miRNA μπορούν να αλληλεπιδρούν με μακρά μη κωδικοποιημένα RNA (lncRNA), κυκλικά RNA (circRNA) και ψευδογονίδια είτε για να προκαλέσουν καταστολή των miRNA είτε για να αυξήσουν τον κυτταρικό ανταγωνισμό για τις θέσεις πρόσδεσης των miRNA. Ως αλληλεπίδραση miRNA:miRNA ονομάζεται η μοριακή διαδικασία ρύθμισης των miRNA μέσω ενός άλλου miRNA [31].

3.2.1 ΑΜΕΣΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ miRNA:miRNA

Οι άμεσες αλληλεπιδράσεις miRNA:miRNA συμβαίνουν όταν ένα miRNA δεσμεύει κάποιο άλλο miRNA με συμπληρωματικό τρόπο. Αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε μεταξύ ενός ώριμου miRNA και ενός pri-miRNA εντός του πυρήνα, είτε μεταξύ δύο ώριμων miRNA στο κυτταρόπλασμα [31].



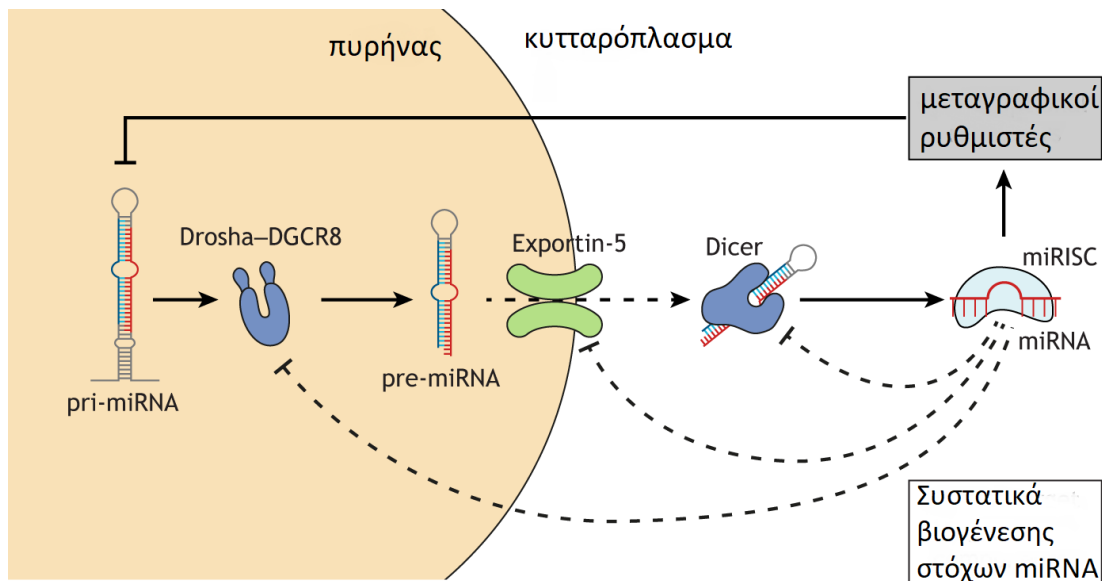
Εικόνα 15. Άμεση αλληλεπίδραση miRNA:miRNA. Μπορούν να συμβούν είτε μεταξύ δύο ώριμων miRNA στο κυτταρόπλασμα είτε μεταξύ ενός ώριμου miRNA και ενός pri-miRNA στον πυρήνα. Οι πυρηνικές αλληλεπιδράσεις εμποδίζουν τη σύνδεση του μικροεπεξεργαστή μπλοκάροντας έτσι την ωρίμανση του πρωτογενούς miRNA, μειώνοντας τα επίπεδά του και αποτρέποντας την αποσιώπηση του miRNA-στόχου του. Η κυτταροπλασματική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο ώριμων miRNA είναι συγκεκριμένη ως προς την αλληλουχία τους και συνδέει δύο σύμπλοκα miRNA επαγόμενα από

Αρκετές άμεσες αλληλεπιδράσεις miRNA:miRNA είναι υπεύθυνες για την ανάπτυξη διάφορων ασθενειών. Το miRNA let-7 είναι ένας ογκοκατασταλτικός παράγοντας που ελέγχεται από το miR-107, συνεπώς η απορρύθμιση του miR-107 μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση των ογκογονιδίων-στόχων του miRNA let-7 επάγοντας την καρκινογένεση. Επιπλέον, το miRNA-484 έχει βρεθεί να έχει ενεργό ρόλο στην απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων και η αλληλεπίδρασή του με το miR-361 μπορεί να έχει επιπτώσεις σε καρδιακές παθήσεις όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου. Επίσης, τα miR-424 και miR-503 προάγουν την κυτταρική διαφοροποίηση και ρυθμίζουν το pri-miR-9 το οποίο έχει την ικανότητα να διατηρεί το κύτταρο σε αδιαφοροποίητη κατάσταση. Η απορρύθμιση του miR-9 από τα miR-424 και miR-503 οδηγεί σε μία αδιαφοροποίητη κατάσταση χαρακτηριστική των καρκινικών κυττάρων [31].

Το miR-21 βρίσκεται υπό αναστολή σε μη καρκινικά ηπατικά κύτταρα με την επίδραση του miR-122, το οποίο ελέγχει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αυξάνοντας την έκφραση του γονιδίου-στόχου του miR-21, το οποίο ονομάζεται PDCD4. Εάν χαθεί η ρύθμιση του miR-122 αυξάνεται η έκφραση του miR-21, μειώνοντας έτσι τα επίπεδα του PDCD4 και οδηγώντας με τον τρόπο αυτό σε καρκινογένεση. Η αλληλεπίδραση miRNA:miRNA μεταξύ του miR-122 και του pri-miR-21 έχει μεγάλη σημασία για τον έλεγχο της κυτταρικής ομοιόστασης, για τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και για την πρόληψη των ογκογενετικών αλλαγών, αφού η ρύθμιση του miR-21 επηρεάζει το μέγεθος και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και επιτρέπει τη συνεχή ανάπτυξη και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων [31].

3.2.2 ΕΜΜΕΣΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ miRNA:miRNA

Τα miRNA είναι ικανά να ρυθμίζουν άμεσα άλλα miRNA σε διάφορα στάδια της βιογένεσής τους, αλλά εκτός από άμεσα μπορούν να τα ρυθμίσουν και με έμμεσο τρόπο είτε μέσω κατευθυνόμενης καταστολής των συστατικών της οδού βιογένεσης του miRNA είτε μέσω των μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι συμπεριλαμβάνουν μεταγραφικούς παράγοντες, μεθυλοτρανσφεράσες του DNA και καταστολείς [31].



Εικόνα 16. Έμμεσες αλληλεπιδράσεις miRNA:miRNA. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές συμβαίνουν μέσω της κατευθυνόμενης από το miRNA καταστολής των συστατικών της οδού βιογένεσης του miRNA ή των μεταγραφικών ρυθμιστών. Η καταστολή των συστατικών βιογένεσης επηρεάζει την παραγωγή συγκεκριμένων miRNA, αντίθετα από την αναμενόμενη αρνητική επίδραση στη συνολική παραγωγή miRNA. Οι στοχευμένοι μεταγραφικοί ρυθμιστές συμπεριλαμβάνουν μεταγραφικούς παράγοντες, μεθυλοτρανσφεράσες του DNA και καταστολείς. [πηγή: Hill, M., & Tran, N. (2021). miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer. Disease models & mechanisms(τροποποιημένο)]

Στο μοντέλο των μεταγραφικών παραγόντων, τα miRNA στοχεύουν την 3' αμετάφραστη περιοχή (UTR) των mRNA που κωδικοποιούν μεταγραφικούς ρυθμιστές και προκαλούν αλλαγές στην έκφρασή τους. Οι μεταγραφικοί ρυθμιστές μπορεί να είναι είτε παράγοντες μεταγραφής είτε παράγοντες μεθυλίωσης. Έτσι, ένα miRNA μπορεί να διαμορφώνει την έκφραση ενός άλλου miRNA ελέγχοντας τα ρυθμιστικά του μονοπάτια ή τη μεταγραφή του ως μέρος ενός γονιδιακού ρυθμιστικού δικτύου. Με τον τρόπο αυτό, η αλληλεπίδραση miRNA:miRNA πραγματοποιείται μέσω δευτερογενούς μεταγραφικού ελέγχου και όχι από άμεση αλληλεπίδραση των miRNA [31].

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ρύθμιση των miR-208b και miR-499 από το miR-208a. Το miR-208a κωδικοποιείται εντός ενός γονιδίου γρήγορης μυοσίνης και είναι υπεύθυνο για την αρνητική ρύθμιση των καταστολέων που είναι υπεύθυνοι για την αποσιώπηση της έκφρασης των μεταγράφων του γονιδίου της αργής μυοσίνης που εμπεριέχουν τα miR-208b και miR-499. Η αύξηση του miR-208a μειώνει τη διαθεσιμότητα των καταστολέων του γονιδίου της αργής μυοσίνης και συνεπάγεται την ανοδική ρύθμιση των miR-208b και miR-499. Η αύξησή τους επάγει την έκφραση των γονιδίων της αργής μυοσίνης μέσω της αύξησης των καταστολέων. Η αύξηση των γονιδίων της αργής μυοσίνης ενισχύει το σήμα για την έκφραση των γονιδίων των miR-208b και miR-499 διαμορφώνοντας

τελικά έναν θετικό βρόγχο ανατροφοδότησης της ακριβής διαμόρφωσης των επιπέδων miRNA με βάση τις φυσιολογικές μεταβολές του περιβάλλοντος και επιτυγχάνοντας τελικά τη ρύθμιση της μυϊκής συστατικότητας [31].

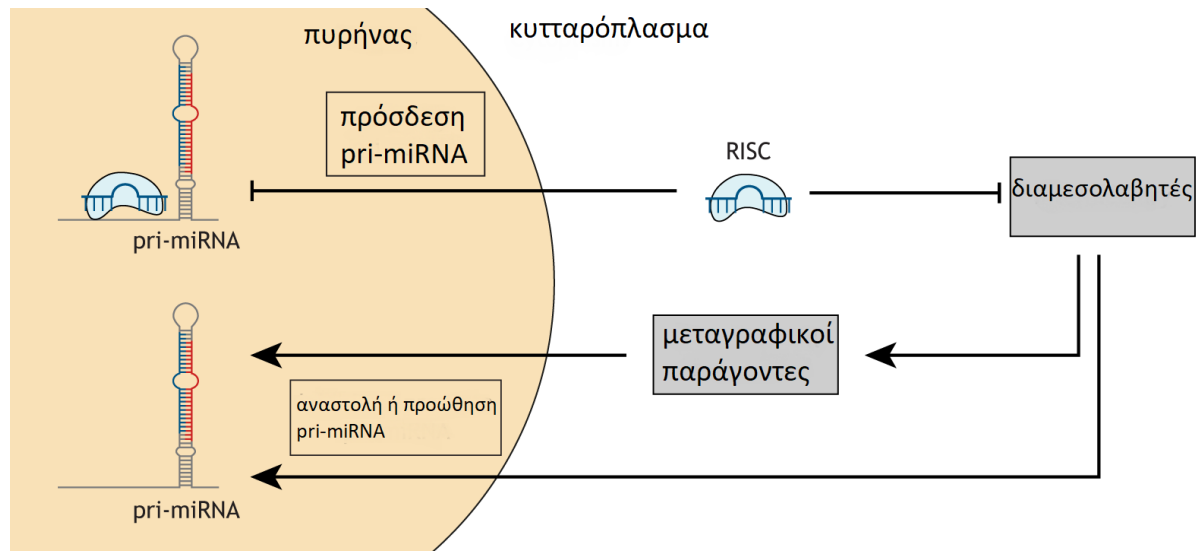
Επιπλέον, έχει βρεθεί πως σε κύτταρα από καρκίνο του πνεύμονα ο ογκοκατασταλτικός παράγοντας miR-660-5p έχει την ικανότητα να ελέγχει την έκφραση του miR-486-5p μέσω των MDM2 και TP53 (p53). Το miR-660 μπορεί να αποσιωπεί τον άμεσο στόχο του MDM2 και συνεπώς οδηγεί σε αύξηση του TP53. Το TP53 είναι μεταγραφικός παράγοντας υπεύθυνος για τη βιογένεση των miRNA και επιπλέον είναι και ισχυρός ογκοκατασταλτικός παράγοντας και η ενεργοποίησή του κατά την αποσιώπηση του MDM2 ξεκινά τη μεταγραφή των miR-486-5p, miR-29 και miR-34 [31].

Εκτός από τη διαμόρφωση των μεταγραφικών παραγόντων, τα miRNA μπορούν να επηρεάσουν την παραγωγή άλλων miRNA προκαλώντας μεταβολές σε επιγενετικούς δείκτες, όπως οι μεθυλοτρανσφεράσες. Μέσω έρευνας σε ιστούς ακανθοκυτταρικού καρκινώματος γλώσσας βρέθηκε πως το miR-29b ρυθμίζει το γονίδιο της μεθυλοτρανσφεράσης DNMT3B, το οποίο στη συνέχεια έχει την ικανότητα να μεταβάλλει το πρότυπο μεθυλίωσης του υποκινητή του miR-195. Με τον τρόπο αυτό, αυξάνεται η παραγωγή του miR-195 δημιουργώντας ένα θετικό ρυθμιστικό σύστημα, στο οποίο η ρύθμιση του miR-29b αυξάνει τα επίπεδα του miR-195. Και τα δύο αυτά miRNA είναι ογκοκατασταλτικοί παράγοντες, επομένως θα μπορούσαν να προσφέρονται ως θεραπευτική λύση για τα πλακώδη καρκινώματα της γλώσσας [31].

Συνεπώς, φαίνεται πως ο έμμεσος έλεγχος των miRNA μέσω των μεταγραφικών παραγόντων, των υποκινητών και της επιγενετικής έχει την ικανότητα να επηρεάζει διάφορα κυτταρικά μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων που ευθύνονται για την ανάπτυξη του καρκίνου [31].

3.2.3 ΚΑΘΟΛΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ miRNA:miRNA

Ένα miRNA μπορεί να έχει αντίκτυπο στη συνολική έκφραση των miRNA σε ένα κυτταρικό σύστημα. Έτσι, οι μεταβολές στα επίπεδα των miRNA μπορούν να έχουν σφαιρικό αντίκτυπο στο περιβάλλον των miRNA προκαλώντας δευτερογενείς μεταβολές τόσο στα miRNA όσο και στα mRNA[31].



Εικόνα 17. Καθολικές αντιδράσεις miRNA:miRNA. Εξετάζονται όλες οι έμμεσες και άμεσες αλλαγές στην έκφραση των mRNA και miRNA ως απόκριση σε διαταραχές έκφρασης των miRNA. Συμπεριλαμβάνεται η ενσωμάτωση πολλών μηχανισμών και η εξέταση των συνεπαγόμενων δευτερογενών αλλαγών στα mRNA και miRNA. [πηγή: Hill, M., & Tran, N. (2021). miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer. Disease models & mechanisms(τροποποιημένο)]

Έχει παρατηρηθεί πως ένα miRNA μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση ενός άλλου miRNA, ώστε να ενισχύσει τη ρυθμιστική επίδραση προς έναν κοινό στόχο. Αυτό φαίνεται να συμβαίνει στην πνευμονική υπέρταση, όπου βρίσκονται αυξημένα τα επίπεδα του miR-130/301 έχοντας ως αποτέλεσμα τη μείωση των miR-204, miR-322 και miR-503. Αυτό ενεργοποιείται με τη βοήθεια του υποδοχέα PPAR γ και του μετατροπέα σήματος και ενεργοποιητή της μεταγραφής STAT3. Η αύξηση των miR-130/301 έχει ως αποτέλεσμα τη στοχευμένη μείωση του PPAR γ , προκαλώντας αύξηση του STAT3 εντός των λείων μυϊκών κυττάρων της πνευμονικής αρτηρίας και μείωση της έκφρασης του miR-204, αυξάνοντας με τον τρόπο αυτό τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [31].

Η συνεργασία των miRNA προϋποθέτει την παρουσία ενός κυρίαρχου miRNA, το οποίο θα έχει την ικανότητα να επηρεάζει την πλειονότητα των miRNA εντός ενός κυτταρικού συστήματος, ώστε με το τρόπο αυτό οι αλλαγές που συμβαίνουν στο κύριο miRNA να μπορούν να επηρεάσουν και τα miRNA του συνεργιστικού του δικτύου. Για παράδειγμα, τα

miRNA που στοχεύουν μεταγραφικούς παράγοντες έχουν τη δυνατότητα να μεταβάλλουν τη μεταγραφική δραστηριότητα άλλων miRNA με παρόμοιες λειτουργίες, ώστε να μπορέσουν να συνεργαστούν σε μία συντονισμένη απόκριση. Λόγω του συνολικού αντικτύπου που έχουν τα κυρίαρχα και τα συνεργετικά miRNA στο περιβάλλον των miRNA και mRNA, τυχόν μεταλλαγές μπορούν να επηρεάσουν διάφορα κυτταρικά μονοπάτια, οδηγώντας σε καρκινογένεση [31].

3.3 ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNA ΣΤΙΣ ΤΡΥΠΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΕΣ

Όπως έχει προαναφερθεί, οι τρυπανοσωματίδες αποτελούν το αίτιο εκδήλωσης διαφόρων ασθενειών συμπεριλαμβανομένου της νόσου του Chagas η οποία συγκεκριμένα οφείλεται στο είδος *Trypanosoma cruzi*. Κατά την εκδήλωση της νόσου, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος έχουν σημαντικό ρόλο στην εγκατάσταση και τον έλεγχο της λοίμωξης. Τα miRNA είναι πολύ σημαντικά για την ανοσολογική ρύθμιση, καθώς μπορούν να διαμορφώνουν την γονιδιακή έκφραση τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Πιο συγκεκριμένα, το miR-155 είναι ένα καλά χαρακτηρισμένο miRNA και αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή των αιμοποιητικών κυττάρων, δηλαδή των μονοκυττάρων, των μακροφάγων, των T-κυττάρων και των B-κυττάρων, επηρεάζοντας έτσι την έκφραση των προφλεγμονωδών και των αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών. Επιπλέον, μπορεί και συνδέεται με τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ Dnaj2 και Dnajb1 και οδηγεί στη δημιουργία του υποσυνόλου των T-βοηθητικών κυττάρων Th1 και Th17. Επίσης, έχει την ικανότητα προώθησης της παρουσίασης των αντιγόνων από τα δενδριτικά κύτταρα και μπορεί να οδηγεί την απόκριση των μακροφάγων στοχεύοντας τον καταστολέα σηματοδότησης των κυτταροκινών (SOCS1). Ο καταστολέας σηματοδότησης των κυτταροκινών είναι ένας ανασταλτικός παράγοντας, ο οποίος αναστέλλει τον μετατροπέα σήματος και ενεργοποιητή της μεταγραφής STAT-1 και ρυθμίζει αρνητικά την ιντερφερόνη-γ (IFN-γ). Έτσι, το miR-155 αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή του ανοσοποιητικού συστήματος στη σπλαχνική λειψομανίαση, στο τοξόπλασμα και στη φυματίωση, καθώς επάγει τόσο τις Th1 όσο και τις Th2 ανοσολογικές αποκρίσεις και συμβάλλει με τον τρόπο αυτό στον έλεγχο της λοίμωξης [32].

Σε όλη τη διάρκεια λοίμωξης από *Trypanosoma cruzi* εμφανίζονται αποκρίσεις Th1 και Th2. Αρχικά, παράγεται η ιντερλευκίνη 12 (IL-12) και διεγείρει στα μακροφάγα τη σύνθεση προφλεγμονωδών διαλυτών μεσολαβητών όπως η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ), ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (TNF-α) και το οξειδίο του αζώτου (NO). Η αύξηση της παραγωγής του

οξειδίου του αζώτου και των προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως οι IL-1, IL-6 και IL-18 είναι απαραίτητη για την ενδοκυττάρια θανάτωση των παρασίτων, καθώς ενεργοποιεί τα φλεγμονώδη κύτταρα. Η IL-4 προάγει την παραγωγή της IL-10 και την επέκταση των Th2 κυττάρων, μετριάζοντας με τον τρόπο αυτό την ανοσολογική απόκριση. Επίσης, τα ειδικά αντισώματα έναντι των παρασίτων, κυρίως IgG και DC8+ λεμφοκύτταρα, συμβάλλουν στη μείωση του παρασιτικού φορτίου στον ξενιστή. Τέλος, έχει διαπιστωθεί πως η απουσία του miR-155 ενισχύει σημαντικά την ευαισθησία σε λοίμωξη από το παράσιτο *T. cruzi*, λόγω της μείωσης της αποτελεσματικής απόκρισης των Th1 βοηθητικών κυττάρων [32].

4. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

4.1 ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

Για την εκπόνηση της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας η αναζήτηση της βιβλιογραφίας έγινε μέσω της ηλεκτρονικής μορφής της εθνικής βιβλιοθήκης της ιατρικής (Pubmed). Αρχικά, μελετήθηκαν οι μορφές των τρυπανοσωμάτων και στη συνέχεια έγινε μία πιο εξειδικευμένη έρευνα για το παράσιτο της λεισμανίας. Μελετήθηκε η μορφολογία του παρασίτου, τα είδη που το αποτελούν, η γεωγραφική του κατανομή και οι κλινικές μορφές της ασθένειας που προκαλεί. Επιπλέον, βρέθηκε η ανοσολογική απόκριση των ασθενών με λεισμανίαση, οι τρόποι διάγνωσης και οι τρόποι αντιμετώπισής της. Στη συνέχεια, η μελέτη προχώρησε στο ρόλο των miRNA στις παρασιτικές λοιμώξεις και έγινε πιο συγκεκριμένη στο ρόλο τους στη λεισμανίαση, αφού πρώτα αναλύθηκε ο τρόπος παραγωγής τους. Βρέθηκε ο ρόλος των miRNAs σε άλλες ασθένειες και καταληκτικά η έρευνα ολοκληρώθηκε με την αναζήτηση μελετών που έχουν γίνει σε σκύλους, ποντίκια και ανθρώπινα λευκοκύτταρα, στις οποίες αναζητείται ο ρόλος των miRNA μετά από λοίμωξη με *Leishmania*.

5.ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNA ΣΕ ΠΑΡΑΣΙΤΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Τα παράσιτα έχουν συνεξελιχθεί με τους ξενιστές με μία σχέση όπου χρησιμοποιούν τους ενδοκυτταρικούς τους μηχανισμούς για την αποφυγή και τη ρύθμιση των ανοσολογικών τους αποκρίσεων. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιούν μηχανισμούς για να αποφύγουν και να απορρυθμίσουν τους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή. Τα miRNA φαίνονται ιδανικά για τα παράσιτα, καθώς δεν είναι ανοσογόνα, δηλαδή δεν προκαλούν ανοσολογική απόκριση στον ξενιστή, και μπορούν να μεταφέρονται από το παθογόνο στα κύτταρα του ξενιστή και να στοχεύουν τις νέες μεταγραφικές του διαδικασίες. Τα miRNA μπορούν παράλληλα να

προκαλούν εξάλειψη του παρασίτου στον ξενιστή, αλλά στο παθογόνο να ευνοούν την αναπαραγωγή του, την ανάπτυξή του, την έκφραση αντιγονικών παραγόντων και παραγόντων μολυσματικότητας και επομένως να προωθούν την επιβίωσή του. Με τον τρόπο αυτό, τα παράσιτα μπορούν να προκαλέσουν μεταγραφική ρύθμιση στον ξενιστή με τη μεσολάβηση των miRNA γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τις ανοσολογικές και φλεγμονώδεις αποκρίσεις, για τον κυτταρικό κύκλο, την απόπτωση, την αυτοφαγία και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού. Επιπλέον, τα παθογόνα τροποποιούν τόσο τα δικά τους miRNA όσο και τα miRNA του ξενιστή, τα οποία είναι υπεύθυνα για τις κυτταρικές διεργασίες σχετικές με τον πολλαπλασιασμό τους και της προώθησης του κύκλου ζωής τους.

Επομένως, τα miRNA έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν την έκβαση των παρασιτικών λοιμώξεων. Η απορρύθμιση των miRNA του ξενιστή σχετίζεται με μειωμένη ανοσολογική απόκριση και συνεπώς αυξημένο αποικισμό του παρασίτου και παράλληλα τα miRNA του ξενιστή μπορούν να είναι μέρος του μηχανισμού άμυνας του ξενιστή έναντι των παρασίτων.

6.ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNA ΣΤΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ

Τα παράσιτα του γένους *Leishmania* έχουν αναπτύξει εξελιγμένες στρατηγικές που τους επιτρέπουν να απενεργοποιούν τα μακροφάγα του ξενιστή τους, ώστε να προάγουν την επιβίωσή τους. Σύμφωνα με το γεγονός πως τα miRNAs έχουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση των εγγενών και προσαρμοστικών ανοσολογικών απαντήσεων έναντι των παθογόνων, τα παράσιτα έχουν αναπτύξει την ικανότητα να ρυθμίζουν την έκφραση των miRNA των μακροφάγων του ξενιστή, ώστε να μπορούν να διαχειρίζονται τους φαινοτύπους των κυττάρων αυτών προς όφελός τους [44].

6.1 ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ ΣΕ ΣΚΥΛΟΥΣ (CANINE LEISHMANIASIS)

Η λεισμανίαση είναι μία ζωνόσος που προκαλείται από ενδοκυτταρικά παράσιτα του γένους *Leishmania* και ειδικότερα των ειδών *Leishmania infantum* και *Leishmania chagasi*. Προσβάλλονται τόσο οι άνθρωποι όσο και οι σκύλοι και μεταδίδονται από φλεβοτόμους. Η ασθένεια που προκαλείται στους σκύλους ονομάζεται *Kala-azar* και πολλαπλασιάζεται σε ιστούς όπως το ήπαρ, ο σπλήνας και ο μυελός των οστών προκαλώντας λειτουργική βλάβη των ιστών αυτών. Η γλυκοπρωτεΐνη gr63 που υπάρχει στα εξωσώματα της *Leishmania*, τα οποία προστατεύουν το RNA από αποικοδόμηση με RNAάσες, μπορεί να αποικοδομήσει το

Dicer1 στα ηπατικά κύτταρα των ξενιστών, μειώνοντας τη σύνθεση του miR-122 του ξενιστή. Κατά την αρχική φάση της λοίμωξης, τα παράσιτα *Leishmania* μπορούν να επιβιώσουν στα ηπατικά κύτταρα Kupffer χωρίς να επηρεάζεται το ηπατικό παρέγχυμα. Η υψηλή ανεκτικότητα των ηπατικών κυττάρων επιτρέπει την επιβίωση των παρασίτων *Leishmania*, τα οποία στη συνέχεια τροποποιούν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση, την πρόσληψη και την εκροή χοληστερόλης. Για το λόγο αυτό, παρατηρούνται διαταραχές στο μεταβολισμό της χοληστερόλης και των λιποπρωτεϊνών σε σκύλους που έχουν μολυνθεί από παράσιτα του γένους *Leishmania*. Έτσι, παρατηρείται υπερχοληστερολαιμία από υψηλά επίπεδα λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) και χαμηλά επίπεδα λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL).

Στο σπλήνα μπορεί να σχηματιστούν κοκκιώματα με διήθηση κυρίως από μακροφάγα, αλλά και πλασματοκύτταρα, καθώς και λεμφοκύτταρα.

6.1.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΡΕΥΝΑΣ ΣΕ ΣΚΥΛΟΥΣ ΜΕ ΛΟΙΜΩΞΗ ΑΠΟ *LEISHMANIA*

Τα κλινικά συμπτώματα που παρουσιάζονται σε σκύλους με λεισμανίαση είναι κυρίως λεμφαδενοπάθεια, ονυχογρύπωση, διάρροια, απώλεια βάρους, καχεξία, πυρετός, ανωμαλίες του κινητικού συστήματος, δερματικές αλλοιώσεις όπως σμηγματόρροια sicca και αλωπεκία, και σπληνομεγαλία. Κατά την εξέλιξη της λοίμωξης εμφανίζεται μείωση των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων που έχει ως αποτέλεσμα την αποτυχία κυτταρικής ανοσίας, καθώς και αυξημένες κυτταροκίνες, οι οποίες καταστέλλουν τη λειτουργία των μακροφάγων.

Από έρευνες που έγιναν σε σκύλους με λεισμανίαση σε σύγκριση με υγιείς σκύλους, φάνηκε μετά από αιματολογικές εξετάσεις πως οι σκύλοι με λεισμανίαση εμφανίζουν νορμοκυτταρική αναιμία, σημαντική μείωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, του αιματοκρίτη και της αιμοσφαιρίνης, καθώς και μείωση του μέσου όγκου ερυθρών αιμοσφαιρίων (MCV), της μέσης περιεκτικότητας αιμοσφαιρίνης ανά ερυθρό αιμοσφαίριο (MCH) και της μέσης συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης (MCHC). Οι βιοχημικές εξετάσεις έδειξαν αύξηση των επιπέδων TP, αύξηση των επιπέδων της LDL και μείωση των επιπέδων της HDL. Τέλος, με ανίχνευση του RNA με χρήση της qRT-PCR φάνηκε μείωση έκφρασης του γονιδίου miR-122, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως δείκτης ηπατικής βλάβης κατά τη διάρκεια λοίμωξης από *Leishmania*. Μετά από μελέτη που έγινε σε μολυσμένα PBMCs και σπληνικά λευκοκύτταρα σκύλων που έχουν μολυνθεί από *L. infantum* παρατηρήθηκε τριπλάσια

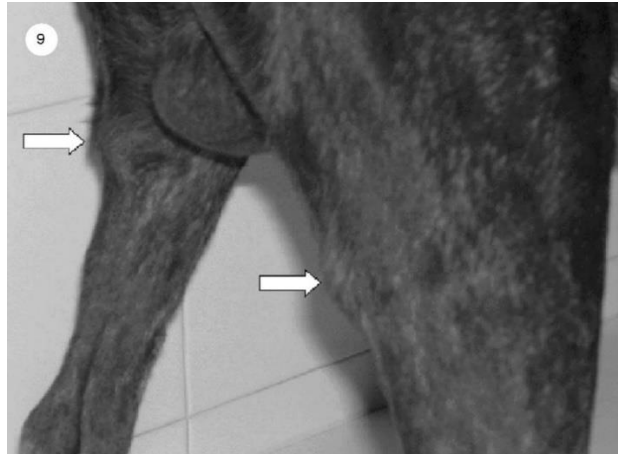
αύξηση έκφρασης των miR-21, miR-194, miR-424 και miR-451, διπλάσια αύξηση έκφρασης τα miR-192, miR-371 και miR-503 και διπλάσια μείωση έκφρασης τα miR-150 και miR-574. Το παρασιτικό φορτίο στα PBMCs φαίνεται να εμφανίζει θετική συσχέτιση με την έκφραση του miR-194 και αρνητική συσχέτιση με την έκφραση του miR-150. Η αύξηση του επιπέδου του miR-194 θα μπορούσε να αποτελεί μηχανισμό ρύθμισης της έκκρισης φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων TNF-α, που ρυθμίζει το φορτίο των παρασίτων *Leishmania* στα μολυσμένα ζώα. Επιπλέον, το miR-194 παρουσίασε επίσης ισχυρή θετική συσχέτιση με την ουρία ορού μολυσμένων με CVL σκύλων, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο miR-194 θα μπορούσε να είναι χρήσιμος ως πιθανός πρώιμος βιοδείκτης πλάσματος στη νεφρική βλάβη σκύλων που έχουν μολυνθεί με σπλαχνική λεισμανίαση. Το miR-150 παρουσίασε αρνητική συσχέτιση με το παρασιτικό φορτίο *Leishmania* στο αίμα και πιθανώς δρα στην υπεργαμμασφαιρίνη και στην ανάπτυξη ρυθμιστικών Β-κυττάρων, ενισχύοντας το παρασιτικό φορτίο *Leishmania* λόγω καταστολής των Τ-κυττάρων στη σπλαχνική λεισμανίαση. Τέλος, αναλύσεις μικροσυστοιχιών έδειξαν αυξημένο επίπεδο έκφρασης των miR-7, miR-21, miR-148a και miR-615 και υπορύθμιση των miR-125a, miR-125b και miR-150 στα μολυσμένα λευκοκύτταρα σε σύγκριση με τα λευκοκύτταρα ελέγχου. Το miR-148a στοχεύει γονίδια που εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόπτωσης, όπως το FAS και ο σύνδεσμος FAS (FASLG), το οποίο υποδηλώνει το ρόλο αυτού του miRNA στο θάνατο των CD4+ και CD8+ κυττάρων σε μολυσμένους σκύλους με σπλαχνική λεισμανίαση. Το miR-615 στοχεύει τον εξαρτώμενο από το ligand πυρηνικό συμπιεστή (LCoR), έναν αποκαταστάτη του ενεργοποιημένου από τον πολλαπλασιαστική υπεροξισώματος υποδοχέα γάμμα (PPARγ), ο οποίος αυξάνει τη φαγοκυτταρική ικανότητα των σπληνικών μακροφάγων και το miR-21 συμβάλλει πιθανώς στη μείωση του επιπέδου του TNF-α, το οποίο θα μπορούσε να οδηγήσει στην αύξηση του σπληνικού παρασιτικού φορτίου και στην εξέλιξη της νόσου [46].



Εικόνα 21. Δερματικές αλλοιώσεις σε σκύλο που πάσχει από λοίμωξη με *Leishmania*

1. Περιφθαλμικές αλλοιώσεις και αλλοιώσεις στην περιοχή των αυτιών
2. Αλωπεκία στα πόδια και ονυχογρύπωση

(πηγή: Alvar, Jorge (2004). [Advances in Parasitology] Advances in Parasitology Volume 57 Volume 57 || Canine Leishmaniasis)



Εικόνα 22. Οίδημα λεμφαδένων σε σκύλο με Λεισμανίαση (πηγή: Alvar, Jorge (2004). [Advances in Parasitology] Advances in Parasitology Volume 57 Volume 57 || Canine Leishmaniasis)



Εικόνα 23. Επιπεφυκίτιδα με κιτρινωπή έκκριση σε σκύλο με λεισμανίαση (πηγή: Alvar, Jorge (2004). [Advances in Parasitology] Advances in Parasitology Volume 57 Volume 57 || Canine Leishmaniasis)



Εικόνα 24. Θόλωση κερατοειδούς λόγω κερατίτιδας σε σκύλο με λεισμανίαση (πηγή: Alvar, Jorge (2004). [Advances in Parasitology] Advances in Parasitology Volume 57 Volume 57 || Canine Leishmaniasis)

6.1.3 ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ miR-21 ΣΕ ΣΚΥΛΟΥΣ ΜΕ ΛΟΙΜΩΞΗ ΑΠΟ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑ

Η ρύθμιση της αποτελεσματικής λειτουργίας των μακροφάγων και των Τ-λεμφοκυττάρων εξαρτάται από τα miRNAs. Το miR-21, το οποίο στοχεύει γονίδια που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση, εμφανίζει αυξημένη έκφραση σε σκύλους με *canine Leishmaniasis*. Επιπλέον, εμφανίζονται μειωμένα επίπεδα των πρωτεϊνών FAS (CD95), FASL (CD178), CCR7 και CD69 σε σκύλους που έχουν μολυνθεί φυσικά από *Leishmania infantum*. Σε σκύλους που έπασχαν από λεϊσμανίαση χορηγήθηκαν μιμητικά και αναστολείς του miR-21 και παρατηρήθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών FAS, FASL, CD69, CCR7, TNF-α, IL-17, IFN-γ και IL-10.

Οι μιμητές του miR-21 παρουσίασαν μείωση της έκφρασης του CD69 σε σπληνικά λευκοκύτταρα τόσο σε υγιείς σκύλους όσο και σε σκύλους με CanL. Επιπλέον, παρατηρήθηκε πως η χορήγηση των μιμητών miR-21 μείωσε την έκφραση της πρωτεΐνης IL-10. Τέλος, οι TNF-α, IFN-γ και IL-17 δεν παρουσίασαν κάποια σημαντική διαφορά. Οι αναστολείς του miR-21 παρουσίασαν μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης IL-10 σε σπληνικά λευκοκύτταρα σκύλων με CanL. Ωστόσο, οι TNF-α, IFN-γ και IL-17 δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές.

Τόσο οι μιμητές όσο και οι αναστολείς του miR-21 δεν παρουσίασαν κάποια διαφορά στη ρύθμιση των πρωτεϊνών FAS, FASL και CCR7. Οι πρωτεΐνες FAS και FASL είναι υπεύθυνες για τον θάνατο των κυττάρων-στόχων που έχουν μολυνθεί από παθογόνα, καθώς και των δυνητικά επικίνδυνων λεμφοκυττάρων. Η σηματοδότηση FAS-FASL πυροδοτεί την απόπτωση των κυττάρων αυτών με τη μεσολάβηση των πρωτεϊνών του προσαρμογέα FADD και της ενεργοποίησης της κασπάσης-8. Παρ' όλο που στο σπλήνα και στα CD4+ κύτταρα του περιφερικού αίματος από σκύλους με CanL παρατηρούνται χαμηλά επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών FAS και FASL, οι μιμητές και οι αναστολείς του miR-21 δεν έδειξαν κάποια μεταβολή στα επίπεδα των πρωτεϊνών αυτών στις καλλιέργειες λευκοκυττάρων και σπληνικών κυττάρων σκύλων με CanL. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πως το mRNA των FAS και FASL πιθανόν να μην αποτελεί στόχο του miR-21.

6.2 ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΠΟΝΤΙΚΩΝ

Τα ζώα παραμένουν τα καλύτερα πειραματικά μοντέλα για τη διερεύνηση ασθενειών που προσβάλλουν τον άνθρωπο. Πιο συγκεκριμένα, η μόλυνση από *Leishmania* έχει μελετηθεί

εκτενώς στα μοντέλα ποντικών Balb/c και C57BL/6 και έχει μελετηθεί η γενετική τους ευαισθησία ή αντοχή στη μόλυνση από παράσιτα *Leishmania*. Η *L. major* είναι το πιο καλά χαρακτηρισμένο είδος *Leishmania* και αποτελεί το κύριο αίτιο της δερματικής λεισμανίασης. Η *L. major* προκαλεί μία διχοτόμηση της ανοσολογικής απάντησης σε Th1 και Th2, όπου τα ποντίκια C57BL/6 είναι εξαιρετικά ανθεκτικά και αυτοθεραπεύονται (Th1) και τα ποντίκια Balb/c είναι εξαιρετικά ευαίσθητα και αναπτύσσουν τραυματισμούς που δεν μπορούν να ελέγξουν (Th2). Η Th1 ανοσολογική απόκριση προλαμβάνει την εγκατάσταση και τη χρονιότητα της λεισμανίασης, καθώς τα ειδικά Th1 κύτταρα παράγουν ιντερφερόνη-γ (IFN-γ), η οποία είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση των μακροφάγων, τα οποία στη συνέχεια οδηγούν σε μία αλυσιδωτή αντίδραση που καταλήγει στη παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) και συνεπώς στην πλήρη εξάλειψη των παρασίτων. Αντιθέτως, τα ποντίκια Balb/c αναπτύσσουν πρώιμη Th2 ανοσολογική απάντηση, έχοντας ως αποτέλεσμα την αδυναμία επούλωσης της βλάβης οδηγώντας σε χρονιότητα, έτσι δεν μπορούν να ελέγξουν τη λοίμωξη, με αποτέλεσμα να μπορεί να διαδοθεί και να εξελιχθεί η λοίμωξη σε διάχυτη δερματική λεισμανίαση. Επιπλέον, τα ποντίκια C57BL/6 μπορούν να αναπτύξουν μικτή Th1 και Th2 ανοσολογική απάντηση με επικράτηση του φαινοτύπου Th2, κατά την οποία επιτρέπεται η πρώιμη εγκατάσταση της λοίμωξης, αλλά αργότερα τα παράσιτα εξαλείφονται. Έρευνες δείχνουν πως τα miR-155, miR-181c, miR-9 και miR-31 διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των T-κυττάρων ρυθμίζοντας το σηματοδοτικό μονοπάτι της IL-2. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε με συνκαλλιέργηση CD4+ T κυττάρων ποντικών με μολυσμένα και μη μολυσμένα μακροφάγα από *Leishmania donovani* ταυτοποιήθηκαν με αλληλούχηση επόμενης γενιάς 604 γνωστά miRNA στα δείγματα ελέγχου και 613 γνωστά miRNA στα μολυσμένα δείγματα, από τα οποία τα 503 ήταν κοινά και για τις δύο ομάδες δειγμάτων. Επιπλέον, επικυρώθηκε πως τα miRNA στοχεύουν στους μεταγραφικούς παράγοντες που προάγουν τη διαφοροποίηση των CD4+ κυττάρων προς τους Th1 και Th2 κυτταρικούς πληθυσμούς [45].

6.3 ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ

Μία ερευνητική ομάδα του Πανεπιστημίου της Βρετανικής Κολομβίας μελέτησε πώς τα παράσιτα *Leishmania* ρυθμίζουν την έκφραση των miRNAs των μακροφάγων του ξενιστή μέσω της εμπλοκής του μεταγραφικού παράγοντα c-Myb. Το c-Myb είναι ένας μεταγραφικός

παράγοντας ο οποίος έχει σημαντικό ρόλο σε κυτταρικές διεργασίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση. Στα πλαίσια μόλυνσης από *Leishmania* πιστεύεται πως ο c-Myc καταστέλλει τη μεταγραφή των γονιδίων συμπεριλαμβανομένων εκείνων των miRNAs μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες όπως οι MIZ-1, SP1 και NF- γ προκαλώντας επιπτώσεις στη ρύθμιση των μακροφάγων των κυττάρων των ξενιστών και προάγοντας έτσι την επιβίωση των παρασίτων. Ωστόσο, οι ακριβείς μηχανισμοί απενεργοποίησης των μακροφάγων είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι. Κατά τη διαδικασία αναζήτησης του μηχανισμού καταστολής που ενεργοποιείται στα κύτταρα μολυσμένα από *Leishmania* βρέθηκε πως η απορρύθμιση των miRNAs δεν οφειλόταν ούτε στην ποσότητα, αλλά ούτε και κυτταρικό εντοπισμό πρωτεϊνών σημαντικών για τη βιογένεση των miRNA, όπως το DGCR8, το Dicer, το TRBP και το Ago2. Στη συνέχεια, αποδείχθηκε πως στα μολυσμένα κύτταρα υπήρξε ελάττωση του ρυθμού παραγωγής των επιπέδων των pri-miRNA και των προ-miRNA, που οδήγησε σε ελαττωμένο ρυθμό μεταγραφής των pri-miRNA και συνεπώς σε απορρύθμιση όλου του γονιδιώματος των ώριμων miRNA. Σε μελέτη όπου c-Myc knock-down μακροφάγα μολύνθηκαν από *Leishmania* παρατηρήθηκε πως ύστερα από 24 ώρες, η μείωση της πρωτεΐνης c-Myc ανέστειλε την καταστολή των επιπέδων των miRNA που προκλήθηκε από τη μόλυνση. Επομένως η αναστολή των miRNA σε μολυσμένα μακροφάγα από παράσιτα *Leishmania*, φαίνεται να πραγματοποιείται στο επίπεδο μεταγραφής των γονιδίων των miRNA και ήταν εξαρτώμενη από την πρωτεΐνη c-Myc [44].

7.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σκοπός της τρέχουσας πτυχιακής εργασίας ήταν η μελέτη του ρόλου των miRNA στην ασθένεια της λείσμανίασης και του τρόπου με τον οποίο θα μπορούσαν εκείνα να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικά μέσα. Τα miRNA έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στην προσαρμογή των ανοσολογικών αποκρίσεων κατά τη διάρκεια της λοίμωξης από παράσιτα *Leishmania* και για το λόγο αυτό θεωρείται πως θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και ως θεραπευτικά μέσα. Η κατανόηση των στρατηγικών αυτών θα μπορούσε να προσφέρει νέες κατευθυντήριες γραμμές και στρατηγικές για τη διαχείριση και τη θεραπεία της λείσμανίασης. Οι έρευνες σε ποντίκια και ανθρώπους έχουν επικεντρωθεί στα miR-21, miR-122, miR-155, miR-181c, miR-9 και miR-31, καθώς φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μετατροπή της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή. Επιπλέον, τα miRNA έχουν

προταθεί ως πολύτιμοι βιοδείκτες στη θεραπεία, τη διάγνωση και την πρόληψη των παρασιτικών λοιμώξεων [46]. Η ταυτοποίηση των miRNA των παρασίτων και εκείνων που επάγονται στο κύτταρο ξενιστή μετά τη μόλυνση έφερε νέες γνώσεις και κατανόηση όσον αφορά τους στόχους που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την καταπολέμηση παρασιτικών ασθενειών, όπως λοίμωξη από *Leishmania*. Περαιτέρω έρευνες θα φέρουν παραπάνω κριτήρια που απαιτούνται ώστε να μπορέσουν τα miRNA να χρησιμοποιούνται ως κατάλληλοι βιοδείκτες, όπως είναι η προσβασιμότητα, η υψηλή εξειδίκευση και η ευαισθησία[46]. Τέλος, είναι επιτακτική ανάγκη η ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού εμβολίου για την πρόληψη της λοίμωξης και για αυτό το λόγο οι μελλοντικές έρευνες θα ήταν ωφέλιμο να εστιάσουν στην περαιτέρω μελέτη του ρόλου των miRNA στη λεισμανίαση και στο πώς εκείνα θα μπορούσαν πιθανόν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη του εμβολίου αυτού. Καθώς δεν υπάρχει διαθέσιμο εμβόλιο, ο περιορισμός της μετάδοσης της λοίμωξης μπορεί να συμβεί με τη λήψη κατάλληλων μέτρων πρόληψης τα οποία θα αποσκοπούν στη αποφυγή δαγκώματος από τους υπεύθυνους φλεβοτόμους.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

miRNAs	microRNAs
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
<i>T. brucei gambiense</i>	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>
<i>T. brucei rhodesiense</i>	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>
<i>T. evansi</i>	<i>Trypanosoma evansi</i>
<i>T. vivax</i>	<i>Trypanosoma vivax</i>
<i>T. congolense</i>	<i>Trypanosoma congolense</i>
<i>T. equiperdum</i>	<i>Trypanosoma equiperdum</i>
CL	Δερματική λεισμανίαση
MCL	Βλεννογονοδερματική λεισμανίαση
VL	Σπλαχνική λεισμανίαση
DCL	Διάχυτη δερματική λεισμανίαση
<i>L. major</i>	<i>Leishmania major</i>

<i>L. tropica</i>	<i>Leishmania tropica</i>
<i>L. aethiopica</i>	<i>Leishmania aethiopica</i>
<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i>
<i>L. chagasi</i>	<i>Leishmania chagasi</i>
<i>L. amazonensis</i>	<i>Leishmania amazonensis</i>
<i>L. mexicana</i>	<i>Leishmania mexicana</i>
<i>L. braziliensis</i>	<i>Leishmania braziliensis</i>
<i>L. panamensis</i>	<i>Leishmania panamensis</i>
<i>L. peruviana</i>	<i>Leishmania peruviana</i>
<i>L. guayanensis</i>	<i>Leishmania guayanensis</i>
<i>L. donovani</i>	<i>Leishmania donovani</i>
<i>L. venezuelensis</i>	<i>Leishmania venezuelensis</i>
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
sbV	Πεντασθενή αντιμικροβιακά
L-amB	Λιποσωμική αμφοτερικίνη-B
FDA	Εθνικός οργανισμός φαρμάκων
CDC	Κέντρο ελέγχου και πρόληψης νοσημάτων
IND	Ερευνητικό πρωτόκολλο νέου φαρμάκου
IV	Ενδοφλέβια
IL	Ενδοδερμικά
HIV	Ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας
AIDS	Σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας
PDT	Φωτοδυναμική θεραπεία
ALA	Αμινολεβουλινικό οξύ
CanL	Λεισμανίαση σκύλων
IFA	Έμμεσος ανοσοφθορισμός
ELISA	Ανοσοενζυμική δοκιμασία
LST	Ενδοδερματική δοκιμασία <i>Leishmania</i>
PBMCs	Μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. D. (2014). Leishmaniasis. *The Journal of infection*, 69 Suppl 1, S10–S18. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016>
2. Waller, R. F., & McConville, M. J. (2002). Developmental changes in lysosome morphology and function *Leishmania* parasites. *International journal for parasitology*, 32(12), 1435–1445. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(02\)00140-6](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(02)00140-6)
3. Sasidharan, S., & Saudagar, P. (2021). Leishmaniasis: where are we and where are we heading?. *Parasitology research*, 120(5), 1541–1554. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07139-2>
4. Correia de Sousa, M., Gjorgjieva, M., Dolicka, D., Sobolewski, C., & Foti, M. (2019). Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing. *International journal of molecular sciences*, 20(24), 6249. <https://doi.org/10.3390/ijms20246249>
5. Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S., & Ghaffari, S. H. (2019). An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of cellular physiology*, 234(5), 5451–5465. <https://doi.org/10.1002/jcp.27486>
6. Dexheimer, P. J., & Cochella, L. (2020). MicroRNAs: From Mechanism to Organism. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 409. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00409>
7. Rojas-Pirela, M., Andrade-Alviárez, D., Medina, L., Castillo, C., Liempi, A., Guerrero-Muñoz, J., Ortega, Y., Maya, J. D., Rojas, V., Quiñones, W., Michels, P. A., & Kemmerling, U. (2022). MicroRNAs: master regulators in host-parasitic protist interactions. *Open biology*, 12(6), 210395. <https://doi.org/10.1098/rsob.210395>
8. Loria, A. D., Dattilo, V., Santoro, D., Guccione, J., De Luca, A., Ciaramella, P., Pirozzi, M., & Iaccino, E. (2020). Expression of Serum Exosomal miRNA 122 and Lipoprotein Levels in Dogs Naturally Infected by *Leishmania infantum*: A Preliminary Study. *Animals : an open access journal from MDPI*, 10(1), 100. <https://doi.org/10.3390/ani10010100>
9. De Freitas, J. H., Bragato, J. P., Rebeck, G. T., Costa, S. F., Dos Santos, M. O., Soares, M. F., Eugênio, F. R., Dos Santos, P. S. P., & De Lima, V. M. F. (2023). MicroRNA-21 and microRNA-148a affects PTEN, NO and ROS in canine leishmaniasis. *Frontiers in genetics*, 14, 1106496. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1106496>

10. Bragato, J. P., Rebech, G. T., Freitas, J. H., Santos, M. O. D., Costa, S. F., Eugênio, F. R., Santos, P. S. P. D., & de Lima, V. M. F. (2022). miRNA-21 regulates CD69 and IL-10 expression in canine leishmaniasis. *PloS one*, 17(3), e0265192. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265192>
11. Chen, L., Heikkinen, L., Wang, C., Yang, Y., Sun, H., & Wong, G. (2019). Trends in the development of miRNA bioinformatics tools. *Briefings in bioinformatics*, 20(5), 1836–1852. <https://doi.org/10.1093/bib/bby054>
12. Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal and Michael A. Pfaller, 2016, Medical Microbiology
13. Cedric Mims, John Playfair, Ivan Roitt, Derek Wakelin and Rosamund Williams, 1998, Medical Microbiology
14. David Greenwood, Richard C.B. Slack, John F. Peutherer and Michael R. Barer, 2007, Medical Microbiology
15. Pays, E., Radwanska, M., & Magez, S. (2023). The Pathogenesis of African Trypanosomiasis. *Annual review of pathology*, 18, 19–45. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-031621-025153>
16. Zuma, A. A., Dos Santos Barrias, E., & de Souza, W. (2021). Basic Biology of Trypanosoma cruzi. *Current pharmaceutical design*, 27(14), 1671–1732. <https://doi.org/10.2174/1381612826999201203213527>
17. Pradhan, S., Schwartz, R. A., Patil, A., Grabbe, S., & Goldust, M. (2022). Treatment options for leishmaniasis. *Clinical and experimental dermatology*, 47(3), 516–521. <https://doi.org/10.1111/ced.14919>
18. Bartholomeu, D. C., Teixeira, S. M. R., & Cruz, A. K. (2021). Genomics and functional genomics in Leishmania and Trypanosoma cruzi: statuses, challenges and perspectives. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 116, e200634. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200634>
19. Morales-Yuste, M., Martín-Sánchez, J., & Corpas-Lopez, V. (2022). Canine Leishmaniasis: Update on Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Veterinary sciences*, 9(8), 387. <https://doi.org/10.3390/vetsci9080387>
20. Echeverria, L. E., & Morillo, C. A. (2019). American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious disease clinics of North America*, 33(1), 119–134. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.015>

21. Mokni M. (2019). *Leishmanioses cutanées [Cutaneous leishmaniasis]*. *Annales de dermatologie et de venerologie*, 146(3), 232–246. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2019.02.002>
22. Aronson, N. E., & Joya, C. A. (2019). *Cutaneous Leishmaniasis: Updates in Diagnosis and Management*. *Infectious disease clinics of North America*, 33(1), 101–117. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.004>
23. Linse, K. P., Bogdan, C., Haenssle, H. A., & Toberer, F. (2022). *Mucocutaneous Leishmaniasis due to Leishmania infantum Infection*. *Acta dermato-venereologica*, 102, adv00748. <https://doi.org/10.2340/actadv.v102.2321>
24. Roca, B., & Roca, M. (2020). *Mucocutaneous leishmaniasis (espundia)*. *Postgraduate medical journal*, 96(1142), 789. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2019-137465>
25. van Griensven, J., & Diro, E. (2019). *Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens*. *Infectious disease clinics of North America*, 33(1), 79–99. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.005>
26. Ratnapriya, S., Keerti, Sahasrabudhe, A. A., & Dube, A. (2019). *Visceral leishmaniasis: An overview of vaccine adjuvants and their applications*. *Vaccine*, 37(27), 3505–3519. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.04.092>
27. Ευσταθίου Αντωνία (2014). *Μελέτη μορίων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των πρωτόζωων Leishmania και Trypanosoma*.
28. Sabzevari, S., Mohebbali, M., & Hashemi, S. A. (2020). *Mucosal and mucocutaneous leishmaniasis in Iran from 1968 to 2018: a narrative review of clinical features, treatments, and outcomes*. *International journal of dermatology*, 59(5), 606–612. <https://doi.org/10.1111/ijd.14762>
29. Mazire, P. H., Saha, B., & Roy, A. (2022). *Immunotherapy for visceral leishmaniasis: A trapeze of balancing counteractive forces*. *International immunopharmacology*, 110, 108969. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108969>
30. Varma, D. M., Redding, E. A., Bachelder, E. M., & Ainslie, K. M. (2021). *Nano- and Microformulations to Advance Therapies for Visceral Leishmaniasis*. *ACS biomaterials science & engineering*, 7(5), 1725–1741. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.0c01132>

31. Hill, M., & Tran, N. (2021). *miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer. Disease models & mechanisms*, 14(4), dmm047662. <https://doi.org/10.1242/dmm.047662>
32. Jha, B. K., Varikuti, S., Seidler, G. R., Volpedo, G., Satoskar, A. R., & McGwire, B. S. (2020). *MicroRNA-155 Deficiency Exacerbates Trypanosoma cruzi Infection. Infection and immunity*, 88(7), e00948-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00948-19>
33. Garcia, A., Dunoyer-Geindre, S., Fish, R. J., Neerman-Arbez, M., Reny, J. L., & Fontana, P. (2021). *Methods to Investigate miRNA Function: Focus on Platelet Reactivity. Thrombosis and haemostasis*, 121(4), 409–421. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1718730>
34. Kaye, Paul M.; Cruz, Israel; Picado, Albert; Van Bocxlaer, Katrien; Croft, Simon L. (2020). *Leishmaniasis immunopathologyâimpact on design and use of vaccines, diagnostics and drugs. Seminars in Immunopathology*, (), -. doi:10.1007/s00281-020-00788-y
35. Conde, L., Maciel, G., de Assis, G. M., Freire-de-Lima, L., Nico, D., Vale, A., Freire-de-Lima, C. G., & Morrot, A. (2022). *Humoral response in Leishmaniasis. Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 1063291. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1063291>
36. Blackwell, J. M., Fakiola, M., & Castellucci, L. C. (2020). *Human genetics of leishmania infections. Human genetics*, 139(6-7), 813–819. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02130-w>
37. Black, J. A., Reis-Cunha, J. L., Cruz, A. K., & Tosi, L. R. O. (2023). *Life in plastic, it's fantastic! How Leishmania exploit genome instability to shape gene expression. Frontiers in cellular and infection microbiology*, 13, 1102462. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1102462>
38. Bamigbola, I. E., & Ali, S. (2022). *Paradoxical immune response in leishmaniasis: The role of toll-like receptors in disease progression. Parasite immunology*, 44(4-5), e12910. <https://doi.org/10.1111/pim.12910>
39. Rodríguez-Serrato, M. A., Salinas-Carmona, M. C., & Limón-Flores, A. Y. (2020). *Immune response to Leishmania mexicana: the host-parasite relationship. Pathogens and disease*, 78(8), ftaa060. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa060>

40. De Brito, R. C. F., Aguiar-Soares, R. D. O., Cardoso, J. M. O., Coura-Vital, W., Roatt, B. M., & Reis, A. B. (2020). Recent advances and new strategies in Leishmaniasis diagnosis. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(19), 8105–8116. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10846-y>
41. de Vries, H. J. C., & Schallig, H. D. (2022). Cutaneous Leishmaniasis: A 2022 Updated Narrative Review into Diagnosis and Management Developments. *American journal of clinical dermatology*, 23(6), 823–840. <https://doi.org/10.1007/s40257-022-00726-8>
42. Ibarra-Meneses, A. V., Corbeil, A., Wagner, V., Onwuchekwa, C., & Fernandez-Prada, C. (2022). Identification of asymptomatic *Leishmania* infections: a scoping review. *Parasites & vectors*, 15(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05129-y>
43. Torrellas, A., Ferrer, E., Cruz, I., De Lima, H., Borges, R., Delgado, O., Moffi, P., Miles, M. A., & Feliciangeli, M. D. (2020). Surveillance for *Leishmania* asymptomatic infection in endemic foci of cutaneous leishmaniasis in Venezuela: a combination of leishmanin skin test and PCR using blood clots improves detection and enables identification of species. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 114(6), 433–439. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trz130>
44. Nandan, D., Rath, C. T., & Reiner, N. E. (2021). *Leishmania* regulates host macrophage miRNAs expression by engaging transcription factor c-Myc. *Journal of leukocyte biology*, 109(5), 999–1007. <https://doi.org/10.1002/JLB.4RU0920-614R>
45. Kumar, V., Das, S., Kumar, A., Tiwari, N., Kumar, A., Abhishek, K., Mandal, A., Kumar, M., Shafi, T., Bamra, T., Singh, R. K., Vijayakumar, S., Sen, A., & Das, P. (2020). *Leishmania donovani* infection induce differential miRNA expression in CD4+ T cells. *Scientific reports*, 10(1), 3523. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60435-2>
46. Rashidi, S., Mansouri, R., Ali-Hassanzadeh, M., Ghani, E., Barazesh, A., Karimazar, M., Nguewa, P., & Carrera Silva, E. A. (2021). Highlighting the interplay of microRNAs from *Leishmania* parasites and infected-host cells. *Parasitology*, 148(12), 1434–1446. <https://doi.org/10.1017/S0031182021001177>
47. Bhargava, P., & Singh, R. (2012). Developments in diagnosis and antileishmanial drugs. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2012, 626838. <https://doi.org/10.1155/2012/626838>

48. Ratnapriya, S., Keerti, Sahasrabuddhe, A. A., & Dube, A. (2019). *Visceral leishmaniasis: An overview of vaccine adjuvants and their applications*. *Vaccine*, 37(27),3505–3519. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.04.092>
-