

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Barbora Matějková**

**Imunitní odpověď hostitele u kožní versus viscerální formy leishmaniózy**

Host immune response in cutaneous versus visceral form of leishmaniasis

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Tereza Leštinová, Ph.D.

Praha, 2023

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část, nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30.4.2023

.....

Matějková Barbora

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou chtěla poděkovat školitelce RNDr. Tereze Leštinové, Ph.D. za poskytnutí cenných rad a konzultací a podporu během psaní této práce. Dále bych ráda poděkovala příteli, rodině a přátelům za trpělivost a podporu, kterou mi poskytovali nejen během psaní bakalářské práce, ale i celého studia.

## Abstrakt

Parazitičtí prvoci z rodu *Leishmania* během životního cyklu kolují mezi přenašeči a hostiteli, ve kterých přicházejí do kontaktu s imunitním systémem. V těle hostitele může infekce vést k rozvoji onemocnění zvaného leishmanióza. Ta se může projevovat vícero způsoby, přičemž nejzákladnější formy se označují jako viscerální, kožně-slizniční a kožní leishmanióza. Tato bakalářská práce se zaměřuje na imunitní odpověď hostitele během kožní a viscerální formy leishmaniózy. Dále je pozornost věnovaná hostitelským, vektorovým i parazitárním faktorům, které se liší mezi druhy kožní a viscerální leishmaniózy, a které mohou ovlivňovat rozdílné klinické projevy. Pozornost je věnovaná nejen faktorům spojených s imunitou, ale i faktorům jako jsou velikosti inokulačních dávek parazitů, teplotní rozdíly mezi kůží a vnitřními orgány, genetika parazitů a další.

**Klíčová slova** – *Leishmania*, viscerální leishmanióza, kožní leishmanióza, imunitní odpověď, parazit, imunita

## Abstract

Parasitic protozoans of the genus *Leishmania* circulate between vectors and hosts during their life cycle, in which they come into contact with the immune system. In the host body, infection can lead to the development of a disease called leishmaniasis. This can manifest itself in a number of ways, with the most basic forms being referred to as visceral, mucocutaneous and cutaneous leishmaniasis. This thesis focuses on the host immune response during the cutaneous and visceral forms of leishmaniasis. In addition, attention has been given to host, vector and parasite factors that differ between cutaneous and visceral leishmaniasis forms and that may influence the different clinical manifestations. Attention is paid not only to factors related to immunity, but also to factors such as parasite inoculum dose sizes, temperature differences between skin and internal organs, parasite genetics, and others.

**Keywords** – *Leishmania*, visceral leishmaniasis, cutaneous leishmaniasis, immune response, parasite, immunity

## Seznam zkratek

APC	antigen prezentující buňka (z anglického antigen presenting cell)
CCL	CC chemokinový ligand
CCR	CC chemokinový receptor
CL	kožní leishmanióza (z anglického cutaneous leishmaniasis)
DC	dendritická buňka (z anglického dendritic cell)
ECM	extracelulární matrix
gp63	glykoprotein 63
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (z anglického human immunodeficiency virus)
HSP	protein teplotního šoku (z anglického heat shock protein)
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
MMP	matrixová metaloproteináza
NETs	neutrofilní extracelulární pasti (z anglického neutrophil extracellular traps)
NOS	NO syntáza (syntáza oxidu dusnatého)
PGE2	prostaglandin E2
PKDL	post-kala-azarová dermální leishmanióza
RNS	reaktivní formy dusíku (z anglického reactive nitrogen species)
ROS	reaktivní formy kyslíku (z anglického reactive oxygen species)
Tc	cytotoxický T lymfocyt
TGF	transformující růstový faktor (z anglického transforming growth factor)
Th	pomocný T lymfocyt (z anglického T helper cell)
TNF	tumor nekrotizující faktor
Treg	regulační T lymfocyt
VL	viscerální leishmanióza

# Obsah

1	Úvod.....	1
2	Charakteristika rodu <i>Leishmania</i> .....	2
3	Obecná charakteristika imunitních buněk a dějů .....	5
3.1	Komplement .....	5
3.2	Neutrofilny (neutrofilní granulocyty).....	6
3.3	Makrofágy .....	7
3.4	Dendritické buňky .....	8
3.5	T lymfocyty .....	8
3.6	B lymfocyty .....	9
3.7	Cytokiny .....	9
4	Imunitní odpověď u kožní leishmaniózy .....	10
4.1	Vrozená imunita .....	10
4.2	Th lymfocyty .....	10
4.3	Treg lymfocyty .....	11
4.4	Tc lymfocyty.....	12
4.5	B lymfocyty .....	12
4.6	Cytokiny .....	13
5	Imunitní odpověď u viscerální leishmaniózy.....	15
5.1	Odpověď v játrech .....	15
5.1.1	Vrozená imunita.....	15
5.1.2	Získaná imunita (CD8+ a CD4+ buňky) .....	15
5.1.3	Cytokiny.....	16
5.2	Odpověď ve slezině .....	18
6	Faktory ovlivňující klinický obraz leishmaniózy.....	19
6.1	Inokulační dávka a jiné vektorové faktory .....	19

6.2	Produkce cytokinů .....	20
6.3	Migrace z kůže do orgánů .....	21
6.4	A2 protein a teplotní rozdíl .....	22
6.5	Imunodeficiencie .....	23
7	Závěr .....	25
8	Použitá literatura .....	26

# 1 Úvod

Parazitičtí prvoci z rodu *Leishmania* mohou po přenosu do hostitelů vyvolat onemocnění zvané leishmanióza. Doposud bylo celkově popsáno přibližně 50 druhů, které mohou kolovat v tělech nejen savců, ale i plazů. Leishmaniózu může u lidí vyvolat přibližně 20 různých druhů z rodu *Leishmania* (shrnutí v Akhoundi et al., 2016). Forem tohoto onemocnění je více a různé druhy leishmanií mohou vyvolávat různé formy. Dvě nejčastěji probírané formy jsou viscerální a kožní forma leishmaniózy, protože viscerální forma může být i smrtelná a kožní je nejběžnějším typem leishmaniózy (shrnutí v Burza et al., 2018).

Leishmanióza se je zdravotním problémem především v rozvojových zemích sužovaných hladem, nízkou úrovní bydlení a hygieny. Rizikovým faktorem může být například i stěhování neimunních populací do oblastí s vysokým výskytem onemocnění, např. v důsledku válečných konfliktů, sucha, hladomoru nebo záplav. Incidenci onemocnění může ovlivňovat i změna klimatu a s tím spojené geografické rozšíření přenašečů (shrnutí v Burza et al., 2018 a WHO, 2023). Světová zdravotnická organizace odhaduje, že se ročně vyskytne přibližně 700 000 až 1 000 000 nových případů leishmaniózy. Nových případů viscerální leishmaniózy je odhadován na 50 000 až 90 000 případů ročně, u kožní leishmaniózy je to odhadováno na 600 000 až 1 000 000 případů (WHO, 2023).

Mezi preventivní kroky proti šíření leishmanií patří včasná diagnóza a léčba, monitorování případů, edukace komunit zaměřených na změnu návyků, využívání insekticidů a moskytiér a další (WHO, 2023). Nicméně v oblasti prevence chybí efektivní vakcinace vůči lidské leishmanióze. K léčbě je dodnes využíváno jen velmi malé množství léků, které mají navíc spoustu vedlejších účinků, jsou toxické, nákladné, a navíc si na některé z nich leishmanie vytváří rezistenci. Potencionální léčbu představuje imunoterapie, která využívá inhibici případně podávání klíčových molekul imunitní odpovědi, což vede tělo k vytvoření efektivní odpovědi vůči patogenu (shrnutí v Sasidharan a Saudagar, 2021). Znalost imunitní odpovědi vůči leishmanióze je proto důležitá pro další výzkumy v této oblasti.

Cílem této bakalářské práce je shrnout poznatky týkající se imunitní odpovědi během kožní a viscerální formy leishmaniózy a zároveň se věnovat faktorům, které vedou k rozdílné patologii těchto dvou forem.



## 2 Charakteristika rodu *Leishmania*

Leishmanióza je označení pro skupinu nemocí vyvolaných parazitickými prvky z rodu *Leishmania*. Doposud bylo popsáno přes 50 druhů leishmanií, které se tradičně rozdělují na druhy Starého světa s převážným výskytem v jižní Asii, na Blízkém východě, v severovýchodní Africe nebo v Jižní Evropě a druhy Nového světa s výskytem v Jižní a Střední Americe (shrnutí v Akhoundi et al., 2016 a Burza et al., 2018). Přibližně 20 druhů leishmanií ze dvou podrodů (*Leishmania* a *Viannia*) může u člověka vyvolat leishmaniózu (shrnutí v Akhoundi et al., 2016 a Steverding, 2017). Mezi tyto druhy patří například *Leishmania major*, *L. tropica*, *L. donovani*, *L. infantum* nebo *L. aethiopica* ze Starého světa a *L. braziliensis*, *L. guynensis*, *L. mexicana* nebo *L. amazonensis* z Nového světa (shrnutí v Burza et al., 2018).

Životní cyklus leishmanií je dvouhostitelský cirkulující mezi hostitelem a vektorem. Roli hostitele plní převážně savci, včetně člověka, a vektorem jsou samice flebotomů, které se řadí mezi nematocerní hmyz z řádu Diptera (shrnutí v Sasidharan a Saudagar, 2021). Významné jsou rody *Phlebotomus* v zemích Starého světa a *Lutzomyia* v Novém světě, které přenášejí lidské leishmaniózy (shrnutí v Akhoundi et al., 2016).

Životní cyklus probíhá následovně: Během sání nakaženého přenašeče na hostiteli se do rány dostávají infekční stádia (metacykličtí promastigoti), která jsou pohlcována buňkami vrozené imunity, především makrofágy (shrnutí v Rossi a Fasel, 2018). Uvnitř buněk je leishmanie uzavřena do parazitoformní vakuoly, kde dochází k diferenciaci z formy promastigota s protáhlejším buněčným tělem a delším pohyblivým bičíkem na amastigota s nepohyblivým krátkým bičíkem (shrnutí v Sunter a Gull, 2017). Amastigoti se dále množí, až způsobí prasknutí infikované buňky a uvolněná stádia začnou napadat další buňky (shrnutí v Sasidharan a Saudagar, 2021). Poté, když vektor saje na infikovaném hostiteli, nasaje společně s krví i amastigoty. Uvnitř trávicího traktu flebotoma dojde vlivem změny pH a teploty k diferenciaci amastigotů na procyklického promastigota. Procyklický promastigot se nachází uvnitř peritrofické matrix v tzv. endoperitrofickém prostoru (shrnutí v Dostálová a Volf, 2012). Peritrofická matrix, složená z chitinu, proteoglykanů a dalších látek, odděluje epitel střev od pozřené potravy, čímž chrání epiteliální buňky před mechanickým a chemickým poškozením a patogeny (shrnutí v Erlandson et al., 2019). U flebotomů tato matrix vzniká v přímé reakci na pozření potravy a obaluje celý povrch tráveniny, čímž v pozdější fázi vytváří překážku pro leishmanie. Procyklický promastigot se uvnitř matrix dělí

a diferencuje na nektomonádní promastigoty charakteristické dlouhým tělem, dlouhým bičíkem a vysokou pohyblivostí. Peritrofická matrix vlivem enzymů praská a nektomonády unikají z endoperitrofického prostoru do lumen střev, aby se mohly pomocí bičíku zakotvit mezi mikroklky střevního epitelu, a zabránily tak nechtěnému vyloučení z těla společně se zbytky potravy (shrnutí v Dostálová a Volf, 2012). Nektomonády se v přední části střeva mění v leptomonádní promastigoty, kteří se dále diferencují v metacyklické promastigoty. Leptomonády se dokážou přeměňovat i v jiné stádium – haptomonády. Ty kolonizují a poškozují část trávicího ústrojí nazývanou stomodeální valva. I díky tomu se znesnadní průběh sání na hostiteli a dojde k refluxu potravy i nakažlivých metacyklických promastigotů přímo do rány obratlovce (shrnutí v Dostálová a Volf, 2012 a Sasidharan a Saudagar, 2021).

V závislosti na druhu leishmanie a dalších faktorech, mezi které patří například i stav imunitního systému, může nákaza u hostitelů vyústit v onemocnění s různými klinickými projevy. Nejčastějším a zároveň nejméně nebezpečným projevem je kožní neboli kutánní leishmanióza (CL), která se projevuje ulcerózními kožními lézemi v místě sání. V závislosti na druhu parazita se léze během několika měsíců až roků samy zhojí. Kožní leishmaniózy Starého světa způsobují např. *L. major*, *L. tropica* nebo *L. aethiopica*, v Novém světě to jsou druhy *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. guyanensis* atd. Některé druhy kožních leishmanií (např. *L. aethiopica*, *L. mexicana* nebo druhy podrodu *Viannia*) mohou vyvolat závažnější formy kožní leishmaniózy – diseminovanou, difúzní nebo recidivující kožní leishmaniózu. Přechodnou formou mezi kožní a viscerální leishmaniózou je kožně-slizniční (mukokutánní) forma, která se projevuje lézemi v oblasti nosní přepážky, rtů a měkkého patra, a jejíž vývoj může mít fatální následky (shrnutí v Burza et al., 2018).

Vážnější formou je viscerální leishmanióza (VL) vyvolaná především druhy *L. infantum* a *L. donovani* (synonymum pro *L. chagasi* v Novém světě) (shrnutí v Akhoundi et al., 2016). Hlavními místy výskytu jsou Indie a okolní státy, východ Afriky (Etiopie a sousední státy) a Jižní Amerika. Mezi projevy patří horečnaté stavy, zvětšení slinivky a jater, změny v krevním obrazu nebo úbytek hmotnosti. Bez léčby je tato forma leishmaniózy smrtelná. Po ukončení léčby VL způsobené většinou *L. donovani*, se u některých pacientů může vyvinout post-kala-azarová dermální leishmanióza (PKDL), která je charakteristická rozsáhlou kožní vyrážkou (shrnutí v Burza et al., 2018).

Pro shrnutí charakteristik hlavních druhů z rodu *Leishmania* viz Tabulka 1.

Tabulka 1 – Charakteristika hlavních zástupců rodu *Leishmania*

(převzato z Akhoundi et al., 2016 a Burza et al., 2018 - upraveno)

	Klinické projevy	Hlavní rezervoár	Přenašeči	Země/oblasti největšího zatížení
<i>L. donovani</i>	VL a PKDL	Lidé	Např. <i>P. argentipes</i> , <i>P. orientalis</i>	Indie, Bangladéš, Etiopie, Súdán, Jižní Súdán
<i>L. infantum</i> ( <i>L. chagasi</i> )	VL a CL	Psi, zajíci a lidé	Např. <i>P. permiciosus</i> , <i>P. major</i> , <i>Lu. longipalpis</i> , <i>Lu. cruzi</i>	Čína, jižní Evropa, Střední a Jižní Amerika (Brazílie)
<i>L. major</i>	CL	Hlodavci	Např. <i>P. duboscqui</i> , <i>P. papatasi</i>	Blízký východ (Írán, Saúdská Arábie), severní, střední a západní Afrika
<i>L. tropica</i>	CL, recidivující CL, vzácně VL	Lidé, ale výskyt i zoonotických ohnisek	Např. <i>P. sergenti</i> , <i>P. arabicus</i>	Blízký východ, severovýchodní a jižní Afrika
<i>L. aethiopica</i>	CL, diseminovaná, difúzní a oronazální CL	Damani	<i>P. longipes</i> , <i>P. pedifer</i> , <i>P. sergenti</i>	Etiopie a Keňa
<i>L. mexicana</i>	CL, diseminovaná a difúzní CL	Hlodavci a vačnatci	Např. <i>Lu olmeca olmeca</i> , <i>Lu. ovallesi</i>	Jižní Amerika
<i>L. amazonensis</i>	CL, diseminovaná a difúzní CL	Vačice a hlodavci	Např. <i>Lu. flaviscutellata</i> , <i>Lu. longipalpis</i>	Jižní Amerika
<i>L. braziliensis</i>	CL, difúzní a recidivující CL, mukokutánní leishmanióza	Psi, lidé, hlodavci a koně	Např. <i>Lu. whitmani</i> , <i>Lu. wellcomei</i>	Jižní Amerika
<i>L. guyanensis</i>	CL, diseminovaná CL, mukokutánní leishmanióza	Vačice, lenochodi a mravenečníci	Např. <i>Lu. umbratilis</i> , <i>Lu. anduzei</i>	Jižní Amerika

### 3 Obecná charakteristika imunitních buněk a dějů

Imunitní systém se skládá ze dvou složek – vrozeného imunitního systému (označovaného také jako antigenně nespecifický nebo neadaptivní) a systému získaného (také označovaný jako specifický nebo adaptivní). Obě tyto složky se rozdělují na humorální část, která zahrnuje různé rozpustné bílkoviny kolující v těle, a buněčnou část, která se skládá z několika typů buněk disponujících různými obrannými mechanismy. Jako první se v boji proti patogenům uplatňuje vrozený imunitní systém a jeden z prvních mechanismů, který se tohoto boje účastní je komplementový systém (shrnutí v Hořejší et al., 2017, str. 26).

#### 3.1 Komplement

Komplement je soubor přibližně 35 proteinů, jejichž prekurzory jsou vytvářeny v játrech, fibroblastech nebo dendritických buňkách a poté kolují tělem v inaktivní formě. Jakmile se v těle vyskytne infekce, komplement je aktivován třemi možnými cestami – klasickou, lektinovou nebo alternativní (shrnutí v Conde et al., 2022). Ať už je komplement aktivován jakkoliv, všechny cesty vedou k vytvoření komplexu zvaného C3 konvertáza, která štěpí molekulu C3 na molekuly C3a a C3b. Molekula C3b je důležitým opsoninem, ukládá se na povrch různých patogenů, zprostředkovává fagocytózu a spolu s dalšími molekulami vytváří C5 konvertázu. Ta dále štěpí molekuly C5 a interakcí s řadou dalších molekul je aktivován membránu atakující komplex (MAC), který způsobuje lýzu patogenu. Zároveň při štěpení některých komponentů vznikají vedlejší produkty (např. molekula C3a nebo C5a), které působí na receptory imunitních buněk a atrahují je do místa infekce (shrnutí v Conde et al., 2022).

Právě molekula C3 má pro nákazu leishmaniózou velký význam, protože leishmanie dokážou těžit z její chemotaktické a opsonizační funkce (Brittingham et al., 1995; Jacobs et al., 2005). Povrch leishmanií je opsonizován fragmenty C3 (Wozencraft a Blackwell, 1987). Molekula C3b i jeho fragment iC3b slouží jako ligandy receptorů CR3 a CR1, které se nacházejí na povrchu cílových buněk leishmanií (neutrofilů a především makrofágů) a jejichž prostřednictvím dochází k fagocytóze (Laufs et al., 2002; Rosenthal et al., 1996). Zároveň je aktivace přes receptory CR3 a CR1 neúčinná v aktivaci oxidačního vzplanutí, které je efektivní v intracelulárním ničení leishmanií (Wright a Silverstein, 1983). Tato pro leishmanie výhodná role komplementu byla dokázána i v *in vivo* studii s *L. chagasi*. V nepřítomnosti komplementu byla míra fagocytózy leishmanií nižší a jejich intracelulární ničení efektivnější, protože došlo k aktivaci oxidačního vzplanutí prostřednictvím receptorů

nezávislých na komplementu. Nepřítomnost komplementu měla účinek i na šíření leishmanií do orgánů – v orgánech byli pozorováni neživotaschopní amastigoti *L. chagasi* (Laurenti et al., 1996).

I přes určité výhody, které komplement leishmaniím poskytuje v úspěšném infikování hostitele a mechanismy, kterými dokážou leishmanie komplement obejít, Domínguez et al., 2002 odhadují, že téměř 90 % infekčních promastigotů je zabito komplementovým systémem už po několika málo minutách v těle hostitele (Domínguez et al., 2002).

### **3.2 Neutrofilny (neutrofilní granulocyty)**

Prvními buňkami, které jsou přitahované do místa infekce způsobené leishmaniemi jsou neutrofilní granulocyty neboli neutrofilny, které jsou poté následované vlnou monocytů/makrofágů (Laurenti et al., 1996; Peters et al., 2008; Thalhoffer et al., 2011). Neutrofilny jsou vrozené imunitní buňky, které disponují řadou intracelulárních i extracelulárních mechanismů, které se uplatňují v boji proti patogenům. Jsou schopné fagocytózy, během které je pohlcený patogen uzavřen do fagosomu. Na povrchu fagosomu dojde k sestavení a aktivaci enzymu NADPH oxidázy, která dále přeměňuje  $O_2$  a NADPH (produkt buněčného metabolismu) na superoxidový anion  $O_2^-$ , který může být dále přetvářen na peroxid vodíku  $H_2O_2$ . Superoxidový anion i peroxid vodíku jsou označovány jako reaktivní formy kyslíku (ROS) a jejich účinkem dochází k poklesu pH v parazitoformní vakuole a k ničení patogenních struktur. Tento děj je označován jako oxidační nebo také respirační vzplanutí (shrnuto v Ganeshan a Chawla, 2014).

V cytoplazmě neutrofilů se nachází několik typů granul, která jsou vyplněna různými enzymy. Na základě podnětů granula fúzí s cytoplazmatickou membránou a vyplavují enzymy do extracelulárních prostorů za účelem ničení patogenů vně buňky. Tento děj se nazývá degranulace. Další možností je splývání granul s membránou fagosomu. V primárních neboli azurofilních granulích se nacházejí především antimikrobiální enzymy. Dále můžeme v neutrofilech najít sekundární (specifická) a terciální granula, jejichž enzymy se účastní oxidačního vzplanutí (shrnuto v Yin a Heit, 2018).

Dalším mechanismem, který neutrofilny využívají v boji proti patogenům je tvorba neutrofilních extracelulárních pastí (NETs) během procesu zvaného NETóza. Jedná se o speciální typ programované buněčné smrti. Při NETóze dochází k uvolňování DNA z jádra

buňky, která společně s histony a proteiny z granul vytváří síť, do které jsou zachycovány a následně ničeny patogeny (shrnuto v Thiam et al., 2020).

Role neutrofilů je při nákaze leishmaniózou poněkud kontroverzní, protože leishmanie dokážou obejít některé jejich obranné mechanismy, např. povrchová molekula leishmanií, lipofosfoglykan, chrání leishmanie před oxidačním vzplanutím (Brandonisio et al., 1994) nebo antimikrobiálními peptidy v NETs (Gabriel et al., 2010). Splývání granul s fagosomem bylo dokázáno u *L. major* a *L. donovani*, ovšem bylo pozorováno pouze splývání primárních granul (Mollinedo et al., 2010), která kromě jiného obsahují i enzym arginázu (Munder et al., 2005), která podporuje proliferaci leishmanií (Inieta et al., 2001). V tomto smyslu je pro leishmanie neutrofil výhodný a představuje jen jakési útočiště před nepříznivým extracelulárním prostředím (shrnuto v Ribeiro-Gomes a Sacks, 2012). Může tomu nasvědčovat i fakt, že samotné leishmanie produkují chemotaktické látky, které umožňují snadnější přístup k neutrofilům. Promastigoti kožních i viscerálních leishmanií vypouštějí molekulu LCF (chemotaktický faktor leishmanií), která se váže na receptor lipoxinu A4 na povrchu neutrofilů, a tím dochází k jejich chemotaxi (van Zandbergen et al., 2002). Leishmanie po pohlcení indukují v neutrofilech tvorbu interleukinu-8 (IL-8) a dalších chemotaktických látek, které působí na neutrofile i jiné imunitní buňky, např. makrofágy (Marques et al., 2015; van Zandbergen et al., 2002). Chemotaxe neutrofilů tedy vede k další chemotaxi imunitních buněk (van Zandbergen et al., 2002). Neutrofile tak mohou sloužit jako prostředek, kterým se leishmanie může dostat blíž k cílovým makrofágům.

Zároveň leishmanie využívají apoptózy neutrofilů a vlastnosti makrofágů tyto mrtvé buňky odstraňovat. Mechanismus „trojského koně“ popisuje fagocytózu apoptotických tělísek neutrofilů i s leishmaniemi (van Zandbergen et al., 2004). Uvolnění živých leishmanií z apoptotických neutrofilů následované fagocytózou makrofágy bylo pozorováno ve studii Peters et al., 2008. Tento mechanismus byl později nazván jako „trojský králík“ (Ritter et al., 2009). Tyto mechanismy byly podpořeny dalšími studiemi. Například *L. major* (Aga et al., 2002) a *L. donovani* (Gueirard et al., 2008) dokážou oddálit apoptózu neutrofilů o 24 až 48 hodin, dokud do místa infekce nenamigují makrofágy. Fagocytóza apoptotických neutrofilů vede ke zvýšenému počtu infikovaných makrofágů (Afonso et al., 2008).

### **3.3 Makrofágy**

Makrofágy jsou hlavní cílové buňky leishmanií, ve kterých probíhá diferenciace v amastigoty následovaná replikací (shrnuto v Rossi a Fasel, 2018). Podobně jako neutrofile,

i makrofágy jsou schopné fagocytózy a uzavírání leishmanií do fagosomu. Makrofágy produkují kromě ROS i oxid dusnatý NO, který se řadí mezi RNS (reaktivní formy dusíku). Hlavním enzymem, který se tvorby NO účastní je NOS (syntáza oxidu dusnatého) (shrnutí v Rossi a Fasel, 2018). Důležitými stimulanty tvorby NOS jsou cytokiny interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) a tumor nekrotizující faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), které jsou produkty populace pomocných T lymfocytů (shrnutí v Hořejší et al., 2017, str. 41).

### 3.4 Dendritické buňky

Dendritické buňky (DC) během imunitní odpovědi plní roli tzv. APC buněk (antigen prezentující buňky). Tyto buňky se nacházejí v krevním a lymfatickém oběhu a v různých tkáních včetně kůže, kde monitorují okolí a pohlcují antigenní částice. Po setkání s antigenem se DC aktivují a putují z tkání do lymfatických orgánů (lymfatických uzlin a dalších sekundárních lymfatických orgánů), kde prezentují pohlcené antigeny T lymfocytům, čímž je aktivují. Díky APC funkci se DC označují za spojky mezi vrozenou a získanou imunitní odpovědí (shrnutí v Hořejší et al., 2017, str. 43-44).

### 3.5 T lymfocyty

Mezi buňky získané imunity se řadí T lymfocyty a B lymfocyty. Lymfocyty vytvářejí obrovské množství unikátních receptorů, které rozeznávají specifické antigeny. Humorální složkou získané imunity jsou protilátky (shrnutí v Hořejší et al., 2017, str. 25,32).

T lymfocyty na svém povrchu nesou nejen antigenně specifický receptor, ale i koreceptor CD4 nebo CD8. Dle toho se také dají dělit na CD8<sup>+</sup> T lymfocyty a CD4<sup>+</sup> T lymfocyty. Po setkání s DC a rozeznání specifického antigenu prostřednictvím svého receptoru se T lymfocyty aktivují a diferencují. CD8<sup>+</sup> T lymfocyty tvoří populaci cytotoxických T lymfocytů (Tc). CD4<sup>+</sup> T lymfocyty, které vytvářejí populace pomocných T lymfocytů (Th). Populace Th lymfocytů se dále rozděluje na základě produkovaných cytokinů například na Th1 buňky, Th2 buňky, regulační T lymfocyty (Treg) a další. Th1 buňky jsou charakteristické produkcí IFN- $\gamma$  a IL-2, Th2 buňky produkují hlavně IL-4, IL-5, IL-6 a IL-10 a Treg jsou zdrojem IL-10 a transformujícího růstového faktoru- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Tyto diferencované lymfocyty se navzájem ovlivňují a regulují prostřednictvím produkce cytokinů. Vývoj Th1 odpovědi a produkce IFN- $\gamma$  inhibuje Th2 odpověď, a naopak produkce cytokinu IL-4 Th2 buňkami inhibuje vývoj Th1 buněk (shrnutí v Dong, 2021 a Hořejší et al., 2017 str. 135-136,140).

### 3.6 B lymfocyty

B lymfocyty jsou významné především díky schopnosti produkovat protilátky neboli imunoglobuliny (Ig) specifické pro daný patogen. Tyto protilátky se poté vážou na povrch patogenů a způsobují jejich neutralizaci (navázání na epitopy patogenů, čímž znemožňují vázání patogenů na povrch cílových buněk nebo vstup do nich), opsonizaci (zlepšování fagocytózy imunitními buňkami) nebo mohou aktivovat komplementový systém klasickou cestou (shrnutí v Hořejší et al., 2017, str. 153,160-161).

### 3.7 Cytokiny

Imunitní buňky i tkáňové buňky sekretují molekuly zvané cytokiny, díky kterým mezi sebou buňky komunikují a vytvářejí optimální imunitní odpovědi. Mezi cytokiny se řadí interleukiny (IL; regulují vývoj imunitní odpovědi a aktivaci imunitních buněk), chemokiny (CC, CXC; regulují migraci buněk), interferony (IFN; regulují imunitní odpověď a neadaptivní obranné mechanismy) a další. Klasifikace cytokinů je složitější a dá se dělit podle několika aspektů. Podle funkce je můžeme například dělit na prozánětlivé (podporují zánětlivou reakci) a protizánětlivé cytokiny (inhibují zánětlivou reakci). Mezi prozánětlivé se řadí IFN, TNF, IL-12, IL-8 a další, mezi protizánětlivé se řadí například IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ . Funkcí cytokinů je více a jednotlivé cytokiny mohou spadat do vícero skupin (shrnutí v Hořejší et al., 2017, str. 100-108).



## 4 Imunitní odpověď u kožní leishmaniózy

### 4.1 Vrozená imunita

Neutrofilů jsou první buňky, které jsou přitahované do místa infekce (Peters et al., 2008). Ačkoliv neutrofilů disponují obrannými mechanismy v podobě ROS, NETs nebo granul, jejich přítomnost spíše podporuje infekci leishmaniózy (viz kapitola 3 – Obecná charakteristika imunitních buněk a dějů). Pohlcením infikovaných apoptotických neutrofilů může docházet k infikování makrofágů i DC (Ribeiro-Gomes et al., 2012; van Zandbergen et al., 2004). Fagocytózou apoptotických neutrofilů navíc dochází k zvýšené produkci protizánětlivého cytokinu TGF- $\beta$  v makrofázích (van Zandbergen et al., 2004) nebo k supresi APC funkce DC v počáteční infekce, která inhibuje aktivaci Th buněk (Ribeiro-Gomes et al., 2012).

Makrofágy jsou cílovými buňkami leishmanií, ve kterých dochází k replikaci amastigotů leishmanií. Jejich účinnou zbraní v zabíjení leishmanií je produkce ROS a RNS (shrnuto v Rossi a Fasel, 2018). Účinnost reaktivních forem v zabíjení druhů CL se může lišit. Zatímco ničení *L. amazonensis* vyžaduje souhru obou reaktivních forem (Mukbel et al., 2007), ničení *L. major* v kůži a lymfatických uzlinách je spíše závislé na produkci NO (Liese et al., 2008). Nedostatek enzymu NOS, a tedy i nedostatečná produkce NO, navíc vede k rozšíření infekce *L. major* do orgánů (Diefenbach et al., 1998).

Hlavní role dendritických buněk v případě infekce *L. major* spočívá v produkci IL-12 a v prezentování antigenů T lymfocytům v lymfatických uzlinách (von Stebut et al., 1998). Tím dochází k diferenciaci v Th1 buňky (Park et al., 2000), které produkují IFN- $\gamma$ . Produkce IFN- $\gamma$  poté vede ke zpětné aktivaci makrofágů, produkci NO a ničení parazitů nejen kožní, ale i viscerální leishmaniózy (Assreuy et al., 1994; Panaro et al., 1999). DC mohou produkcí IL-12 také aktivovat NK buňky, které jsou též producenti IFN- $\gamma$  a ovlivňují diferenciaci T lymfocytů (Bajénoff et al., 2006; Liese et al., 2008).

### 4.2 Th lymfocyty

Polarizace Th1/Th2 odpovědi hraje při nákaze CL důležitou roli. Na myších modelech bylo dokázáno, že diferenciaci T lymfocytů v Th1 buňky vede k produkci IFN- $\gamma$  a odolnosti vůči nákaze *L. major*, zatímco vývoj v Th2 odpověď vede k náchylnosti na infekci (Scott, 1991).

Ve studiích s pacienty s diagnostikovanou CL, která byla vyvolaná *L. major*, *L. braziliensis*, *L. guynensis*, byly ale pozorované směsi cytokinů Th1 i Th2 odpovědi, jejichž zastoupení se ale v čase měnilo (Baratta-Masini et al., 2007; Bourreau et al., 2003; Castellano et al., 2009). V počátcích infekce byla hladina protizánětlivých cytokinů IL-4, IL-10 a TGF- $\beta$  vyšší. Tento stav umožňuje růst a množení leishmanií a je spojen s rozvojem nemoci. S postupem infekce došlo k navýšení produkce cytokinů Th1 na úkor Th2. Zvýšené hladiny IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  mají za následek aktivaci makrofágů a zamezení šíření nemoci (Baratta-Masini et al., 2007; Castellano et al., 2009).

U asymptomatických jedinců byla rovněž pozorována směs cytokinů Th1 i Th2 odpovědi (Baratta-Masini et al., 2007). Dále byl pozorován jiný poměr mezi IFN- $\gamma$  a IL-10 u asymptomatických jedinců a pacientů, u kterých došlo k vývoji CL v důsledku nákazy *L. braziliensis*. U asymptomatických pacientů byl poměr vyrovnanější (Bittar et al., 2007). Autoři se proto domnívají že klinický obraz CL, resp. rezistence vůči infekci, u lidí je dána spíše rovnováhou mezi Th1 a Th2 cytokiny, než rozvojem jedné či druhé odpovědi, jako tomu je u myších modelů (Baratta-Masini et al., 2007; Bittar et al., 2007).

### 4.3 Treg lymfocyty

Akumulace regulačních T lymfocytů v kůži byla pozorovaná u myších modelů (Belkaid et al., 2002) i pacientů s CL (Bourreau et al., 2009). Treg prostřednictvím produkce IL-10 suprimují efektorové funkce jiných T lymfocytů, což následně vede ke snížení hladiny IFN- $\gamma$  a přetrvávání leishmanií v kůži. Naopak neutralizací IL-10 dochází k navýšení tvorby IFN- $\gamma$  (Bourreau et al., 2009). Zajímavou částí studie bylo porovnávání hladin mRNA transkripčního faktoru Foxp3 typického pro Treg v lézích starších a mladších než 1 měsíc. Ve starších lézích byla pozorována nižší hladina Foxp3 než v novějších lézích. Opačný stav nastal u hladin mRNA IFN- $\gamma$  (starší léze obsahovaly více IFN- $\gamma$  než ty nové) (Bourreau et al., 2009). Tato pozorování mohou souviset se změnou polarizace Th1/Th2 odpovědi, která byla pozorovaná u pacientů s CL (Bourreau et al., 2003). Snížením množství Treg a jimi produkovaných supresivních cytokinů může dojít ke zvýšení produkce IFN- $\gamma$  a překlopení odpovědi Th2 v odpověď Th1 (Bourreau et al., 2009). Větší množství Treg bylo také zaznamenáno v hůře hojených kožních lézích způsobených *L. guynensis* (Bourreau et al., 2009). Treg tedy mohou svou supresivní funkcí ovlivňovat patologii kožní leishmaniózy.

#### 4.4 Tc lymfocyty

Dalšími T lymfocyty, které se akumulují v kožních lézích jsou cytotoxické T lymfocyty (Santos et al., 2013). Ačkoliv jsou Th1 buňky považovány za hlavní zdroj IFN- $\gamma$  (Santos et al., 2013) i Tc buňky jsou jeho důležitým producentem (Rostami et al., 2010). Tc jsou kromě produkce cytokinů důležité kvůli jejich cytotoxické funkci, kterou v buňkách indukují apoptózu prostřednictvím enzymů perforinu a granzymů, jako tomu je např. při infekci *L. mexicana* (Hernández-Ruiz et al., 2010). Apoptóza může být vyvolána i interakcí Fas receptoru s Fas ligandem nebo prostřednictvím cytokinu lymfotoxinu (shrnutí v Hořejší et al., 2017, str. 146).

Tc mohou produkcí IFN- $\gamma$  přispět k nastolení Th1 odpovědi (Uzonna et al., 2004). Dále mohou svou cytokinovou produkcí a cytotoxickou aktivitou přispět k lokalizaci infekce. V případě lokalizované infekce *L. mexicana* byla aktivita CD8+ buněk větší oproti diseminované formě (Hernández-Ruiz et al., 2010).

Na druhou stranu se Tc podílejí na poškození tkáně (Santos et al., 2013). Produkce perforinu a granzymů CD8+ buňkami, popř. NK buňkami, může přispívat k tvorbě ulcerujících kožních lézí a nekróze. Mimochodem dále tomu může napomáhat i nadměrná produkce prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$  (Saldanha et al., 2020).

#### 4.5 B lymfocyty

B lymfocyty během nákazy kožní leishmaniózou spíše podporují vývoj infekce. Spojitost mezi B lymfocyty a náchylností na infekci byla prokázána na BALB/c myších s deficitem B lymfocytů, které byly schopné kontroly kožních lézí (Sacks et al., 1984). Výsledky další studie, během které byly také využité deficitní myši, ukazují, že léze obsahovaly méně parazitů *L. major* v porovnání s infikovanými kontrolními myšmi (Ronet et al., 2008). Pokud ale deficitním myším byly inokulovány B lymfocyty došlo k vývoji progresivních lézí podobných těm, které vznikaly u kontrolních myší (Ronet et al., 2008).

Vývoj infekce mohou B lymfocyty podpořit i prostřednictvím produkce imunoglobulinů nebo cytokinů. Byla pozorovaná vazba IgG na povrchu amastigotů *L. major* získaných z kožních lézí. Jejich vazba na Fc receptor makrofágů podpořila tvorbu IL-10, která následně vedla k inhibici IL-12 a TNF- $\alpha$  (Kane a Mosser, 2001). K podobným výsledkům došla i studie Buxbaum a Scott, 2005, kteří také pozorovali tvorbu IL-10 v makrofázích po interakci s *L. mexicana*. Ti dále zjistili, že buňky myší, kterým chyběl receptor pro IgG, produkovaly

méně IL-10 a více IFN- $\gamma$  než kontrolní myši (Buxbaum a Scott, 2005). Také samotné B lymfocyty mohou produkovat IL-10, který snižuje produkci IL-12 (Ronet et al., 2010).

## 4.6 Cytokiny

IFN- $\gamma$  patří mezi hlavní cytokiny produkované při Th1 odpovědi. Jeho účinkem dochází k aktivaci makrofágů a produkci NO (Assreuy et al., 1994). Ačkoliv je produkce IFN- $\gamma$  důležitá (Souza-Neto et al., 2004), Melby et al., 1994 se domnívají, že samotná produkce IFN- $\gamma$  není dostatečná pro zvládnutí infekce CL. Důležitými jsou i další prozánětlivé cytokiny, např. IL-12 a TNF- $\alpha$  (Castellano et al., 2009).

IL-12 je nezbytný pro aktivaci Th1 buněk (von Stebut et al., 1998) a deficience tohoto cytokinu u myši vykazuje při nákaze *L. major* zvýšenou parazitární zátěž doprovázenou sníženou hladinou IFN- $\gamma$  (Mattner et al., 1997). Při infekci *L. braziliensis* vedl nedostatek IL-12 dokonce k šíření parazitů do orgánů (Souza-Neto et al., 2004).

TNF- $\alpha$  spolu s IFN- $\gamma$  působí na makrofágy, ve kterých indukují tvorbu NO (Liew et al., 1990). U pacientů s mukokutánní leishmaniózou byla pozorována vyšší produkce TNF- $\alpha$  než u pacientů s CL (Da-Cruz et al., 1996). To vedlo autory k domněnce, že kromě jeho role, kterou zastává při léčení lézí, se jeho zvýšená přetrvávající produkce může podílet na poškození tkání a způsobovat horší klinické projevy (Da-Cruz et al., 1996). Tuto domněnku podporuje pozorování snižování hladiny TNF- $\alpha$  po vyléčení lokalizované CL (Castellano et al., 2009).

Keratinocyty – nejhojnější typ kožních buněk, které mohou produkovat do extracelulárního prostoru řadu látek zahrnující cytokiny, antimikrobiální peptidy, enzymy a další (shrnutí v El-Serafi et al., 2022) – mohou být v malém množství infikované leishmaniemi (Scorza et al., 2017). *L. major* v těchto buňkách indukuje produkci IL-4, což není pozorováno po infekci viscerálním druhem *L. infantum* (Scorza et al., 2017). IL-4 je cytokin charakteristický pro Th2 odpověď a je spojován s náchylností na infekci leishmaniózou (Scott, 1991), nicméně byla odhalena i jeho opačná role, která může vést ke kontrole kožní leishmaniózy (Ehrchen et al., 2010). Jeho exprese byla zaznamenána u keratinocytů časně po infekci *L. major*. Tato časná produkce nevedla k vytvoření Th2 odpovědi, ale podpořila diferenciaci T lymfocytů v Th1 buňky. Změna z Th1 v Th2 odpověď nastala po lokální neutralizaci IL-4 prostřednictvím imunoglobulinů (Ehrchen et al., 2010). Již dříve bylo zjištěno, že IL-4 podporuje tvorbu IL-12 v DC (Hochrein et al., 2000), která

následně vede k vývoji Th1 odpovědi (Biedermann et al., 2001). Z toho důvodu byla vyslovena hypotéza, že časná tvorba IL-4 v místě sání flebotomů působí na DC, které po migraci do lymfatických uzlin mohou formovat Th1 odpověď prostřednictvím produkce IL-12 (Ehrchen et al., 2010). Účast IL-4 na vývoji Th1 odpovědi a zvýšené expresi IFN- $\gamma$  byla pozorována pouze pokud byl cytokin přítomen při aktivaci DC, pokud byl IL-4 přítomen při aktivaci T lymfocytů, došlo k vývoji Th2 odpovědi (Biedermann et al., 2001).

## 5 Imunitní odpověď u viscerální leishmaniózy

### 5.1 Odpověď v játrech

#### 5.1.1 Vrozená imunita

Kupferovy buňky tvoří populaci residentních makrofágů v játerních sinusoidech (shrnutí v Nguyen-Lefebvre a Horuzsko, 2015). Ačkoliv jsou právě tyto buňky jednou z cílových populací buněk, které napadají druhy VL (shrnutí v McCall et al., 2013), podle nedávné studie s *L. infantum* jsou Kupferovy buňky účinnější v ničení parazitů než krevní makrofágy, které naopak vytvářejí příznivé prostředí pro šíření leishmanií do orgánů (Rodrigues et al., 2022). Murray a Nathan, 1999 se ve své studii zabývali parazitární zátěží *L. donovani* v játrech myši, které měly narušené kaskády vzniku ROS a RNS. Počet parazitů byl vyšší v obou typech deficitních myši v porovnání s kontrolními myši. Zatímco u myši s nedostatkem ROS s postupem času docházelo k likvidaci parazitů, u myši s deficitem RNS docházelo k nárůstu množství parazitů. Spíše než produkce ROS je důležitější tvorba RNS, která vede k likvidaci parazitů (Murray a Nathan, 1999).

V játrech v reakci na infekci viscerální leishmaniózou vznikají útvary nazývané jako granulomy (McElrath et al., 1988) a právě infikované fúzíující Kupferovy buňky z játerních sinusoidů vytvářejí základ těchto granulomů (Beattie et al., 2010; shrnutí v Murray, 2001). Deficience RNS a ROS v makrofázích způsobila opožděnou tvorbu a zrání granulomů (Murray a Nathan, 1999). Do jater jsou dále prostřednictvím chemokinů přitahované imunitní buňky (Cotterell et al., 1999), které začnou obklopotvat Kupferovy buňky. Jedny z prvních jsou granulocyty (neutrofilů a eozinofilů) a monocyty (McElrath et al., 1988). Ve studii Terrazas et al., 2017 bylo prokázáno, že i neutrofilů a především zánětlivé monocyty v granulomech mohou být infikované *L. donovani*, a dokonce ve větší míře než rezidenční makrofágy (Terrazas et al., 2017). Inhibice chemoatraktivního receptoru CCR2 ovlivnila chemoatrakci zánětlivých monocytů a následně vedla ke sníženému počtu parazitů v játrech i slezině (Terrazas et al., 2017). Nedostatek monocytů a neutrofilů v granulomech také vede ke zpomalené tvorbě a zrání granulomů (Cervia et al., 1993; McFarlane et al., 2008). Dále se ke granulomům přidává směs CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> buněk a B lymfocyty (McElrath et al., 1988).

#### 5.1.2 Získaná imunita (CD8<sup>+</sup> a CD4<sup>+</sup> buňky)

Účast Tc a Th buněk na tvorbě granulomů je důležitá. Populace rezidenčních T lymfocytů v játrech podporují tvorbu granulomů přímo i nepřímo produkcí chemokinů,

kteře působí na populace imunitních buněk přitahovaných do jater (Cotterell et al., 1999). Myši infikované *L. donovani*, které postrádají T lymfocyty, popř. je funkce T lymfocytů inhibována prostřednictvím protilátek, vykazují v játrech menší produkci prozánětlivých i protizánětlivých cytokinů, která se i projevuje ve zvýšené parazitární zátěži a neschopnosti tvořit granulomy (Engwerda et al., 1996; Stern et al., 1988). Podstatné jsou obě populace CD4+ i CD8+. Inokulace CD4+ i CD8+ buněk do deficitních myši má za následek zvýšení produkce IFN- $\gamma$  (Stern et al., 1988).

CD8+ lymfocyty se podílejí na tvorbě granulomů, ve kterých můžou i převyšovat počty CD4+ buněk (McElrath et al., 1988). V granulomech přicházejí do kontaktu s Kupfferovými buňkami, které jim prezentují antigeny. Kupfferovy buňky jsou dokonce považované za jediné antigen prezentující buňky pro CD8+ lymfocyty v jaterních granulomech (Beattie et al., 2010). Role CD8+ buněk po kontaktu s antigenem spočívá v cytotoxické aktivitě (skrze produkci perforinu i Fas/FasL interakce), produkci chemokinů a prozánětlivých cytokinů (IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$ ), jak bylo zjištěno v odpovědi na infekci *L. infantum* (Tsagozis et al., 2003). Důležitost těchto buněk dokazuje také experiment zahrnující inokulaci CD8+ buněk do myši infikovaných *L. donovani*, která způsobila snižování počtu parazitů (Polley et al., 2006).

### 5.1.3 Cytokiny

Hlavní příspěvek CD4+ buněk spočívá v produkci širokého spektra Th1 i Th2 cytokinů, které je produkováno v játrech v reakci na infekci (Miralles et al., 1994). Na rozdíl od kožní leishmaniózy, kde je v BALB/c myších Th2 odpověď zodpovědná za horší průběh nemoci (Scott, 1991), v případě viscerální leishmaniózy není indukce Th2 odpovědi v játrech dostatečně silná, aby potlačila účinky Th1 cytokinů, především co se týče IL-4 (Miralles et al., 1994).

Z prozánětlivých cytokinů se uplatňují především IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$ . Použití protilátek proti IL-2 negativně ovlivnilo vývoj granulomů (Murray et al., 1993). Naopak exogenní podávání IL-2 redukovalo množství *L. donovani*, díky jeho vlivu na zvyšování exprese IFN- $\gamma$  (Murray et al., 1993). Obdobně byla také charakterizovaná role IL-12. Použití protilátek proti IL-12 odhalilo jeho vliv na zvyšování produkce IFN- $\gamma$  a lepší vývoj granulomů (Murray, 1997). IL-12 má vliv i na obranné mechanismy nezávislých na IFN- $\gamma$ . IL-12 zprostředkuje produkci NO prostřednictvím stimulace TNF- $\alpha$  (Taylor a Murray, 1997).

Funkce IFN- $\gamma$  je velice důležitá hlavně v prvních týdnech vývoje imunitní odpovědi v játrech proti *L. donovani*, jak bylo prokázáno ve studiích využívajících geneticky modifikované myši deficitní na IFN- $\gamma$  nebo protilátky proti IFN- $\gamma$ . V obou případech vedl nedostatek IFN- $\gamma$  k drastickému vzestupu parazitární zátěže v játrech a k narušenému zrání granulomů (Squires et al., 1989; Taylor a Murray, 1997). S postupem infekce se k IFN- $\gamma$  přidává TNF- $\alpha$ , který je zodpovědný za snižování parazitární zátěže v pozdějších fázích infekce (Taylor a Murray, 1997). Využití protilátek proti TNF- $\alpha$  vedlo ke zvýšení množství parazitů v porovnání s kontrolní skupinou, nicméně nebyl pozorován vliv na vývoj granulomů (Tumang et al., 1994).

Protektivní role byla při nákaze VL prokázána u protizánětlivých cytokinů IL-4 a IL-13, které jsou v případě CL spojované s náchylností na infekci (viz kapitola 4 – Imunitní odpověď u kožní leishmaniózy). Myši s nedostatkem receptoru pro IL-4 a IL-13 vykazovaly zvýšenou parazitární zátěž a opožděné zrání granulomů (Stäger et al., 2003). V novějších studiích bylo potvrzeno, že cytokiny IL-4 a IL-13 mají skutečně na nákazu viscerální leishmaniózou pozitivní vliv. Bylo také zjištěno, že tato protektivní role cytokinů není zprostředkována makrofágy, neutrofilů ani T lymfocyty (McFarlane et al., 2019, 2011). Autoři vyřkli hypotézu, že by IL-4 a IL-13 mohly působit na DC, ve kterých IL-4 i IL-13 indukuje tvorbu IL-12 (Hochrein et al., 2000; McFarlane et al., 2011), což zprostředkovává vývoj Th1 odpovědi, jak bylo též popsáno u časně infekce *L. major* (Biedermann et al., 2001). Stäger et al., 2003 ve své studii také objevili, že nedostatek receptoru pro IL-4 a IL-13 vede kromě horšího průběhu nemoci i ke zvýšené expresi NOS buňkami na okraji granulomů. Autoři se domnívají, že přínos IL-4 a IL-13 spočívá v regulaci produkce NO, která by ve vysokých hodnotách mohla lokálně narušit produkci IFN- $\gamma$  T lymfocyty, což by vedlo ke zvýšené parazitární zátěži (Stäger et al., 2003).

Experimenty s dalšími protizánětlivými cytokiny zjistily, že jejich přítomnost negativně ovlivňuje vývoj infekce. Tyto cytokiny, jako je například IL-6, IL-10 nebo TGF- $\beta$ , ovlivňují produkci IFN- $\gamma$  (Murphy et al., 2001; Murray, 2008; Wilson et al., 2002). IL-10 byl označen za nejdůležitější regulační cytokin, který podporuje infekci VL (Bacellar et al., 2000; Murphy et al., 2001). Jeho vlivem dochází k redukci množství IL-12, IFN- $\gamma$  a produkce NO. V případě odstranění IL-10 došlo k výraznému poklesu parazitů v játrech (Murphy et al., 2001).



## 5.2 Odpověď ve slezině

Nákaza viscerální leishmaniózou je ve slezině charakterizovaná narušenou vnitřní strukturou a splenomegalií, způsobenou fibrózou tkáně a infiltrací buněk (Saha et al., 1991). U pacientů, kteří nemoci podlehli, byla zaznamenaná redukce bílé pulpy, nekróza a fibróza folikulů a ztráta lymfocytů (Veress et al., 1977).

Hlavní cílové buňky leishmanií ve slezině jsou populace makrofágů, které se nacházejí v marginální zóně (Gorak et al., 1998). Marginální zóna odděluje oblasti nazývané červená a bílá pulpa, která je bohatá na T lymfocyty (T-zóna) a B lymfocyty (B-zóna, folikuly). Marginální zóna obsahuje kromě makrofágů i DC a B lymfocyty marginální zóny (shrnutí v Mebius a Kraal, 2005).

DC pozorované v oblasti bílé pulpy jsou důležitými producenty IL-12 v odpovědi na infekci *L. donovani* (Gorak et al., 1998). DC po styku s antigenem migrují za účasti chemokinů CCL21 a CCL19 z marginální zóny do T-zóny, kde aktivují T lymfocyty (Ato et al., 2006). V pozdější fázi infekce *L. donovani* byla pozorovaná narušená migrace DC. Migrační pokles nastal v důsledku snížené exprese receptoru CCR7 na povrchu DC, který váže chemokiny CCL21 a CCL19 (Ato et al., 2002). Narušení mechanismů migrace DC a aktivace a diferenciací T lymfocytů má vliv i na infekci v játrech – opoždí zrání granulomů (Ato et al., 2006). Ato et al., 2002 dále zjistili, že za sníženou expresi CCR7 je zodpovědná produkce cytokinů TNF- $\alpha$  a IL-10. Cytokin TNF- $\alpha$  je také přisuzován vliv na narušení vnitřní struktury sleziny. Vlivem TNF- $\alpha$  dochází k redukci makrofágů marginální zóny (Engwerda et al., 2002) a buněk retikulární tkáně (Ato et al., 2002), což vede k remodelaci tkáně (Engwerda et al., 2002). Pokles buněk není způsoben cytotoxickou aktivitou CD8+ buněk ani Fas/FasL interakcemi (Engwerda et al., 2002).

## 6 Faktory ovlivňující klinický obraz leishmaniózy

Co stojí za rozdílnými klinickými projevy? Pokusit se odpovědět na tuto otázku je jeden z hlavních cílů této práce.

Jedna z možných odpovědí by mohla být, že za rozdílnými projevy stojí samotná genetika leishmanií. Ve studiích porovnávajících druhy *L. major*, *L. braziliensis*, *L. mexicana* a *L. infantum* bylo ale zjištěno jen malé množství druhově specifických genů v porovnání s celkovou kapacitou genomu (Peacock et al., 2007; Rogers et al., 2011). Tyto druhově specifické geny například kódují proteiny účastníci se transportu molekul na povrch buněk, čímž by mohlo docházet k ovlivnění interakcí mezi parazitem a hostitelem (Peacock et al., 2007). Velmi důležitá je přítomnost genu pro A2 protein u viscerálních druhů (Ghedini et al., 1997), kterému je věnována samostatná podkapitola. Autoři se domnívají, že z genetického hlediska by za rozdílnou patologií mohla stát přítomnost pseudogenů (Peacock et al., 2007) nebo rozdíly v počtu genových sekvencí a chromozomů (Rogers et al., 2011).

Součástí životního cyklu leishmanií jsou i vektor a hostitel a na výsledné podobě klinického obrazu se podílejí všichni tři činitelé. Následující kapitola je proto věnována dalším hypotézám a faktorům (vektorovým, hostitelským i parazitárním), které mohou ovlivnit patologii leishmaniózy.

### 6.1 Inokulační dávka a jiné vektorové faktory

Ve studii Rogers a Bates, 2007 bylo zjištěno, že *L. mexicana* v přenašečích vytváří metacyklické promastigoty rychleji a ve větším množství v porovnání s *L. infantum*. To také souvisí s rychlejším nástupem tvorby proteofosfoglykanů, které vyvářejí zátoku blokující přední část střev, čímž znesnadňují sání na hostitelích (Rogers a Bates, 2007). Tyto skutečnosti umožňují přenášení většího množství parazitů způsobujících CL v porovnání s VL (Rogers a Bates, 2007).

Studie porovnávající infekční dávky viscerotropního a dermatropního kmene *L. infantum* odhalila, že dermatropní kmen je přenášen do hostitele ve větším množství (Maia et al., 2011). Větší infekční dávka by mohla vést k stimulaci časně imunitní odpovědi, která udržuje leishmanie v kůži. Naopak menší dávka parazitů nevytvoří dostatečně silnou odpověď v kůži, což vede k šíření parazitů do orgánů (Maia et al., 2011). Jiné studie ale ukázaly, že pro šíření parazitů je zapotřebí vyšších inokulačních dávek (Ribeiro-Romão et al., 2014; Rostamian et al., 2018). Visceralizace byla pozorována pouze v případě podání vyšších dávek *L. tropica*,

zatímco podáváním menších dávek k šíření do orgánů nedošlo (Rostamian et al., 2018). Tyto studie (Ribeiro-Romão et al., 2014; Rostamian et al., 2018) využívaly jinou metodiku, která zahrnovala intradermální inokulaci do hostitelských organismů ve vyšším množství než se ve skutečnosti přenáší do hostitele přirozeným sáním, jak bylo zjištěno ve studii Maia et al., 2011.

Kromě množství inokulovaných parazitů se imunitní odpovědi v místě infekce a celkového projevu leishmaniózy účastní i jiné látky, které jsou do místa infekce inokulované společně s leishmaniemi. Jedná se například o střevní mikrobiotu přenašečů, která v místě infekce podporuje tvorbu IL-1 $\beta$  s následným náborem neutrofilů, což podporuje rozšiřování parazitů do orgánů (Dey et al., 2018). Dále sliny flebotomů obsahují v různém množství vasodilatační látky. Sliny druhů flebotomů, kteří přenášejí *L. chagasi* způsobující CL, obsahovaly méně vasodilatačních látek v porovnání se slinami flebotomů přenášejících *L. chagasi* způsobující VL formu (Warburg et al., 1994). Autoři se domnívají, že by přítomnost vasodilatačních látek mohla vést k většímu přísunu cirkulujících makrofágů, kteří by infekci šířili dál. Naopak leishmanie přenášené spolu se slinami bez vasodilatačního účinku by mohly mít za cílové buňky dermální makrofágy, což by mělo za následek rychlou proliferaci parazitů v kůži a vznik kožních lézí (Warburg et al., 1994).

## 6.2 Produkce cytokinů

Jak už bylo dříve zmíněno, inokulované leishmanie dokážou v hostitelích ve velmi malém množství infikovat keratinocyty (Scorza et al., 2017). V případě infekce *L. infantum* byla zjištěná výrazně zvýšená exprese genů prozánětlivých cytokinů a chemokinů IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 a TNF. *L. major* naopak lehce zvýšila produkci IL-4 (Scorza et al., 2017).

Vytvoření prozánětlivé odpovědi v počátcích infekce *L. infantum* může mít pro leishmanie negativní ale i pozitivní výsledek. Rozvoj prozánětlivé odpovědi v kůži může vést k přísunu imunitních buněk, které jsou účinné v boji proti leishmaniím, což může i vysvětlovat absenci kožních lézí v případě VL (Scorza et al., 2017). Na druhou stranu ne všechny leishmanie jsou zničeny a migrující imunitní buňky mohou leishmaniím posloužit jako prostředek pro rozšiřování infekce do těla. Naopak nevytvoření prozánětlivé odpovědi v kůži v případě infekce *L. major* může podporovat její lokální přežívání a proliferaci s následným rozvojem kožních lézí (Scorza et al., 2017). Autoři tuto hypotézu podporují i zjištěním, že nejnižší tvorba prozánětlivých cytokinů keratinocyty byla naměřena u kmene *L. infantum* vyvolávající CL v porovnání s kmeny vyvolávající VL (Scorza et al., 2017).

Jiné studie poukazují na mohutnější prozánětlivou odpověď v kůži u CL, která infekci lokalizuje a zabraňuje jejímu šíření. Bylo například dokázáno, že *L. major* v porovnání s *L. donovani* atrahuje ve větší míře imunitní buňky a indukuje v nich tvorbu TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , chemokinů a chemokinových receptorů (Matte a Olivier, 2002). Důležitým cytokinem, který brání rozšiřování infekce je IFN- $\gamma$  (Laskay et al., 1995). Přítomnost většího množství IFN- $\gamma$  a menšího množství IL-10 byla měřena u myši infikovaných dermatotropním kmenem *L. donovani*. U viscerotropního kmene *L. donovani* byla naopak pozorovaná nižší hladina IFN- $\gamma$  a vyšší hladina IL-10 (Kariyawasam et al., 2017).

Leishmanie ovlivňují v makrofázích produkci cytokinů i dalších látek, které následně ovlivňují průběh imunitní odpovědi. Jedním z příkladů může být produkce prostaglandinu E2 (PGE2), tkáňového hormonu, jehož zvýšená produkce může přispět k šíření viscerálních druhů do orgánů (Anstead et al., 2001). Bylo zjištěno, že *L. donovani* v porovnání s *L. major* indukuje v makrofázích ve větší míře expresi genů pro COX2 (cyklooxygenáza 2) a PGE2 syntázu (Gregory et al., 2008). Oba enzymy se účastní tvorby PGE2 (shrnuto v Kawahara et al., 2015). Zvýšená produkce PGE2 je spojena se sníženou produkcí NO a podporou infekce viscerální leishmaniózy v orgánech (Anstead et al., 2001). Dále PGE2 podporuje tvorbu protizánětlivého cytokinu TGF- $\beta$  v makrofázích (Fadok et al., 1998).

### 6.3 Migrace z kůže do orgánů

Není zcela známo, jakým způsobem se paraziti šíří z kůže do vnitřních orgánů. Bylo odhaleno, že se volní amastigoti mohou šířit krví. Transfúze krevní plasmy z infikovaných křečků se v příjemcích vyvinula v typickou viscerální leishmaniózu (Paraguai de Souza et al., 2001). To naznačuje, že se amastigoti v krvi vyskytují i extracelulárně a mohou se v této formě šířit do orgánů (Paraguai de Souza et al., 2001). Snadnější vsup leishmanií z kůže do krevního nebo lymfatického oběhu může umožňovat MMPproteáza gp63 (glykoprotein 63), která svou proteolytickou aktivitou dokáže narušit strukturu extracelulární matrix (ECM) (McGwire et al., 2003). K transkripci genu pro gp63 dochází ve větší míře v druzích VL v porovnání s druhem CL (Mukkala et al., 2022). To dokládá důležitost molekuly gp63 při šíření leishmanií.

Druhou možností šíření do orgánů je migrace infikovaných makrofágů a dendritických buněk, které v místě inokulace odstraňují infikované neutrofile, popř. přímo fagocytují leishmanie, které se nacházejí v extracelulárním prostoru (viz kapitola 3 – Obecná charakteristika imunitních buněk a dějů). Makrofágy a dendritické buňky infikované

*L. donovani* migrují z kůže ve větším množství v porovnání s *L. major* (Zhang et al., 2003). Zároveň mohou leishmanie ovlivnit rychlost šíření. Zatímco druhy VL migraci buněk urychlují prostřednictvím enzymu fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K $\gamma$ ) (Rocha et al., 2020), druhy CL migraci buněk neovlivňují nebo dokonce snižují (de Menezes et al., 2017; Rocha et al., 2020).

Dále leishmanie ovlivňují adhezi buněk k pojivové tkáni (Carvalho et al., 2004) nebo sekreci matrixových metaloproteináz (MMP), které obdobně jako gp63, narušují strukturu ECM, čímž usnadňují migraci buněk (Maretti-Mira et al., 2011). V porovnání lokalizované kožní leishmaniózy a mukokutánní leishmaniózy způsobených *L. braziliensis* byla hladina MMP-9 vyšší u pacientů s mukokutánní leishmaniózou (Maretti-Mira et al., 2011). Obdobně u pacientů s PKDL byla zjištěna vyšší hladina inhibitorů MMP v porovnání s pacienty VL (Ansari et al., 2008). Výsledky těchto studií naznačují, že druhy VL zvyšují migraci buněk a ovlivňují mechanismy s ní spojenými, což následně vede k jejich šíření do vnitřních orgánů, zatímco narušení migrace imunitních buněk vede k vývoji kožních forem.

#### **6.4 A2 protein a teplotní rozdíly**

V amastigotech druhů viscerální leishmaniózy *L. donovani* a *L. infantum* (*chagasi*) a druhů kožní leishmaniózy *L. mexicana* a *L. amazonensis* byla zjištěna přítomnost i následná exprese genu pro A2 protein (Charest a Matlashewski, 1994; Ghedin et al., 1997). Analýza dalších druhů CL přítomnost genu pro A2 protein neodhalila (Ghedin et al., 1997). V pozdější studii s *L. major* však vyšlo najevo, že tyto druhy CL mohou nést A2 genové sekvence, ale netvoří funkční protein (Zhang et al., 2003).

A2 protein vzniká v odpovědi na stres (McCall a Matlashewski, 2010) a poskytuje leishmaniím ochranu před tepelným a oxidačním stresem (McCall a Matlashewski, 2012), na který jsou druhy CL náchylnější než druhy VL (Sarkar et al., 2012). Zatímco v kožních lézích se teplota pohybuje mezi 27 až 32 °C, druhy viscerální leishmaniózy musejí v orgánech překonávat teploty vyšší i než 40 °C (shrnutí v McCall et al., 2013). A2 protein jim tak poskytuje ochranu před vyššími teplotami v orgánech i před horečnatými stavy typickými pro viscerální leishmaniózu (McCall a Matlashewski, 2010). Většina druhů kožní leishmaniózy protein A2 neprodukuje (Ghedin et al., 1997; Zhang et al., 2003), a proto jsou tyto druhy na vyšší teploty náchylnější (Callahan et al., 1996). Tepelný rozdíl mezi kůží a vnitřními orgány může být tedy jeden z aspektů, kvůli kterým nedochází k šíření druhů

kožní leishmaniózy do orgánů a zůstávají v tepelně příznivějším prostředí v kůži (McCall a Matlashewski, 2010).

Jak již bylo řečeno výše, kromě viscerálních druhů, byla odhalena přítomnost genu A2 u *L. mexicana* a *L. amazonensis* (u *L. mexicana* byl odhalen i produkt tohoto genu) (Ghedini et al., 1997), které ovšem způsobují kožní leishmaniózu a nejsou moc tepelně odolné (Callahan et al., 1996). Z toho důvodu se Zhang et al., 2003 domnívají, že přítomnost A2 proteinu není jediným faktorem, který umožňuje viscerálním druhům šíření do orgánů. Roli v tom může hrát například i množství produkovaného A2 proteinu, či jiné druhově specifické faktory (Zhang et al., 2003).

Bylo zjištěno, že přítomnost proteinu A2 v případě infekce *L. donovani* je nezbytná, neboť bez proteinu A2 nebyli paraziti schopni přežít *in vivo* v orgánech BALB/c myši (Zhang a Matlashewski, 1997). Zároveň byl pozorován i pomalejší růst amastigotů *L. donovani* uvnitř makrofágů (Zhang a Matlashewski, 1997).

Klíčová role proteinu A2 v šíření do orgánů byla prokázána i opačným způsobem – vložením genu A2 z *L. donovani* do *L. major*. Došlo tak ke zvýšení životaschopnosti *L. major* v reakci na tepelný stres (McCall a Matlashewski, 2010), zvýšení migrace infikovaných makrofágů z kůže do orgánů (Zhang et al., 2003) a visceralizaci s následnou splenomegalií (Zhang a Matlashewski, 2001).

Kromě proteinu A2 mohou být leishmanie ochráněné před vysokými teplotami prostřednictvím proteinů teplotního šoku (HSP). HSP proteiny se řadí mezi chaperony – proteiny, které napomáhají bílkovinám získávat jejich prostorovou strukturu i v případě jejich poškození, například vlivem vyšší teploty (shrnutí v Requena et al., 2015). RNA transkripty různých typů HSP byly měřeny u druhů VL a CL. Několikanásobně vyšší množství HSP transkriptů bylo zjištěno u druhů VL v porovnání s druhy CL, což opět naznačuje, že druhy VL jsou lépe přizpůsobené tepelně náročnějšímu prostředí (Mukkala et al., 2022).

## 6.5 Imunodeficiency

Virus lidské imunitní nedostatečnosti (HIV), podobně jako leishmanie, napadá lidské imunitní buňky, čímž dochází k jejich poškození nebo ztrátě (shrnutí v Okwor a Uzonna, 2013). HIV a leishmanie mohou koinfikovat stejné imunitní buňky, především makrofágy a monocyty (Mock et al., 2012). Tato koinfekce následně zvýhodňuje obě infekce. V případě HIV dochází v makrofázích/monocytech díky koinfekci s leishmaniemi k urychlenému vývoji

nemoci (Mock et al., 2012). V případě leishmanií vede koinfekce k atypickému šíření VL druhů do kůže (Santos-Oliveira et al., 2011) nebo může naopak způsobit rozšíření druhů CL do orgánů (Gramiccia, 2003).

Koinfekce s jinými patogeny také mohou mít vliv na klinické projevy. Například koinfekce tasemnice *Taenia crassiceps* s *L. mexicana* vede k diseminaci leishmanií do sleziny. V případě koinfekce s *L. major* dochází ke vzniku progresivnějších a větších lézí (Rodríguez-Sosa et al., 2006). Koinfekce *L. mexicana* a *L. amazonensis* s původcem malárie *Plasmodia yoelli* vede k vývoji větších, progresivnějších a hůře léčitelných lézí (Coleman et al., 1988; Pinna et al., 2016). V případě *L. mexicana* navíc může docházet k šíření leishmanií a tvorbě metastatických lézí (Coleman et al., 1988).

Kromě koinfekcí s různými patogeny může být diseminace do orgánů pozorovaná i u pacientů, kteří jsou imunodeficientní v důsledku posttransplantační supresivní terapie. Zdokumentováno to bylo například u pacienta po transplantaci ledviny, u kterého byla infekce *L. braziliensis* zaznamenaná nejen v kůži, ale i v orgánech nebo oblasti očí (Gontijo et al., 2002).

## 7 Závěr

Jak u kožní, tak i u viscerální formy je rozhodující vznik osy IL-12 → Th1 → IFN- $\gamma$  → NO, která je klíčová pro vznik odpovědi efektivní v ničení parazitů z rodu *Leishmania*. Naopak vznik Th2 odpovědi a odpovídajících protizánětlivých cytokinů podporuje replikaci a přetrvávání infekce. Množství konkrétních cytokinů se mezi kožními a viscerálními může lišit a nastavený balanc mezi Th1 a Th2 cytokiny může mít vliv na rozdílné patologie těchto dvou forem. Klíčovou molekulou je zřejmě IL-10, jehož hladiny při infekci dermatotropních kmenů *L. donovani* jsou v porovnání s viscerotropními nižší. IL-10 je imunosupresivní cytokin, který suprimuje aktivitu IL-12, IFN- $\gamma$  a NO produkce. Zvýšená hladina tedy podporuje šíření druhů VL a jejich přežívání v těle hostitele. Naopak množství prozánětlivých cytokinů je vyšší u dermatotropních kmenů v porovnání s viscerotropními. Některé role cytokinů jsou při nákazách VL a CL druhy leishmaniózy kontroverzní např. TNF- $\alpha$ . Ten sice spolupracuje s IFN- $\gamma$  v produkci NO, ale ve větší míře může mít negativní vliv na okolní tkáň – u kožní leishmaniózy zhoršuje kožní léze a u viscerální formy je spojován s destrukcí tkáňe sleziny.

Dalším kontroverzním cytokinem je IL-4, který je především u kožní leishmaniózy spojován s přetrváváním infekce. Jeho protektivní účinky byly ale pozorované během imunitní odpovědi v játrech u VL nebo v časně fázi infekce CL, která je spojená s keratinocyty. V keratinocytech druhy CL indukují větší produkci IL-4 a menší produkci prozánětlivých cytokinů než druhy VL, což může podpořit jejich lokální přežívání. Po vstupu do makrofágů, ale indukují větší prozánětlivou odpověď než druhy VL, což může souviset s jejich lokalizací v kůži. Větší prozánětlivá odpověď keratinocytů během VL může vést k chemoatrakci imunitních buněk s následnou migrací a šířením leishmanií.

Druhy VL dokážou na rozdíl od druhů CL zvyšovat migraci imunitních buněk a ovlivňovat mechanismy spojené s migrací. S tím jim mohou pomáhat i vasodilatační účinky slin přenašečů. Druhy VL mají taky oproti kožním druhům výhodu v podobě přítomnosti A2 proteinu, který je chrání před vyšší teplotou v orgánech.



## 8 Použitá literatura

- Afonso, L., Borges, V.M., Cruz, H., Ribeiro-Gomes, F.L., DosReis, G.A., Dutra, A.N., Clarêncio, J., de Oliveira, C.I., Barral, A., Barral-Netto, M., Brodskyn, C.I., 2008. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *Journal of Leukocyte Biology* 84, 389–396.
- Aga, E., Katschinski, D.M., van Zandbergen, G., Laufs, H., Hansen, B., Müller, K., Solbach, W., Laskay, T., 2002. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *The Journal of Immunology* 169, 898–905.
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., Sereno, D., 2016. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 10, 1–40.
- Ansari, N.A., Katara, G.K., Ramesh, V., Salotra, P., 2008. Evidence for involvement of TNFR1 and TIMPs in pathogenesis of post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Clinical and Experimental Immunology* 154, 391–398.
- Anstead, G.M., Chandrasekar, B., Zhao, W., Yang, J., Perez, L.E., Melby, P.C., 2001. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. *Infection and Immunity* 69, 4709–4718.
- Assreuy, J., Cunha, F.Q., Epperlein, M., Noronha-Dutra, A., O'Donnell, C.A., Liew, F.Y., Moncada, S., 1994. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *European Journal of Immunology* 24, 672–676.
- Ato, M., Maroof, A., Zubairi, S., Nakano, H., Kakiuchi, T., Kaye, P.M., 2006. Loss of dendritic cell migration and impaired resistance to *Leishmania donovani* infection in mice deficient in CCL19 and CCL211. *The Journal of Immunology* 176, 5486–5493.
- Ato, M., Stäger, S., Engwerda, C.R., Kaye, P.M., 2002. Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. *Nature Immunology* 3, 1185–1191.
- Bacellar, O., D'oliveira, A., Jerônimo, S., Carvalho, E.M., 2000. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine* 12, 1228–1231.
- Bajénoff, M., Breart, B., Huang, A.Y.C., Qi, H., Cazareth, J., Braud, V.M., Germain, R.N., Glaichenhaus, N., 2006. Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *The Journal of Experimental Medicine* 203, 619–631.
- Baratta-Masini, A., Teixeira-Carvalho, A., Malaquias, L.C.C., Mayrink, W., Martins-Filho, O.A., Corrêa-Oliveira, R., 2007. Mixed cytokine profile during active cutaneous leishmaniasis and in natural resistance. *Frontiers in Bioscience* 12, 839–849.
- Beattie, L., Peltan, A., Maroof, A., Kirby, A., Brown, N., Coles, M., Smith, D.F., Kaye, P.M., 2010. Dynamic imaging of experimental *Leishmania donovani*-induced hepatic granulomas detects Kupffer cell-restricted antigen presentation to antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *PLOS Pathogens* 6, 1–17.
- Belkaid, Y., Piccirillo, C.A., Mendez, S., Shevach, E.M., Sacks, D.L., 2002. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420, 502–507.

- Biedermann, T., Zimmermann, S., Himmelrich, H., Gummy, A., Egeter, O., Sakrauski, A.K., Seegmüller, I., Voigt, H., Launois, P., Levine, A.D., Wagner, H., Heeg, K., Louis, J.A., Röcken, M., 2001. IL-4 instructs Th1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. *Nature Immunology* 2, 1054–1060.
- Bittar, R.C., Nogueira, R.S., Vieira-Gonçalves, R., Pinho-Ribeiro, V., Mattos, M.S., Oliveira-Neto, M.P., Coutinho, S.G., Da-Cruz, A.M., 2007. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102, 625–630.
- Bourreau, E., Gardon, J., Pradinaud, R., Pascalis, H., Prévot-Linguet, G., Karimnia, A., Pascal, L., 2003. Th2 responses predominate during the early phases of infection in patients with localized cutaneous leishmaniasis and precede the development of Th1 responses. *Infection and Immunity* 71, 2244–2246.
- Bourreau, E., Ronet, C., Darcissac, E., Lise, M.C., Sainte Marie, D., Clity, E., Tacchini-Cottier, F., Couppie, P., Launois, P., 2009. Intralesional regulatory T-cell suppressive function during human acute and chronic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*. *Infection and Immunity* 77, 1465–1474.
- Brandonisio, O., Panaro, M.A., Marzio, R., Marangi, A., Faliero, S.M., Jirillo, E., 1994. Impairment of the human phagocyte oxidative responses caused by *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG): *in vitro* studies. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 8, 57–62.
- Brittingham, A., Morrison, C.J., McMaster, W.R., McGwire, B.S., Chang, K.P., Mosser, D.M., 1995. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *The Journal of Immunology* 155, 3102–3111.
- Burza, S., Croft, S.L., Boelaert, M., 2018. Leishmaniasis. *The Lancet* 392, 951–970.
- Buxbaum, L.U., Scott, P., 2005. Interleukin 10- and Fcγ receptor-deficient mice resolve *Leishmania mexicana* lesions. *Infection and Immunity* 73, 2101–2108.
- Callahan, H.L., Portal, I.F., Bensinger, S.J., Grogl, M., 1996. *Leishmania* spp: temperature sensitivity of promastigotes *in vitro* as a model for tropism *in vivo*. *Experimental Parasitology* 84, 400–409.
- Carvalho, D.G.F., Barbosa, A., D’El-Rei Hermida, M., Clarencio, J., Pinheiro, N.F., Veras, P.S.T., dos-Santos, W.L.C., 2004. The modelling of mononuclear phagocyte-connective tissue adhesion *in vitro*: application to disclose a specific inhibitory effect of *Leishmania* infection. *Experimental Parasitology* 107, 189–199.
- Castellano, L.R., Filho, D.C., Argiro, L., Dessen, H., Prata, A., Dessen, A., Rodrigues, V., 2009. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. *Human Immunology* 70, 383–390.
- Cervia, J.S., Rosen, H., Murray, H.W., 1993. Effector role of blood monocytes in experimental visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity* 61, 1330–1333.
- Charest, H., Matlashewski, G., 1994. Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene. *Molecular and Cellular Biology* 14, 2975–2984.

- Coleman, R.E., Edman, J.D., Semprevivo, L.H., 1988. Metastasis of *Leishmania mexicana* in a *Leishmania*-resistant mouse strain (C/57) following concomitant malarial infection. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 82, 399–401.
- 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, 1–8.
- Cotterell, S.E., Engwerda, C.R., Kaye, P.M., 1999. *Leishmania donovani* infection initiates T cell-independent chemokine responses, which are subsequently amplified in a T cell-dependent manner. *European Journal of Immunology* 29, 203–214.
- Da-Cruz, A.M., Oliveira, M.P. de, De Luca, P.M., Mendonça, S.C., Coutinho, S.G., 1996. Tumor necrosis factor- $\alpha$  in human American tegumentary leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91, 225–229.
- de Menezes, J.P.B., Koushik, A., Das, S., Guven, C., Siegel, A., Laranjeira-Silva, M.F., Losert, W., Andrews, N.W., 2017. *Leishmania* infection inhibits macrophage motility by altering F-actin dynamics and the expression of adhesion complex proteins. *Cellular Microbiology* 19, 1–9.
- Dey, R., Joshi, A.B., Oliveira, F., Pereira, L., Guimarães-Costa, A.B., Serafim, T.D., Castro, W. de, Coutinho-Abreu, I.V., Bhattacharya, P., Townsend, S., Aslan, H., Perkins, A., Karmakar, S., Ismail, N., Karetnick, M., Meneses, C., Duncan, R., Nakhasi, H.L., Valenzuela, J.G., Kamhawi, S., 2018. Gut microbes egested during bites of infected sand flies augment severity of leishmaniasis via inflammasome-derived IL-1 $\beta$ . *Cell Host & Microbe* 23, 134–143.
- Diefenbach, A., Schindler, H., Donhauser, N., Lorenz, E., Laskay, T., MacMicking, J., Röllinghoff, M., Gresser, I., Bogdan, C., 1998. Type 1 interferon (IFN $\alpha/\beta$ ) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity* 8, 77–87.
- Domínguez, M., Moreno, I., López-Trascasa, M., Toraño, A., 2002. Complement interaction with Trypanosomatid promastigotes in normal human serum. *Journal of Experimental Medicine* 195, 451–459.
- Dong, C., 2021. Cytokine regulation and function in T cells. *Annual Review of Immunology* 39, 51–76.
- Dostálová, A., Volf, P., 2012. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & Vectors* 5, 1–12.
- Ehrchen, J.M., Roebrock, K., Foell, D., Nippe, N., Stebut, E. von, Weiss, J.M., Münck, N.-A., Viemann, D., Varga, G., Müller-Tidow, C., Schubert, H.-J., Roth, J., Sunderkötter, C., 2010. Keratinocytes determine Th1 immunity during early experimental leishmaniasis. *PLOS Pathogens* 6, 1–16.
- El-Serafi, A.T., El-Serafi, I., Steinvall, I., Sjöberg, F., Elmasry, M., 2022. A systematic review of keratinocyte secretions: a regenerative perspective. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 1–18.
- Engwerda, C.R., Ato, M., Cotterell, S.E.J., Mynott, T.L., Tschannerl, A., Gorak-Stolinska, P.M.A., Kaye, P.M., 2002. A role for tumor necrosis factor- $\alpha$  in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. *The American Journal of Pathology* 161, 429–437.

- Engwerda, C.R., Smelt, S.C., Kaye, P.M., 1996. An *in vivo* analysis of cytokine production during *Leishmania donovani* infection in scid mice. *Experimental Parasitology* 84, 195–202.
- Erlandson, M.A., Toprak, U., Hegedus, D.D., 2019. Role of the peritrophic matrix in insect-pathogen interactions. *Journal of Insect Physiology* 117, 1–11.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y., Henson, P.M., 1998. Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *The Journal of Clinical Investigation* 101, 890–898.
- Gabriel, C., McMaster, W.R., Girard, D., Descoteaux, A., 2010. *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. *The Journal of Immunology* 185, 4319–4327.
- Ganeshan, K., Chawla, A., 2014. Metabolic regulation of immune responses. *Annual Review of Immunology* 32, 609–634.
- Ghedini, E., Zhang, W.W., Charest, H., Sundar, S., Kenney, R.T., Matlashewski, G., 1997. Antibody response against a *Leishmania donovani* amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 4, 530–535.
- Gontijo, C.M., Pacheco, R.S., Oréfice, F., Lasmar, E., Silva, E.S., Melo, M.N., 2002. Concurrent cutaneous, visceral and ocular leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a kidney transplant patient. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97, 751–753.
- Gorak, P.M.A., Engwerda, C.R., Kaye, P.M., 1998. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. *European Journal of Immunology* 28, 687–695.
- Gramiccia, M., 2003. The identification and variability of the parasites causing leishmaniasis in HIV-positive patients in Italy. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 97, 65–73.
- Gregory, D.J., Sladek, R., Olivier, M., Matlashewski, G., 2008. Comparison of the effects of *Leishmania major* or *Leishmania donovani* infection on macrophage gene expression. *Infection and Immunology* 76, 1186–1192.
- Gueirard, P., Laplante, A., Rondeau, C., Milon, G., Desjardins, M., 2008. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. *Cellular Microbiology* 10, 100–111.
- Hernández-Ruiz, J., Salaiza-Suazo, N., Carrada, G., Escoto, S., Ruiz-Remigio, A., Rosenstein, Y., Zentella, A., Becker, I., 2010. CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, *in vitro*, by TLR2 agonists. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 4, 1–11.
- Hochrein, H., O’Keeffe, M., Luft, T., Vandenabeele, S., Grumont, R.J., Maraskovsky, E., Shortman, K., 2000. Interleukin (IL)-4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12 production by mouse and human dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 192, 823–834.
- Hořejší, V., Bartůňková, J., Brdička, T., Špišek, R., 2017. *Základy imunologie*, 6th ed. Triton, Praha.

- Iniesta, V., Gómez-Nieto, L.C., Corraliza, I., 2001. The inhibition of arginase by N $\omega$ -hydroxy-l-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *Journal of Experimental Medicine* 193, 777–784.
- Jacobs, T., Andrä, J., Gaworski, I., Graefe, S., Mellenthin, K., Krömer, M., Halter, R., Borlak, J., Clos, J., 2005. Complement C3 is required for the progression of cutaneous lesions and neutrophil attraction in *Leishmania major* infection. *Medical Microbiology and Immunology* 194, 143–149.
- Kane, M.M., Mosser, D.M., 2001. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *The Journal of Immunology* 166, 1141–1147.
- Kariyawasam, K.K.G.D.U.L., Selvapandiyan, A., Siriwardana, H.V.Y.D., Dube, A., Karunanayake, P., Senanayake, S. a. S.C., Dey, R., Gannavaram, S., Nakhasi, H.L., Karunaweera, N.D., 2017. Dermotropic *Leishmania donovani* in Sri Lanka: visceralizing potential in clinical and preclinical studies. *Parasitology* 145, 443–452.
- Kawahara, K., Hohjoh, H., Inazumi, T., Tsuchiya, S., Sugimoto, Y., 2015. Prostaglandin E2-induced inflammation: relevance of prostaglandin E receptors. *Biochimica et Biophysica Acta* 1851, 414–421.
- Laskay, T., Diefenbach, A., Röllinghoff, M., Solbach, W., 1995. Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. *European Journal of Immunology* 25, 2220–2227.
- Laufs, H., Müller, K., Fleischer, J., Reiling, N., Jahnke, N., Jensenius, J.C., Solbach, W., Laskay, T., 2002. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infection and Immunology* 70, 826–835.
- Laurenti, M. d., Corbett, C. e. p., Sotto, M. n., Sinhorini, I. l., Goto, H., 1996. The role of complement in the acute inflammatory process in the skin and in host-parasite interaction in hamsters inoculated with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *International Journal of Experimental Pathology* 77, 15–24.
- Liese, J., Schleicher, U., Bogdan, C., 2008. The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology* 213, 377–387.
- Liew, F.Y., Li, Y., Millott, S., 1990. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *The Journal of Immunology* 145, 4306–4310.
- Maia, C., Seblova, V., Sadlova, J., Votypka, J., Volf, P., 2011. Experimental transmission of *Leishmania infantum* by two major vectors: a comparison between a viscerotropic and a dermatropic strain. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 5, 1–6.
- Maretti-Mira, A.C., de Pinho Rodrigues, K.M., de Oliveira-Neto, M.P., Pirmez, C., Craft, N., 2011. MMP-9 activity is induced by *Leishmania braziliensis* infection and correlates with mucosal leishmaniasis. *Acta Tropica* 119, 160–164.
- Marques, C.S., Passero, L.F.D., Vale-Gato, I., Rodrigues, A., Rodrigues, O.R., Martins, C., Correia, I., Tomás, A.M., Alexandre-Pires, G., Ferronha, M.H., Santos-Gomes, G.M., 2015. New insights into neutrophil and *Leishmania infantum in vitro* immune interactions. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 40, 19–29.

- Matte, C., Olivier, M., 2002. *Leishmania*-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: modulation of proinflammatory mediators. *The Journal of Infectious Diseases* 185, 673–681.
- Mattner, F., Di Padova, K., Alber, G., 1997. Interleukin-12 is indispensable for protective immunity against *Leishmania major*. *Infection and Immunity* 65, 4378–4383.
- McCall, L.-I., Matlashewski, G., 2012. Involvement of the *Leishmania donovani* virulence factor A2 in protection against heat and oxidative stress. *Experimental Parasitology* 132, 109–115.
- McCall, L.-I., Matlashewski, G., 2010. Localization and induction of the A2 virulence factor in *Leishmania*: evidence that A2 is a stress response protein. *Molecular Microbiology* 77, 518–530.
- McCall, L.-I., Zhang, W.-W., Matlashewski, G., 2013. Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. *PLOS Pathogens* 9, 1–7.
- McElrath, M.J., Murray, H.W., Cohn, Z.A., 1988. The dynamics of granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. *Journal of Experimental Medicine* 167, 1927–1937.
- McFarlane, E., Carter, K.C., McKenzie, A.N., Kaye, P.M., Brombacher, F., Alexander, J., 2011. Endogenous IL-13 plays a crucial role in liver granuloma maturation during *Leishmania donovani* infection, independent of IL-4R $\alpha$ -responsive macrophages and neutrophils. *The Journal of Infectious Diseases* 204, 36–43.
- McFarlane, E., Mokgethi, T., Kaye, P.M., Hurdal, R., Brombacher, F., Alexander, J., Carter, K.C., 2019. IL-4 mediated resistance of BALB/c mice to visceral leishmaniasis is independent of IL-4R $\alpha$  signaling via T cells. *Frontiers in Immunology* 10, 1–13.
- McFarlane, E., Perez, C., Charmoy, M., Allenbach, C., Carter, K.C., Alexander, J., Tacchini-Cottier, F., 2008. Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. *Infection and Immunity* 76, 532–541.
- McGwire, B.S., Chang, K.-P., Engman, D.M., 2003. Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. *Infection and Immunity* 71, 1008–1010.
- Mebius, R.E., Kraal, G., 2005. Structure and function of the spleen. *Nature Reviews Immunology* 5, 606–616.
- Melby, P.C., Andrade-Narvaez, F.J., Darnell, B.J., Valencia-Pacheco, G., Tryon, V.V., Palomo-Cetina, A., 1994. Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity* 62, 837–842.
- Miralles, G.D., Stoeckle, M.Y., McDermott, D.F., Finkelman, F.D., Murray, H.W., 1994. Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity* 62, 1058–1063.
- Mock, D.J., Hollenbaugh, J.A., Daddacha, W., Overstreet, M.G., Lazarski, C.A., Fowell, D.J., Kim, B., 2012. *Leishmania* induces survival, proliferation and elevated cellular dNTP levels in human monocytes promoting acceleration of HIV co-infection. *PLOS Pathogens* 8, 1–13.

- Mollinedo, F., Janssen, H., Iglesia-Vicente, J. de la, Villa-Pulgarin, J.A., Calafat, J., 2010. Selective fusion of azurophilic granules with *Leishmania*-containing phagosomes in human neutrophils. *Journal of Biological Chemistry* 285, 34528–34536.
- Mukbel, R.M., Patten, C., Gibson, K., Ghosh, M., Petersen, C., Jones, D.E., 2007. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76, 669–675.
- Mukkala, A.N., Kariyawasam, R., Lau, R., Valencia, B.M., Llanos-Cuentas, A., Boggild, A.K., 2022. Elevated baseline expression of seven virulence factor RNA transcripts in visceralizing species of *Leishmania*: a preliminary quantitative PCR study. *Therapeutic Advances in Infection* 9, 1–9.
- Munder, M., Mollinedo, F., Calafat, J., Canchado, J., Gil-Lamaignere, C., Fuentes, J.M., Luckner, C., Doschko, G., Soler, G., Eichmann, K., Müller, F.-M., Ho, A.D., Goerner, M., Modolell, M., 2005. Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood* 105, 2549–2556.
- Murphy, M.L., Wille, U., Villegas, E.N., Hunter, C.A., Farrell, J.P., 2001. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *European Journal of Immunology* 31, 2848–2856.
- Murray, H., 2001. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *International Journal of Experimental Pathology* 82, 249–267.
- Murray, H.W., 2008. Accelerated control of visceral *Leishmania donovani* infection in interleukin-6-deficient mice. *Infection and Immunity* 76, 4088–4091.
- Murray, H.W., 1997. Endogenous interleukin-12 regulates acquired resistance in experimental visceral leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases* 175, 1477–1479.
- Murray, H.W., Miralles, G.D., Stoeckle, M.Y., McDermott, D.F., 1993. Role and effect of IL-2 in experimental visceral leishmaniasis. *The Journal of Immunology* 151, 929–938.
- Murray, H.W., Nathan, C.F., 1999. Macrophage microbicidal mechanisms *in vivo*: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *Journal of Experimental Medicine* 189, 741–746.
- Nguyen-Lefebvre, A.T., Horuzsko, A., 2015. Kupffer cell metabolism and function. *Journal of Enzymology and Metabolism* 1, 1–26.
- Okwor, I., Uzonna, J.E., 2013. The immunology of *Leishmania*/HIV co-infection. *Immunology Research* 56, 163–171.
- Panaro, M.A., Acquafredda, A., Lisi, S., Lofrumento, D.D., Trotta, T., Satalino, R., Saccia, M., Mitolo, V., Brandonisio, O., 1999. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in *Leishmania infantum*-infected human macrophages stimulated with interferon- $\gamma$  and bacterial lipopolysaccharide. *International Journal of Clinical and Laboratory Research* 29, 122–127.
- Paraguai de Souza, E., Paula Esteves Pereira, A., Machado, F.C.S., Melo, M.F., Souto-Padrón, T., Palatnik, M., Palatnik-de-Sousa, C.B., 2001. Occurrence of *Leishmania donovani* parasitemia in plasma of infected hamsters. *Acta Tropica* 80, 69–75.
- Park, A.Y., Hondowicz, B.D., Scott, P., 2000. IL-12 is required to maintain a Th1 response during *Leishmania major* infection. *The Journal of Immunology* 165, 896–902.

- Peacock, C.S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J.C., Quail, M.A., Peters, N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M., Kerhornou, A., Ivens, A., Fraser, A., Rajandream, M.-A., Carver, T., Norbertczak, H., Chillingworth, T., Hance, Z., Jagels, K., Moule, S., Ormond, D., Rutter, S., Squares, R., Whitehead, S., Rabbinowitsch, E., Arrowsmith, C., White, B., Thurston, S., Bringaud, F., Baldauf, S.L., Faulconbridge, A., Jeffares, D., Depledge, D.P., Oyola, S.O., Hilley, J.D., Brito, L.O., Tosi, L.R.O., Barrell, B., Cruz, A.K., Mottram, J.C., Smith, D.F., Berriman, M., 2007. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature Genetics* 39, 839–847.
- Peters, N.C., Egen, J.G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., Lawyer, P., Fay, M.P., Germain, R.N., Sacks, D., 2008. *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321, 970–974.
- Pinna, R.A., Silva-dos-Santos, D., Perce-da-Silva, D.S., Oliveira-Ferreira, J., Villa-Verde, D.M.S., De Luca, P.M., Banic, D.M., 2016. Malaria-cutaneous leishmaniasis co-infection: influence on disease outcomes and immune response. *Frontiers in Microbiology* 7, 1–15.
- Polley, R., Stager, S., Prickett, S., Maroof, A., Zubairi, S., Smith, D.F., Kaye, P.M., 2006. Adoptive immunotherapy against experimental visceral leishmaniasis with CD8+ T cells requires the presence of cognate antigen. *Infection and Immunity* 74, 773–776.
- Requena, J.M., Montalvo, A.M., Fraga, J., 2015. Molecular chaperones of *Leishmania*: central players in many stress-related and -unrelated physiological processes. *BioMed Research International* 2015, 1–21.
- Ribeiro-Gomes, F., Sacks, D., 2012. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2, 1–8.
- Ribeiro-Gomes, F.L., Peters, N.C., Debrabant, A., Sacks, D.L., 2012. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-*Leishmania* response. *PLOS Pathogens* 8, 1–12.
- Ribeiro-Romão, R.P., Moreira, O.C., Osorio, E.Y., Cysne-Finkelstein, L., Gomes-Silva, A., Valverde, J.G., Pirmez, C., Da-Cruz, A.M., Pinto, E.F., 2014. Comparative evaluation of lesion development, tissue damage, and cytokine expression in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected by inocula with different *Leishmania (Viannia) braziliensis* concentrations. *Infection and Immunity* 82, 5203–5213.
- Ritter, U., Frischknecht, F., van Zandbergen, G., 2009. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? *Trends in Parasitology* 25, 505–510.
- Rocha, M.I., Dias, F., Resende, M., Sousa, M., Duarte, M., Tomás, A.M., Castro, H., 2020. *Leishmania infantum* enhances migration of macrophages via a phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$ -dependent pathway. *ACS Infectious Diseases* 6, 1643–1649.
- Rodrigues, A.V., Valério-Bolas, A., Alexandre-Pires, G., Aires Pereira, M., Nunes, T., Ligeiro, D., Pereira da Fonseca, I., Santos-Gomes, G., 2022. Zoonotic visceral leishmaniasis: new insights on innate immune response by blood macrophages and liver Kupffer cells to *Leishmania infantum* parasites. *Biology* 11, 1–20.
- Rodríguez-Sosa, M., Rivera-Montoya, I., Espinoza, A., Romero-Grijalva, M., López-Flores, R., González, J., Terrazas, L.I., 2006. Acute cysticercosis favours rapid and more severe lesions caused by *Leishmania major* and *Leishmania mexicana* infection, a role for alternatively activated macrophages. *Cellular Immunology* 242, 61–71.



- Rogers, M.B., Hilley, J.D., Dickens, N.J., Wilkes, J., Bates, P.A., Depledge, D.P., Harris, D., Her, Y., Herzyk, P., Imamura, H., Otto, T.D., Sanders, M., Seeger, K., Dujardin, J.-C., Berriman, M., Smith, D.F., Hertz-Fowler, C., Mottram, J.C., 2011. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Research* 21, 2129–2142.
- Rogers, M.E., Bates, P.A., 2007. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLOS Pathogens* 3, 818–825.
- Ronet, C., Hauyon-La Torre, Y., Revaz-Breton, M., Mastelic, B., Tacchini-Cottier, F., Louis, J., Launois, P., 2010. Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with *Leishmania major* through IL-10 production. *The Journal of Immunology* 184, 886–894.
- Ronet, C., Voigt, H., Himmelrich, H., Doucey, M.-A., Hauyon-La Torre, Y., Revaz-Breton, M., Tacchini-Cottier, F., Bron, C., Louis, J., Launois, P., 2008. *Leishmania major*-specific B cells are necessary for Th2 cell development and susceptibility to *L. major* LV39 in BALB/c Mice. *The Journal of Immunology* 180, 4825–4835.
- Rosenthal, L.A., Sutterwala, F.S., Kehrli, M.E., Mosser, D.M., 1996. *Leishmania major*-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. *Infection and Immunity* 64, 2206–2215.
- Rossi, M., Fasel, N., 2018. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! *International Immunology* 30, 103–111.
- Rostami, M.N., Keshavarz, H., Edalat, R., Sarrafnejad, A., Shahrestani, T., Mahboudi, F., Khamesipour, A., 2010. CD8<sup>+</sup> T cells as a source of IFN- $\gamma$  production in human cutaneous leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 4, 1–9.
- Rostamian, M., Jafari, D., Abolghazi, M., Farahani, H., Niknam, H.M., 2018. *Leishmania tropica*: suggestive evidences for the effect of infectious dose on pathogenicity and immunogenicity in an experimental model. *Parasitology Research* 117, 2949–2956.
- Sacks, D.L., Scott, P.A., Asofsky, R., Sher, F.A., 1984. Cutaneous leishmaniasis in anti-IgM-treated mice: enhanced resistance due to functional depletion of a B cell-dependent T cell involved in the suppressor pathway. *The Journal of Immunology* 132, 2072–2077.
- Saha, B., Nanda-Roy, H., Pakrashi, A., Chakrabarti, R.N., Roy, S., 1991. Immunobiological studies on experimental visceral leishmaniasis I. changes in lymphoid organs and their possible role in pathogenesis. *European Journal of Immunology* 21, 577–581.
- Saldanha, M.G., Pagliari, C., Queiroz, A., Machado, P.R.L., Carvalho, L., Scott, P., Carvalho, E.M., Arruda, S., 2020. Tissue damage in human cutaneous leishmaniasis: correlations between inflammatory cells and molecule expression. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10, 1–7.
- Santos, C. da S., Boaventura, V., Cardoso, C.R., Tavares, N., Lordelo, M.J., Noronha, A., Costa, J., Borges, V.M., Oliveira, C.I. de, Weyenbergh, J.V., Barral, A., Barral-Netto, M., Brodskyn, C.I., 2013. CD8<sup>+</sup> granzyme B<sup>+</sup>-mediated tissue injury vs. CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. *Journal of Investigative Dermatology* 133, 1533–1540.
- Santos-Oliveira, J.R., Da-Cruz, A.M., Pires, L.H.S., Cupolillo, E., Kuhls, K., Giacoia-Gripp, C.B.W., Oliveira-Neto, M.P., 2011. Atypical lesions as a sign of cutaneous dissemination of visceral leishmaniasis in a human immunodeficiency virus-positive

- patient simultaneously infected by two viscerotropic *Leishmania* species. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 85, 55–59.
- Sarkar, A., Ghosh, S., Pakrashi, S., Roy, D., Sen, S., Chatterjee, M., 2012. *Leishmania* strains causing self-healing cutaneous leishmaniasis have greater susceptibility towards oxidative stress. *Free Radical Research* 46, 665–673.
- Sasidharan, S., Saudagar, P., 2021. Leishmaniasis: where are we and where are we heading? *Parasitology Research* 120, 1541–1554.
- Scorza, B.M., Wacker, M.A., Messingham, K., Kim, P., Klingelutz, A., Fairley, J., Wilson, M.E., 2017. Differential activation of human keratinocytes by *Leishmania* species causing localized or disseminated disease. *Journal of Investigative Dermatology* 137, 2149–2156.
- Scott, P., 1991. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Immunology* 147, 3149–3155.
- Souza-Neto, S.M. de, Carneiro, C.M., Vieira, L.Q., Afonso, L.C.C., 2004. *Leishmania braziliensis*: partial control of experimental infection by interleukin-12 p40 deficient mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99, 289–294.
- Squires, K.E., Schreiber, R.D., McElrath, M.J., Rubin, B.Y., Anderson, S.L., Murray, H.W., 1989. Experimental visceral leishmaniasis: role of endogenous IFN-gamma in host defense and tissue granulomatous response. *The Journal of Immunology* 143, 4244–4249.
- Stäger, S., Alexander, J., Carter, K.C., Brombacher, F., Kaye, P.M., 2003. Both interleukin-4 (IL-4) and IL-4 receptor  $\alpha$  signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. *Infection and Immunity* 71, 4804–4807.
- Stern, J.J., Oca, M.J., Rubin, B.Y., Anderson, S.L., Murray, H.W., 1988. Role of L3T4+ and LyT-2+ cells in experimental visceral leishmaniasis. *The Journal of Immunology* 140, 3971–3977.
- Steverding, D., 2017. The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors* 10, 1–10.
- Sunter, J., Gull, K., 2017. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biology* 7, 1–13.
- Taylor, A.P., Murray, H.W., 1997. Intracellular antimicrobial activity in the absence of interferon- $\gamma$ : effect of interleukin-12 in experimental visceral leishmaniasis in interferon- $\gamma$  gene-disrupted mice. *Journal of Experimental Medicine* 185, 1231–1240.
- Terrazas, C., Varikuti, S., Oghumu, S., Steinkamp, H.M., Ardic, N., Kimble, J., Nakhasi, H., Satoskar, A.R., 2017. Ly6Chi inflammatory monocytes promote susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *Scientific Reports* 7, 1–10.
- Thalhofer, C.J., Chen, Y., Sudan, B., Love-Homan, L., Wilson, M.E., 2011. Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *Leishmania infantum chagasi*. *Infection and Immunity* 79, 108–117.
- Thiam, H.R., Wong, S.L., Wagner, D.D., Waterman, C.M., 2020. Cellular mechanisms of NETosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 36, 191–218.

- Tsagozis, P., Karagouni, E., Dotsika, E., 2003. CD8<sup>+</sup> T cells with parasite-specific cytotoxic activity and a Tc1 profile of cytokine and chemokine secretion develop in experimental visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology* 25, 569–579.
- Tumang, M.C., Keogh, C., Moldawer, L.L., Helfgott, D.C., Teitelbaum, R., Hariprashad, J., Murray, H.W., 1994. Role and effect of TNF-alpha in experimental visceral leishmaniasis. *The Journal of Immunology* 153, 768–775.
- Uzonna, J.E., Joyce, K.L., Scott, P., 2004. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon  $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> T cells. *Journal of Experimental Medicine* 199, 1559–1566.
- van Zandbergen, G., Hermann, N., Laufs, H., Solbach, W., Laskay, T., 2002. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. *Infection and Immunity* 70, 4177–4184.
- van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., Laskay, T., 2004. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *The Journal of Immunology* 173, 6521–6525.
- Veress, B., Omer, A., Satir, A.A., El Hassan, A.M., 1977. Morphology of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis. *Immunology* 33, 607–610.
- von Stebut, E., Belkaid, Y., Jakob, T., Sacks, D.L., Udey, M.C., 1998. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *Journal of Experimental Medicine* 188, 1547–1552.
- Warburg, A., Saraiva, E., Lanzaro, G.C., Titus, R.G., Neva, F., 1994. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 345, 223–230.
- WHO, 2023. Leishmaniasis [online]. World Health Organization (WHO). dostupné z <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (citováno 30.4.2023).
- Wilson, M.E., Recker, T.J., Rodriguez, N.E., Young, B.M., Burnell, K.K., Streit, J.A., Kline, J.N., 2002. The TGF-beta response to *Leishmania chagasi* in the absence of IL-12. *European Journal of Immunology* 32, 3556–3565.
- Wozencraft, A.O., Blackwell, J.M., 1987. Increased infectivity of stationary-phase promastigotes of *Leishmania donovani*: correlation with enhanced C3 binding capacity and CR3-mediated attachment to host macrophages. *Immunology* 60, 559–563.
- Wright, S.D., Silverstein, S.C., 1983. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *Journal of Experimental Medicine* 158, 2016–2023.
- Yin, C., Heit, B., 2018. Armed for destruction: formation, function and trafficking of neutrophil granules. *Cell and Tissue Research* 371, 455–471.
- Zhang, W.-W., Matlashewski, G., 2001. Characterization of the A2–A2rel gene cluster in *Leishmania donovani*: involvement of A2 in visceralization during infection. *Molecular Microbiology* 39, 935–948.

- Zhang, W.-W., Matlashewski, G., 1997. Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94, 8807–8811.
- Zhang, W.-W., Mendez, S., Ghosh, A., Myler, P., Ivens, A., Clos, J., Sacks, D.L., Matlashewski, G., 2003. Comparison of the A2 gene locus in *Leishmania donovani* and *Leishmania major* and its control over cutaneous infection. *Journal of Biological Chemistry* 278, 35508–35515.