ΜΑΤΘΑΙΟΛΑΜΠΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ
ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ ΕΓΚΛΕΙΣΜΕΝΟΥ
ΣΕ ΝΑΝΟΣΦΑΙΡΕΣ ΠΟΛΥ(ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ)

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Πάτρα 2009

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΑΤΘΑΙΟΛΑΜΠΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗ
ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ ΕΓΚΛΕΙΣΜΕΝΟΥ ΣΕ
ΝΑΝΟΣΦΑΙΡΕΣ ΠΟΛΥ(ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ)**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αναπλ. Καθηγητής Κ. Αυγουστάκης (Επιβλέπων Καθηγητής)

Επικ. Καθηγητής Κ. Κλεπετσάνης

Επικ. Καθηγητής Δ. Μπικιάρης

Καθηγητής Π. Κορδοπάτης

Καθηγητής Σ. Τζάρτος

Αναπλ. Καθηγητή Γ. Σιβολαπένκο

Επικ. Καθηγήτρια Ε. Παπαδημητρίου

Αφιερώνεται στην οικογένεια μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε κατά τα έτη 2005-2009 στο Εργαστήριο Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακευτικής Τεχνολογίας κ. Κωνσταντίνου Αυγουστάκη, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την ουσιαστική του καθοδήγηση, τις γνώσεις που μου μετέδωσε και γιατί χωρίς την πολύτιμη βοήθειά του τόσο κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων όσο και κατά την συγγραφή της εργασίας η μελέτη αυτή δεν θα είχε ολοκληρωθεί.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Παύλο Κλεπετσάνη, Επίκουρο Καθηγητή Φυσικοφαρμακευτικής του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών, για την τεχνική υποστήριξη κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων, την πολύτιμη βοήθειά του στον χαρακτηρισμό προϊόντων καθώς και τις χρήσιμες συμβουλές του.

Επίσης την κ. Ευαγγελία Παπαδημητρίου, Επίκουρο Καθηγήτρια Μοριακής Φαρμακολογίας του τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών, για την πολύτιμη βοήθεια της στην επεξεργασία των δερμάτων και την φωτογράφιση τους, όπως επίσης για τις χρήσιμες συμβουλές της.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τους αγαπητούς συναδέλφους Δρ. Γ. Λαγουμιντζή, Δρ. Ζωή Παναγή και υποψήφιο διδάκτορα Κωνσταντίνο Μικέλη για την βοήθεια τους στην διεξαγωγή πειραματικών και τις συμβουλές τους. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Λεωνίδα Χρονά, Βούλα Ζαγανά, Σπυριδούλα Κυριακοπούλου και όλους τους μεταπτυχικούς φοιτητές των εργαστηρίων Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Μοριακής Φαρμακολογίας και Μοριακής Βιολογίας και Ανοσολογίας για την φιλία τους και την συμπαράσταση τους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου για την ηθική και υλική υποστήριξη που μου παρείχαν καθώς και για την διαρκή ενθάρρυνσή τους χωρίς την οποία δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT.....	11
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	15
1.1 Στοιχεία ανοσοποιητικού συστήματος	16
1.1.1 Φυσική και επίκτητη ανοσία	16
1.1.2 Τύποι της επίκτητης ανοσίας	17
1.1.3 Αντιγόνα	18
1.1.4 Αντισώματα	18
1.1.5 IgG αντισώματα.....	20
1.1.6 Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα	22
1.1.7 Λεμφοκύτταρα.....	22
1.1.8 Δομή και λειτουργία των μορίων του MHC.....	24
1.1.9 Μιτογόνα	25
1.1.10 Κυτταροκίνες.....	26
1.1.11 Th1 και Th2 ανοσοαποκρίσεις	27
1.2 Εμβόλια	29
1.2.1 Τύποι εμβολίων	29
1.2.2 Ανοσοενισχυτικά	31
1.3 Πολυμερικές νανοσφαίρες βιοσυμβατού και βιοαποικοδομήσιμου πολυμερούς πολύ (γαλακτικού οξέως).....	34
1.3.1 Πολύ(γαλακτικό οξύ)	36
1.3.1.1 Σύνθεση του πολύ(γαλακτικού οξέος)	37
1.3.1.2 Ιδιότητες του πολύ (γαλακτικού οξέος)	40
1.3.2 Μέθοδοι παρασκευής νανοσωματιδίων.....	42
1.3.2.1 Νανοσωματίδια που λαμβάνονται με in situ πολυμερισμό	45
1.3.2.2 Νανοσωματίδια από ήδη παρασκευασμένα πολυμερή	46
1.3.2.3 Νανοσωματίδια από φυσικά μακρομόρια.....	52
1.3.3 Χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων	53
1.3.3.1 Μέγεθος νανοσωματιδίων	53
1.3.3.2 Επιφανειακές ιδιότητες των νανοσωματιδίων	55

1.3.3.3 Φόρτωση νανοσωματιδίων με φάρμακο	56
1.3.3.4 Αποδέσμευση φαρμάκων	57
1.3.3.5 Σύνδεση πρωτεϊνών in vivo	58
1.4 Διαδερμική ανοσοποίηση.....	59
1.4.1 Ο δερματικός φραγμός	61
1.4.2 Διαδερμική χορήγηση φαρμάκων	64
1.4.3 Συστήματα διαδερμικής ανοσοποίησης	65
1.5 Οβαλβουμίνη.....	72
1.6 Τοξίνη της χολέρας	74
1.7 Σκοπός της μελέτης.....	75
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	77
2.1 Υλικά.....	78
2.2 Όργανα	79
2.3 Αντιδραστήρια	81
2.3.1 Ρυθμιστικά διαλύματα	81
2.3.2 Αντιδραστήρια ανοσοανάλυσεων.....	81
2.3.3 Διαλύματα μέτρησης πρωτεϊνών από τα νανοσωματίδια.....	82
2.3.4 Διαλύματα για τις καλλιέργειες των κυττάρων	83
2.3.5 Διαλύματα για την επεξεργασία ιστών.....	84
2.4 Μέθοδοι.....	86
2.4.1 Παρασκευή και χαρακτηρισμός πολυμερών	86
2.4.2 Παρασκευή και χαρακτηρισμός νανοσφαιρών PLA	89
2.4.3 Παρασκευή PLA-φοριζόντων νανοσφαιρών για την μελέτη διείσδυσης τους στο δέρμα	93
2.4.2 Έλεγχος διατήρησης της αντιγονικότητας της οβαλβουμίνης μετά την ενκαψακίωσή της στις PLA νανοσφαίρες	94
2.4.3 Υπερανοσοποίηση και αιμοληψία από μύες	95
2.4.4 In vivo μελέτη της δυνατότητας διείσδυσης των νανοσφαιρών στο δέρμα μυών.....	96
2.4.5 Μελέτη προσδιορισμού της βέλτιστης δόσης του ενκαψακιωμένου αντιγόνου	98
2.4.6 Ανοσοποίηση	99

2.4.7 Ανάλυση μονάδων αντισωμάτων από αντιορούς που ελήφθησαν από ανοσοποιημένους μύες	103
2.4.8 Προσδιορισμός της ανοσολογικής απόκρισης σε κυτταρικό επίπεδο.....	104
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	109
3.1 Ταυτοποίηση και καθαρότητα πολυμερών	110
3.2 Χαρακτηριστικά των νανοσφαιρών πολύ-γαλακτικού οξέως.....	113
3.3 Αποτελέσματα μελέτης διατήρησης της αντιγονικότητας της οβαλβουμίνης.	115
3.4 Αποτελέσματα μελέτης διείσδυσης νανοσφαιρών στο δέρμα μυών.....	117
3.4.1 Μελέτη με χρήση φθορίζοντος μικροσκοπίου	117
3.4.2 Μελέτη με χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης.....	120
3.5 Αποτελέσματα μελέτης της βέλτιστης δόσης για την διαδερμική χορήγηση του ενκαψακιωμένου αντιγόνου	123
3.6 Αποτελέσματα διαδερμικής ανοσοποίησης	125
3.6.1 1 ^ο Πείραμα.....	125
3.6.2 2 ^ο Πείραμα.....	132
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	149
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	158
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	160
6.1 Κατάλογος εικόνων.....	161
6.2 Κατάλογος πινάκων	165
6.3 Συντμήσεις	167
6.4 Βιβλιογραφία.....	169

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το δέρμα λειτουργεί σαν μηχανικός φραγμός ενάντια σε ένα εχθρικό περιβάλλον. Παράλληλα λειτουργεί ως ένα ανοσολογικό εμπόδιο, το οποίο είναι πλούσιο σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, όπως τα κύτταρα Langerhans. Αν και είναι γενικά παραδεκτό ότι το δέρμα δεν είναι περατό από μεγαλομοριακές ουσίες, και συνεπώς δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως οδός χορήγησης αντιγόνων, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το δέρμα μπορεί να αποτελέσει οδό για τη χορήγηση αντιγόνων. Συγκεκριμένα έδειξαν ότι η διαδερμική χορήγηση ενός αντιγόνου μαζί με την τοξίνη της χολέρας ως ανοσοενισχυτικό επάγει ικανοποιητική ανοσοαπόκριση έναντι του αντιγόνου. Επιπρόσθετα, η διαδερμική χορήγηση της τοξίνης της χολέρας δεν εμφανίζει τοξικότητα όπως με άλλες οδούς χορήγησης.

Η διαδερμική χορήγηση εμβολίων εμφανίζει αρκετά πλεονεκτήματα καθώς αποφεύγεται ο μεταβολισμός πρώτης διόδου για τις ουσίες, ενώ παράλληλα αποφεύγεται η χρήση ενέσεων, μειώνοντας τον κίνδυνο μολύνσεων προερχόμενων από το αίμα. Επίσης για την διαδερμική χορήγηση εμβολίων δεν απαιτείται ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό και ο εμβολιασμός μέσω του άθικτου δέρματος αναμένεται να έχει μικρότερο κόστος.

Η υποδόρια χορήγηση αντιγόνων εγκλεισμένων σε PLA και PLGA μικροσφαίρες και νανοσφαίρες έχει ευρεθεί ότι επάγει ισχυρή και μακράς διάρκειας ανοσοαπόκριση. Μέχρι σήμερα δεν έχει μελετηθεί η δυνατότητα διαδερμικής χορήγησης αντιγόνων εγκλεισμένων σε πολυμερικά νανοσωματίδια. Έτσι, στην παρούσα μελέτη μελετήθηκε η ανοσοαπόκριση που λαμβάνεται μετά την διαδερμική χορήγηση οβαλβουμίνης (OVA) εγκλεισμένης σε νανοσφαίρες πολύ (γαλακτικού οξέως) (PLA) σε BALB/c μύες με ή χωρίς την συγχορήγηση ανοσοενισχυτικού, της τοξίνης της χολέρας (CT). Επίσης διερευνήθηκε ο πιθανός μηχανισμός εισόδου των νανοσφαιρών στο άθικτο δέρμα των μυών.

Για τη παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σε πρώτο στάδιο σύνθεση πολύ (γαλακτικού οξέως) (PLA) το οποίο χαρακτηρίστηκε ως προς το μοριακό του βάρος με χρωματογραφία διαπέρατοτητας πηκτής και ως προς την καθαρότητα του με

φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ($^1\text{H-NMR}$). Επίσης νανοσφαίρες PLA με ενκαψακιωμένη οβαλβουμίνη παρασκευάστηκαν με την μέθοδο του διπλού γαλακτώματος και χαρακτηρίστηκαν ως προς την μορφολογία με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, το μέγεθος με την τεχνική σκέδασης φωτός (μέσο μέγεθος 150nm) και ως προς την φόρτωση σε αντιγόνο (μέση φόρτωση 10%) με την μέθοδο του δικιγχονικού οξέος (BCA).

Σε προκαταρκτικά πειράματα ελέγχθηκε η διατήρηση της αντιγονικότητας της οβαλβουμίνης κατόπιν ενκαψακίωσης στα νανοσωματίδια με εξειδικευμένη ανοσοενζυμομετρική μέθοδο ELISA. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι η ενκαψακίωση της οβαλβουμίνης στις νανοσφαίρες προκάλεσε περίπου 30% μείωση της αντιγονικότητας της πρωτεΐνης.

Στην συνέχεια μελετήθηκε η ικανότητα των νανοσφαιρών να εισχωρούν στο δέρμα μυών μετά από εφαρμογή τους σε περιοχή της πλάτης των μυών από την οποία είχαν απομακρυνθεί οι τρίχες με ξύρισμα. Για αυτή την μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αρχικά κενές νανοσφαίρες φθορίζοντος πολυμερούς PLA-pyren-butanol (μονο-επισημασμένες) και νανοσφαίρες φθορίζοντος πολυμερούς PLA-pyren-butanol με ενκαψακιωμένη ροδαμίνη (διπλά-επισημασμένες). Με την βοήθεια φθορίζοντος μικροσκοπίου παρατηρήθηκε ότι οι νανοσφαίρες έχουν εισχωρήσει στις εσωτερικές στοιβάδες του ιστού, σε στοιβάδες αρκετά πιο βαθιά από την κερατίνη στοιβάδα. Στην συνέχεια διερευνήθηκε η οδός εισόδου νανοσφαιρών επισημασμένων με φθορίζουσα αλβουμίνη (FITC-albumin) στο δέρμα χρησιμοποιώντας συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης (confocal laser microscopy). Παρατηρήθηκε ότι οι νανοσφαίρες εμφανίστηκαν ικανές να διεισδύουν στο εσωτερικό του δέρματος μέσω των θυλάκων των τριχών του ιστού ενώ δεν παρατηρήθηκε άλλη οδός εισόδου των νανοσφαιρών στο εσωτερικό του δέρματος.

Για την ανίχνευση της ειδικής ανοσοαπόκρισης μελετήθηκαν αντιοροί προς την ολική IgG και των ισοτύπων IgG1 και IgG2a έναντι της οβαλβουμίνης. Επίσης πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε κυτταρικό επίπεδο στα σπληνοκύτταρα που ελήφθησαν από τους μύες οι οποίοι ανοσοποιήθηκαν διαδερμικά, με την μέτρηση του πολλαπλασιασμού των σπληνοκυττάρων και μετρήθηκαν τα επίπεδα των κυτταροκινών (IL-4, IL-10, IFN- γ και IL-2) στα υπερκείμενα καλλιέργειών των

σπληνοκυττάρων κατόπιν *in vitro* διέγερσης με το αντιγόνο. Η ικανότητα πολλαπλασιασμού των σπληνοκυττάρων κατόπιν διέγερσης με το αντιγόνο μελετήθηκε μετά από ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης. Τα επίπεδα των αντισωμάτων και τα επίπεδα των κυτταροκινών μετρήθηκαν με ειδικές ανοσοενζυμομετρικές αναλύσεις ELISA.

Στο πρώτο μέρος της μελέτης έγινε διαδερμική χορήγηση (σε ξυρισμένη περιοχή της πλάτης) διαφορετικών μορφών αντιγόνου (ενκαψακιωμένη ή ελεύθερη οβαλβουμίνη και παρουσία ή απουσία ανοσοενισχυτικού). Οι νανοσφαίρες με το αντιγόνο παρουσίασαν παρόμοια επίπεδα ολικών αντισωμάτων IgG με την ελεύθερη οβαλβουμίνη (οβαλβουμίνη σε υδατικό διάλυμα). Επιπρόσθετα, και με τις δύο μορφές χορήγησης του αντιγόνου (διάλυμα και νανοσφαίρες) η συγχορήγηση τοξίνης της χολέρας προκάλεσε αύξηση της παραγωγής αντισωμάτων IgG. Μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε στην περίπτωση των νανοσφαιρών. Τα αποτελέσματα του πειράματος σε κυτταρικό επίπεδο δείχνουν ότι οι νανοσφαίρες με το ενκαψακιωμένο αντιγόνο συν το ανοσοενισχυτικό προκάλεσαν αρκετά υψηλότερες αποκρίσεις IFN- γ σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες μορφές χορήγησης.

Στο δεύτερο μέρος της μελέτης διερευνήθηκε πρωταρχικά η ικανότητα της διαδερμικής χορήγησης ενκαψακιωμένου και μη-ενκαψακιωμένου αντιγόνου (OVA) να επάγει αυξημένη ανοσοαπόκριση μετά από μετέπειτα «πρόκληση» με το αντιγόνο (priming efficiency) και δευτερευόντως η ανοσοαπόκριση που λαμβάνεται με την συγχορήγηση μικρότερης δόσης ανοσοενισχυτικού (50 μ g τοξίνης της χολέρας ανά μ l). Διαπιστώθηκε ότι η συγχορήγηση έστω και μικρότερης δόσης ανοσοενισχυτικού προκαλεί βελτίωση της ανοσοαπόκρισης σε αντισώματα, ιδιαίτερα στην περίπτωση του ελεύθερου αντιγόνου. Πιο σημαντικό όμως ίσως είναι ότι τα επίπεδα ολικής IgG μετά από υποδόρια χορήγηση 50 μ g OVA ανά μ l (δόση «πρόκλησης») σε μύες που είχαν ήδη ανοσοποιηθεί με δύο διαδερμικές δόσεις ενκαψακιωμένης και μη-ενκαψακιωμένης OVA ήταν υψηλότερα (περίπου διπλάσια με όλες τις μορφές χορήγησης) από τα επίπεδα ολικής IgG που λήφθηκαν από μύες που δέχτηκαν μονάχα την υποδόρια δόση με το αντιγόνο. Σε κυτταρικό επίπεδο, οι νανοσφαίρες παρουσίασαν ελαφρώς υψηλότερα επίπεδα παραγωγής IFN- γ και IL-2 από το διάλυμα του αντιγόνου ενώ επέδειξαν παρόμοια επίπεδα IL-4 και IL-10 με το διάλυμα του αντιγόνου. Τα επίπεδα των IFN- γ και IL-2 που μετρήθηκαν για τις

νανοσφαίρες με το αντιγόνο συν το ανοσοενισχυτικό ήταν σημαντικά υψηλότερα από όλες τις άλλες μορφές χορήγησης του αντιγόνου. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι σε κυτταρικό επίπεδο η διαδερμική χορήγηση του αντιγόνου ενκαψακιωμένου σε PLA νανοσφαίρες πλεονεκτεί της χορήγησης του ελεύθερου αντιγόνου. Τα αυξημένα επίπεδα IFN- γ και IL-2 με την ενκαψακιωμένη μορφή του αντιγόνου είναι πιθανόν να σχετίζονται με αλλαγή της ισορροπίας της ανοσοαπόκρισης προς μία περισσότερο Th1 κατεύθυνση. Οι διαφορές που προκύπτουν στην ανοσογονική συμπεριφορά μεταξύ της ενκαψακιωμένης οβαλβουμίνης στις νανοσφαίρες και της ελεύθερης οβαλβουμίνης μπορεί να οφείλονται στον διαφορετικό τρόπο πρόσληψης και παρουσίασης του αντιγόνου από τα ανοσοπαρουσιαστικά κύτταρα.

Η διαδερμική χορήγηση του αντιγόνου ενκαψακιωμένου σε νανοσφαίρες PLA δεν παρείχε σημαντικό πλεονέκτημα όσον αφορά την χυμική ανοσοαπόκριση (παραγωγή αντισωμάτων) σε σύγκριση με την διαδερμική χορήγηση ελεύθερου αντιγόνου. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η διαδικασία της ενκαψακίωσης της οβαλβουμίνης προκάλεσε μείωση της αντιγονικότητάς της κατά 30% περίπου, είναι πιθανόν με την βελτιστοποίηση της παρασκευής των νανοσφαιρών ώστε να μην συμβαίνει απώλεια της αντιγονικότητας του αντιγόνου να μπορούν να ληφθούν ακόμη ισχυρότερες χυμικές αποκρίσεις με το ενκαψακιωμένο στις PLA νανοσφαίρες αντιγόνο.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι το σύστημα διαδερμικής χορήγησης του αντιγόνου (η σύνθεση του διαδερμικού «εμβολίου») έχει σημαντική επίδραση στην λαμβανόμενη ανοσοαπόκριση και δικαιολογούν την περαιτέρω μελέτη της χρησιμότητας των PLA νανοσφαιρών στην διαδερμική χορήγηση αντιγόνων.

ABSTRACT

The skin is part of the epithelial system of the body, which serves as an effective barrier against a potentially hostile environment. As a structural barrier, the skin keeps water and other vital substances in and foreign material out. As an immunological barrier the skin is rich of immunocompetent cells, such as Langerhans cells. Recent studies have demonstrated the potential of skin as a non-invasive route for administering antigens. In the case of protein antigens, the skin barrier limits the penetration of high molecular weight molecules, preventing their use for therapeutic purposes. However, co-administration of proteins with cholera toxin (CT) has been shown to enhance protein-specific antibody responses. Also, CT was not toxic when applied onto bare skin. Using non-invasive routes such as the skin for vaccine delivery could be advantageous for vaccination for several reasons. The use of needles is avoided, limiting the risk of infections from blood-borne pathogens. Also, the first-pass metabolism is avoided. Finally, transdermal vaccination does not require trained medical personnel and it is expected to be more economical.

Subcutaneous delivery of antigen-loaded PLA- and PLGA-microspheres and nanospheres has been found capable of inducing efficient and long-lasting immune responses. In the present study we investigated the immune responses obtained after transcutaneous administration of a model antigen (ovalbumin, OVA) encapsulated in PLA nanospheres. OVA-loaded PLA nanospheres were applied onto bare skin of Balb/c mice in the presence or the absence of CT and the immune responses obtained were compared to those obtained with free OVA (OVA aqueous solution). Also, we investigated the possible route of entry of the nanospheres in the skin.

PLA polymer was synthesized by melt polymerization and was characterized by ^1H -NMR and gel permeation chromatography (GPC). OVA-loaded nanospheres were prepared by a double emulsion technique and characterized for their size by photon correlation spectroscopy and for antigen loading by the bicinchoninic acid assay. The average size of the nanospheres was 150 nm and the loading with antigen was 10% w/w.

In a preliminary experiment, we evaluated the antigenicity of liberated OVA from nanospheres by ELISA. The results showed a reduction of OVA's antigenicity by about 30%.

We investigated the ability of nanospheres labeled with one fluorescent dye (1-pyrene-butanol coupled to PLA) and nanospheres labeled with two fluorescent dyes (1-pyrene-butanol/PLA and dextran-rhodamine) to penetrate into the mouse skin using fluorescent microscopy. The results indicated that the nanospheres were capable of entering into the inner layers of the skin. Then, we investigated the possible route of nanospheres entrance into the skin using confocal laser microscopy. The nanospheres appeared capable to enter the skin only through the duct of the hair follicles. We did not observe other modes of nanospheres entry into the skin in any of the skin samples examined.

Having established that the encapsulated OVA did not exhibit heavy antigenicity losses and that the PLA nanospheres can gain access into the mouse skin, we then proceeded in the evaluation of immune responses elicited after transcutaneous immunization with OVA aqueous solution and OVA-loaded PLA nanospheres. For the evaluation of the immune responses, total IgG, IgG1 and IgG2a levels were measured in anti-serum samples. We also measured the proliferative responses of splenocytes retrieved from the immunized mice and the IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10 responses in the supernatant of cultured splenocytes after in vitro stimulation with OVA.

On the first stage of the study, we transcutaneously immunized mice onto their bare back with OVA in solution or OVA-loaded nanospheres (200 μ g OVA per mouse) in the presence or absence of CT (100 μ g CT per mouse). The OVA-loaded nanospheres elicited similar total IgG responses with the OVA solution. With both modes of antigen delivery (aqueous solution and nanospheres-entrapped), the co-administration of CT adjuvant increased IgG response, especially that obtained with the OVA-loaded nanospheres. Also, the OVA-loaded nanospheres plus CT exhibited higher IFN- γ responses than the other formulations tested but similar IL-4 and IL-10 responses.

On the second stage of the study, we investigated mainly the ability of transcutaneous delivery of OVA-loaded nanospheres and OVA solution to induce an increased immune response after a subcutaneous booster (“challenge”) with the antigen. Also, we investigated the immune responses obtained by transcutaneous immunization with a lower dose of CT. We observed that even a relatively small amount of CT (50 µg per mouse) could augment antibody responses, especially in the case of the free antigen. It is important to note that the IgG responses obtained after subcutaneous booster with OVA (50 µg per mouse) of mice previously primed with 2 transcutaneous doses of the different OVA formulations were significantly higher than the IgG responses obtained by mice which received only the subcutaneous dose of OVA. This would indicate that transcutaneous administration of antigens in the form of aqueous solution or antigen-loaded nanospheres can prime antibody responses (can induce “memory” response). All formulations elicited both IgG1 and IgG2a responses, indicating a balanced type of immune response.

The OVA-loaded nanospheres exhibited a little higher IFN- γ and IL-2 responses than the OVA-solution and similar IL-4 and IL-10 responses with the OVA solution. On the other hand, the OVA-loaded nanospheres plus CT induced much higher IFN- γ and IL-2 responses than all other formulations tested. These results indicate that as far as the cellular responses induced by transcutaneous antigen administration is concerned it may be advantageous to deliver the antigen in nanosphere-encapsulated form rather than in free (aqueous solution) form. The increased IFN- γ and IL-2 levels obtained with the encapsulated forms of OVA compared to the soluble forms of OVA may indicate a possibility of altering the balance of immune response towards a Th1-type of response using nanosphere-encapsulated antigens. The differences in the immunogenic behavior between the encapsulated antigen (OVA entrapped in nanospheres) and free antigen (OVA solution) may arise from the facilitated uptake and presentation of the encapsulated antigen by antigen presenting cells.

Taking into account that the encapsulation of OVA in the nanospheres was accompanied by a significant (around 30%) reduction of OVA antigenicity, it might be expected that optimized OVA-loaded nanospheres, in which the protein would retain its full antigenic potential, could have resulted to more potent IgG responses than those obtained in this study.

The results of the present study reveal that the type of antigen formulation could have a pronounced effect on the immune response obtained after transcutaneous administration of the antigen and justify the further investigation of the possible advantages of using PLA nanospheres as the antigen delivery system in transcutaneous immunization.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Στοιχεία ανοσοποιητικού συστήματος

Η δυνατότητα απόκρισης του ανοσοποιητικού συστήματος ενάντια σε ασθένειες αναγνωρίστηκε κυρίως στις αρχές του 20^{ου} αιώνα από τον Paul Ehrlich, ο οποίος τόνισε ότι το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί προσεκτικά να ξεχωρίσει την διαφορά μεταξύ εσωτερικών και εξωτερικών παραγόντων και την δυνατότητα αποφυγής αυτοάνοσων φαινομένων. Ο Ehrlich προέβλεψε ότι στην ανάπτυξη των ανοσοαποκρίσεων κατόπιν διέγερσης με αντιγόνα, υπάρχουν σαφείς μηχανισμοί που ελέγχουν την ανάπτυξη των κλώνων των κυττάρων μονάχα έναντι του αντιγόνου και όχι του ιδίου του οργανισμού. [1]. Επιπρόσθετα, η αδυναμία του ελέγχου αυτής της ανάπτυξης θα οδηγούσε σε αυτοάνοσα νοσήματα. Αυτή η ιδέα ενισχύθηκε με την βοήθεια της υπόθεσης της επιλογής των κατάλληλων κλώνων κυττάρων για κάθε διεγέρτη [2-4]. Αυτή η υπόθεση ισχυροποιήθηκε με την αναγνώριση των αντιγονικών υποδοχέων στα T και B λεμφοκύτταρα και της ανακάλυψης ότι η ειδικότητα των αντιγονικών υποδοχέων είναι αποτέλεσμα συνδυασμών πολλών γονιδίων που κωδικοποιούν τα σημεία πρόσδεσης των αντιγόνων πάνω σε αυτούς τους υποδοχείς, μια διαδικασία που μπορεί να παράγει πάνω από 10^9 διαφορετικούς υποδοχείς [5].

1.1.1 Φυσική και επίκτητη ανοσία

Οι μηχανισμοί άμυνας του ξενιστή περιλαμβάνουν τη φυσική ανοσία, που μεσολαβεί στην αρχική φάση της προστασίας απέναντι στις λοιμώξεις, και την επίκτητη ανοσία, που αναπτύσσεται πιο αργά και μεσολαβεί στο όψιμο, αλλά πιο αποτελεσματικό στάδιο της άμυνας απέναντι στα μικρόβια. Ο όρος «φυσική» ανοσία αναφέρεται στο γεγονός ότι ο τύπος αυτός της άμυνας του ξενιστή υπάρχει πάντα σε υγιή άτομα, έτοιμος να σταματήσει την είσοδο των μικροοργανισμών και να απομακρύνει γρήγορα τους μικροοργανισμούς που επιτυγχάνουν να εισέλθουν στους ιστούς του ξενιστή. «Επίκτητη» ανοσία είναι ο τύπος της άμυνας του ξενιστή που διεγείρεται από τους μικροοργανισμούς που εισβάλλουν στους ιστούς, δηλαδή προσαρμόζεται στην παρουσία μικροβιακών εισβολέων.

Το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα αποτελείται από τα λεμφοκύτταρα και τα προϊόντα τους, όπως τα αντισώματα. Ενώ οι μηχανισμοί της φυσικής ανοσίας αναγνωρίζουν δομές κοινές σε διάφορα είδη μικροοργανισμών, τα κύτταρα της επίκτητης ανοσίας, δηλαδή τα λεμφοκύτταρα, εκφράζουν υποδοχείς οι οποίοι αναγνωρίζουν ειδικά συγκεκριμένες ουσίες που παράγονται από μικροοργανισμούς καθώς και μη μολυσματικές ουσίες. Οι ουσίες αυτές ονομάζονται αντιγόνα. Οι επίκτητες ανοσοαποκρίσεις ενεργοποιούνται μόνο αν οι μικροοργανισμοί ή τα αντιγόνα τους διαπεράσουν τους επιθηλιακούς φραγμούς και αναγνωρισθούν από τα λεμφοκύτταρα. Οι επίκτητες ανοσοαποκρίσεις δημιουργούν μηχανισμούς εξειδικευμένους για την αντιμετώπιση διαφόρων τύπων λοιμώξεων. Για παράδειγμα τα αντισώματα εξουδετερώνουν μικροοργανισμούς στα εξωκυττάρια υγρά, ενώ τα ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα εξουδετερώνουν ενδοκυττάριους μικροοργανισμούς [6].

1.1.2 Τύποι της επίκτητης ανοσίας

Υπάρχουν δύο τύποι επίκτητης ανοσίας, η χυμική ανοσία (humoral immunity) και η κυτταρική ανοσία (cell-mediated immunity), στις οποίες μεσολαβούν διαφορετικά μόρια και κύτταρα και παρέχουν την άμυνα κατά εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων μικροοργανισμών αντίστοιχα. Στην χυμική ανοσία μεσολαβούν πρωτεΐνες που ονομάζονται αντισώματα, οι οποίες παράγονται από κύτταρα που ονομάζονται Β λεμφοκύτταρα. Τα αντισώματα εκκρίνονται στην κυκλοφορία και στα υγρά των βλεννογόνων, όπου εξουδετερώνουν και απομακρύνουν τους μικροοργανισμούς και τις τοξίνες τους που βρίσκονται στο αίμα. Τα αντισώματα δεν μπορούν όμως να φτάσουν σε μικροοργανισμούς μέσα σε μολυσμένα κύτταρα. Η άμυνα κατά τέτοιων ενδοκυττάρων οργανισμών ονομάζεται κυτταρική ανοσία επειδή μεσολαβούν κύτταρα, τα Τ λεμφοκύτταρα. Ορισμένα Τ λεμφοκύτταρα ενεργοποιούν τα φαγοκύτταρα ενώ άλλα μπορούν να σκοτώσουν κάθε τύπο κυττάρων του ξενιστή που φιλοξενεί λοιμώδεις μικροοργανισμούς στο κυτταρόπλασμα τους [6].

1.1.3 Αντιγόνα

Με τον όρο αντιγόνα χαρακτηρίζονται εκείνες οι χημικές ενώσεις οι οποίες έχουν την ιδιότητα να διεγείρουν τα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος (B- και T-λεμφοκύτταρα) με αποτέλεσμα την ανάπτυξη μιας ειδικής ανοσολογικής απόκρισεως. Η ειδική ανοσολογική απόκριση εκδηλώνεται με την παραγωγή διαλυτών ουσιών, των αντισωμάτων, από τα B-λεμφοκύτταρα, ή την ανάπτυξη αντιδράσεων κυτταρικής ανοσίας από τα T-λεμφοκύτταρα, ενώ σε πολλές περιπτώσεις εκδηλώνονται ταυτόχρονα και οι δύο μηχανισμοί της ανοσολογικής απόκρισεως, [7].

Κατά συνέπεια, το αντιγόνο έχει δύο ιδιότητες:

- α) Δρα ως ανοσογόνο, δηλαδή προκαλεί ανοσολογική απόκριση
- β) Αντιδρά ειδικά με το προϊόν της ανοσολογικής απόκρισεως του οργανισμού

1.1.4 Αντισώματα

Πρωτεϊνικά μόρια τα οποία συνδέονται ειδικά με αντιγόνα καλούνται αντισώματα (antibodies, ab(s)). Οι πρωτεΐνες που έχουν αντισωματική δράση αναφέρονται ως ανοσοσφαιρίνες (Immunoglobulins – Ig(s)) και χαρακτηρίζονται ως γ-σφαιρίνες με μοριακά βάρη κυμαινόμενα από 150.000 ως 900.000. Όλες οι ανοσοσφαιρίνες έχουν την ίδια βασική δομή και αποτελούνται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, δύο μεγάλες και δύο μικρές. Οι μεγάλες αλυσίδες καλούνται και βαριές αλυσίδες (Heavy chains) και οι μικρές καλούνται ελαφριές αλυσίδες (Light chains).

Με βάση διαφορές στις καθοριστικές ομάδες του μορίου, οι βαριές αλυσίδες διακρίνονται σε πέντε είδη, την γ, α, μ, δ, και ε και οι ελαφριές αλυσίδες σε δύο είδη, την κ και λ. Το μόριο της ανοσοσφαιρίνης αποτελείται από δύο πανομοιότυπες βαριές και δύο πανομοιότυπες ελαφριές αλυσίδες. Ανάλογα με το είδος της βαριάς αλυσίδας διακρίνονται πέντε τάξεις ανοσοσφαιρινών, η IgG, IgA, IgM, IgD και IgE. Τα μόρια των Igs παράγονται από τα πλασματοκύτταρα, τελικά κύτταρα των Β λεμφοκυττάρων [7].

Κάθε ελαφριά αλυσίδα συνδέεται με μια βαριά αλυσίδα και οι δύο βαριές αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους, όλες με δισουλφιδικούς δεσμούς. Η κάθε περιοχή (μεταβλητή ή σταθερή) των αλυσίδων αναδιπλώνεται παίρνοντας μια χαρακτηριστική τρισδιάστατη μορφή που ονομάζεται περιοχή ανοσοσφαιρίνης. Στην Εικόνα 1.1 φαίνεται χαρακτηριστικά ότι στα αντισώματα υπάρχουν τουλάχιστον δύο μεταβλητές θέσεις, όπου πραγματοποιείται η πρόσληψη των αντιγόνων.

Εικόνα 1.1: Παρουσίαση της σταθερής και της μεταβλητής περιοχής ενός αντισώματος.

Τα τμήματα του αντιγόνου που αναγνωρίζονται από τα αντισώματα ονομάζονται *επίτοποι*. Η αναγνώριση διαφόρων αντιγονικών επιτόπων μπορεί να εξαρτάται από την αλληλουχία των αμινοξέων τους ή από το σχήμα τους. Κάθε μόριο αντισώματος μπορεί να προσδεθεί σε δύο μέχρι δέκα επιτόπους ενός ή πολλών αντιγόνων. Τα αντισώματα προσδένονται στα αντιγόνα μέσω αναστρέψιμων, μη ομοιοπολικών αλληλοεπιδράσεων, που περιλαμβάνουν δεσμούς υδρογόνου αλλά και αλληλεπιδράσεις ηλεκτρικών φορτίων [6].

Η λειτουργία των αντισωμάτων βασίζεται στους εξής διαφορετικούς τρόπους:

- 1) Συγκόλληση στους αντιγονικούς παράγοντες και σχηματισμός μιας μάζας μεγάλου μοριακού βάρους.
- 2) Καθίζηση, κατά την οποία το σύμπλεγμα του διαλυτού αντιγόνου και του αντισώματος γίνεται αδιάλυτο και καθιζάνει
- 3) Εξουδετέρωση, δηλαδή κάλυψη των τοξικών θέσεων του αντιγονικού παράγοντα από τα αντισώματα
- 4) Λύση, στην οποία μερικά πολύ ισχυρά αντισώματα είναι ικανά για άμεση προσβολή των μεμβρανών των κυτταρικών παραγόντων, με συνέπεια την ρήξη του κυττάρου.

1.1.5 IgG αντισώματα

Το μόριο της IgG αποτελείται από δύο βαριές αλυσίδες γ που ανήκουν στην ίδια υποτάξη και φέρουν τους ίδιους αλλότυπους. Το μοριακό βάρος της IgG είναι 150.000. Αποτελεί το 80% των ανοσοσφαιρινών του ορού του αίματος και των εσωτερικών εκκρίσεων. Η μεγάλη συγκέντρωση της στο ορό είναι αποτέλεσμα του μεγάλου ρυθμού συνθέσεων και του μικρού ρυθμού καταβολισμού της συγκεκριμένης ανοσοσφαιρίνης. Αντιγονικές καθοριστικές ομάδες στο σταθερό τμήμα διαχωρίζουν τη γ αλυσίδα σε τέσσερις υποτάξεις (ισότυπους), ενώ άλλες καθοριστικές ομάδες στο ίδιο τμήμα διαχωρίζουν περαιτέρω τις υποτάξεις σε αλλότυπους. Το μόριο της IgG είναι σταθερό στους 56° – 60° C και διατηρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα στη θερμοκρασία ψυγείου (4° C). Σε κάθε αντιγονικό ερεθισμό πρώτη παράγεται η IgM σε μικρά ποσά και ακολουθεί η παραγωγή της IgG σε μεγαλύτερα ποσά. Η παραγωγή της IgG προσφέρει στον οργανισμό ανοσολογική μνήμη. Κατά την δεύτερη χορήγηση του ίδιου αντιγόνου πρώτη παράγεται πάλι η IgM σε μικρά ποσά, και ακολουθεί η παραγωγή πολύ μεγάλων ποσών της IgG. Το ίδιο επαναλαμβάνεται και κατά τις αναμνηστικές χορηγήσεις του αντιγόνου.

Εικόνα 1.2: Δομή αντισώματος IgG2a

Η IgG δρα επίσης ως οψωνίνη. Η οψωνική δράση της IgG συμβάλλει ουσιαστικά στην αναγνώριση του μικροβιακού παράγοντα από τα κύτταρα του οργανισμού. Η ιδιότητα αυτή αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την έναρξη της ενσωματώσεως (φαγοκυτταρώσεως) του μικροβιακού κυττάρου ή σωματιδίων από το φαγοκύτταρο [7].

1.1.6 Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα

Τα πρωτεϊνικά αντιγόνα των μικροοργανισμών που εισέρχονται στον οργανισμό προσλαμβάνονται από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs) και συγκεντρώνονται στα περιφερικά λεμφικά όργανα, όπου και ξεκινούν οι ανοσοαποκρίσεις. Οι μικροοργανισμοί εισέρχονται στον οργανισμό κυρίως μέσω του δέρματος (μέσω επαφής), του γαστρεντερικού σωλήνα (μέσω κατάποσης) και από το αναπνευστικό σύστημα (μέσω εισπνοής). Όλες οι διεπιφάνειες μεταξύ του οργανισμού και του εξωτερικού περιβάλλοντος επενδύονται από συνεχή επιθήλια, των οποίων η κύρια λειτουργία είναι να προσφέρουν ένα μηχανικό φραγμό στη λοίμωξη. Τα επιθήλια περιέχουν ένα πληθυσμό APCs που ανήκει στην σειρά των δενδριτικών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά απαντώνται επίσης στις πλούσιες σε T κύτταρα περιοχές των περιφερικών λεμφικών οργάνων και σε μικρότερο αριθμό στα περισσότερα υπόλοιπα όργανα.

Στο δέρμα, τα επιδερμικά δενδριτικά κύτταρα ονομάζονται κύτταρα Langerhans. Τα δενδριτικά κύτταρα προσλαμβάνουν τα αντιγόνα μικροοργανισμών που εισέρχονται στο επιθήλιο, μέσω φαγοκυττάρωσης (για σωματιδιακά αντιγόνα) ή μέσω πινοκυττάρωσης (για διαλυτά αντιγόνα). Με μια σειρά μηχανισμών και την παραγωγή κυτταροκινών TNF (παράγοντας νέκρωσης όγκου) και IL-1, τα δενδριτικά κύτταρα αποκολλούνται από το ενδοθήλιο και μεταναστεύουν μέσω των λεμφαγγείων που παροχετεύουν το επιθήλιο προς τους λεμφαδένες. Κατά την μετανάστευση, τα κύτταρα αυτά ωριμάζουν και γίνονται ικανά να διεγείρουν T λεμφοκύτταρα προς ανοσοαπόκριση. Το συνολικό αποτέλεσμα αυτής της διεργασίας είναι ότι τα πρωτεϊνικά αντιγόνα των μικροοργανισμών που εισβάλλουν στον οργανισμό, μεταφέρονται και συγκεντρώνονται σε περιοχές των λεμφαδένων όπου τα αντιγόνα είναι πιθανότερο να συναντήσουν T λεμφοκύτταρα [6].

1.1.7 Λεμφοκύτταρα

Τα λεμφοκύτταρα είναι τα μοναδικά κύτταρα με ειδικούς υποδοχείς για αντιγόνα και έτσι έχουν ένα ρόλο κλειδί στην επίκτητη ανοσία. Αν και όλα τα λεμφοκύτταρα είναι μορφολογικά όμοια και χωρίς κάτι αξιοσημείωτο στην εμφάνισή τους, είναι

εξαιρετικά ετερογενή όσον αφορά την προέλευση τους, την λειτουργία τους και τον φαινότυπό τους καθώς είναι επίσης ικανά να επιτελούν περίπλοκες βιολογικές δραστηριότητες. Τα κύτταρα αυτά μπορούν να διακριθούν με βάση τις επιφανειακές τους πρωτεΐνες που ανιχνεύονται με μονοκλωνικά αντισώματα. Η ονοματολογία των πρωτεϊνών αυτών είναι οι χαρακτήρες «CD» (cluster of differentiation, ομάδα διαφοροποίησης) συνοδευόμενοι με έναν αριθμό, ο οποίος χρησιμοποιείται για να καθορίσει επιφανειακές πρωτεΐνες που προσδιορίζουν ένα στάδιο της κυτταρικής διαφοροποίησης και αναγνωρίζονται από μια ομάδα αντισωμάτων.

Τα Β λεμφοκύτταρα είναι τα μόνα κύτταρα ικανά να παράγουν αντισώματα και επομένως είναι τα κύτταρα που μεσολαβούν στη χυμική ανοσία. Τα Β κύτταρα εκφράζουν τις μεμβρανικές μορφές των αντισωμάτων, οι οποίες χρησιμεύουν σαν υποδοχείς αναγνώρισης αντιγόνου και κινητοποιούν τη διαδικασία ενεργοποίησης των κυττάρων αυτών. Τα Τ λεμφοκύτταρα είναι τα κύτταρα της κυτταρικής ανοσίας. Ο αντιγονικός υποδοχέας των Τ λεμφοκυττάρων αναγνωρίζει μόνο πεπτιδικά τμήματα πρωτεϊνικών αντιγόνων τα οποία είναι προσδεμένα σε ειδικά μόρια παρουσίασης πεπτιδίων. Τα μόρια αυτά ονομάζονται μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC) και βρίσκονται στην επιφάνεια εξειδικευμένων κυττάρων, που ονομάζονται αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Antigen-Presenting Cells, APCs).

Μεταξύ των Τ λεμφοκυττάρων, τα CD4⁺ Τ λεμφοκύτταρα ονομάζονται βοηθητικά Τ κύτταρα επειδή βοηθούν τα Β λεμφοκύτταρα να παράγουν αντισώματα και τα φαγοκύτταρα να καταστρέψουν τους μικροοργανισμούς που έχουν ήδη φαγοκυτταρωθεί. Τα CD8⁺ Τ λεμφοκύτταρα ονομάζονται κυτταροτοξικά ή κυτταρολυτικά Τ λεμφοκύτταρα επειδή φονεύουν κύτταρα που φέρουν ενδοκυττάριους μικροοργανισμούς, δηλαδή λύουν άλλα κύτταρα. Όλα τα λεμφοκύτταρα προέρχονται από πολυδύναμα προγονικά κύτταρα (stem cells) του μυελού των οστών. Τα Β λεμφοκύτταρα ωριμάζουν στο μυελό των οστών και τα Τ λεμφοκύτταρα στο θύμο αδέν. Οι θέσεις αυτές στις οποίες παράγονται ώριμα λεμφοκύτταρα ονομάζονται κεντρικά λεμφικά όργανα [6].

1.1.8 Δομή και λειτουργία των μορίων του MHC

Τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) είναι πρωτεΐνες της μεμβράνης των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APCs) που παρουσιάζουν πεπτιδικά αντιγόνα ώστε να αναγνωρισθούν από τα T λεμφοκύτταρα. Το MHC ανακαλύφθηκε σαν ο γενετικός τόπος που καθόρισε κατά κύριο λόγο την αποδοχή ή την απόρριψη ιστικών μοσχευμάτων από ένα άτομο σε άλλο. Με άλλα λόγια, τα άτομα που είναι πανομοιότυπα στον τόπο MHC θα αποδεχθούν μοσχεύματα το ένα του άλλου, ενώ άτομα που διαφέρουν στον τόπο MHC θα απορρίψουν τα μοσχεύματα αυτά. Τώρα πια γνωρίζουμε ότι η φυσιολογική λειτουργία των μορίων MHC είναι η παρουσίαση πεπτιδίων από πρωτεϊνικά αντιγόνα στα αντιγονο-ειδικά T λεμφοκύτταρα.

Σε όλα τα είδη, ο τόπος MHC περιέχει δύο ομάδες εξαιρετικά πολυμορφικών γονιδίων, τα γονίδια του MHC τάξης I και II. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν τα μόρια MHC τάξης I και II τα οποία παρουσιάζουν πεπτίδια στα T κύτταρα.

Τα μόρια MHC τάξης I και II είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες η καθεμία από τις οποίες περιέχει μια αύλακα σύνδεσης του πεπτιδίου στο αμινοτελικό τους άκρο. Κάθε μόριο τάξης I αποτελείται από μια α αλυσίδα, μη ομοιοπολικά συνδεδεμένη σε μια πρωτεΐνη, τη β2-μικροσφαιρίνη, η οποία κωδικοποιείται εκτός του MHC. Τα αμινοτελικά τμήματα των περιοχών α1 και α2 του μορίου MHC τάξης I σχηματίζουν μια αύλακα σύνδεσης του πεπτιδίου, η οποία είναι αρκετά μεγάλη ώστε να εφαρμόζουν πεπτίδια 8 ως 11 αμινοξέων. Τα πεπτίδια που θα παρουσιαστούν στα T λεμφοκύτταρα συνδέονται στη βάση της αύλακας σύνδεσης του πεπτιδίου, ενώ ο υποδοχέας των T κυττάρων έρχεται σε επαφή με τις πλευρές της αύλακας.

Κάθε μόριο MHC τάξης II αποτελείται από δύο αλυσίδες, τις α και β. Τα αμινοτελικά τμήματα και των δύο αλυσίδων, οι περιοχές α1 και β1, περιέχουν πολυμορφικά αμινοξέα και σχηματίζουν μια αύλακα αρκετά μεγάλη ώστε να εφαρμόζουν πεπτίδια μήκους 10 ως 30 αμινοξέων. Η μη πολυμορφική περιοχή β2 περιέχει τη θέση σύνδεσης του συνυποδοχέα CD4 των T κυττάρων. Επειδή το CD4 συνδέεται με τα μόρια MHC τάξης II, τα CD4+ T κύτταρα απαντούν μόνο σε πεπτίδια που παρουσιάζονται από μόρια MHC τάξης II. Τα μόρια τάξης I

εκφράζονται σε όλα τα εμπύρηντα κύτταρα, αλλά τα μόρια τάξης II εκφράζονται κυρίως στα επαγγελματικά APCs, όπως τα δενδριτικά κύτταρα καθώς και στα μακροφάγα και στα Β λεμφοκύτταρα [6].

Εικόνα 1.3: Μόρια MHC I (αριστερά) και II (δεξιά)

1.1.9 Μιτογόνα

Μιτογόνα είναι ουσίες, οι οποίες προάγουν τις μιτώσεις και χρησιμοποιούνται ευρέως στην ανοσολογία για την διέγερση, τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων. Ως μιτογόνα χρησιμοποιούνται φυτικές πρωτεΐνες (λεκτίνες) και προϊόντα βακτηρίων. Ορισμένα μιτογόνα είναι ειδικά για τα Β-λεμφοκύτταρα, άλλα για τα Τ-λεμφοκύτταρα, ενώ μια τρίτη κατηγορία μιτογόνων διεγείρει και τους δύο πληθυσμούς των λεμφοκυττάρων. Το μιτογόνο προκαλεί μη ειδική διέγερση των λεμφοκυττάρων, δηλαδή διεγείρει όλους τους κλώνους.

Κονκαναβαλίνη Α (Concanavalin A, Con A)

Η Con A είναι πρωτεΐνη η οποία λαμβάνεται δια εκχυλίσεως από ένα είδος φασολιού. Σε pH μεγαλύτερο από 7 βρίσκεται ως τετραμερές, ενώ σε pH μικρότερο από 6 βρίσκεται ως διμερές. Η κάθε υπομονάδα του τετραμερούς ή του διμερούς έχει M.B. ίσο με 25000.

Η Con A συνδέεται με α-D-mannopyranosides και α-D-glucopyranosides της μεμβράνης των T λεμφοκυττάρων. Η σύνδεση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη διέγερση των T λεμφοκυττάρων και την έναρξη των μιτώσεων.

1.1.10 Κυτταροκίνες

Κατά τη διάρκεια της ανοσολογικής αποκρίσεως παράγονται από τα κύτταρα διάφορες διαλυτές ουσίες, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως κυτταροκίνες. Οι ουσίες αυτές ασκούν τη δράση τους τοπικά σε άλλα κύτταρα, σε κύτταρα-στόχους μακριά από την παραγωγή τους, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις ασκούν δράση και στα κύτταρα τα οποία τις παράγουν.

Οι κυτταροκίνες διαφέρουν από τις ανοσοσφαιρίνες, αφ'ενός μεν επειδή δεν έχουν ειδικότητα για τα αντιγόνα, τα οποία διεγείρουν την παραγωγή τους, και αφ'ετέρου επειδή η δράση τους ασκείται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις.

Όλες οι κυτταροκίνες είναι πολυπεπτίδια και αποτελούνται από 127 έως 223 αμινοξέα, παράγονται κυρίως από τα μονοκύτταρα/μακροφάγα και τα T-λεμφοκύτταρα, αλλά και από άλλα είδη κυττάρων. [7]

Οι κυτταροκίνες είναι πρωτεΐνες που ρυθμίζουν ένα μεγάλο φάσμα βιολογικών λειτουργιών, περιλαμβάνοντας ανοσολογικές αποκρίσεις και επιδιορθώσεις ιστών. Στην δεκαετία του 1980, υπήρξε μεγάλη αύξηση στην βιβλιογραφία όσον αφορά τις κυτταροκίνες ανθρώπων και μύων. Τα τελευταία χρόνια υπήρξε πρόοδος στην κλωνοποίηση και χαρακτηρισμό κυτταροκινών από ζώα [10, 16]. Οι κυτταροκίνες

μπορούν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα ενός εμβολιασμού με ανταγωνιστικά φαινόμενα σε όλα τα στάδια της ανοσοαπόκρισης, περιλαμβάνοντας την ενίσχυση ή μη της αντιγονοπαρουσίασης, το είδος των παραγόμενων λεμφοκυττάρων, ρύθμιση των αντισωματικών ισοτύπων και επέκταση της ανοσολογικής μνήμης των T και B λεμφοκυττάρων. Έχουν πραγματοποιηθεί προσπάθειες για καθορισμό του μηχανισμού των ανοσολογικών αποκρίσεων κατά τον εμβολιασμό ή γενικά την απομάκρυνση των παθογόνων από τους οργανισμούς με βάση την λειτουργία των κυτταροκινών. Αυτές οι μελέτες παρέχουν στοιχεία για περαιτέρω βελτίωση των μεθόδων ανοσοποίησης.

1.1.11 Th1 και Th2 ανοσοαποκρίσεις

Πιθανών η πιο σημαντική ανακάλυψη στην κυτταρική ανοσολογία υπήρξε η ανακάλυψη ότι πολλά από τα T κύτταρα μυνών μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως Th1 ή Th2 τύπου. Αυτές οι υποκατηγορίες των κυττάρων χαρακτηρίζονται από τις κυτταροκίνες που παράγουν. Τα Th1 κύτταρα παράγουν ιντερλευκίνη 2 (IL-2), ιντερφερόνη γ (IFN- γ) και λυμφοτοξίνη (LT) ενώ τα Th2 παράγουν ιντερλευκίνη 4 (IL-4), ιντερλευκίνη 5 (IL-5), ιντερλευκίνη 9 (IL-9), ιντερλευκίνη 10 (IL-10) και ιντερλευκίνη 13 (IL-13). Και οι δύο κατηγορίες κυττάρων παράγουν IL-3, παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF- α) και παράγοντα διέγερσης μακροφάγων (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)). Παρόλα αυτά, δεν κατηγοριοποιούνται όλοι οι κλώνοι των T κυττάρων σε αυτές τις δύο κατηγορίες. Έρευνες έχουν δείξει ότι πολλοί ανθρώπινοι και μυϊκοί κλώνοι παράγουν και Th1 και Th2 κυτταροκίνες [11, 12, 13]. Αυτά τα κύτταρα χαρακτηρίζονται ως Th0 και αποτελούν τα πρόδρομα T κύτταρα που ωριμάζουν σε Th1 ή Th2 τελικώς. Η τελική διαφοροποίηση των κυττάρων εξαρτάται από το αντιγόνο που έχουν διεγερθεί και τις παραγόμενες κυτταροκίνες.

Μελέτες δείχνουν ότι τέτοια κατηγοριοποίηση υπάρχει και στους ανθρώπους. Ανθρώπινα Th1 κύτταρα αναπτύσσονται κατά την διάρκεια μολύνσεων από ενδοκυττάρια βακτήρια και ιούς, ενώ Th2 κύτταρα αναπτύσσονται σε εξωκυττάρια μολύνσεις [17]. Στους ανθρώπους με μη ικανοποιητική ανοσολογική απόκριση κατά

την διάρκεια μόλυνσης από ιούς, μια αλλαγή από Th1 σε Th2 ανοσοαπόκριση έχει σαν αποτέλεσμα ο οργανισμός να νοσεί [8].

Η ανακάλυψη ότι η IL-12 και οι κλινικές της δυνατότητες σαν θεραπευτικός παράγοντας κατά μολυσματικών ασθενειών και του καρκίνου υπήρξε πολύ σημαντική. Η IL-12 παράγεται από φαγοκύτταρα, B κύτταρα και άλλα APCs για την αντιμετώπιση βακτηρίων, προϊόντων βακτηρίων και ενδοκυτταρικά παράσιτα. Αυτή η κυτταροκίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην φυσική και επίκτητη ανοσοαπόκριση. Παράγεται από τα μακροφάγα και B λεμφοκύτταρα προωθώντας την ανάπτυξη Th1 κυττάρων που παράγουν IL-2 και IFN- γ και γενικά ενεργοποιεί μηχανισμούς κυτταρικής αντίστασης εναντίων παθογόνων [19]. Από την άλλη, η IL-4 είναι η καθοριστική κυτταροκίνη που προωθεί την ανάπτυξη Th2 κυττάρων [14, 18].

Ένα άλλο παράδειγμα της σημαντικότητας των κυτταροκινών και στην επίδραση που έχουν στον τύπο της ανοσοαπόκρισης (Th1 ή Th2) παρουσιάστηκε όταν κύτταρα Th1 μετατράπηκαν σε Th2 παρουσία IL-4 [15]. Πρόδρομα T λεμφοκύτταρα χρειάζονται να δεχτούν δύο σήματα για την παραγωγή κυτταροκινών και τον πολλαπλασιασμό τους. Το πρώτο σήμα αποτελεί την ένωση του υποδοχέα του T κυττάρου με αντιγονικό πεπτίδιο, το οποίο βρίσκεται στο κατάλληλο μόριο συμπλέγματος μείζονος ιστοσυμβατότητας. Το δεύτερο σήμα προέρχεται από επιφανειακά μόρια των APCs. Αναλόγως με το τύπο των APCs, ενισχύεται και η πρόκληση είτε Th1 είτε Th2 ανοσοαπόκρισης. Έχει παρουσιαστεί ότι επαγγελματικά APCs όπως τα δενδριτικά κύτταρα προκαλούν Th1 ανοσοαπόκριση ενώ επιθηλιακά ή B κύτταρα ενισχύουν Th2 ανοσοαπόκριση. Επίσης μικρή δόση του αντιγόνου ενισχύει μια Th1 ανοσοαπόκριση ενώ μια υψηλή δόση ενισχύει μια Th2 στις περίπτωση όπου τα αντιγόνα παρουσιάζονται από B ή δενδριτικά κύτταρα.

Οι κυτταροκίνες επίσης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή αντισωμάτων καθώς επηρεάζουν σημαντικά τα είδη των αντισωμάτων που θα παραχθούν [9].

1.2 Εμβόλια

Ο εμβολιασμός περιλαμβάνει την σκόπιμη έκθεση ενός οργανισμού σε ανοσογόνες ουσίες (π.χ. αντιγόνα) υπό συνθήκες που δεν προκαλούν ασθένεια. Οι αρχικές προσπάθειες σε ανθρώπους για ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος πραγματοποιήθηκαν με την έκθεση τους σε μολυσματικούς οργανισμούς με σκοπό την ανάπτυξη ανοσίας, με τυπικό παράδειγμα την έκθεση των μικρών παιδιών σε ιλαρά ή ανεμοβλογιά, φαινόμενα που δεν έχουν εκλείψει ακόμα. Η βελτίωση των συνθηκών υγιεινής και η ανακάλυψη των αντιβιοτικών είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση των θανάτων από μολυσματικούς οργανισμούς στα αναπτυγμένα κράτη. Παρόλα αυτά ο εμβολιασμός παρέχει έναν από τους καλύτερους τρόπους για την πρόληψη και αντιμετώπιση των μολυσματικών ασθενιών.

Τα εμβόλια παρασκευάζονται κατόπιν αυστηρών δοκιμών όσον αφορά την αποτελεσματικότητα τους και την ασφάλεια τους. Για αυτό το λόγο το εμβόλιο πρέπει να χορηγείται στην κατάλληλη ποσότητα και να κατέχει τα κατάλληλα χημικά χαρακτηριστικά ώστε να προκαλεί ανοσοαπόκριση, η οποία θα περιλαμβάνει την παραγωγή είτε χυμικής είτε κυτταρικής ανοσοαπόκρισης.

Ένα ιδανικό εμβόλιο θα έπρεπε να τηρεί τις εξής προϋποθέσεις:

- 1) Να μην προκαλεί εξασθένηση στον οργανισμό, υπερευαισθησία και αυτοανοσοαπόκριση
- 2) Να παράγει ικανή ανοσοαπόκριση έναντι της ασθένειας
- 3) Να παραμένει σταθερό κατά την αποθήκευση και να παράγεται εύκολα
- 4) Να έχει (κατά το δυνατόν) χαμηλό κόστος [20]

1.2.1 Τύποι εμβολίων

- **Εμβόλια υπομονάδων.** Περιέχουν καθαρισμένα αντιγόνα αντί ολόκληρους οργανισμούς. Για παράδειγμα εμβόλια ενάντια της γρίπης, της χολέρας, της ηπατίτιδας. Αυτού του τύπου τα εμβόλια δεν προκαλούν κάποια μόλυνση, όποτε μπορούν να θεωρηθούν ασφαλή. Το μειονέκτημα τους είναι ότι τα αντιγόνα μπορεί να μη διατηρήσουν της φυσική τους στερεοχημική μορφή με

το πέραςμα του χρόνου ή κατά την οδό χορήγησης τους, με αποτέλεσμα τα παραγόμενα αντισώματα να μην αναγνωρίζουν το φυσικό αντιγόνο. Επίσης μια απομονωμένη πρωτεΐνη δεν διεγείρει το ανοσοποιητικό σύστημα το ίδιο ισχυρά όσο ολόκληρος ο οργανισμός από τον οποίο προέρχεται.

- **Εμβόλια τοξινών.** Είναι εμβόλια που περιέχουν τοξίνες μικροοργανισμών επεξεργασμένες με τέτοιο τρόπο ώστε να παρουσιάζουν μειωμένη τοξικότητα. Τα εμβόλια αυτά προκαλούν ανοσολογική απόκριση έναντι των φυσικών τοξινών.
- **Εμβόλια συμπλόκων.** Είναι εμβόλια που περιέχουν συμπλέγματα πολύ-σακχαριτών βακτηρίων με πρωτεϊνικούς φορείς, οι οποίοι πολυσακχαρίτες έχουν ασθενή αντιγονική δράση. Το ανοσοποιητικό σύστημα ανταποκρίνεται στο σύμπλοκο και κατ'επέκταση στον πολύ-σακχαρίτη.
- **Εμβόλια ανασυνδυασμένα.** Περιέχουν μικρο-οργανισμούς μικρής μολυσματικότητας, στους οποίους έχει εισαχθεί ανασυνδυασμένο DNA ενός άλλου μικρο-οργανισμού έναντι του οποίου επιθυμείται ανοσία.
- **Εμβόλια DNA.** Σε αυτή την περίπτωση πραγματοποιείται η χορήγηση του DNA ενός μολυσματικού παράγοντα, όπως ιού ή βακτήριου. Ένα πλεονέκτημα των εμβολίων DNA είναι ότι παρασκευάζονται εύκολα και αποθηκεύονται για μεγάλα χρονικά διαστήματα.
- **Εμβόλια με νεκρούς μικροοργανισμούς.** Περιέχουν μολυσματικούς μικρο-οργανισμούς οι οποίοι έχουν θανατωθεί με χημική ή θερμική επεξεργασία.
- **Εμβόλια με ζωντανούς μικροοργανισμούς.** Περιέχουν μικρο-οργανισμούς, όπου με ειδική επεξεργασία έχει μειωθεί η μολυσματικότητα τους. Προκαλούν συνήθως μεγαλύτερης διάρκειας ανοσοαποκρίσεις και προτιμούνται σε υγιείς ενήλικους.

1.2.2 Ανοσοενισχυτικά

Ο εμβολιασμός παραμένει το βασικό εργαλείο για τη προστασία και μείωση των ασθενειών. Παρόλα αυτά η ανάπτυξη ενός νέου ασφαλούς και αποδοτικού εμβολίου δεν είναι εύκολο. Σήμερα υπάρχουν πολλά εμβόλια που στηρίζονται σε ζωντανούς οργανισμούς επιδεικνύοντας υψηλή αποτελεσματικότητα. Παρόλα αυτά εγκυμονούν κινδύνους εξαιτίας πολλών παρενεργειών που συναντώνται στην χρήση τους. Τα εμβόλια πρωτεϊνών προερχόμενα από τους μικροοργανισμούς είναι πολύ πιο ασφαλή, αλλά έχουν χαμηλή αποτελεσματικότητα στην ανάπτυξη επαρκούς ανοσοαπόκρισης. Η χρήση ουσιών για την ενίσχυση των ανοσοαποκρίσεων αποτελεί σημαντική ανακάλυψη στην προσπάθεια για ανάπτυξη αποτελεσματικότερων εμβολίων. Αυτές οι ουσίες ονομάζονται ανοσοενισχυτικά (adjuvants) και λειτουργούν με την ενίσχυση της παρουσίας των αντιγόνων στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. [20].

Οποιοδήποτε υλικό που βοηθά τα αντιγόνα ή απλά αυξάνει την χυμική ή/και την κυτταρική ανοσοαπόκριση έναντι του αντιγόνου μπορεί να χαρακτηριστεί ως ανοσοενισχυτικό. Τα ανοσοενισχυτικά χρησιμοποιούνται για περίπου 80 χρόνια από τότε που ο Ramon [22, 23] έδειξε ότι υπάρχει αυξημένη απόκριση αντι-τοξίνης στις τοξίνες του τετάνου και της διφθερίτιδας όταν χορηγηθεί μαζί με άλλα υλικά. Τα επόμενα χρόνια υπήρξε μια ραγδαία ανάπτυξη στους τύπους των ανοσοενισχυτικών και αρκετά από αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί για εμβολιασμό των ανθρώπων. Παρόλα αυτά, πολλά από τα ανοσοενισχυτικά που έχουν βρεθεί δεν χρησιμοποιήθηκαν τελικά εξαιτίας της αυξημένης τοξικότητας και των παρενεργειών που προκαλούσαν. [21]

Ο σκοπός εφαρμογής ενός ανοσοενισχυτικού είναι:

1. Αύξηση της συνολικής ποσότητας των αντισωμάτων
2. Μείωση της απαιτούμενης ποσότητας του αντιγόνου στις χορηγούμενες δόσεις
3. Μείωση του αριθμού των απαιτούμενων δόσεων
4. Ανοσοενίσχυση σε νεαρά και ηλικιωμένα άτομα
5. Αύξηση της ταχύτητας και της διάρκειας της ανοσοαπόκρισης
6. Πρόκληση ικανοποιητικής κυτταρικής ανοσοαπόκρισης

και τελικά η ανάπτυξη αποτελεσματικών εμβολίων [24].

Μερικοί από τους παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη για την επιλογή του κατάλληλου ανοσοενισχυτικού είναι:

- Το αντιγόνο
- Το είδος (άνθρωπος ή κάποιο ζώο) που θα εμβολιαστεί
- Η οδός χορήγησης του εμβολίου
- Η πιθανότητα παρενεργειών [26, 28]

Ιδανικά, τα ανοσοενισχυτικά θα πρέπει να είναι σταθερά κατά την μακροχρόνια αποθήκευση, βιοαποικοδομήσιμα, οικονομικά στην παραγωγή τους και να προκαλούν μια επαρκή ανοσολογική απόκριση, είτε χυμική είτε κυτταρική, αναλόγως των αναγκών για καλύτερη ανοσολογική προστασία [29]. Υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην αποτελεσματικότητα των ανοσοενισχυτικών όταν αλλάζει η οδός χορήγησης. [30]. Για παράδειγμα, παρόλο που η ενδοδερμική ή υποδόρια οδός είναι πολύ πιο αποδοτική στην πρόκληση ανοσίας από ότι η ενδομυϊκή οδός, εξαιτίας της τοπικής τοξικότητας των ανοσοενισχυτικών αλουμινίου, προτιμάται εν τέλει η ενδομυϊκή οδός για την χορήγηση τους.

Τα πλεονεκτήματα της συγχορήγησης ανοσοενισχυτικών στα εμβόλια είναι απαραίτητο να εξισορροπηθούν με τους κινδύνους για τυχόν παρενέργειες [31, 32]. Τοπικές παρενέργειες μπορεί να περιλαμβάνουν πόνο, πρήξιμο, νέκρωση, διόγκωση των λεμφαδένων, έλκη και σπυριά. Συστηματικές παρενέργειες περιλαμβάνουν ναυτία, πυρετό, ανοσοενισχυτική αρθρίτιδα, φλεγμονές στα μάτια, αλλεργίες, αναφυλαξία, φαινόμενα τοξικότητας στα όργανα και ανοσοτοξικότητα (για παράδειγμα μεγάλη παραγωγή κυτταροκινών), ή γενικά ασθένειες αυτοανοσοποίησης [33, 34]. Δυστυχώς, ισχυρά ανοσοενισχυτικά συχνά προκαλούν φαινόμενα τοξικότητας, όπως το πλήρες ανοσοενισχυτικό Freud (FCA). Έτσι, η μείωση της τοξικότητας παραμένει ένας από τους πιο σημαντικούς στόχους στην μελέτη των ανοσοενισχυτικών.

Τα ανοσοενισχυτικά θα μπορούσαν να χωρισθούν στις παρακάτω κατηγορίες:

1. **Μεταλλικά άλατα.** Κυρίως υδροξείδια του αλουμινίου ή φωσφορικά άλατα του αλουμινίου, είναι αυτά που χρησιμοποιούνται ευρέως στους ανθρώπους [33]. Ο

ακριβής μηχανισμός δράσης τους παραμένει άγνωστος. Παρόλα αυτά έχει προταθεί ότι δημιουργούν «δεξαμενές» του αντιγόνου στο σημείο του εμβολιασμού [36]. Παρενέργειες αυτών των αλάτων αποτελεί η αύξηση των αντισωμάτων IgE, η δημιουργία αλλεργιών [35, 37-41] και πιθανώς νευροτοξικότητα. Φυσιολογικά, το αλουμίνιο αποβάλλεται μέσω των νεφρών, αν και κάτω από κάποιες συνθήκες, όπως μειωμένη νεφρική επάρκεια, μπορεί να πραγματοποιηθεί συσσώρευση του αλουμινίου στο σώμα και να γίνει τοξικό. Εναλλακτικά, άλατα του ασβεστίου, του σιδήρου και του ζirkονίου έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης ως ανοσοενισχυτικά [38].

2. **Ανοσοενισχυτικά προερχόμενα από μικροοργανισμούς.** Δεδομένου της ισχυρής ανοσογόνας δράσης τους, οι ουσίες που προέρχονται από βακτήρια ή μύκητες αποτελούν πιθανά ανοσοενισχυτικά. Η κυτταρική μεμβράνη βακτηρίων και η LPS ενισχύουν τις ανοσοαποκρίσεις, αν και από μόνα τους δεν είναι ιδιαιτέρως ανοσογόνα. Διάφορα είδη βακτηρίων χρησιμοποιούνται ως πηγές για ανοσοενισχυτικά όπως τα *Mycobacterium* spp., *Corynebacterium parvum*, *C. granulorum*, *Bordetella pertussis* και *Neisseria meningitidis*. Οι οργανισμοί αυτοί πρέπει να επισημανθεί ότι ολόκληροι, ακόμα και αν είναι νεκροί, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν ανοσοενισχυτικά στους ανθρώπους, διότι είναι πολύ τοξικοί [35]. Άλλα ανοσοενισχυτικά που προέρχονται από μικροοργανισμούς είναι και οι τοξίνες, όπως η τοξίνη της χολέρας ή θερμοευαίσθητη εντεροτοξίνη (heat-labile enterotoxin) από *Escherichia coli*.
3. **Γαλακτώματα.** Αυτό το είδος των ανοσοενισχυτικών περιλαμβάνει γαλακτώματα οργανικού διαλύτη σε νερό ή νερού σε οργανικό διαλύτη, όπως για παράδειγμα το μη-πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freund (FIA), το Montanide, το ανοσοενισχυτικό 65 [42-44], ή το Lipovant [28]. Ο μηχανισμός δράσης τους στηρίζεται στην δημιουργία μιας «δεξαμενής» του αντιγόνου στο σημείο χορήγησης, με αργή αποδέσμευση του αντιγόνου και την διέγερση των λεμφοκυττάρων [45]. Γενικά, αυτά τα ανοσοενισχυτικά είναι πολύ τοξικά για συχνή χρήση στους ανθρώπους, αν και χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις ασθενών που βρίσκονται σε τελικό στάδιο καρκίνου όπου υπάρχει μεγαλύτερη ανοχή σε φαινόμενα παρενεργειών. Κάποιες από τις παρενέργειες είναι φλεγμονώδη φαινόμενα και έλκη στα σημεία χορήγησης. Διάφορα γαλακτώματα έχουν χρησιμοποιηθεί, με διαφορετικά φυσικά έλαια με σκοπό την μείωση της τοξικότητας και αύξηση της σταθερότητας και της αποτελεσματικότητας. Διάφορα γαλακτώματα, έλαιο σε

νερό [46] και νερό σε ελαιώδη φάση [47], έχουν αναπτυχθεί με σκοπό να είναι εξίσου ισχυρά όσο το FIA, αλλά πιο σταθερά, λιγότερο ιξώδη και να χορηγούνται πιο εύκολα [48,49].

4. **Σωματιδιακά συστήματα χορήγησης αντιγόνου.** Ο μηχανισμός δράσης αρχικά είναι η δημιουργία ενός συστήματος όπου και πάλι θα λειτουργεί ως μια «δεξαμενή» για την αργή αποδέσμευση του αντιγόνου. Παρόλα αυτά η επιτυχία του συστήματος και το είδος της ανοσοαπόκρισης εξαρτάται καθαρά από το είδος των σωματιδίων που θα χρησιμοποιηθούν. Έτσι η τελική χημική σύσταση του εμβολίου θα καθορίσει αν η ανοσοαπόκριση στραφεί προς χυμική ή κυτταρική. Η διαδικασία μπορεί να ενισχυθεί αν σε συνδυασμό με το αντιγόνο χορηγηθούν και μόρια που ρυθμίζουν ή συν-διεγείρουν το ανοσοποιητικό [50]. Μερικά από τα πιο σημαντικά συστήματα είναι: λιποσώματα, πολυμερικές μικροσφαίρες και νανοσφαίρες, ανοσοδιεγερτικά σύμπλοκα (ISCOMs), σωματίδια με μορφή ιών (VLPs). Αυτά τα ανοσοενισχυτικά έχουν εκτενώς χρησιμοποιηθεί σαν φορείς για πρωτεϊνικά εμβόλια και εμβόλια DNA. Πολλές μελέτες ασχολούνται με την πλήρη κατανόηση των βιολογικών αλληλοεπιδράσεων και των μηχανισμών δράσης των σωματιδιακών φορέων αντιγόνων σε σχέση με το μέγεθος και τη χημική σύστασή τους [51].
5. **Κυτταροκίνες.** Έχει βρεθεί ότι η συγχορήγηση κυτταροκινών προκαλεί αύξηση της ανοσοαπόκρισης. Τυπικό παράδειγμα είναι η συγχορήγηση ιντερλευκίνης 12 όπου αυξάνει σημαντικά τις ανοσοαποκρίσεις [52,53]
6. **Πολυσακχαρίτες.** Ένα παράδειγμα αποτελεί η Ινουλίνη, ένας υδρογονάνθρακας που προέρχεται από τις ρίζες ενός φυτού της οικογένειας Compositae, ο οποίος όταν μορφοποιηθεί σε μικρο-σωματιδιακή μορφή έχει ισχυρές ανοσοενισχυτικές ιδιότητες. [54].

1.3 Πολυμερικές νανοσφαίρες βιοσυμβατού και βιοαποικοδομήσιμου πολυμερούς πολύ (γαλακτικού οξέως)

Ένα μεγάλο πλήθος πολυμερών υπάρχουν από όπου μπορούν να παρασκευαστούν νανο- και μικροσφαίρες για την χορήγηση φαρμάκων. Παρόλα αυτά, τα περισσότερα μελετημένα πολυμερή είναι το πολύ (γαλακτικό οξύ) (PLA)

και τα συμπολυμερή του με γλυκολικό οξύ (PLGA) [56]. Αυτά τα βιοαποικοδομήσιμα και βιοσυμβατά πολυμερή έχουν εγκριθεί για χρήση στον άνθρωπο (π.χ. σαν εμφυτεύματα οστών ή εμφυτεύματα για παρατεταμένη αποδέσμευση φαρμάκων) και έχουν εκτενώς μελετηθεί για χρήση σε εμβόλια αντιγόνων σε σωματιδιακή μορφή (π.χ. πρωτεΐνες, πεπτίδια, DNA κ.α.) [56-58]. Σε αυτή την περίπτωση το αντιγόνο μπορεί είτε να έχει εγκλωβιστεί στο εσωτερικό του σωματιδίου είτε να έχει απορροφηθεί στην επιφάνεια του. Στην συνέχεια, η διαδικασία της βιοαποικοδομήσιμότητας του σωματιδίου, έχει ως αποτέλεσμα την βραδεία αποδέσμευση του αντιγόνου [56]. Επιπλέον, πολυμερικά σωματίδια προσφέρουν προστασία στα ενκαψακωμένα αντιγόνα σε ακραία περιβάλλοντα (όπως για παράδειγμα στην *per os* χορήγηση). Προ-κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα πολυμερικά νανοσωματίδια μπορούν να προκαλέσουν αποκρίσεις αντισωμάτων συγκρίσιμες με αυτές των αλάτων του αλουμινίου [56]. Επιπρόσθετα, σε μελέτη με τοξίνη του τετάνου (TT) βρέθηκε ότι η ανοσοαπόκριση υπήρξε τέσσερις φορές μεγαλύτερη (σε επίπεδα αντισωμάτων αντι-TT IgG) στην συνέργεια TT συνδεδεμένου σε άλατα αλουμινίου και την συγχορήγηση νανοσφαίρων φορτωμένων με TT [56,59]. Σε μελέτη των Elamanchili και συνεργατών παρατηρήθηκε ότι νανοσωματίδια PLGA προσλαμβάνονται σε ικανοποιητικό βαθμό από τα δενδριτικά κύτταρα *in vitro*, ενισχύοντας την άποψη της στόχευσης των αντιγονο-παρουσιαστικών κυττάρων από τα νανοσωματίδια [60].

Επίσης τα πολυμερικά μικροσωματίδια με ενκαψακωμένο αντιγόνο είναι η νέα τάση στην χορήγηση αντιγόνων καθώς προστατεύουν τις αντιγονικές πρωτεΐνες, τα πεπτίδια ή το DNA από άμεση αποικοδόμηση και έχουν την ικανότητα να επιμηκύνουν και να ελέγχουν την αποδέσμευση του αντιγόνου για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα *in vivo* [98,99]. Τα πολυμερή που είναι βιοαποικοδομήσιμα είναι τα πιο κατάλληλα για δημιουργία εμβολίων, μεταξύ αυτών το πολύ(γαλακτικό γλυκολικό) οξύ (PLGA), το πολυγαλακτικό οξύ (PLA), ο πολύ(ορθο εστέρας) (POE) ή η κιτοζάνη [215]. Αυτά τα σωματίδια και ειδικά τα νανοσωματίδια PLA μεγέθους περίπου 200nm είναι οι ισχυρότεροι υποψήφιοι για την ανάπτυξη νανοσωματιδιακών εμβολίων [102-104]. Όπως αναφέρθηκε, πολλοί συγγραφείς αναφέρουν για την αποδοτικότητα των PLGA και PLA σωματιδίων στην ανοσοποίηση [100,105]. PLA νανοσωματίδια επικαλυμμένα με την πρωτεΐνη του ιού HIV p24 παρουσίασαν

ισχυρές αποκρίσεις και επιπρόσθετα αυξημένη τάση παραγωγή κυτταροκινών τύπου Th1 (IFN- γ , IL-2) σε μύες σε σύγκριση με χορήγηση του p24 με ανοσοενισχυτικό Freund. Η ικανότητα αυτή επιβεβαιώθηκε σε πιθήκους, όπου παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα T κυττάρων CD4+ που παράγουν IFN- γ και CD8+ [103]. Ενκαψακισμένα πεπτίδια και πρωτεΐνες σε PLA/PLGA μικροσωματίδια έχουν παρουσιάσει να προκαλούν ισχυρές ανοσοαποκρίσεις, περιλαμβάνοντας αυξημένη παραγωγή αντισωμάτων και κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων [106]. Προκλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα PLGA νανοσωματίδια μπορούν να προκαλέσουν συστηματικές αποκρίσεις αντισωμάτων συγκρίσιμες με αυτές των αλάτων του αλουμινίου [56].

Με τα δεδομένα που έχουν παρουσιαστεί μέχρι στιγμής είναι εμφανές η σημαντικότητα των νανοσωματιδίων στην πρόκληση ανοσοαποκρίσεων και την μελέτη τους σε εναλλακτικά συστήματα και μεθόδους χορήγησης, με το πολύ γαλακτικό οξύ να είναι ένα από τα καταλληλότερα πολυμερή εξαιτίας των ιδιοτήτων του.

1.3.1 Πολύ(γαλακτικό οξύ)

Το πολύ(γαλακτικό οξύ) (PLA) είναι ένα συνθετικό πολυμερές του γαλακτικού οξέως (α-υδροξύ προπανοϊκό οξύ). Το γαλακτικό οξύ περιέχει ένα ασύμμετρο άτομο άνθρακα με αποτέλεσμα να εμφανίζεται σε δύο οπτικά ισομερή: το L(+) γαλακτικό οξύ και το D(-) γαλακτικό οξύ. Το γαλακτικό οξύ απαντάται στην φύση είτε ως ενδιάμεσο ή τελικό προϊόν του μεταβολισμού των υδρογονανθράκων.

Εικόνα 1.4: Τα οπτικά ισομερή του γαλακτικού οξέος

Το PLA μπορεί να συνθεθεί με άμεσο πολυμερισμό του γαλακτικού οξέως. Παρόλα αυτά, ο πιο αποδοτικός τρόπος για την παραλαβή υψηλού μοριακού βάρους πολυμερούς είναι ο πολυμερισμός γαλακτιδίων. Το γαλακτίδιο είναι ο κυκλικός διεστέρας του γαλακτικού οξέως και παρασκευάζεται με την θερμική επεξεργασία του γαλακτικού οξέος.

Εικόνα 1.5: Οι διαστερεοϊσομερείς μορφές του γαλακτιδίου

Το γαλακτίδιο, όπως και το γαλακτικό οξύ, περιέχει ασύμμετρο άτομο άνθρακα και διαθέτει τέσσερις διαστερεοϊσομερείς μορφές, τις L και D που είναι οπτικοί αντίποδες (L (-) και D (+) γαλακτίδιο αντίστοιχα), τη μεσομορφή DL και το ρακεμικό μίγμα των L (-) και D (+). Το σημείο τήξεως του ρακεμικού μίγματος είναι υψηλότερο από αυτό των συστατικών του [216].

Ισομερή :	L-Γαλακτίδιο	D-Γαλακτίδιο	DL-Γαλακτίδιο	Μέσο-Γαλακτίδιο
Σημείο τήξης(°C) :	95-136	95-136	124-126	41-42

1.3.1.1 Σύνθεση του πολύ(γαλακτικού οξέος)

Το PLA μπορεί να συνθεθεί με απευθείας πολυσυμπύκνωση του γαλακτικού οξέως, αλλά το τελικό πολυμερές που παράγεται έχει μικρό μοριακό βάρος. Για την παρασκευή όμως πολυμερούς PLA μεγάλου μοριακού βάρους σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα, είναι απαραίτητο να γίνει μέσω πολυμερισμού των κυκλικών

διεστέρων, δηλαδή με γαλακτίδια. Τα γαλακτίδια παράγονται από θερμική αφυδάτωση του γαλακτικού οξέως.

Εικόνα 1.6: Πολυμερισμός πολύ(γαλακτικού οξέως)

Η αντίδραση πολυμερισμού πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες υψηλές (>130°C), θερμοκρασία όπου τα μονομερή και το παραγόμενο πολυμερές βρίσκονται σε κατάσταση τήγματος (πολυμερισμός τήγματος). Ο πολυμερισμός, με σκοπό υψηλά μοριακά βάρη, μπορεί να πραγματοποιηθεί παρουσία καταλύτη, όπως κόνις ψευδαργύρου, οξέα κατά Lewis, χλωριούχο ψευδάργυρο, τριφθοριούχο αντιμόνιο και οργανομεταλλικές ενώσεις, όπως ο 2-(2-αιθυλ-εξανοϊκός) κασσίτερος ή οκτανοϊκός κασσίτερος [127,128,129]. Ο οκτανοϊκός κασσίτερος είναι ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος καταλύτης καθώς έχει λάβει έγκριση από τον οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων (F.D.A.) των Η.Π.Α. για χρήση ως σταθεροποιητής τροφίμων. Αν χρησιμοποιούνται οργανομεταλλικοί καταλύτες όπως ο διαιθυλικός ψευδάργυρος, η αντίδραση πολυμερισμού που λαμβάνει χώρα απεικονίζεται στην Εικόνα 1.7, [130].

Εικόνα 1.7: Πιθανός μηχανισμός κατάλυσης του 2-(2-αιθυλ-εξανοϊκός) κασσίτερος

Στην περίπτωση του οκτανοϊκού κασσίτερου στην κατάλυση της αντίδρασης πολυμερισμού, η αρχή λειτουργίας του είναι περισσότερο πολύπλοκη. Βασισμένοι σε κινητικά και φασματοσκοπικά δεδομένα, οι Kowalski, Duda και Penczek συμπέραναν ότι ο οκτανοϊκός κασσίτερος δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ούτε ως εκκινητής ούτε ως καταλύτης της αντίδρασης πολυμερισμού των γαλακτιδίων [131]. Με αντίδραση του οκτανοϊκού κασσίτερου με ουσίες που περιέχουν υδροξύλια (π.χ. αλκοόλες, νερό) που προστίθενται στην διαδικασία πολυμερισμού ή είναι παρόντα ως προσμίξεις του οκτανοϊκού κασσίτερου, παράγονται οι δραστικές μορφές που προκαλούν την εκκίνηση του πολυμερισμού. Η αντίδραση πολυμερισμού έχει βρεθεί ότι ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης ως προς τη συγκέντρωση των μονομερών [130,131]. Επίσης η ταχύτητα της αντίδρασης του πολυμερισμού αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του οκτανοϊκού κασσίτερου, παρουσιάζοντας μια μέγιστη συγκέντρωση από την οποία η περαιτέρω αύξηση οδηγεί σε μείωση του ρυθμού της αντίδρασης [131]. Για την λήψη πολυμερούς με υψηλό μοριακό βάρος απαιτείται η χρήση μονομερών γαλακτιδίων υψηλής καθαρότητας. Για αυτό το λόγο είναι απαραίτητη η πλήρης απομάκρυνση της υγρασίας από τα αντιδραστήρια, καθώς είναι δυνατόν να προκληθεί τερματισμός της αντίδρασης και της περαιτέρω αύξησης της πολυμερικής αλυσίδας ή υδρόλυση των μονομερών σε όξινα προϊόντα. Η αντίδραση

του πολυμερισμού πρέπει να πραγματοποιείται σε υψηλό κενό ή σε αδρανή ατμόσφαιρα (π.χ. αζώτου, αργό).

Τυπικά, ο πολυμερισμός τήγματος των γαλακτιδίων συνήθως πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες μεταξύ 130 °C και 220 °C με διάρκεια 2 με 6 ώρες. Ο οκτανοϊκός κασσίτερος προστίθεται σε αναλογία 0.03-0.1% w/w. Υπό αυτές τις συνθήκες λαμβάνεται πολυμερές με μοριακό βάρος που κυμαίνεται μεταξύ των 10000 έως 100000 με απόδοση πολυμερισμού μεγαλύτερη του 90% [129]. Αντίδραση μεγάλης διάρκειας σε υψηλές θερμοκρασίες πρέπει να αποφεύγεται, καθώς υπάρχει ο κίνδυνος σπασίματος της πολυμερικής αλυσίδας και δημιουργία πολυμερικών αλυσίδων μικρότερου μοριακού βάρους [132,133]. Στο τέλος της διεργασίας είναι απαραίτητος ο καθαρισμός του πολυμερούς από παραπροϊόντα της αντίδρασης και μη πολυμερισμένων γαλακτιδίων με την διάλυση του πολυμερούς σε διχλωρομεθάνιο ή χλωροφόρμιο και στην συνέχεια την σταδιακή κατακρήμνισή του σε περίσσεια ποσότητα μεθανόλης ή διαιθυλ-αιθέρα. Το καθαρισμένο πολυμερές φυλάσσεται υπό κενό ή σε ατμόσφαιρα αζώτου, με μηδενική υγρασία.

1.3.1.2 Ιδιότητες του πολύ (γαλακτικού οξέος)

1. Διαλυτότητα

Η διαλυτότητα ενός πολυμερούς είναι πολύ σημαντική για την ευκολία ταυτοποίησής του, χειρισμού του και για τις εφαρμογές του. Το PLA είναι διαλυτό στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες, όπως οι αλογονωμένοι υδρογονάνθρακες (χλωροφόρμιο και διχλωρομεθάνιο), ο οξικός αιθυλεστέρας, η ακετόνη και το τετραϋδροφουράνιο.

2. Κρυσταλλικότητα και σημείο τήξεως

Η κρυσταλλικότητα του PLA πολυμερούς εξαρτάται από την στερεοχημεία των γαλακτιδίων από τα οποία παρασκευάστηκε. Αν το πολυμερές PLA αποτελείται μόνο από L-γαλακτίδια ή D-γαλακτίδια, τότε εμφανίζει κρυσταλλικότητα. Για παράδειγμα

το Poly(L(-)-lactic acid) είναι ένα ημικρυσταλλικό πολυμερές ($\approx 37\%$ κρυσταλλικότητα) με σημείο τήξης τους $170 - 182^{\circ}\text{C}$ και θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης T_g ίση με $54 - 59^{\circ}\text{C}$. Σε αντίθεση το Poly (DL-lactic acid) είναι άμορφο πολυμερές με T_g ίση με $50-53^{\circ}\text{C}$. Μία τεχνική που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της κρυσταλλικότητας ενός υλικού είναι η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC).

3. Αποικοδόμηση

Το PLA αποικοδομείται μέσω της υδρόλυσης των εστερικών δεσμών. Το τελικό προϊόν αποικοδόμησης είναι το γαλακτικό οξύ. Η διαδικασία αποικοδόμησης περιλαμβάνει δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται τυχαία διάσπαση των εστερικών δεσμών μέσω υδρόλυσης, οδηγώντας σε προϊόντα μικρότερου μοριακού βάρους. Η υδρόλυση των εστερικών δεσμών του πολυμερούς συμβαίνει με παρόμοιο μηχανισμό *in vitro* και *in vivo*, γεγονός το οποίο υποδεικνύει ότι δεν υπάρχει στη διαδικασία αυτή συμμετοχή ενζύμων. Στο δεύτερο στάδιο, ακολουθεί ταχεία μείωση του μοριακού βάρους με αύξηση του ρυθμού διάσπασης της πολυμερικής αλυσίδας και έναρξη απώλειας μάζας όταν τα θραύσματα των αλυσίδων γίνονται διαλυτά στο μέσο αποικοδόμησης (νερό). Η διαδικασία υδρόλυσης της αλυσίδας πιστεύεται ότι αυτοκαταλύεται από τις ελεύθερες καρβοξυλικές ομάδες που αποκαλύπτονται με τη λύση των δεσμών [134,135]. Ούτε σε αυτό το στάδιο έχει αποδειχθεί συμμετοχή ενζύμων.

Ο χρόνος που απαιτείται για την βιοδιάσπαση των PLA πολυμερών αυξάνεται με αύξηση του μοριακού τους βάρους. Αύξηση των d - μονάδων γαλακτικού οξέος στο dl - PLA αυξάνει το ρυθμό βιοδιάσπασης του πολυμερούς. Το πιο σταθερό μέλος της οικογένειας αυτής των πολυμερών φαίνεται ότι είναι το l- PLA. Το dl- PLA εμφανίζει χρόνο βιοαποικοδόμησης 12-16 μήνες ενώ το L-PLA εμφανίζει χρόνο βιοαποικοδόμησης μεγαλύτερο από 24 μήνες.

1.3.2 Μέθοδοι παρασκευής νανοσωματιδίων

Η ενκαψακίωση βιοδραστικών ενώσεων σε νανοσωματίδια περιλαμβάνει την δημιουργία σωματιδίων με διάμετρο που κυμαίνεται μεταξύ των 1 και 1000nm. Τα νανοσωματίδια ορίζονται ως στερεοί φορείς ουσιών μεγέθους μικρότερου του 1μm που μπορεί να είναι βιοαποικοδομήσιμα ή όχι [137,138]. Ο όρος νανοσωματίδιο είναι η γενική ονομασία των νανοσφαιρών και των νανοκαψακίων. Οι νανοσφαίρες έχουν δομή μιας στερεής πολυμερικής μήτρας. Οι βιοδραστικές ουσίες μπορούν να προσροφηθούν στην επιφάνεια της σφαίρας ή να ενκαψακισθούν εντός του σωματιδίου. Τα νανοκαψάκια είναι κυστιδικά συστήματα, όπου η ουσία είναι περιορισμένη στο εσωτερικό του κυστιδίου σε ένα υγρό πυρήνα, ο οποίος περιβάλλεται από μία πολυμερική μεμβράνη [137]. Σε αυτή την περίπτωση, οι δραστικές ουσίες είναι συνήθως σε διαλυτή μορφή στον εσωτερικό πυρήνα αλλά μπορούν επίσης να είναι και προσροφημένες στην επιφάνεια του κυστιδίου [139].

Τα νανοσωματίδια αποτελούν αντικείμενο ευρείας μελέτης στην χορήγηση ουσιών, ενώ σε πολλές μελέτες επισημαίνονται τα πλεονεκτήματά τους σε σύγκριση με τα μικροσωματίδια και τα λιποσώματα [140,141]. Το μικρό μέγεθος των νανοσωματιδίων τους παρέχει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τα μικροσωματίδια, όπως η συγκριτικά υψηλότερη πρόσληψη τους από τα κύτταρα και η αποφυγή της κατακράτησής τους από τον σπλήνα. Η πρόσληψη των νανοσωματιδίων από επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου εξαρτάται, εκτός από το μέγεθός τους, αλλά και από την φύση του σωματιδίου και το φορτίο που φέρουν. Τα νανοσωματίδια που είναι κατασκευασμένα από λιπόφιλα πολυμερή προσλαμβάνονται από τα κύτταρα σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι τα νανοσωματίδια υδρόφιλων πολυμερών.

Πολλές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την παρασκευή των νανοσωματιδίων, οι οποίες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο βασικές κατηγορίες εξαρτούμενου αν η παρασκευή των νανοσωματιδίων απαιτεί την επί τόπου (in situ) πραγματοποίηση της αντίδρασης πολυμερισμού ή αν μπορεί να γίνει η παρασκευή τους με έτοιμο (ήδη παρασκευασμένο) πολυμερές [137]. Οι μέθοδοι πολυμερισμού μπορούν περαιτέρω να κατηγοριοποιηθούν σε πολυμερισμό γαλακτώματος ή διεπιφάνειας. Όλες οι μέθοδοι που αναφέρθηκαν, περιγράφονται αναλυτικά στην συνέχεια. Στον Πίνακα 1.1

εμφανίζονται μερικές από τις πιο σημαντικές παρασκευές, καθώς επίσης και οι ουσίες που ενκαψακιάθηκαν και το μέσο μέγεθος των παραγόμενων σωματιδίων.

Πίνακας 1.1: Παραδείγματα νανοσωματιδίων διαφόρων μεθόδων παρασκευής, πολυμερών και ενκαψακιωμένων ουσιών. Στην αριστερή στήλη παρουσιάζεται το πολυμερές, στην μεσαία η ουσία που ενκαψακιάθηκε και στην δεξιά στήλη το μέσο μέγεθος (nm) [136]

Νανοσωματιδία που λήφθηκαν με επι τόπου πολυμερισμό μονομερών		
Πολυμερισμός γαλακτώματος		
Υδατική συνεχή φάση		
Πολύ(μεθυλμεθακρυλικό)	Αντιγόνο ιού γρίπης	130
Πολύ(μεθυλμεθακρυλικό)	Δοξορουβικίνη	300
Πολύ(μεθυλμεθακρυλικό)	Βιμπλαστίνη	200 – 300
Πολύ(αιθυλκυανοακρυλικό)	Ινσουλίνη	< 500
Πολύ(βουτυλκυανοακρυλικό)	Προγεστερόνη	250
Πολύ(ισοβουτυλκυανοακρυλικό)	Αμπικιλίνη	40– 80
	Αντισώματα	120
	hGRF	140 – 170
Πολύ(εξαλκυανοακρυλικό)	Βινκαμίνη	200
Πολύ(ισοεξαλκυανοακρυλικό)	Αμπικιλίνη	30– 80
	Δοξορουμπικίνη	300
Πολύ(διαλκυλμεθυλιδενικό μανολίτη)	Πριμακουίνη	< 1000
Οργανική συνεχή φάση		
Πολυακριαμίδιο	Ένζυμα	<1000
Πολύ(μεθυλκυανοακρυλικό)	Τριακινολόνη	500
	Φλορεσκεΐνη	800 – 1000
	Πιλοκαρπίνη	300 – 600
Άλλα πολυμερή: Πολύ(αιθυλκυανοακρυλικό), Πολύ(βουτυλκυανοακρυλικό), Πολύ(στυρένιο), πολύ(βινυλοπυριδίνη)		
Πολυμερισμός διεπιφάνειας		
Πολύ(αιθυλκυανοακρυλικό)	Ινσουλίνη	~151
Πολύ(ισοβουτυλκυανοακρυλικό)	Ινδομεθασίνη	220-240
	Δαροδιπίνη	150
	Ινσουλίνη	150 – 300
	Καλσιτονίνη	< 1000
	Οκτρεοτίδη	260
Πολύ(ισοεξαλκυανοακρυλικό)	Φθαλοκυανίνες	180
Άλλα πολυμερή: Πολυαμίδια, πολύ(φενυλεστέρες) και πολύ ουραιθάνια		
Διεπιφανειακή πολύ-συμπύκνωση		
Πολυουραιθάνιο και πολύ(αιθερουραιθάνιο)	A-Τοκοφερόλη	< 500

Νανοσωματίδια από μακρομόρια ή από ήδη παρασκευασμένα πολυμερή		
Νανοσωματίδια παρασκευασμένα από συνθετικά/ημι-συνθετικά πολυμερή		
Μέθοδος εξάτμισης διαλύτη		
Πολύ(γαλακτικό οξύ)	Τεστοστερόνη	<1000
	Αλβουμίνη	100 ή 120
	Τοξίνη του τετάνου	150
	Λοπεραμίδιο	~300
Πολύ(γαλακτικό οξύ) – πολύ(γλυκολικό οξύ) συμπολυμερές	DNA	~100
Κυκλοσπορίνη Α		~300
Άλλα πολυμερή: Πολύ-(Ε καπρολακτόνη) και πολύ (Υδροξυβουτιρικό)		
Μέθοδος εκτόπισης διαλύτη		
Πολύ(γαλακτικό οξύ) – πολύ(γλυκολικό οξύ) συμπολυμερές	Ινδομεθακίνη	~168
	Δοξορουβικίνη	274
	Κυκλοσπορίνη Α	~170
	Βαλπροϊκό οξύ	~166
	Κετοπροφίνη	~167
	Βανκομυκίνη	~187
	Ινσουλίνη	~105 – 170
Πολύ(γαλακτικό οξύ)	Δοξορουβικίνη	270
	Ταξόλη	~260
	Δεξαμεθανόξη	~300
	Βιταμίνη Κ	~270
Πολύ-(Ε καπρολακτόνη)	Κυκλοσπορίνη Α	~100 – 200
Άλλα πολυμερή: σύμπλοκα η-κυκλοδεξτρίνης , PVM/MA και πολύ(αλκυλομεθακρυλικό)		
Μέθοδος εξαλάτωσης		
Poly(lactic acid)	Σαβοξεπίνη	< 1000
Άλλα πολυμερή: Poly(alkylmethacrylate) και ethylcellulose		
Νανοσωματίδια από φυσικά πολυμερή		
Αλβουμίνη ορού	Δοξορουβικίνη	200 – 1500
Ζελατίνη	Μιτομυκίνη Γ	280
Πολυσακχαρίτες	Ολιγονουκλεοτίδια	<1000
	Δοξορουβικίνη	<1000
	Ινσουλίνη	<1000
	Τοξίνη του τετάνου	<1000
	Καλσιτονίνη	<1000

1.3.2.1 Νανοσωματίδια που λαμβάνονται με in situ πολυμερισμό

1. Πολυμερισμός γαλακτώματος

Ο πολυμερισμός γαλακτώματος είναι μία από τις πιο γρήγορες μεθόδους για την παρασκευή νανοσωματιδίων. Η μέθοδος χωρίζεται σε δύο κατηγορίες σε συνάρτηση με την φύση της συνεχούς φάσης, οργανικής ή υδατικής. Η μεθοδολογία της συνεχούς οργανικής φάσης περιλαμβάνει τη διασπορά των μονομερών μέσα σε ένα γαλάκτωμα (ή αντίστροφο μικρογαλάκτωμα), ή σε υλικό όπου τα μονομερή δεν είναι διαλυτά. Για την αποφυγή συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων κατά την παρασκευή είναι απαραίτητη η χρήση επιφανειοδραστικών ή άλλων διαλυτών πολυμερών στη συνεχή φάση. Στην περίπτωση της υδατικής συνεχούς φάσης, τα μονομερή διαλύονται στην συνεχή φάση, ενώ επιφανειοδραστικά δεν χρειάζονται. Η έναρξη του πολυμερισμού μπορεί να προκληθεί με διάφορους μηχανισμούς, όπως για παράδειγμα όταν ένα μόριο των μονομερών που είναι διαλυμένο στην συνεχή φάση έρθει σε επαφή με ένα μόριο του καταλύτη που μπορεί να είναι ένα ιόν ή μια ελεύθερη ρίζα. Εναλλακτικά, μόρια των μονομερών μπορούν να μετατραπούν σε ρίζες με ακτινοβόληση υψηλής ενέργειας, όπως γ-ακτινοβολία, υπεριώδες ή δυνατό ορατό φως. Με αυτό τον τρόπο ξεκινά μια αλυσιδωτή αντίδραση όπου τα ιοντισμένα μονομερή συγκρούονται με άλλα μονομερή σύμφωνα με τον μηχανισμό πολυμερισμού ανιόντων [143]. Ο διαχωρισμός φάσεων και ο σχηματισμός στερεών σωματιδίων μπορεί να πραγματοποιηθεί πριν ή μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης πολυμερισμού [144]. Ενδεικτικά, με αυτή την μέθοδο έχουν παρασκευαστεί νανοσωματίδια από πολύ-(μεθακρυλικός μεθυλεστερας) (PMMA), πολύ(αιθυλενοκυανοκρίλικος εστέρας) (PECA) και πολύ (βουτυλ-κυανοακρυλικό) [142] μέσω διασποράς και την χρήση επιφανειοδραστικών σε διαλύτες όπως το κυκλοεξάνιο, κανονικό πεντάνιο και τολουόλιο για οργανική φάση.

2. Πολυμερισμός διεπιφάνειας

Νανοσωματίδια πολυ(αλκυλ-κυανοακρυλικού) έχουν παρασκευαστεί με τη διαδικασία αυτή η οποία περιέχει αρκετά πλεονεκτήματα, όπως η πολύ γρήγορη αντίδραση πολυμερισμού (πραγματοποιείται εντός δευτερολέπτων) [146]. Τα

μονομερή του κυανοακρυλικού και το φάρμακο διαλύονται σε ένα μίγμα οργανικού διαλύτη και απόλυτης αιθανόλης [147]. Το μίγμα στην συνέχεια περνά μέσω βελόνας σε ένα διάλυμα νερού υπό ισχυρή ανάδευση, το οποίο μπορεί να περιέχει λίγη αιθανόλη ή ακετόνη, παρουσία επιφανειοδραστικών. Νανοκάψουλες σχηματίζονται αυθόρμητα με τον πολυμερισμό του κυανοακρυλικού κατόπιν επαφής των μονομερών με ιόντα που βρίσκονται στο νερό. Η παραγόμενη κολλοειδής διασπορά μπορεί να συμπυκνωθεί μέσω εξάτμισης υπό κενό. Επίσης PECA [148] και πολύ (ισοβουτυλ-κυανοακρυλικό) [149,150] είναι κάποια από τα πολυμερή που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή νανοσωματιδίων με αυτή την μέθοδο. Ένα πλεονέκτημα του πολυμερισμού διεπιφάνειας είναι η υψηλή ενκαψακίωση των φαρμάκων (π.χ. με την ινσουλίνη βρέθηκε ενκαψακίωση 95%) [146]. Επιπρόσθετα, το πλεονέκτημα της λήψης των νανοκαψουλών με αυτή την μέθοδο είναι ότι το πολυμερές δημιουργείται επι τόπου, επιτρέποντας την πολυμερική μεμβράνη να επικαλύψει τον εσωτερικό πυρήνα του εκάστοτε γαλακτώματος [146]. Σε αυτή την περίπτωση, το βασικό μειονέκτημα αποτελεί η χρήση οργανικών διαλυτών για την εξωτερική φάση. Η απομάκρυνση τους και η αντικατάστασή τους με νερό είναι χρονοβόρα και δύσκολη διεργασία [139].

3. Διεπιφανειακή πολύ-συμπύκνωση

Πολυμερικά νανοσωματίδια μπορούν επίσης να παρασκευαστούν από την διεπιφανειακή πολύ-συμπύκνωση λιπόφιλων και υδρόφιλων μονομερών παρουσία ή απουσία επιφανειοδραστικών [151]. Αυτά τα νανοσωματίδια είναι σε μέγεθος μικρότερα από 500 nm. Μια παραλλαγή της βασικής μεθόδου έχει επίσης αναπτυχθεί, όπου συμπολυμερές πολυ(ουρεθάνης) και πολύ(αιθερ-ουρεθάνης) χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία φορέων α-τοκοφερόλης [152]. Τα νανοκαψάκια δημιουργήθηκαν από την διεπιφανειακή αντίδραση μεταξύ των δύο μονομερών.

1.3.2.2 Νανοσωματίδια από ήδη παρασκευασμένα πολυμερή

Με εξαίρεση τα αλκυλ-κυανοακρυλικά, τα περισσότερα μονομερή που είναι κατάλληλα για μικκυλιακό πολυμερισμό σε υδατική φάση οδηγούν σε πολυμερή που

βιοαποικοδομούνται αργά ή δεν βιοαποικοδομούνται καθόλου. Επιπρόσθετα, τα εναπομείναντα μόρια στο μέσο πολυμερισμού (μονομερή, олиγομερή, επιφανειοδραστικά κ.α.) μπορεί να είναι τοξικά, απαιτώντας διαδικασίες καθαρισμού του κολλοειδούς υλικού. Για αποφυγή αυτών των προβλημάτων, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι παρασκευής νανοσωματιδίων χρησιμοποιώντας προ-παρασκευασμένα πολυμερή.

1. Μέθοδος γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης διαλύτη

Η μέθοδος γαλακτώματος έχει δύο παραλλαγές, αναλόγως την φύση της βιοδραστικής ουσίας που εγκλωβίζεται στα νανοσωματίδια: το μονό γαλάκτωμα (οργανικό διαλύτη σε νερό, o/w) και το διπλό γαλάκτωμα (νερό σε οργανικό διαλύτη σε νερό, w/o/w). Στην πρώτη παραλλαγή, η οποία χρησιμοποιείται για την ενκαψακίωση λιπόφιλων μορίων, το πολυμερές και το φάρμακο διαλύονται σε ένα πτητικό οργανικό διαλύτη, μη αναμίξιμο με το νερό, όπως το διχλωρομεθάνιο ή τον οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση γαλακτωματοποιείται χρησιμοποιώντας ομογενοποιητή, μικρορευστοποίηση ή ακίδα υπερήχων εντός μιας υδατικής φάσεως που περιέχει ποσότητα επιφανειοδραστικού (π.χ. χολικό νάτριο ή πολύ-βυνιλική αλκοόλη). Ο οργανικός διαλύτης αφήνεται να εξατμιστεί (υπο ελαφριά ανάδευση, παρουσία ή απουσία χαμηλού κενού) και τα παραγόμενα νανοσωματίδια συλλέγονται και καθαρίζονται συνήθως με φυγοκέντρηση (Εικόνα 1.8).

Εικόνα 1.8: Βήματα παρασκευής νανοςωματιδίων με την μέθοδο γαλακτώματος/εξάτμισης διαλύτη

Η δεύτερη μέθοδος, δηλαδή στην περίπτωση του διπλού γαλακτώματος, χρησιμοποιείται συνήθως για υδρόφιλες ουσίες και πρωτεΐνες, όπου η ουσία διαλύεται σε μικρή ποσότητα υδατικής φάσης. Στην συνέχεια αυτή η ποσότητα γαλακτοματοποιείται σε μια οργανική φάση όπου περιέχεται το πολυμερές σε διαλυτή μορφή. Το γαλάκτωμα w/o που παράγεται, τοποθετείται σε ένα μεγαλύτερο όγκο υδατικής φάσης όπου περιέχεται το επιφανειοδραστικό και γαλακτοματοποιείται, λαμβάνοντας τελικά ένα διπλό γαλάκτωμα w/o/w. Η συνέχεια είναι ίδια με αυτή στην μέθοδο του μονού γαλακτώματος.

Το μέγεθος των παραγόμενων νανοςωματιδίων εξαρτάται από την ένταση, το χρόνο και τον τρόπο γαλακτοματοποίησης, την ποσότητα των διαλυτών που χρησιμοποιούνται, την συγκέντρωση πολυμερούς, το ιξώδες της οργανικής και υδατικής φάσης και τη θερμοκρασία [153]. Παρόλο που μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα γαλακτώματα, το o/w γαλάκτωμα αποτελεί το κυρίαρχο

καθώς το νερό δεν διαλύει τα πολυμερή και διευκολύνει και απλουστεύει την διαδικασία στο θέμα του καθαρισμού [154]. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα πολυμερή για αυτή την μέθοδο είναι τα PLA [155, 156], PLGA [157], αιθυλική κυτταρίνη (ethylcellulose)[158] και πολύ(Ε-καπρολακτόνη) (PCL) [159-161].

Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι η ευκολία παρασκευής των νανοσωματιδίων. Μειονεκτήματα της μεθόδου είναι η απαιτούμενη χρήση σχετικά τοξικών οργανικών διαλυτών και η εφαρμογή έντονων διατμητικών δυνάμεων. Ο συνδυασμός οργανικών διαλυτών και ισχυρών διατμητικών δυνάμεων μπορεί να οδηγήσει σε αλλοίωση ή αποικοδόμηση διαφόρων φαρμάκων όπως οι πρωτεΐνες [170,171].

2. Μέθοδος εκτόπισης διαλύτη

Η μέθοδος εκτόπισης διαλύτη στηρίζεται στην αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση μιας οργανικής φάσης, όπου περιέχεται διαλυμένο το πολυμερές, σε μια υδατική εξωτερική φάση, με αποτέλεσμα την δημιουργία νανοσωματιδίων. Η διαδικασία περιλαμβάνει την κατακρήμνιση ενός ήδη παρασκευασμένου πολυμερούς από ένα οργανικό διάλυμα και την διάχυση του οργανικού διαλύτη στην υδατική φάση, στην οποία μπορεί να έχουν προστεθεί επιφανειοδραστικές ουσίες [162-165].

Συνήθως, το πολυμερές και το φάρμακο διαλύονται σε ένα οργανικό διαλύτη αναμίξιμο με το νερό, όπως η ακετόνη. Η οργανική φάση μεταφέρεται αργά στην υδατική που περιέχει το επιφανειοδραστικό, όπως το PVA, υπό ήπια ανάδευση. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ενός ο/ω γαλακτώματος μεγέθους μικρότερου από το 1μm, εξαιτίας της απότομης αλλαγής της επιφανειακής τάσης με την ταχεία διάχυση της ακετόνης στην υδατική φάση. Στην συνέχεια, τα νανοσωματίδια σχηματίζονται με συσσωμάτωση πολυμερούς και φαρμάκου. Ο οργανικός διαλύτης απομακρύνεται με εξάτμιση και τα νανοσωματίδια συμπυκνώνονται και καθαρίζονται με φυγοκέντρηση ή με μεμβράνη διαπίδυσης.

Εικόνα 1.9: Βήματα παρασκευής νανοσωματιδίων με την μέθοδο εκτόπισης διαλύτη

Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι η απλότητά της και οι ήπιες διατμητικές δυνάμεις που απαιτούνται για την παρασκευή των νανοσωματιδίων. Παρόλα αυτά, η μέθοδος δεν ενδείκνυται για την ενκαψακίωση υδρόφιλων ουσιών, εξαιτίας την σημαντικής διαρροής της δραστικής ουσίας στην υδατική φάση κατά την παρασκευή. Για βελτίωση της ενκαψακίωση υδρόφιλων ουσιών, ο Takeuchi και οι συνεργάτες του [172] αντικατέστησαν το μέσο διασποράς από υδατικό διάλυμα σε ελαϊκό μέσο αποτελούμενο από μίγμα τριγλυκεριδίων (cargylate και caprate) και πρόσθεσε επιφανειοδραστικό (Span 80) στην φάση που είναι διαλυμένο το πολυμερές. Ένα άλλο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι πολλά φάρμακα δεν έχουν ικανοποιητική διαλυτότητα σε ημιπολικούς διαλύτες όπως η ακετόνη ή οι αλκοόλες. Για την βελτίωση της διαλυτότητας και του εγκλωβισμού συγκεκριμένων φαρμάκων, έχει προταθεί η αντικατάσταση της ακετόνης από μίγμα ακετόνης και διχλωρομεθανίου [173].

3) Μέθοδος εξαλάτωσης

Σε αυτή την μέθοδο [174,175], το πολυμερές και το φάρμακο διαλύονται σε ένα διαλύτη αναμίξιμο με το νερό (π.χ. ακετόνη ή τετραυδροφουράνιο) και το διάλυμα αυτό γαλακτωματοποιείται υπό έντονη μηχανική ανάδευση σε μία υδρογέλη που περιέχει έναν παράγοντα εξαλάτωσης και ένα σταθεροποιητή κολλοειδών (π.χ. PVA, PVP, υδροξυαιθυλοκυτταρίνη). Αυτό το ο/ω γαλάκτωμα αραιώνεται με νερό για την ενίσχυση της διάχυσης της ακετόνης στην υδατική φάση, προκαλώντας την δημιουργία νανοσωματιδίων. Τα νανοσωματίδια καθαρίζονται με διήθηση διασταυρούμενης ροής (cross-flow filtration).

Εικόνα 1.10: Βήματα παρασκευής νανοσωματιδίων με την μέθοδο εξαλάτωσης

Ως παράγοντες εξαλάτωσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν ηλεκτρολύτες, όπως το χλωριούχο μαγνήσιο, χλωριούχο νάτριο ή οξικό μαγνήσιο, όπως επίσης και μη ηλεκτρολυτικές ουσίες, όπως η σουκρόζη. Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι η πιθανή ενσωμάτωση στα νανοσωματίδια υψηλών ποσοτήτων πολυμερούς και φαρμάκου, οι υψηλές αποδόσεις που γενικά επιτυγχάνονται και η ευκολία παραγωγής

των νανοσωματιδίων σε μεγάλη κλίμακα παραγωγής. Στην περίπτωση πρωτεϊνικών ουσιών, με αυτή την μέθοδο επίσης ελαχιστοποιείται η αποικοδόμηση τους. Τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι η αδυναμία χρήσης της σε ενώσεις που δεν είναι λιπόφιλες, καθώς επίσης ότι απαιτείται έντονος καθαρισμός των νανοσωματιδίων [176]. Ένα άλλο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η χρήση αλάτων που μπορεί να μην είναι συμβατά με τις ουσίες που πρόκειται να εισαχθούν στα νανοσωματίδια [177].

1.3.2.3 Νανοσωματίδια από φυσικά μακρομόρια

1. Νανοσωματίδια αλβουμίνης

Νανοσωματίδια αλβουμίνης παράγονται με την γαλακτωματοποίηση υδατικού διαλύματος της αλβουμίνης σε οργανική συνεχή φάση. Δύο βασικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για την παρασκευή μικροσφαιρών αλβουμίνης, που διαφέρουν ως προς την μέθοδο σταθεροποίησης: την θερμική επεξεργασία ($95 - 180^{\circ}\text{C}$) ή την χημική επεξεργασία σε φυτικό λάδι, γαλακτώματα ισο-οκτάνιου ή υδατικά μέσα. Άλλες τεχνικές περιλαμβάνουν μικρές μεταβολές των δύο βασικών μεθόδων [166]. Σε πρώτη περίπτωση, νανοσωματίδια αλβουμίνης σχηματίζονται με την ομογενοποίηση μια οργανικής φάσης που περιέχει σταγονίδια αλβουμίνης και την σταθεροποίηση τους με θέρμανση στους $175^{\circ} - 180^{\circ} \text{C}$ για δέκα λεπτά [166]. Το μίγμα ψύχεται και αραιώνεται με διαιθυλ-αιθέρα για την μείωση του ιξώδους της οργανικής φάσης, έτσι ώστε να επιτραπεί ο διαχωρισμός των νανοσωματιδίων από τον διαλύτη μέσω φυγοκέντρωσης.

Η μέθοδος της θέρμανσης είναι κατάλληλη μόνο για ουσίες που δεν είναι ευαίσθητα σε υψηλές θερμοκρασίες. Εναλλακτικά, νανοσωματίδια παρασκευάστηκαν με την γαλακτωματοποίηση υδατικού διαλύματος σε βαμβακέλαιο στο 25°C [167] και την στερεοποίηση της αλβουμίνης με την επαναιώρηση των σωματιδίων σε αιθέρα που περιέχει 2,3-βουταδιένιο ή φορμαλδεϋδη (σταυρωτή διασύνδεση μορίων αλβουμίνης). Τα σωματίδια αναδεύονται και καθαρίζονται με φυγοκέντρωση, με τον καθαρισμό (πλήρης απομάκρυνση του βαμβακέλαιου) να αποτελεί το δυσκολότερο κομμάτι της διεργασίας.

2. Νανοσωματίδια ζελατίνης

Γαλακτωματοποιημένα σταγονίδια υδατικού διαλύματος ζελατίνης στερεοποιήθηκαν με την ψύξη του γαλακτώματος, κάτω από τη θερμοκρασία δημιουργίας γέλης σε λουτρό πάγου, με αποτέλεσμα την πήξη των σταγονιδίων της ζελατίνης. Αυτές οι νανοσταγόνες διηθούνται, καθαρίζονται και στερεοποιούνται με προσθήκη φορμαλδεΐδης (σταυρωτή διασύνδεση μορίων ζελατίνης) [168]. Τα παραγόμενα σωματίδια κυμαίνονται σε διαμέτρους μεταξύ 100 και 600nm με μέσο μέγεθος τα 280 nm [145]. Αυτή η τεχνική είναι εφαρμόσιμη για φάρμακα ευαίσθητα σε υψηλές θερμοκρασίες. Παρόλα αυτά, ένα πλήθος φαρμάκων μπορούν να προσδεθούν στην ζελατίνη με την επεξεργασία της με την φορμαλδεΐδη. Η επεξεργασία όμως με την φορμαλδεΐδη αποτελεί μειονέκτημα, καθώς παραμένουν κατάλοιπα της στα νανοσωματίδια.

1.3.3 Χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων

1.3.3.1 Μέγεθος νανοσωματιδίων

Το μέγεθος των νανοσωματιδίων και η κατανομή μεγέθους είναι ίσως το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό τους. Καθορίζουν την *in vivo* βιοκατανομή, την τυχόν τοξικότητα και την ικανότητα στόχευσης του νανοσωματιδιακού συστήματος. Επιπρόσθετα, το μέγεθος επηρεάζει την φόρτωση σε φάρμακο και τον ρυθμό αποδέσμευσης φαρμάκων από τα νανοσωματίδια. Πολλές μελέτες έχουν δείξει την ανωτερότητα των νανοσωματιδίων ως φορείς ελεγχόμενης χορήγησης και στόχευσης φαρμάκων σε σύγκριση με τα μικροσωματίδια [180]. Γενικά, τα νανοσωματίδια παρουσιάζουν συγκριτικά υψηλότερη πρόσληψη τους από κύτταρα σε σύγκριση με τα μικροσωματίδια, ενώ φθάνουν σε περισσότερους βιολογικούς στόχους. Επιπρόσθετα, για να είναι εφικτή η κυκλοφορία των νανοσωματιδίων, που χορηγούνται ενδοφλέβια, μέσα ακόμη και στα μικρότερα τριχοειδή αγγεία θα πρέπει το μέγεθος τους να μην υπερβαίνει τα 5 μm . Επιπλέον απαιτείται να έχουν διάμετρο μικρότερη από 200 nm ώστε να αποφεύγουν την παγίδευση τους στον σπλήνα. Έχει επίσης αναφερθεί ότι τα νανοσωματίδια είναι δυνατόν να στοχευθούν προς τον

εγκέφαλο, δηλαδή θα μπορούσαν να χορηγηθούν σε θεραπευτικές ποσότητες φάρμακα στον εγκέφαλο με εγκλεισμό τους σε νανοσωματίδια κατάλληλης σύστασης, π.χ. σε περιπτώσεις καρκίνου του εγκεφάλου [181]. Η αποδέσμευση φαρμάκων επηρεάζεται από το μέγεθος των νανοσωματιδίων, καθώς μικρότερου μεγέθους σωματίδια παρουσιάζουν μεγαλύτερη ειδική επιφάνεια, με αποτέλεσμα τη πιο ταχεία αποδέσμευση του φαρμάκου μέσω διάχυσης, σε σύγκριση με μεγαλύτερα σωματίδια [182]. Από την άλλη, μικρότερα σωματίδια έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο συσσωμάτωσης κατά την διάρκεια της αποθήκευσης τους.

Σήμερα, ο πιο γρήγορος και εύκολος τρόπος για τον προσδιορισμό του μεγέθους των νανοσωματιδίων είναι με φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων (Photon Correlation Spectroscopy, PCS) ή οποία ονομάζεται και δυναμική σκέδαση φωτός (dynamic light scattering). Για αυτή την τεχνική είναι απαραίτητο να είναι γνωστό το ιξώδες του μέσου διασποράς. Η διάμετρος των σωματιδίων προσδιορίζεται από την κινητικότητα που εμφανίζουν τα σωματίδια λόγω της κίνησης Brown και την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός. Η μέθοδος εμφανίζει σημαντικά πλεονεκτήματα όπως η ευκολία στον χειρισμό και η ταχύτητα λήψης αποτελεσμάτων καθώς κάθε μέτρηση διαρκεί λίγα λεπτά, επιτρέποντας πολλαπλές μετρήσεις σε πολλαπλά δείγματα. Με σύγχρονα μηχανήματα μέτρησης μεγέθους είναι δυνατόν το δείγμα να χρησιμοποιηθεί χωρίς κάποια προεπεξεργασία (π.χ. αραιώση) όποτε και να συλλεχθεί πάλι, ενώ το εύρος των μεγεθών που μπορούν να μετρηθούν είναι αρκετά μεγάλο (από 1nm έως 6μm) με την τεχνική της μη παρεμβατικής οπισθοσκέδασης (Non Invasive Back Scatterig). Μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι η παρουσία τυχών προσμίξεων από άλλα σωματίδια, όπως σκόνη, ακόμα και μικρές φυσαλίδες αέρα, μπορούν να επηρεάσουν την μέτρηση.

Εναλλακτικές μέθοδοι μέτρησης του μεγέθους των νανοσωματιδίων αποτελεί η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) και η μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων (AFM) με μειονεκτήματα στην αδυναμία μέτρησης πολλαπλών δειγμάτων σε σύντομο χρονικό διάστημα, μεγάλο χρόνο προετοιμασίας του δείγματος και καταστροφή του.

Τυπικά τα PLA νανοσωματίδια συνήθως παρουσιάζουν μέσο μέγεθος από 100 έως 300 nm, εξαρτώμενο από το μοριακό βάρος του πολυμερούς και την μέθοδο

παρασκευής των νανοσωματιδίων. Από την μέθοδο παρασκευής θα εξαρτηθεί το τελικό μέγεθος που θα ληφθεί.

1.3.3.2 Επιφανειακές ιδιότητες των νανοσωματιδίων

Όταν τα νανοσωματίδια χορηγούνται ενδοφλεβίως αναγνωρίζονται εύκολα από το ανοσοποιητικό σύστημα, και απομακρύνονται από την κυκλοφορία από τα φαγοκύτταρα [183]. Εκτός από το μέγεθος των νανοσωματιδίων, η επιφανειακή τους υδροφοβικότητα καθορίζει την ποσότητα των συστατικών του αίματος (π.χ. οψωνινών) που θα προσροφηθούν στην επιφάνεια των σωματιδίων. Αυτό με την σειρά του επηρεάζει την βιολογική τύχη (βιοκατανομή, απομάκρυνση) των νανοσωματιδίων [183,184]. Η σύνδεση των οψωνινών στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων (οψωνοποίηση), αποτελεί το πρώτο βήμα σε μία σειρά φαινομένων που οδηγούν τελικά στην φαγοκυττάρωση των σωματιδίων. Η ενκαψακίωση ή προσρόφηση ενός φαρμάκου σε ένα φορέα έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή της βιοκατανομής του φαρμάκου, καθώς αυτή εξαρτάται από τις ιδιότητες του φορέα. Τα συμβατικά νανοσωματίδια, δηλαδή χωρίς κάποια επιφανειακή επεξεργασία, οψωνοποιούνται και προσλαμβάνονται από τα όργανα που είναι πλούσια σε μακροφάγα όπως το συκώτι, τον σπλήνα, και τον μυελό των οστών [185].

Το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων μετράται με σκοπό τον χαρακτηρισμό του επιφανειακού φορτίου των νανοσωματιδίων [186]. Εκφράζει το ηλεκτρικό δυναμικό των σωματιδίων και εξαρτάται από την σύνθεση του σωματιδίου και το μέσο διασποράς τους. Η ύπαρξη των φορτίων στην επιφάνεια των σωματιδίων οφείλεται κυρίως στην ύπαρξη φορτισμένων ομάδων ή/και στην προσρόφηση ιόντων από το μέσο διασποράς. Το ζ-δυναμικό μετράται με μετρήσεις της κινητικότητας των σωματιδίων παρουσία ηλεκτρικού πεδίου (ηλεκτροφορητικές μετρήσεις). Τυπικά το ζ-δυναμικό των PLA νανοσωματιδίων κυμαίνεται γύρω στα -30 ως -50 mV. Η εξίσωση που χρησιμοποιείται είναι η εξής:

$$\zeta = \frac{4\pi\eta}{\varepsilon} \times U$$

όπου ζ: το ζ-δυναμικό

η: το ιξώδες του δείγματος

ε: Διηλεκτρική σταθερά

U: ηλεκροφοριστική κινητικότητα που εξάγεται από την ταχύτητα κίνησης των σωματιδίων, την διαφορά δυναμικού των ηλεκτροδίων και από την απόσταση των ηλεκτροδίων.

1.3.3.3 Φόρτωση νανοσωματιδίων με φάρμακο

Ιδανικά, ένα πετυχημένο νανοσωματιδιακό σύστημα πρέπει να έχει την δυνατότητα για υψηλές φορτώσεις (% κατά βάρος του φαρμάκου στα νανοσωματίδια) σε φάρμακο, ώστε να απαιτούνται μικρές ποσότητες νανοσωματιδίων για την χορήγηση των απαιτούμενων δόσεων του φαρμάκου και να μην δημιουργείται κίνδυνος συσσώρευσης του πολυμερούς στον οργανισμό που μπορεί να οδηγήσει σε φαινόμενα τοξικότητας.

Η φόρτωση ενός φαρμάκου στα νανοσωματίδια μπορεί να γίνει με δύο τρόπους:

- Με ενκαψακίωση κατά την διάρκεια παρασκευής των νανοσωματιδίων
- Προσρόφιση του φαρμάκου σε προσχηματισμένα νανοσωματίδια, με επώαση των νανοσωματιδίων με πυκνό διάλυμα του φαρμάκου

Η φόρτωση και η ενκαψακίωση (ποσοστό % της ποσότητας του φαρμάκου που εγκλωβίζεται τελικά στις νανοσφαίρες προς την αρχική ποσότητα που προστέθηκε) φαρμάκων στα νανοσωματίδια εξαρτώνται από την λιποφιλικότητα ή υδροφιλικότητα του φαρμάκου και την διαλυτότητά του σε στερεά κατάσταση στο υλικό (πολυμερές) των νανοσωματιδίων, δηλαδή εξαρτάται από την σύσταση του πολυμερούς, τις φυσικοχημικές ιδιότητες και το μοριακό βάρος του φαρμάκου, την αλληλεπίδραση πολυμερούς και φαρμάκου και την τυχόν παρουσία δραστικών ομάδων στο πολυμερές για αντίδραση με το φάρμακο (π.χ. υδροξύλια ή καρβοξύλια) [187-189].

Τα μακρομόρια και οι πρωτεΐνες επιδεικνύουν μεγαλύτερη φόρτωση όταν η διαδικασία της φόρτωσης τους γίνεται κοντά στο ισοηλεκτρικό τους σημείο (δηλαδή στο σημείο όπου το συνολικό φορτίο είναι μηδέν), όπου παρουσιάζουν την μικρότερη υδατοδιαλυτότητα τους και μεγίστη προσρόφηση στα νανοσωματίδια [179]. Για μικρά μόρια, μελέτες έχουν δείξει ότι η χρήση ιοντικών αλληλοεπιδράσεων μεταξύ του φαρμάκου και του υλικού μήτρας των νανοσωματιδίων αποτελεί πολύ αποδοτική μέθοδο για την αύξηση της φόρτωσης των νανοσωματιδίων σε φάρμακο [190,191].

Η φόρτωση του φαρμάκου στα νανοσωματίδια έχει παρατηρηθεί να αυξάνεται με αύξηση της αρχικής εισαγόμενης ποσότητας φαρμάκου (drug input) (% θεωρητική φόρτωση φαρμάκου). Ωστόσο η ενκαψακίωση του φαρμάκου μπορεί να μειώνεται με αύξηση της αρχικής ποσότητάς του.

1.3.3.4 Αποδέσμευση φαρμάκων

Για την ανάπτυξη ενός νανοσωματιδιακού συστήματος, τόσο ο ρυθμός αποδέσμευσης του φαρμάκου όσο και η βιοαποικοδομησιμότητα του πολυμερούς πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν. Γενικά, ο ρυθμός αποδέσμευσης φαρμάκων εξαρτάται από:

- Την διαλυτότητα του φαρμάκου στο μέσο διάλυσης
- Τον ρυθμό αποδέσμευσης των προσροφημένων ή χημικά συνδεδεμένων μορίων του φαρμάκου από την επιφάνεια του νανοσωματιδίου
- Το ρυθμό διάχυσης του φαρμάκου από την πολυμερική μήτρα του νανοσωματιδίου
- Τον ρυθμό διάβρωσης ή αποικοδόμησης της νανοσωματιδιακής μήτρας

Συγκεντρωτικά, οι βασικές διεργασίες που καθορίζουν το ρυθμό αποδέσμευσης των φαρμάκων είναι η διαλυτότητα, η διάχυση και η αποικοδόμηση των υλικών του νανοσωματιδιακού πυρήνα. Στην περίπτωση των νανοσφαιρών, όπου το φάρμακο είναι διασπαρμένο στο σύνολο του πολυμερικού πυρήνα, η αποδέσμευση του πραγματοποιείται μέσω διάχυσης του φαρμάκου από την πολυμερική μήτρα που μπορεί να διαβρώνεται ή όχι από το υγρό διάλυσης.. Αν η διάχυση του φαρμάκου

πραγματοποιείται σε μεγαλύτερο ρυθμό από την αποικοδόμηση της μήτρας, ο μηχανισμός της αποδέσμευσης ελέγχεται από τη διεργασία της διάχυσης. Η γρήγορη αρχική αποδέσμευση του φαρμάκου στην αρχή της διεργασίας αποδέσμευσης του οφείλεται κυρίως σε ελαφρώς συνδεδεμένο ή προσροφημένο φάρμακο στην σχετικά μεγάλη επιφάνεια των νανοσωματιδίων (burst effect) [217]. Παρόλα αυτά η μέθοδος σύνδεσης του φαρμάκου στο νανοσωματίδιο, π.χ. στην περίπτωση χημικής σύνδεσης με το πολυμερές, επηρεάζει τον ρυθμό αποδέσμευσης, ενώ παράλληλα παρουσιάζεται μειωμένη η αρχική απότομη αποδέσμευση του φαρμάκου και ο συνολικός ρυθμός αποδέσμευσης του φαρμάκου είναι πιο σταθερός [192].

Πολλές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για την *in vitro* μελέτη της αποδέσμευσης των φαρμάκων από τα νανοσωματίδια όπως:

- Κυψελίδες διάχυσης συνδεδεμένες μέσω τεχνητών ή φυσικών μεμβρανών
- Σάκοι διαπίδυσης
- Τεχνική αντίστροφου σάκου διαπίδυσης
- Διαχωρισμός των νανοσωματιδίων από το φάρμακο με φυγοκέντρηση
- Υπερ-διήθηση ή φυγοκεντρική υπερ-διήθηση.

Η μέθοδος που θα επιλεγθεί εξαρτάται από της ιδιότητες του φαρμάκου (π.χ. μοριακό βάρος), αν και η πλέον συνήθης μέθοδος είναι η χρήση σάκου διαπίδυσης.

1.3.3.5 Σύνδεση πρωτεϊνών *in vivo*

Η σύνδεση πρωτεϊνών (οψωνίνες) και η απομάκρυνση των νανοσωματιδιακών φορέων φαρμάκων μέσω της πρόσληψης από το μονοπυρηνικό φαγοκυτταρικό σύστημα (mononuclear phagocytic system, MPS), γνωστό και ως δικτυοενδοθηλιακό σύστημα (reticuloendothelial system, RES), είναι ένα βασικό χαρακτηριστικό των νανοσωματιδίων. Τα μακροφάγα του MPS έχουν την δυνατότητα να απομακρύνουν τα νανοσωματίδια από το αίμα εντός ολίγων δευτερολέπτων, σε περίπτωση ενδοφλέβιας χορήγησης [195]. Αυτά τα μακροφάγα, που είναι συνήθως κύτταρα Kupffer ή μακροφάγα του ήπατος, δεν είναι ικανά να αναγνωρίσουν απευθείας τα νανοσωματίδια, αλλά αναγνωρίζουν ειδικές πρωτεΐνες, τις οψωνίνες, οι οποίες

συνδέονται στην επιφάνεια των σωματιδίων [194]. Γενικότερα, ως οψωνίνη χαρακτηρίζεται οποιοδήποτε συστατικό του αίματος που βοηθά στην διαδικασία της φαγοκυτταρικής αναγνώρισης, μερικά από τα οποία είναι τα συμπληρώματα C3, C4 και C5 καθώς και οι ανοσοσφαιρίνες. Την οψωνοποίηση ακολουθεί η φαγοκυττάρωση, η οποία οδηγεί τελικά στην καταστροφή ή απομάκρυνση των ξένων υλικών από το αίμα. Αυτές οι δύο διεργασίες μαζί αποτελούν το βασικό μηχανισμό απομάκρυνσης ανεπιθύμητων συστατικών. Αν το πολυμερές των νανοσωματιδίων δεν είναι βιοαποικοδομήσιμο, έχουμε συσσώρευση του πολυμερούς στα MPS όργανα, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε φαινόμενα τοξικότητας και άλλες παρενέργειες [196-198].

1.4 Διαδερμική ανοσοποίηση

Παρόλο που οι κλασσικές μέθοδοι ανοσοποίησης έχουν αποδειχθεί εξαιρετικά αποτελεσματικές στην αντιμετώπιση μολυσματικών ασθενειών, τα τελευταία χρόνια υπάρχει μια αυξανόμενη ανάγκη για πιο αποδοτικά εμβόλια ενάντια σε μια πληθώρα μολυσματικών ασθενειών και του καρκίνου. Ο εμβολιασμός με παθογόνα ή υπομονάδες παθογόνων περιορίζεται σε στενό φάσμα παθογόνων από τα οποία υπάρχουν, καθώς πολλά από αυτά δεν μπορούν να αξιοποιηθούν εξαιτίας διαφόρων προβλημάτων. Ένα είναι ο κίνδυνος παρενεργειών μετά την ανοσοποίηση. Δεύτερο πρόβλημα μπορεί να είναι η ανοσογονικότητα, δηλαδή εάν το παθογόνο είναι ικανό να προκαλέσει επαρκή ανοσοαπόκριση του οργανισμού για μελλοντική προστασία του. Τρίτο πιθανό πρόβλημα αποτελεί η οδός ανοσοποίησης. Τυπικό παράδειγμα αποτελεί η αποτελεσματική ανοσοποίηση έναντι της γρίπης με εισπνεόμενο εμβόλιο (ενδορινικό). Η ίδια (ρινική) οδός όμως δεν είναι αποδοτική και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανοσοποίηση έναντι άλλων ιών. Τις τελευταίες δεκαετίες έχει υπάρξει εκπληκτική πρόοδος στην διερεύνηση των λειτουργιών του πολύπλοκου ανοσοποιητικού συστήματος, όπως επίσης έχουν αναπτυχθεί νέες στρατηγικές για την ανακάλυψη και ταυτοποίηση νέων αντιγόνων σε μικρότερο χρόνο και κόστος [200]. Σήμερα, είναι δυνατός ο σχεδιασμός βελτιωμένων εμβολίων εξαιτίας της αναγνώρισης της σημαντικότητας των ανοσοενισχυτικών στην αλληλεπίδραση τους με τα παθογόνα και στη βελτίωση της αποδοτικότητας των παραγόμενων εμβολίων [201]. Παράλληλα, ο σχεδιασμός νέων μεθόδων χορήγησης παρέχει την δυνατότητα

να επιτευχθούν απλοί τρόποι εμβολιασμών. Εξαιτίας αυτών θα είναι δυνατόν να μειωθούν οι απαιτήσεις για ενέσεις με απώτερο σκοπό μέχρι και την εφαρμογή του εμβολίου από τον ίδιο τον ασθενή. Αν μειωθεί η χρήση ενέσεων για εμβολιασμούς, μειώνονται παράλληλα και οι κίνδυνοι μολύνσεων από μη καλά αποστειρωμένες βελόνες ή ακόμα και από την κατά λάθος χρήση ίδιας βελόνας σε περισσότερους από έναν ασθενή. Είναι φανερό ότι ο εμβολιασμός χωρίς την χρήση βελόνων έχει αρκετά πλεονεκτήματα. Επιπρόσθετα είναι πιο δεκτικός στους ασθενείς εξαιτίας της απουσίας του άγχους ή του πόνου που προκαλούν οι ενέσεις.

Ένα από τα πιθανά προβλήματα στην διαδικασία της ανοσοποίησης, είναι η ύπαρξη ικανού πληθυσμού αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων στο σημείο εφαρμογής του εμβολίου. Οι μύες, ένας παραδοσιακός στόχος του σώματος για εμβολιασμό, δεν θεωρούνται ένα αποδοτικό σημείο για αντιγονοπαρουσίαση, εξαιτίας της ελλειπούς ποσότητας αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, είτε δενδριτικών είτε μακροφάγων [62]. Επιπρόσθετα, τα κύτταρα που βρίσκονται στους μύες εκφράζουν σε πολύ μικρό βαθμό μόρια του MHC τάξης II με αποτέλεσμα να γίνεται δύσκολη η διέγερση των T λεμφοκυττάρων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να απαιτείται η χρήση ανοσοενισχυτικών για την αύξηση της διέγερσης των δενδριτικών κυττάρων και την είσοδο τους στο εσωτερικό ή στην περίμετρο του σημείου της ενδομυϊκής ένεσης [63-67]. Σε αντίθεση το δέρμα είναι ένα από τα μεγαλύτερα ανοσολογικά όργανα του σώματος και είναι πλούσιο σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα όπως τα κύτταρα Langerhans που βρίσκονται στο τμήμα της επιδερμίδας και άλλων δενδριτικών κυττάρων της δερμίδας [68,69,76], αυτά τα κύτταρα είναι ικανά να προκαλέσουν ανοσοαποκρίσεις όπως έχει δείχθει και *in vitro* και *in vivo* [69]. Παράλληλα το δέρμα φαίνεται να αποτελεί καλό στόχο για την πρόκληση χυμικών και κυτταρικών ανοσοαποκρίσεων [68]. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η ενδοδερμική ανοσοποίηση είναι πιο ικανοποιητική από ότι η ενδομυϊκή, χρησιμοποιώντας μάλιστα μικρότερη ποσότητα του αντιγόνου. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην μεγαλύτερη διαθεσιμότητα των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων στο σημείο εμβολιασμού [70-72].

Παρόλο που τα κύτταρα Langerhans αποτελούν ένα μικρό ποσοστό επί του συνόλου των κυττάρων του δέρματος, έχουν το πλεονέκτημα ότι βρίσκονται πολύ κοντά στην επιφάνεια του δέρματος και αντιπροσωπεύουν ένα δίκτυο ανοσολογικών

κυττάρων που καλύπτει το 25% της συνολικής επιφάνειας του δέρματος [69,73,74]. Σχηματίζουν ένα ημι-συνεχές δίκτυο στην επιδερμίδα και εντοπίζονται σε μεγάλο αριθμό στους θύλακες των τριχών [75]. Παρόλα αυτά, αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα όπως αναφέρθηκε βρίσκονται και σε άλλα σημεία του δέρματος (όπως το χόριο) [68,69,76].

Έτσι λοιπόν το δέρμα είναι ισχυρός υποψήφιος στόχος για την χορήγηση εμβολίων και την πρόκληση ικανών ανοσοαποκρίσεων. Στην συνέχεια περιγράφονται αναλυτικότερα τα τμήματα από τα οποία αποτελείται το δέρμα. Επίσης αναλύονται η διαδερμική χορήγηση φαρμάκων και τα υπάρχοντα συστήματα διαδερμικής ανοσοποίησης που έχουν μελετηθεί.

1.4.1 Ο δερματικός φραγμός

Το δέρμα θεωρείται το μεγαλύτερο όργανο του σώματος και αποτελεί περίπου το 16% του συνολικού του βάρους ενώ στους ενήλικες έχει επιφάνεια κατά μέσο όρο τα 2 m² και επιτρέπει στο σώμα να αλληλεπιδρά με το περιβάλλον. Οι λειτουργίες του δέρματος θεωρούνται σημαντικές για την επιβίωση του ανθρώπου σε ένα σχετικά εχθρικό περιβάλλον, παρέχοντας μια πολλαπλά λειτουργική διεπιφάνεια μεταξύ του σώματος και του περιβάλλοντος χώρου, περιλαμβάνοντας την προστασία και την παροχή αισθήσεων. Εξαιτίας του φραγμού που παρέχει το δέρμα, επιτρέπει την επιβίωση του ανθρώπου σε μεταβολές των εξωτερικών συνθηκών (π.χ. της θερμοκρασίας) και σε περιπτώσεις έκθεσης του σε επικίνδυνες ουσίες, ακτινοβολία και μικροοργανισμούς. Για την διατήρηση αυτών των δυνατοτήτων, το δέρμα βρίσκεται σε διαδικασία συνεχούς ανανέωσης [220].

Λόγω της ιδιότητας του να λειτουργεί σαν φραγμός, το δέρμα είναι ικανό να περιορίζει την μεταφορά μορίων από και προς το σώμα. Η άρση αυτού του φραγμού αποτελεί το στόχο της διαδερμικής χορήγησης βιοδραστικών ουσιών. Για καλύτερη κατανόηση της λειτουργίας του δέρματος ως φραγμός, είναι απαραίτητο να μελετηθεί η ανατομία, η φυσιολογία και η χημική σύστασή του.

Ανατομικά, το δέρμα αποτελείται από 4 βασικές στοιβάδες, τη κερατίνη στοιβάδα (stratum corneum, νεκρή επιδερμίδα), τη ζωντανή επιδερμίδα, το χόριο (δερμίδα) ή κυρίως δέρμα και τον υποδόριο ιστό (Εικόνα 1.11). Επιπρόσθετα σε αυτές τις δομές υπάρχουν και άλλα στοιχεία, όπως οι θύλακες των τριχών, ιδρωτοποιοί και σμηγματογόνοι αδένες, φλέβες, νεύρα και νύχια.

Εικόνα 1.11: Δομή του δέρματος

Ο υποδόριος ιστός χαρακτηρίζεται από την ινώδη συνδετική δομή του και αποτελείται κυρίως από ελαστικές ίνες και λίπος. Αυτό το στρώμα λειτουργεί ως μόνωση και αποθήκη θερμίδων και θρεπτικών ουσιών για τα υπερκείμενα στρώματα. Στην περιοχή του συνδετικού ιστού υπάρχουν αιμοφόρα αγγεία, νεύρα, η βάση των ιδρωτοποιών αδένων και των θυλάκων των τριχών.

Το χόριο είναι ένα ινώδες στρώμα που στηρίζει και δυναμώνει την επιδερμίδα. Το πάχος του κυμαίνεται μεταξύ 2-3 mm. Αποτελείται από ένα σύμπλεγμα χαλαρών συνδετικών ιστών από κολλαγόνο σε ένα περιβάλλον ημιγέλης, που αποτελείται από νερό, ιόντα και πολυσακχαρίτες. Αυτό το σύμπλεγμα βοηθά στην ακινητοποίηση των κυττάρων και επιτρέπει την διάχυση του οξυγόνου και των θρεπτικών υλικών στα επιδερμικά κύτταρα. Σε αυτό το στρώμα βρίσκονται πολλά αιμοφόρα αγγεία,

δενδριτικά κύτταρα και δίκτυα νευρώνων, όπως επίσης οι θύλακες των τριχών και οι αδένες.

Η επιδερμίδα αποτελείται κυρίως από έναν πολυστοιβαδικό κερατινοποιημένο πλακώδες επιθήλιο και τριών ακόμα τύπων κυττάρων σε μικρότερη αναλογία, τα μελανοκύτταρα, τα κύτταρα Langerhans και τα κύτταρα του Merkel. Τα κερατινοποιημένα επιδερμικά κύτταρα αποκαλούνται κερατινοκύτταρα. Τα κύτταρα Langerhans είναι αστεροειδή κύτταρα που συναντώνται κυρίως στην στοιβάδα της επιδερμίδας και αντιπροσωπεύουν το 2-8% των επιδερμικών κυττάρων. Όπως έχει αναφερθεί, παράγονται στο μυελό των οστών, μεταφέρονται στο δέρμα με την κυκλοφορία του αίματος και έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν, να επεξεργάζονται και να παρουσιάζουν αντιγόνα στα T λεμφοκύτταρα. Κατά συνέπεια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις ανοσολογικές αντιδράσεις του δέρματος και γενικά του οργανισμού, λαμβάνοντας υπόψιν την συνεχή επαφή του δέρματος με το περιβάλλον.

Η κερατίνη στοιβάδα (stratum corneum, SC) αποτελεί το εξωτερικό κομμάτι της επιδερμίδας και έχει πάχος από 10 έως 20 μm που ποικίλει στα διάφορα σημεία του σώματος. Αποτελείται από 15 με 25 στοιβάδες πεπλατυσμένων, απύρηνων, κερατινοποιημένων κυττάρων, των οποίων το κυτταρόπλασμα είναι γεμάτο από μια νηματοειδή διπλοθλαστική σκληροπρωτεΐνη, την κερατίνη. Η κερατίνη περιέχει τουλάχιστον 6 διαφορετικά πολυπεπτίδια με μοριακά βάρη που κυμαίνονται μεταξύ 40 έως 70 kDa. Ο χώρος μεταξύ των κυττάρων αποτελείται από λιπίδια.

Τα λιπίδια αυτής της περιοχής είναι χαρακτηριστικά για τους εξής λόγους:

1. Δημιουργούν τη μόνη συνεχή φάση από την επιφάνεια του δέρματος στην βάση του SC.
2. Η σύσταση τους αποτελείται από λιπιδικά οξέα και χοληστερόλη
3. Τα λιπίδια της κερατίνης στοιβάδας δημιουργούν πολύ-στοιβαδικά φύλλα, παρά την απουσία φωσφολιπιδίων (πολικά λιπίδια)
4. Ο μεγάλος αριθμός κορεσμένων υδρογονανθράκων μεγάλου μοριακού βάρους στην λιπιδική περιοχή εξυπηρετεί στην δημιουργία ενός καλά δομημένου συστήματος που απεικονίζεται και στην εικόνα 1.12.

Εικόνα 1.12: Δομή κερατίνης στοιβάδας. Οι δύο οδοί εισχώρησης ουσιών διαμέσω αυτής

1.4.2 Διαδερμική χορήγηση φαρμάκων

Τα τελευταία χρόνια έχουν υπάρξει πολλές μελέτες με σκοπό την διαδερμική χορήγηση φαρμακευτικών ουσιών με κύριο στόχο την υπερνίκηση του φυσικού φραγμού που δημιουργεί το δέρμα και κυρίως η κερατίνη στοιβάδα. Η διαδερμική χορήγηση ουσιών παρέχει πολλά πλεονεκτήματα. Για παράδειγμα το δέρμα είναι μια αρκετά μεγάλη επιφάνεια έτοιμη για εφαρμογή ουσιών, ενώ η χορήγηση τους είναι μη επεμβατική. Επίσης είναι εύκολη η διακοπή της χορήγησης στην περίπτωση εφαρμογής υπερβολικής δόσης ή εμφάνισης παρενεργειών.

Σε σύγκριση με την χορήγηση από το στόμα, η διαδερμική έχει επιπλέον πλεονεκτήματα. Αρχικά η χορηγούμενη ουσία αποφεύγει τον μεταβολισμό πρώτης διόδου και ακραία περιβάλλοντα όπως τα οξέα του στομάχου. Ταυτόχρονα μειώνονται τυχόν αλληλεπιδράσεις με άλλες ουσίες που προέρχονται από τρόφιμα

και επιπλέον η διαδερμική χορήγηση μπορεί να είναι μια διαδικασία κατά την οποία ελέγχεται καλύτερα ο ρυθμός χορήγησης του φαρμάκου.

Η διαδερμική χορήγηση εμφανίζει και μειονεκτήματα. Μεταξύ αυτών είναι ότι δεν είναι κατάλληλες όλες οι ουσίες για διαδερμική χορήγηση. Επίσης ο ρυθμός διείσδυσης των ουσιών δεν είναι ίδιος σε όλες τις περιπτώσεις και διαφοροποιείται με την ηλικία, τη φυλή, το σημείο εφαρμογής και τυχόν ασθένειες του δέρματος [223, 224]. Ο σκοπός της διαδερμικής χορήγησης φαρμάκων δεν είναι η χορήγηση ενώσεων με γρήγορο ρυθμό, αλλά ο αργός και σταθερός ρυθμός αποδέσμευσης και χορήγησης αυτών για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Τα υπάρχοντα συστήματα διαδερμικής χορήγησης χρησιμοποιούνται κυρίως σε περιπτώσεις όπου η *per os* χορήγηση οδηγεί σε χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα ή υπάρχουν παρενέργειες [221,225].

Ένα καλό σύστημα χορήγησης ουσιών διαδερμικώς πρέπει να είναι ικανό να παρέχει επαρκή ποσότητα φαρμάκου στις εσωτερικές στοιβάδες του δέρματος, να μην ερεθίζει την περιοχή χορήγησης και να εξασφαλίζει όσο είναι δυνατόν την δραστηριότητα της ουσίας κατά την διάρκεια της διαδρομής μέχρι τον τελικό της στόχο [10].

1.4.3 Συστήματα διαδερμικής ανοσοποίησης

Η χορήγηση εμβολίων στο δέρμα συνήθως γίνεται με την χρήση βελόνων που φθάνουν στο χόριο ή στη υποδόρια στοιβάδα του δέρματος (Εικόνα 1.13). Η ενδοδερμική χορήγηση ενός εμβολίου με την βοήθεια βελόνας έχει σαν αποτέλεσμα την απόθεσή του κάτω από το χόριο ή στην διεπιφάνεια μεταξύ της δερμίδας και του υποδόριου ιστού (Εικόνα 1.13). Παρ'όλα αυτά, αυτή η περιοχή στον άνθρωπο είναι δύσκολο να εντοπιστεί και να αποτελέσει στόχο με τις συμβατικές βελόνες με αποτέλεσμα να απαιτείται ειδικά εξειδικευμένο προσωπικό για την εκτέλεση αυτών των εμβολιασμών. Για αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί εναλλακτικά συστήματα για τον εμβολιασμό μέσω του δέρματος.

Εικόνα 1.13: Μέθοδοι χορήγησης εμβολίων στο δέρμα, το οποίο είναι πλούσιο σε αντιγονοπαροσιαστικά κύτταρα

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, υπάρχουν δύο μονοπάτια για την διείσδυση των αντιγόνων στις εσωτερικές στοιβάδες του δέρματος διαμέσω της κερατίνης στοιβάδας: μέσα από τα κερατινοποιημένα κύτταρα ή μεταξύ των κυττάρων αυτών. Η οδός που κυριαρχεί για τις περισσότερες ουσίες είναι μεταξύ των κυττάρων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, η συνολική διαδρομή που πρέπει να διανύσει η ουσία να είναι αρκετά μεγαλύτερη ($\approx 500\mu\text{m}$) από το συνολικό πάχος της κερατίνης στοιβάδας ($\approx 15\mu\text{m}$) [226].

Η απορρόφηση ουσιών στα εσωτερικά στρώματα του δέρματος με τοπική εφαρμογή επί αθίκτου δέρματος περιορίζεται από τη κερατίνη στοιβάδα. Αυτό εξηγεί γιατί μέχρι τώρα ήταν απαραίτητη η φυσική επεξεργασία της κερατίνης στοιβάδας για την λήψη ανοσοαποκρίσεων διαμέσω του δέρματος. Νέες προσεγγίσεις, όπως οι τεχνολογίες Gene Gun ή το Powder Jet, η δημιουργία τοπικού ηλεκτρικού πεδίου για δημιουργία πόρων (electroporation), η ιοντοφόρηση και οι διαδικασίες αφαίρεσης των ανωτέρων στρωμάτων της επιδερμίδας (stripping) έχουν χρησιμοποιηθεί για την χορήγηση πρωτεϊνικών εμβολίων και εμβολίων DNA [86].

Ανάμεσα στις μεθόδους χορήγησης αντιγόνων μπορούν να διακριθούν η φυσική επεξεργασία του δέρματος και οι χημικοί ενισχυτές διαπερατότητας.

Συγκεντρωτικά, οι διάφορες στρατηγικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για την χορήγηση ουσιών διαμέσω του δέρματος είναι:

Μέθοδοι φυσικής ενίσχυσης

- Ιοντοφόρηση, όπου περιλαμβάνει την χρήση μικρής έντασης ηλεκτρικού ρεύματος μέσω ηλεκτροδίων που είναι σε επαφή με το δέρμα, προωθώντας με αυτό τον τρόπο την κίνηση ιόντων μέσω του δέρματος
- Δημιουργία τοπικού ηλεκτρικού πεδίου, εφαρμόζοντας ηλεκτρικούς παλμούς υψηλού δυναμικού για σύντομα χρονικά διαστήματα για την δημιουργία προσωρινών οπών στο δέρμα και την τελική ώθηση εντός του δέρματος των αντιγόνων
- Χρήση υπερήχων για την διάσπαση της λιπιδικής διάταξης στην κερατίνη στοιβάδα δημιουργώντας υδρόφιλους πόρους
- Μικρο-βελόνες όπου προκαλούν διάτρηση της κερατίνης στοιβάδας, χωρίς να φτάνουν σε βάθος που βρίσκονται οι νευρώνες και δεν γίνονται αισθητές [230]
- Τοπικές θερμικές επεξεργασίες [222, 229]
- Μηχανική διαπέραση της κερατίνης στοιβάδας με υψηλής ταχύτητας (βαλλιστικά) σωματίδια (Gene gun, Powder Ject) [229]

Μέθοδοι χημικής ενίσχυσης

- Ενυδάτωση της κερατίνης στοιβάδας με εφαρμογή πάνω στο δέρμα υλικού που απελευθερώνει την απαιτούμενη ποσότητα νερού
- Ουσίες (ενισχυτές ρόφησης) που καταστρέφουν την δομή της κερατίνης στοιβάδας όπως αλκοόλες, διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και λιπαρά οξέα.

Στις διάφορες μορφές χορήγησης έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετοί φορείς όπως τα λιποσώματα, τα βιροσώματα (viroosomes), τα τρανσφεροσώματα (transferosomes) και οι μικροσφαίρες [61].

Γενικά, ένα μόριο πρέπει να έχει αρκετές προϋποθέσεις ώστε να είναι ικανό να διεισδύσει μέσω της κερατίνης στοιβάδας, όπως να έχει κατάλληλη υδροφιλικότητα και λιποφιλικότητα (κατάλληλο συντελεστή κατανομής) και κατάλληλο μοριακό βάρος (μέγεθος). Άλλοι παράγοντες που πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν είναι το φορτίο του σε φυσιολογικό pH και η διαλυτότητά του [221, 222, 226, 227, 77].

Η επιφανειακή χορήγηση των εμβολίων με στόχο την επιδερμίδα περιορίζεται από την κερατίνη στοιβάδα, που είναι ένας αποτελεσματικός φυσικός φραγμός σε μόρια μεγαλύτερα των 500 Da [77]. Η διάχυση των μορίων διαμέσω της κερατίνης στοιβάδας πραγματοποιείται με πολύ αργό ρυθμό και τα μεγαλύτερα μόρια, όπως και οι πρωτεΐνες, διαπερνούν την στοιβάδα με πολύ μεγάλη δυσκολία. Αξιολογώντας τις διαστάσεις των ανοιγμάτων και των οπών που έχει το δέρμα και των εναλλακτικών οδών για την είσοδο στις κατώτερες στοιβάδες του, θεωρήθηκε ότι σωματίδια πολύ μικρού μεγέθους ίσως έχουν την δυνατότητα να διεισδύσουν σε αυτό. Παρόλα αυτά, η έκταση της διείσδυσης, όπως επίσης και η οδός εισόδου, εξαρτώνται ισχυρά από όλες της αλληλεπιδράσεις που μπορεί να συμβαίνουν μεταξύ των σωματιδίων και του δέρματος ή των πιθανών δομών που χαρακτηρίζουν το σημείο εφαρμογής.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, για την διαπέραση ουσιών μέσω της κερατίνης στοιβάδας με στόχο τα κατώτερα στρώματα υπάρχουν δύο οδοί, μέσα από τα κερατινοποιημένα νεκρά κύτταρα ή μεταξύ των κερατινοποιημένων κυττάρων. Εναλλακτικά όμως μπορούν να χρησιμοποιηθούν και οι θύλακες των τριχών για την διείσδυση των ουσιών στα κατώτερα στρώματα του δέρματος.

Στο παρελθόν, η διαδικασία διείσδυσης περιγράφονταν από την διάχυση διαμέσω των λιπιδικών διάκενων της κερατίνης στοιβάδας. Λιποσώματα με διάμετρο μεταξύ των 20 και 200 nm βρέθηκαν ότι είναι ικανοί φορείς για τοπική εφαρμογή φαρμάκων με στόχο την ζωντανή επιδερμίδα μέσα από τα διάκενα των κερατινοποιημένων κυττάρων της κερατίνης στοιβάδας [78,79]. Αρχικά, θεωρήθηκε ότι η οδός διαμέσω των θυλάκων των τριχών δεν υπήρξε η βασική οδός διείσδυσης

σε αυτή την περίπτωση, καθώς η συνολική επιφάνεια του δέρματος που αποτελεί τους θύλακες είχε εκτιμηθεί λιγότερο από 0,1% [80]. Παρόλα αυτά, αρκετές μελέτες έχουν δείξει την δυνατότητα της διείσδυσης ουσιών μέσα από τους θύλακες [75,78-81].

Δύο παράγοντες είναι ιδιαίτερα σημαντικοί για την διαδερμική ανοσοποίηση με εφαρμογή μικροσωματιδίων:

- Το μέγεθος σωματιδίων
- Οι φυσικές και χημικές ιδιότητες τους

Η χρήση μικροσωματιδίων (<5 μm σε διάμετρο) ως σύστημα χορήγησης για ενέσιμα εμβόλια στηρίζεται στην δυνατότητα τους να προσλαμβάνονται από μια ποικιλία φαγοκυτταρικών αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, όπως έχει αρκετές φορές παρουσιαστεί σε πειράματα *in vitro* και *in vivo* [89-92]. Οι Tabata και Ikada [93] επιβεβαίωσαν ότι η πρόσληψη των μικροσωματιδίων στα μακροφάγα αυξάνεται για σωματίδια μικρότερα από 2 μm . Η αποτελεσματικότητα όμως των σωματιδίων μεγέθους μικρότερου από 1 μm (π.χ. 100nm) δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί, καθώς αντίθετες απόψεις υπάρχουν στην βιβλιογραφία όσον αφορά την πρόσληψη τους από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα σε σύγκριση με τα μικροσωματίδια, με τα αποτελέσματα να εξαρτώνται από την φύση του σωματιδίου, του αντιγόνου που περιέχουν, την οδό χορήγησης και το στάδιο ολοκλήρωσης της κάθε μελέτης. Οι περιορισμοί στην διαδερμική ανοσοποίηση των σωματιδίων προέρχονται από τα στρώματα του δέρματος. Έχειδειχθεί ότι, κατόπιν εφαρμογής επί αθίκτου δέρματος σωματιδίων με διάμετρο 1-10 μm , η παρουσία τους περιορίζεται στα ανώτερα στρώματα της κερατίνης στοιβάδας όπως επίσης και στους θύλακες των τριχών [80]. Θεωρείται ότι διαλυτά υλικά μπορούν να διασπείρονται περισσότερο μέσα στο θύλακα των τριχών μέχρι τα ζωντανά στρώματα του δέρματος. Ο Singh και οι συνεργάτες [101] έδειξαν χρησιμοποιώντας μικροσφαίρες πολύ-(γαλακτικού-γλυκολικού) οξέος επικαλυμμένες με pDNA, ότι όσο μικρότερο το μέγεθος των μικροσφαιρών (300nm, >1 μm , >30 μm), τόσο ισχυρότερη η ανοσοαπόκριση. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την υπόθεση ότι μικρότερα και καλύτερα κατασκευασμένα νανοσωματίδια θα στόχευαν καλύτερα τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του δέρματος και θα εισχωρούσαν ευκολότερα στο δέρμα. Το πρώτο τμήμα της υπόθεσης

στην συνέχεια αποδείχτηκε, ότι δηλαδή πράγματι τα νανοσωματίδια εμφανίζουν να προσλαμβάνονται περισσότερο από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα [94,95], το οποίο σημαίνει ότι θα μπορούσαν να προκαλούν καλύτερες ανοσοαποκρίσεις σε σύγκριση με τα μικροσωματίδια.

Σε μια άλλη περίπτωση, κατόπιν απομάκρυνσης των ανωτέρω στρωμάτων της επιδερμίδας και αφαίρεση των τριχών χρησιμοποιώντας κυανοακρυλική μεμβράνη, η εφαρμογή μικρών νανοσωματιδίων (40nm) οδήγησε στην εισχώρηση τους στους ανοιχτούς θύλακες των τριχών. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα τα σωματίδια να προσλαμβάνονται από τα Langerhans κύτταρα που περιβάλλουν τον εκάστοτε θύλακα [75]. Παρόλα αυτά, μεγαλύτερου μεγέθους σωματίδια ($>500\text{nm}$) παραμένουν στα ανώτερα στρώματα των θυλάκων των τριχών. Επειδή οι θύλακες των τριχών λειτουργούν σαν δεξαμενές για τα νανοσωματίδια [96,97], η βελτιστοποίηση του μεγέθους των νανοσωματιδίων και των φυσικών τους ιδιοτήτων θα επιδράσει σημαντικά την πρόσληψη τους από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του δέρματος και στην απόδοση της ανοσοποίησης. Παρόλα αυτά, από τις διάφορες μελέτες εξάγεται το συμπέρασμα ότι ακόμη και τα μικρού μεγέθους σωματίδια μπορούν να περάσουν μονάχα μέσω των θυλάκων και όχι από κάποια άλλη οδό.

Το 1982, ο Streilein και συνεργάτες έδειξαν ότι με την απομάκρυνση των ανωτέρων στρωμάτων του δέρματος είναι δυνατόν να προκληθεί ενεργοποίηση των Langerhans κυττάρων και μετανάστευση τους από το δέρμα [108]. Επίσης παρατήρησαν για πρώτη φορά ότι η επιστροφή αυτών των κυττάρων στο δέρμα γινόταν μέσα στις επόμενες 24 ώρες [108]. Κατόπιν αυτής της ανακάλυψης, πολλές μέθοδοι αναπτύχθηκαν για την στόχευση του δέρματος, άλλες μη επεμβατικές ή σε μικρό βαθμό επεμβατικές, όπως για παράδειγμα απλή εφαρμογή επί αθίκτου δέρματος, ξύσιμο των ανωτέρων στρωμάτων καθώς και άλλοι τρόποι προετοιμασίας του δέρματος (με αλκοόλες, κρέμες, κ.α.) [83, 84, 87, 88, 109-118]. Αυτές οι μέθοδοι διαδερμικής ανοσοποίησης είναι χρονοβόρες, περιλαμβάνουν πολύπλοκες προετοιμασίες για τον εμβολιασμό και απαιτείται σχετικά μεγάλη επιφάνεια του δέρματος. Μετά την εφαρμογή του εμβολίου, τα αντιγόνα μπορεί να αραιωθούν με βιολογικά υγρά, να χαθούν από την ροή του αίματος, να παγιδευτούν σε ιστούς που δεν έχουν την ικανότητα ικανοποιητικής αντιγονοπαρουσίασης, με τελικό αποτέλεσμα την σημαντική απώλεια του χορηγούμενου αντιγόνου. Για την

αντιστάθμιση αυτών των φαινομένων είναι απαραίτητο να χορηγηθεί μεγαλύτερη ποσότητα του εμβολίου. Έτσι, επιτυχημένος μη-επεμβατικός διαδερμικός εμβολιασμός με τοπική εφαρμογή πρωτεϊνών, πεπτιδίων ή DNA έχει πραγματοποιηθεί σε μύες, με την πρόκληση προστατευτικών χυμικών και κυτταρικών ανοσοαποκρίσεων, αλλά συχνά ήταν απαραίτητο να γίνουν αρκετές επαναλήψεις των χορηγήσεων, σε μεγάλες επιφάνειες εφαρμογής και με μεγάλες ποσότητες των αντιγόνων.

Η πλειοψηφία των μελετών στην διαδερμική ή ενδοδερμική ανοσοποίηση έχουν εστιάσει στην πρόκληση χυμικών αποκρίσεων, αλλά ο σημαντικός ρόλος που διαδραματίζουν τα κύτταρα Langerhans και γενικότερα τα δενδριτικά κύτταρα στην αντιγονοπαρουσίαση στους λεμφαδένες έχει σπανίως μελετηθεί. Το ενδιαφέρον έχει εστιαστεί στα πολυμερικά σωματίδια και στα λιποσώματα, τα οποία στοχεύουν περιφερικά δενδριτικά κύτταρα του δέρματος, όπου τα σωματίδια αυτά προσλαμβάνονται και προκαλούν τη μετανάστευση των δενδριτικών κυττάρων στους λεμφαδένες, όπου τελικώς ενεργοποιούνται τα T λεμφοκύτταρα [119]. Σε μελέτη ανοσοποίησης παρατηρήθηκε ανάπτυξη ανοσολογικής προστασίας από κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα έναντι του ιού της γρίπης κατόπιν ανοσοποίησης με DNA εμβόλιο της γρίπης (τρεις φορές επανάληψης της χορήγησης), αλλά πραγματοποιήθηκε κατόπιν απομάκρυνσης της κερατίνης στοιβάδας. Η ταυτόχρονη τοπική εφαρμογή εκφραζόμενου πλασμιδίου GM-CSF (pGM-CSF) ή λιποσωμάτων προκάλεσε ισχυρότερη ανοσοαπόκριση και ενίσχυσε την προστασία έναντι του ιού της γρίπης [87].

Έχει επίσης δειχθεί ότι κατόπιν διαδερμικής ανοσοποίησης με DNA του ιού HIV σε πιθήκους λήφθηκε μια ικανοποιητική ανοσοαπόκριση χρησιμοποιώντας όμως μια παρόμοια τεχνική επεξεργασίας του δέρματος όπως στην περίπτωση του ιού της γρίπης [120, 121]. Η ανοσοποίηση πραγματοποιήθηκε με σωματίδια πολυ-αιθυλαμίνης και μανόζης με διάμετρο 0.1 μm επικαλυμμένα με pDNA. Η επιφάνεια εφαρμογής είχε μέγεθος τουλάχιστον 40 cm^2 του δέρματος των πιθήκων. Εκτιμήθηκε ότι 1% του αριθμού των κυττάρων Langerhans εξέφρασαν το DNA [121]. Για την λήψη ικανοποιητικής όμως ανοσοαπόκρισης ήταν αναγκαία η πολλαπλή επανάληψη της εφαρμογής των ουσιών σε πολλαπλά σημεία του δέρματος.

Ένας βασικός στόχος της διαδερμικής ανοσοποίησης είναι τα δενδριτικά κυττάρα που βρίσκονται στο δέρμα. Για αυτό, ο Kwon και συνεργάτες [107] συνέδεσαν το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι δενδριτικών κυττάρων, το anti-Dec205, σε μικροσωματίδια. Το αποτέλεσμα ήταν η αύξηση της πρόσληψης *in vivo* των σωματιδίων από δενδριτικά κύτταρα περίπου 3 φορές περισσότερο από τα σωματίδια που δεν είχαν το συγκεκριμένο αντίσωμα. Παρόμοια μελέτη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση λιποσωμάτων που έφεραν τα anti-CD11c και anti-Dec205 αντισώματα για την ενίσχυση της ειδικής στόχευσης δενδριτικών κυττάρων και κατ'έκταση της ανοσοαπόκρισης [122,123].

Παράγοντες μεταβολής της διαπερατότητας μεμβρανών όπως η τοξίνη της χολέρας (CT) σε συνδυασμό με υψηλές δόσεις αντιγόνων προκάλεσαν σημαντικές ανοσοαποκρίσεις έναντι των αντιγόνων [82-85]. Μια πολύ σημαντική μελέτη υπήρξε των Glenn και των συνεργατών του, όπου για πρώτη φορά παρουσιάστηκε η δυνατότητα διαδερμικής χορήγησης επί αθίκτου δέρματος πρωτεϊνικών αντιγόνων με την χρήση ανοσοενισχυτικών όπως τοξίνη της χολέρας, θερμο-ευαίσθητη εντεροτοξίνη (heat-labile enterotoxin από *Escherichia coli*) ή άλλα μη τοξικά προϊόντα τους, τα οποία αυξάνουν την διαπερατότητα του δέρματος [82,83,124,125]. Στην αρχική τους μελέτη βρέθηκε ότι η συγχορήγηση της τοξίνης της χολέρας με τις πρωτεΐνες αλβουμίνη, επεξεργασμένη τοξίνη της διφθερίτιδας και του τετάνου, είχε σαν αποτέλεσμα την σημαντικά αυξημένη παραγωγή αντισωμάτων έναντι αυτών των αντιγόνων σε σύγκριση με την χορήγηση των αντιγόνων απουσία της τοξίνης της χολέρας (όπου τα επίπεδα των παραχθέντων αντισωμάτων ήταν μηδαμινά).

1.5 Οβαλβουμίνη

Η οβαλβουμίνη (Ovalbumin, OVA ή Gal d 2) έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές μελέτες ανοσολογικών αντιδράσεων και συστημάτων χορήγησης, όπως τα λιποσώματα και μικροσωματίδια, ενώ θεωρείται μοντέλο αντιγόνο [207, 232]. Αποτελεί μια γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 45kDa. Είναι η βασική πρωτεΐνη στο ασπράδι του αυγού, σε ποσοστό 54% επι του συνόλου των πρωτεϊνών. Αποτελείται από 385 αμινοξέα. Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της OVA είναι ότι ανήκει δομικά στην

υπερ-οικογένεια αναστολέων πρωτεάσης σερίνης, αλλά δεν επιδεικνύει καμία αναστολή πρωτεασών. Εκτός του γεγονότος ότι αποτελεί μια βασική πηγή αμινοξέων, δεν επιδεικνύει κάποια ιδιαίτερη βιολογική ιδιότητα. Η OVA έχει χρησιμοποιηθεί ευραίως ως πρότυπο μοντέλο για δομικές μελέτες πρωτεϊνών, ενώ επίσης έχει χρησιμοποιηθεί σε πειράματα αλλεργιών. Σε μελέτες ανοσοποίησης έχει βρεθεί ότι η OVA προκαλεί παραγωγή αντισωμάτων IgE, IgG (και ειδικά IgG1) και IgM. [233]

Εικόνα 1.14: Δομή μορίου οβαλβουμίνης

1.6 Τοξίνη της χολέρας

Η τοξίνη της χολέρας είναι μια πρωτεϊνική εντεροτοξίνη που προέρχεται από το αρνητικό κατά Gram βακτήριο *vibrio cholerae* και έχει μοριακό βάρος 86 kDa. Αποτελείται από δύο υπομονάδες, την υπομονάδα A (28 kDa) και υπομονάδα B. Η υπομονάδα A αποτελείται από την περιοχή A1 όπου αποτελεί τοξικό κομμάτι και τη περιοχή A2 όπου περιλαμβάνει μια α-έλικα, ενώ η B υπομονάδα αποτελείται από πέντε πανομοιότυπα πολυπεπτίδια (11.6 kDa). Η α-έλικα μπαίνει στον πόρο που δημιουργεί το πενταμερές, δημιουργώντας την τοξίνη της χολέρας, όπου η δομή της είναι πολύ παρόμοια με την θερμο-ευαίσθητη εντεροτοξίνη από το *Escherichia coli*. Η υπομονάδα B έχει σαν σκοπό την σύνδεση του μορίου στα κύτταρα και να υποβοηθά την είσοδο την υπομονάδας A στο εσωτερικό του κυττάρου. Όταν η τοξίνη της χολέρας απελευθερώνεται από τα βακτήρια σε μολυσμένο έντερο, προσδένεται στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα. Τα συμπτώματα των ασθενών είναι έντονη διάρροια, με αποτέλεσμα συμπτώματα έντονης αφυδάτωσης, εμετό, μυικές κράμπες και αδύναμο σφυγμό. Η χολέρα παραμένει σημαντικός κίνδυνος για την δημόσια υγεία στην Αφρική, Ασια και Λατινική Αμερική με 200.000 – 500.000 αναφορές για νέες περιπτώσεις κάθε χρόνο. Μεταφέρεται μέσω μολυσμένου φαγητου και νερού και σε περίπτωση που δεν υπάρξει φαρμακευτική αγωγή, οδηγεί σε οξεία αφυδάτωση και σοκ, με ποσοστά θνησιμότητας 20% - 50% [234,235].

Η τοξίνη της χολέρας έχει παρατηρηθεί ότι διαθέτει ισχυρές βλεννογόνες ανοσοενισχυτικές ιδιότητες για αντιγόνα που συγχορηγούνται μαζί της και αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην πρόκληση διαδερμικών ανοσοαποκρίσεων [82,83,109].

Εικόνα 1.15: Δομή του μορίου της τοξίνης της χολέρας.

1.7 Σκοπός της μελέτης

Το δέρμα αποτελεί ένα ανοσολογικά ενεργό ιστό, αποτελούμενο από διαφόρων τύπων κύτταρα, όπως κερατινοκύτταρα, κύτταρα Langerhans και δενδριτικά. Η διαδερμική ανοσοποίηση είναι μια καινοτόμος στρατηγική για μη επεμβατική ανοσοποίηση που περιλαμβάνει την τοπική εφαρμογή αντιγόνου στην επιφάνεια του δέρματος [82]. Η ανάπτυξη μεθόδων που επιτρέπουν την απλή, μη-επεμβατική χορήγηση εμβολίων μπορεί να βοηθήσει στην υπερνίκηση εμποδίων και δυσκολιών στις προσπάθειες μαζικών εμβολιασμών, όπως η απαίτηση για εξειδικευμένο ιατρικό προσωπικό, οι κίνδυνοι από την χρήση μολυσμένων ενέσεων και οι δυσκολίες που αφορούν την μεταφορά και αποθήκευση των εμβολίων. Για αποδοτική διαδερμική

ανοσοποίηση φαίνεται να είναι απαραίτητη η συγχορήγηση ενός ανοσοενισχυτικού, όπως η τοξίνη της χολέρας ή η θερμο-ευαίσθητη εντεροτοξίνη [82,203], καθώς βοηθούν στην αύξηση της παραγωγής αντισωμάτων και στην ενίσχυση των κυτταρικών αποκρίσεων [204,205]. Επίσης ο τύπος του ανοσοενισχυτικού μπορεί να ρυθμίσει τον τύπο της ανοσοαπόκρισης [206].

Τα πρόσφατα χρόνια, PLA και PLGA μικροσωματίδια έχουν μελετηθεί εκτενώς για την χορήγηση αντιγόνων, κυρίως υποδορίως. In vivo χορήγηση των αντιγόνων εγκλεισμένων σε PLGA μικροσωματίδια οδήγησε σε ισχυρή χυμική και κυτταρική ανοσοαπόκριση [207-211], που δικαιολογείται από την παρατεταμένη αποδέσμευση του αντιγόνου από τα μικροσωματίδια, από τον τρόπο παρουσίασης του αντιγόνου με την πρόσληψη των μικροσωματιδίων από τα μακροφάγα οπότε και την πρόσληψη μεγαλύτερης ποσότητας του αντιγόνου και από την προφύλαξη του αντιγόνου από αποικοδόμηση του στο ορό του αίματος. Με βάση in vitro πειράματα, τα νανοσωματίδια έχουν βρεθεί να είναι ικανά να εισχωρούν σε δέρμα χοίρων [212,213]. Η οδός διείσδυσης των νανοσωματιδίων μέσα στο δέρμα φαίνεται να είναι οι θύλακες των τριχών [202]. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα σωματίδια προσλαμβάνονται από τα επιδερμικά κύτταρα Langerhans.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω δεδομένα, αποφασίστηκε να μελετηθεί σε αυτή την εργασία η διαδερμική χορήγηση σε πειραματόζωα ενός προτύπου αντιγόνου εγκλεισμένου σε PLA νανοσωματίδια και η αξιολόγηση της ανοσοαπόκρισης που λαμβάνεται σε σύγκριση με την ανοσοαπόκριση που λαμβάνεται με εφαρμογή του ίδιου αντιγόνου υπό μορφή υδατικού διαλύματος. Ως πρότυπο αντιγόνο χρησιμοποιήθηκε η οβαλβουμίνη.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Υλικά

Όλες οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τουλάχιστον αναλυτικού βαθμού καθαρότητας ενώ χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο και απεσταγμένο νερό σε όλες τις διαδικασίες.

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Applichem)
- KCl (Merck)
- KH_2PO_4 (Merck)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Applichem)
- NaCl (Fluka)
- NaOH (Fluka)
- Αιθανόλη (Sigma)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (Merck)
- Γενταμυκίνη (Biochrom AG)
- HCl (Biochrom AG)
- RPMI 1640 (Biochrom AG)
- FCS (Biochrom AG)
- Φορμαλδεΰδη (Merck)
- BSA (Sigma)
- BCA (Sigma)
- Χολικό νάτριο (Sigma)
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- Trehalose (Sigma)
- Οβαλβουμίνη (Sigma)
- Αλβουμίνη (Sigma)
- TMB (Promega)
- H_2O_2 (Promega)
- Albumin με FITC (Sigma)
- Dextran-rhodamine B isothiocyanate (Sigma)
- 1-pyrene-butanol (Sigma)
- Tween 20 (Sigma)

- Sodium tartate.2H₂O (Sigma)
- Τοξίνη της χολέρας (Sigma)
- Trypan Blue (Sigma)
- Κονκαναβαλίνη A (Sigma)
- ³H θυμιδίνη (GE Healthcare)
- MTT (Appllichem)
- Αιματοξυλίνη (Papanicolaou Losung)
- Ιοζίνη (Sigma)
- H₂SO₄ (Fluka)
- Πεταλούδες G 21 (Venynsystem, Butterfly)
- Υγρό σπινθηρισμού (MP)
- Elisa kit για mIFN γ από Diaclone
- Elisa kit για IL-2 (Diaclone)
- Elisa kit για IL-4 (Diaclone)
- Elisa kit για IL-10 (Diaclone)
- IgG, IgG1, IgG2a (AbD Serotec)

Τα πλαστικά σωληνάρια μιας χρήσης 15ml, 50ml, τα τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας, οι πλάκες μικροκαλλιιεργιών 96 φρεατίων με κοίλο ή επίπεδο πυθμένα και οι πλάκες 24 και 6 φρεατίων και τα σωληνάρια τύπου erpendorf είναι εταιρίας CORNING COSTAR.

2.2 Όργανα

- Περιστροφικός εξατμιστής (Rotary evaporator Buchi R-114)
- Υδατόλουτρο (Bioline ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας με εσωτερική κυκλοφορία και ανακίνηση)
- Φυγόκεντρος (Heraeus seratech biofuge 28RS)
- Φυγόκεντρος (Heraeus Labofuge 200)
- Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ορατού (UV-VIS) (Shimadzu UV-1205)
- Φασματοφωτόμετρο πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Bruker AC 250)
- Συσκευή μέτρησης μεγέθους σωματιδίων Nano ZS (Malvern instruments)

- Συσκευή μέτρησης δυναμικού νανοσωματιδίων: Nano ZS (Malvern instruments)
- Συσκευή λυοφιλοποίησης (Freeze dryer 4.5 Labconco)
- Ακίδα υπερήχων (Ultrasonic Processor)
- Λουτρό υπερήχων (Tuttnauer)
- Χρωματογραφία διαπέρασης γέλης αποτελούμενο από: αντλία υψηλής πίεσεως της Waters (Waters, 600E Controller), στήλες Styragel HR1, HR3 και HR4 (7,8x300mm Column), ανιχνευτή δείκτη διάθλασης Waters 484 ανιχνευτή απορρόφησης, και σύστημα ανάλυσης: Millennium 2010 Waters Chromatography manager
- Πεχάμετρο (Consort c535)
- Μηχανικός αναδευτήρας (vortex) (Labconco L 46)
- Ζυγός ακρίβειας (Mettler AE 166)
- Μαγνητικός αναδευτήρας (Hot plate stirrer SB 162-3, Stuart)
- Ελαιόλουτρο
- Αιματοκυτταρόμετρο (Neubauer improved)
- Ανάστροφο μικροσκόπιο (Axiovert 40 CFL Zeiss)
- Αυτόκαυστο
- Θάλαμος κάθετης γραμμικής νηματικής ροής (Microflow)
- Κλίβανος παρουσία 5% CO₂ και υγρασίας (ThermoForma)
- Μετρητής β ραδιενέργειας (Wallac 1410 liquid scintillation counter)
- Μετρητής οπτικής απορρόφησης πλακιδίων μικροτιτλοδότησης (Elisa-plate reader Multiskan EX)
- Οπτικό μικροσκόπιο (Leica DMLB)
- Φούρνος
- Κρυοτόμος (Leica CM 1500)
- Συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης (Leica TCS SP5, Leica DMI 6000B)
- Φθορίζον μικροσκόπιο (Zeiss)
- Ηλεκτρική κουρευτική μηχανή (Panasonic ER 140H)

2.3 Αντιδραστήρια

2.3.1 Ρυθμιστικά διαλύματα

Ισοτονικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-χλωριούχων (PBS) 0,01M pH 7,4

KH ₂ PO ₄	0.204g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1.424g
KCl	0.201g
NaCl	8.766g

Τα παραπάνω συστατικά διαλύονται σε 1L dH₂O και το pH ρυθμίζεται στο 7.4.

Ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών 0,05M pH 9,6

Na ₂ CO ₃	1.59g
NaHCO ₃	2.93g

Τα παραπάνω συστατικά διαλύονται σε 1L dH₂O και το pH ρυθμίζεται στο 9.6.

2.3.2 Αντιδραστήρια ανοσοαναλύσεων

Διάλυμα έκπλυσης

0.05% v/v Tween 20 σε PBS pH 7.4.

Διάλυμα κορεσμού

Διάλυμα έκπλυσης που περιέχει 2% w/v BSA.

Διάλυμα αραίωσης

0.2% w/v BSA σε διάλυμα έκπλυσης.

Διάλυμα επικάλυψης των μικροφρεατίων

Είναι διάλυμα Οβαλβουμίνης 5μg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών pH 9.6.

Διάλυμα πρώτων αντισωμάτων

Το διάλυμα πρώτων αντισωμάτων παρασκευάζεται με αραίωση των αντιορών σε διάλυμα αραίωσης πριν από την χρήση.

Διαλύματα δευτέρων αντισωμάτων

- Διάλυμα ανοσοσφαιρινών αίγας έναντι IgG ανοσοσφαιρινών μυός συζευγμένων με HRP σε αραίωση 1:3000 στο διάλυμα αραίωσης.
- Διάλυμα ανοσοσφαιρινών αρουραίου έναντι IgG1 ανοσοσφαιρινών μυός συζευγμένων με HRP σε αραίωση 1:5000 στο διάλυμα αραίωσης.
- Διάλυμα ανοσοσφαιρινών αρουραίου έναντι IgG2a ανοσοσφαιρινών μυός συζευγμένων με HRP σε αραίωση 1:2000 στο διάλυμα αραίωσης.

2.3.3 Διαλύματα μέτρησης πρωτεϊνών από τα νανοσωματίδια

Διαλύματα δικιγχονικού οξέος (BCA)

Διάλυμα Α

- BCA 1 g
- Na₂CO₃ 0.855 g
- NaOH 0.2256 g
- NaHCO₃ 0.475 g
- Na₂-tartrate 0.0948 g
- 100ml dH₂O

Αφού παρασκευαστεί το διάλυμα, διηθείται μέσω Millipore 0.45 μm. Το pH ρυθμίζεται στο 11.25.

Διάλυμα Β

- CuSO₄.5H₂O 4g
- 100ml H₂O

Αφού παρασκευαστεί το διάλυμα, διηθείται μέσω Millipore 0.45 μm.

Αντιδραστήριο εργασίας

- 50ml διαλύματος Α
- 1ml διαλύματος Β

Σταθερό για μία εβδομάδα.

2.3.4 Διαλύματα για τις καλλιέργειες των κυττάρων

Πλήρες διάλυμα RPMI

- RPMI 1640 with stable glutamine
- 10% FCS
- Γενταμυκίνη 100μg/ml
- 50μM 2-μερκαπτοαιθανόλη

Διαλύματα για τον πολλαπλασιασμό των σπληνοκυττάρων και την μέτρηση κυτταροκινών

- 100μg/ml Οβαλβουμίνη σε πλήρες διάλυμα RPMI 1640 (για την παραγωγή και μέτρηση κυτταροκινών)
- 50μg/ml και 10μg/ml Οβαλβουμίνη σε πλήρες διάλυμα RPMI 1640 (για τον πολλαπλασιασμό των σπληνοκυττάρων)
- 5μg/ml ConA σε πλήρες διάλυμα RPMI (για την παραγωγή και μέτρηση κυτταροκινών και τον πολλαπλασιασμό των σπληνοκυττάρων – Θετικός μάρτυρας)

Διάλυμα ραδιενεργού θυμιδίνης

- 1mCi/ml

Αραίωση 40μl διαλύματος ^3H θυμιδίνης σε τελικό όγκο 1ml πλήρους διαλύματος RPMI. Τελική συγκέντρωση 40μCi/ml.

Διάλυμα MTT (10X)

- 5mg/ml σε αποστειρωμένο PBS

2.3.5 Διαλύματα για την επεξεργασία ιστών

Διάλυμα φορμόλης

NaHPO₄.2H₂O 18.6g

NaH₂PO₄.2H₂O 21.06g

100ml φορμαλδεΰδη

Αραίωση στο 1lt με αποσταγμένο νερό

Διαλύματα αφυδάτωσης και παραφινποίησης ιστού

Διάλυμα αιθανόλης σε νερό 75%

Διάλυμα αιθανόλης σε νερό 96%

Καθαρή αιθανόλη

Ξυλόλη

Ξυλόλη σε θερμοκρασία 80°C

Μίγμα ξυλόλη παραφίνης (1:1) σε θερμοκρασία 80°C

Παραφίνη σε θερμοκρασία 80°C

Διαλύματα αποπαραφινποίησης και ενυδάτωσης ιστών

Ξυλόλη σε θερμοκρασία 80°C

Ξυλόλη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

Καθαρή αιθανόλη

Διάλυμα αιθανόλης σε νερό 96%

Διάλυμα αιθανόλης σε νερό 80%

Διάλυμα αιθανόλης σε νερό 50%

Διαλύματα για την χρώση των ιστών

Διάλυμα Αιματοξυλίνης (Ετοιμο προς χρήση κατόπιν διήθησης)

Διάλυμα Ιοζίνης 1% w/v

Διάλυμα που περιέχει 0.25 ml π.HCl σε 100ml 70% αιθανόλη

Διάλυμα Mowiol 4-88

- Προσθήκη 2.4g Mowiol 4-88 σε 6g γλυκερόλης και ανάμειξη

- Προσθήκη 6ml αποσταγμένου νερού και ανάδευση για 5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη ρυθμιστικού 0,2M Tris (pH 8.5) και θέρμανση στους 50 °C για 10 λεπτά με ήπια ανάδευση
- Φυγοκέντρωση στα 5000g για 15 λεπτά
- Φύλαξη στους -20°C

2.4 Μέθοδοι

2.4.1 Παρασκευή και χαρακτηρισμός πολυμερών

Ανακρυστάλλωση μονομερούς dl-lactide

Σε 20 ml ξηρού οξικού αιθυλεστέρα διαλύονται 15g μονομερούς dl-lactide. Το μίγμα θερμαίνεται και αναδεύεται μέχρι πλήρους διάλυσης του μονομερούς. Στην συνέχεια όσο το διάλυμα είναι ακόμα θερμό, διηθείται με χαρτί διήθησης και συλλέγεται το διήθημα. Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Καθώς το διάλυμα είναι υπέρκορο σε θερμοκρασία δωματίου, αρχίζουν να δημιουργούνται αργά κρύσταλλοι του μονομερούς. Κατόπιν το μίγμα διηθείται εκ νέου με χαρτί διήθησης και συλλέγονται οι κρύσταλλοι που παραμένουν στο χαρτί, οι οποίοι τοποθετούνται υπό κενό για την ξήρανση τους.

Σύνθεση και χαρακτηρισμός PLA

Για την παρασκευή του πολύ-(γαλακτικού οξέος) (PLA) από dl-lactide χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του πολυμερισμού τήγματος υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Συγκεκριμένα, 5g ανακρυσταλλωμένου dl-lactide τοποθετήθηκαν στο εσωτερικό τρίλαιμης σφαιρικής φιάλης. Η υάλινη φιάλη τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο θερμοκρασίας 130°C για την τήξη των στερεών. Κατόπιν προστίθεται ο καταλύτης οκτανοϊκός κασσίτερος σε ποσότητα 0.05% w/w υπό μορφή διαλύματος σε κανονικό επτάνιο. Το σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση, θέρμανση και υπό ατμόσφαιρα αζώτου για τρεις ώρες. Στην συνέχεια αφαιρείται η θέρμανση και η ροή αζώτου και όσο είναι ακόμα τήγμα προστίθενται 30ml διχλωρομεθανίου μέχρι την πλήρη διάλυση του στερεού. Για τον καθαρισμό του πολυμερούς πραγματοποιείται κατακρήμνιση του πολυμερούς με προσθήκη στάγδην του διαλύματός του σε 10-πλάσια ποσότητα ψυχρού διαιθυλαιθέρα (4°C). Το στερεό υπόλειμμα συλλέγεται και τοποθετείται υπό κενό.

Για τον έλεγχο της καθαρότητας του πολυμερούς πραγματοποιείται μαγνητικός πυρηνικός συντονισμός πρωτονίων ($^1\text{H-NMR}$) με διάλυση του ξηραθέντος πολυμερούς σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.

Για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους του πολυμερούς χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία διαπερατότητας πηκτής (GPC) αποτελούμενη από: αντλία υψηλής πίεσεως της Waters (Waters, 600E Controller), στήλες Styragel HR1, HR3 και HR4 (7,8x300mm Column), ανιχνευτή δείκτη διάθλασης Waters 484 και σύστημα ανάλυσης Millennium 2010 Waters. Δημιουργήθηκε πρότυπη καμπύλη του μοριακού βάρους σε συνάρτηση με τον χρόνο έκλουσης με την βοήθεια πρότυπων πολυμερών πολυστυρενίου γνωστών μοριακών βαρών (Εικόνα 2.1). Τα μοριακά βάρη (M_w) των πρότυπων πολυμερών που χρησιμοποιήθηκαν με τους αντίστοιχους χρόνους έκλουσης είναι τα εξής:

Χρόνος (λεπτά)	M_w
18.517	109000
20.2	42900
21.733	18300
23.3	9440
24.05	6610

Ποσότητα πολυμερούς PLA ($\approx 15\text{mg}$) διαλύεται σε τετραυδροφουράνιο (1ml, παρόμοια συγκέντρωση με τα πρότυπα πολυμερή) και εισάγεται στον χρωματογράφο.

Εικόνα 2.1: Πρότυπη καμπύλη του λογάριθμου των μοριακών βαρών ως προς τον χρόνο έκλυσης

Σύνθεση και χαρακτηρισμός PLA-pyrene-butanol συμπολυμερούς

Για την παρασκευή του συμπολυμερούς PLA-pyrene-butanol χρησιμοποιήθηκαν μονομερή dl-lactide και πυρενοβουτανόλη-1. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι ο πολυμερισμός σε διάλυμα τολουολίου υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Συγκεκριμένα, 10 g ανακρυσταλλωμένου dl-lactide και 0.328g πυρεν-βουτανόλης-1 μαζί με 30 ml άνυδρου τολουολίου εισάγονται σε τρίλαιμη φιάλη, στην οποία έχει συνδεθεί ψυκτήρας. Η υάλινη φιάλη τοποθετείται σε ελαιόλουτρο θερμοκρασίας 120°C μέχρι την πλήρη διάλυση των στερεών. Κατόπιν προστίθεται ο καταλύτης, οκτανοϊκός κασσίτερος σε ποσότητα 0.01% w/w. Το σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση, θέρμανση και ατμόσφαιρα αζώτου για τρεις ώρες. Στην συνέχεια αφαιρείται ο ψυκτήρας και αφήνεται να εξατμισθεί το τολουόλιο. Έπειτα αφαιρείται η θέρμανση και η ροή του αζώτου και όσο είναι ακόμα τήγμα προστίθενται 30 ml διχλωρομεθανίου μέχρι την πλήρη διάλυση του στερεού. Το προϊόν καθαρίζεται όπως περιγράφηκε προηγουμένως για το PLA. Το στερεό υπόλειμμα συλλέγεται και αποθηκεύεται σε ξηραντήρα υπό κενό.

Για τον χαρακτηρισμό του πολυμερούς πραγματοποιείται μαγνητικός πυρηνικός συντονισμός πρωτονίων ($^1\text{H-NMR}$) με διάλυση του ξηρού πολυμερούς σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.

2.4.2 Παρασκευή και χαρακτηρισμός νανοσφαιρών PLA

Για την παρασκευή των νανοσφαιρών PLA με ενκαψακιωμένη Οβαλβουμίνη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του διπλού γαλακτώματος. Το διπλό γαλάκτωμα που παρασκευάζεται αποτελείται από: α) οργανική φάση, β) εσωτερική υδατική φάση (Y1), γ) εξωτερική υδατική φάση (Y2). Για την παρασκευή της οργανικής φάσης, 50 mg πολυμερούς PLA διαλύονται σε 2 ml CH_2Cl_2 , ενώ η εσωτερική υδατική φάση (Y1) αποτελείται από 400 μl υδατικού διαλύματος Οβαλβουμίνης (10mg). Για την παρασκευή της εξωτερικής υδατικής φάσης (Y2), 36.5 mg άλατος χολικού νατρίου διαλύονται σε 6 ml απεσταγμένο νερό (dH_2O) και προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 12 mM. Η παρασκευή του πρώτου γαλακτώματος γίνεται με την προσθήκη της εσωτερικής υδατικής φάσης (Y1) στην οργανική και εφαρμογή υπερήχων (probe sonication) για 1min στα 12 W. Εν συνεχεία το πρώτο γαλάκτωμα προστίθεται στην εξωτερική υδατική φάση και επαναλαμβάνεται η εφαρμογή υπερήχων για 2min στα 15 W. Το παρασκεύασμα αφήνεται υπό ήπια ανάδευση σε απαγωγό μέχρι πλήρους εξατμίσεως του οργανικού διαλύτη (περίπου 4 ώρες). Για τον καθαρισμό των νανοσφαιρών το εναιώρημα που προκύπτει μετά την εξάτμιση του διαλύτη (όγκος αιωρήματος ≈ 6.4 ml) κατανέμεται ισομερώς σε 2 πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρωσης και φυγοκεντρείται στις 10.000 rpm για 0.5 h στους 22°C . Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης απομακρύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό, το οποίο περιέχει μη εγκλωβισμένη στις νανοσφαίρες Οβαλβουμίνη και ελεύθερο χολικό νάτριο. Ακολουθεί στη συνέχεια η ανασύσταση των νανοσφαιρών σε 3 ml dH_2O ανά σωλήνα και vortexing. Το τελικό αιώρημα νανοσφαιρών, συνολικού όγκου 6 ml, συλλέγεται και διηθείται από φίλτρο 1.2 μ για απομάκρυνση τυχόν συσσωματωμάτων (Millex AP, Millipore).

Παρασκευάστηκαν επίσης νανοσφαίρες οβαλβουμίνης με την μέθοδο του διπλού γαλακτώματος, με την διαφορά ότι η οργανική φάση αποτελούταν από 50 mg πολυμερούς διαλυμένο σε 2 ml οξικού αιθυλεστέρα (ethyl acetate) αντί του CH_2Cl_2 ,

για την μελέτη διατήρησης της αντιγονικότητας της οβαλβουμίνης κατόπιν της ενκαψακίωσης της. Επίσης παρασκευάστηκαν κενές (χωρίς οβαλβουμίνη) νανοσφαίρες με την μέθοδο του μονού γαλακτώματος. Επαναλαμβάνεται η ίδια διεργασία που περιγράφηκε προηγουμένως για το διπλό γαλάκτωμα, με την διαφορά ότι δεν προστίθεται εσωτερική υδατική φάση.

Τα αιωρήματα των νανοσφαιρών λυοφιλοποιήθηκαν με προσθήκη λυοπροστατευτικής τριαλόζης, σε αναλογία μάζας 2:1 τριαλόζη:νανοσφαίρες, και με ταχεία κατάψυξη του δείγματος με βοήθεια υγρού αζώτου.

Το μέσο μέγεθος των νανοσφαιρών προσδιορίστηκε με την τεχνική σκεδασμού φωτός, χρησιμοποιώντας τη συσκευή Malvern Nano ZS. Συγκεκριμένα μικρή ποσότητα νανοσφαιρών ($\approx 50\mu\text{l}$) αραιώνεται σε ορισμένο όγκο dH₂O ($\approx 1\text{ml}$). Οι νανοσφαίρες μετρούνται αμέσως χωρίς περαιτέρω επεξεργασία και προσδιορίζονται οι μέσοι διάμετροι και οι κατανομές μεγέθους. Στις ρυθμίσεις του οργάνου, ως δείκτης διάθλασης (Refractive index R.I) λαμβάνεται ο δείκτης διάθλασης του νερού R.I = 1.330 και του υλικού της κυψελίδας το πολυστυρένιο με R.I. = 1.590. Το μέγεθος κάθε παρτίδας νανοσωματιδίων προσδιορίστηκε 10 φορές και λήφθηκε η μέση τιμή, ενώ δίνεται και σαν αποτέλεσμα ο δείκτης πολυδιασποράς, το εύρος δηλαδή των τιμών.

Για την μέτρηση του ζ-δυναμικού των νανοσωματιδίων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική μικροηλεκτροφόρησης στην ίδια συσκευή. Οι μετρήσεις έγιναν με τη χρησιμοποίηση μικρού όγκου δείγματος νανοσωματιδίων που αραιώνεται με νερό, όπως προηγουμένως. Για κάθε παρτίδα νανοσωματιδίων έγιναν δέκα μετρήσεις και λήφθηκε η μέση τιμή.

Πραγματοποιήθηκε επίσης παρατήρηση και φωτογράφιση των PLA νανοσφαιρών με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM). Δείγμα των νανοσφαιρών αραιωμένο κατά 1000 φορές αφέθηκε να ξηραθεί σε μεταλλικό κυλινδρικό δειγματοφορέα. Το δείγμα επικαλύφτηκε με χρυσό στα 5mA για 15 λεπτά χρησιμοποιώντας JFC Ion Sputter (JOEL 1100) και στην συνέχεια μεταφέρθηκε στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (JOEL JSM-6300) για παρατήρηση και φωτογράφιση.

Δείγματα νανοσφαιρών οβαλβουμίνης παρατηρήθηκαν επίσης με μικροσκόπιο ατομικών δυνάμεων (AFM) σε θερμοκρασία δωματίου σε περιβάλλον αέρα. Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Dimension 3000 και η συσκευή Multimode Equipment, όπου και οι δύο χειρίζοντουσαν από ελεκτή? Nanoscope IIIa των Digital Instruments (Santa Barbara, CA, USA). Μια σταγόνα (5 μ L) δείγματος λυοφιλοποιημένων και ανασυσταμένων σε νερό νανοσφαιρών τοποθετήθηκε σε επιφάνεια μίκας, απλώθηκε και ξηράθηκε μερικώς με ροή αέριου αργού. Οι εικόνες λήφθηκαν με την μέθοδο κάλυψης από νανοαισθητήρες με βραχίονα μήκους 228 μ m, συχνότητες συντονισμού 75-98 kHz και σταθερά ελατηρίων της τάξης των 29-61 N/m. Ο ρυθμός σάρωσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1 Hz.

Προσδιορισμός απόδοσης νανοσφαιρών και φόρτωσης τους σε οβαλβουμίνη

Για τον προσδιορισμό της απόδοσης των νανοσφαιρών σε κάθε παρασκευή, λαμβάνεται ποσότητα 1ml από κάθε παρτίδα και λυοφιλοποιείται, χωρίς την προσθήκη λυοπροστατευτικού. Η ποσότητα του ιζήματος που παραμένει δίνει την ποσότητα των νανοσφαιρών σε mg ανά ml. Στην συνέχεια μετράται η ποσότητα της πρωτεΐνης σε mg ανά ml (βλ. παρακάτω). Γνωρίζοντας τον συνολικό αρχικό όγκο της παρασκευής γίνονται οι υπολογισμοί επί του συνόλου και υπολογίζεται η απόδοση των νανοσφαιρών και η φόρτωσή τους σε οβαλβουμίνη σύμφωνα με τις εξισώσεις:

$$\text{Απόδοση νανοσφαιρών \%} = \frac{\text{Συνολικό Βάρος νανοσφαιρών}}{\text{Αρχική Ποσότητα Πρωτεΐνης και Πολυμερούς}} * 100\%$$

$$\text{Φόρτωση νανοσφαιρών \%} = \frac{\text{Ποσότητα Ενκαψακίωσης Πρωτεΐνης}}{\text{Συνολικού βάρους νανοσφαιρών}} * 100\%$$

Μέτρηση της ποσότητας οβαλβουμίνης που περιέχεται στις νανοσφαίρες με την μέθοδο του δικιγχνικού οξέως (BCA)

Πραγματοποιείται λυοφιλοποίηση 1ml παρασκευάσματος νανοσφαιρών χωρίς την προσθήκη λυοπροστατευτικού. Κατόπιν γίνεται προσθήκη 1ml 0.2N NaOH και το αιώρημα αφήνεται σε υδατόλουτρο 37°C για 24 ώρες μέχρι την πλήρη διάλυση. Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 50 µl δείγματος και 950 µl αντιδραστηρίου εργασίας BCA. Ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά στους 37 °C σε υδατόλουτρο. Το δείγμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά και στην συνέχεια πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 562 nm.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των δειγμάτων σε οβαλβουμίνη, παρασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη με μη ενκαψακωμένη οβαλβουμίνη σε καυστικό νάτριο 0.2N (Εικόνα 2.2).

Εικόνα 2.2: Πρότυπη καμπύλη BCA του αντιγόνου Οβαλβουμίνη σε διαλύτη NaOH 0.2N

Είναι απαραίτητο να επισημανθεί ότι η μέθοδος ανίχνευσης πρωτεϊνών BCA έχει λίγες παρεμβολές από άλλες ενώσεις. Παρόλα αυτά ελέγχθησαν όλα τα συστατικά από τα οποία απαρτίζονται οι νανοσφαίρες ξεχωριστά για να επιβεβαιωθεί ότι δεν

υπάρχουν παρεμβολές. Οι απορροφήσεις που μετρήθηκαν ήταν ουσιαστικά μηδενικές, επιβεβαιώνοντας ότι με την μέθοδο μετράται μονάχα το αντιγόνο.

2.4.3 Παρασκευή PLA-φθοριζόντων νανοσφαιρών για την μελέτη διείσδυσης τους στο δέρμα

Για την μελέτη διείσδυσης των νανοσφαιρών χρησιμοποιήθηκαν τρεις τύποι φθοριζόντων νανοσφαιρών.

Στην πρώτη περίπτωση παρασκευάστηκαν φθορίζοντες νανοσφαίρες με την μέθοδο του μονού γαλακτώματος όπου 30 mg PLA και 20 mg φθορίζοντος πολυμερούς PLA-pyrene-butanol διαλύονται σε 2 ml CH_2Cl_2 . Το διάλυμα μεταφέρεται σε 6ml διαλύματος χολικού νατρίου (12 mM) και πραγματοποιείται υπερήχηση με ακίδα για 2 λεπτά στα 15W. Στην συνέχεια ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο.

Στην δεύτερη περίπτωση παρασκευάστηκαν φθορίζοντες νανοσφαίρες που περιέχουν δύο φθορίζουσες ουσίες με την μέθοδο του διπλού γαλακτώματος. Συγκεκριμένα, 10 mg Dextran-rhodamine B isothiocyanate διαλύονται σε 400 μl νερό (εσωτερική υδατική φάση). Στην οργανική φάση διαλύονται 30 mg PLA και 20 mg φθορίζοντος πολυμερούς PLA-pyrene-butanol σε 2 ml CH_2Cl_2 . Η εσωτερική υδατική φάση αναμιγνύεται με την οργανική και πραγματοποιείται υπερήχηση με ακίδα για 1 λεπτό στα 12 W. Το παραγόμενο γαλάκτωμα μεταφέρεται σε 6 ml νερό που περιέχει χολικό νάτριο (12 mM) και πραγματοποιείται υπερήχηση με ακίδα για 2 λεπτά στα 15 W. Στην συνέχεια ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο.

Στην τρίτη περίπτωση παρασκευάστηκαν φθορίζοντες νανοσφαίρες με ενκαψακισμένη Albumin-FITC με την μέθοδο του διπλού γαλακτώματος. Συγκεκριμένα 4 mg χημικά συνδεδεμένης αλβουμίνης με FITC διαλύονται σε 400 μl νερό (εσωτερική υδατική φάση). Στην οργανική φάση διαλύονται 50 mg PLA σε 2 ml CH_2Cl_2 . Η εσωτερική υδατική φάση αναμιγνύεται με την οργανική και πραγματοποιείται υπερήχηση με ακίδα για 1 λεπτό. Το παραγόμενο γαλάκτωμα

μεταφέρεται σε 6 ml νερό που περιέχει χολικό νάτριο (12 mM) και πραγματοποιείται υπερήχηση με ακίδα για 2 λεπτά. Στην συνέχεια ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο.

2.4.2 Έλεγχος διατήρησης της αντιγονικότητας της οβαλβουμίνης μετά την ενκαψακίωσή της στις PLA νανοσφαίρες

Για τον έλεγχο της διατήρησης της αντιγονικής δράσης του εγκλωβισμένου αντιγόνου κατόπιν ενκαψακίωσης της στις νανοσφαίρες αναπτύχθηκε εξειδικευμένη ανοσοανάλυση ως εξής:

Ποσότητα νανοσφαιρών με ενκαψακιωμένη οβαλβουμίνη αφήνεται σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37 °C για 15 μέρες για αποδέσμευση του αντιγόνου. Το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 15000 στροφές για 1 ώρα και συλλέγεται το υπερκείμενο. Μετράται η ποσότητα της αποδεσμευμένης οβαλβουμίνης με την μέθοδο του BCA. Οι συνθήκες που μελετήθηκαν αναγράφονται στον Πίνακα 2.1. Όλες οι παρασκευές έγιναν εις διπλούν.

Πίνακας 2.1: Συνθήκες παρασκευής νανοσφαιρών

Νούμερο παρτίδας	PLA	Οργανική φάση (2ml)	Ποσότητα αντιγόνου στην εσωτερική φάση	Λυοφιλοποίηση
1	50mg	Et.ac.	10mg	OXI
2	50mg	dcm:et.ac (1:1)	10mg	OXI
3	50mg	dcm	10mg	OXI
4	50mg	dcm	10mg	NAI

Et.ac.= οξικός αιθυλεστέρας, dcm= διχλωρομεθάνιο

Γνωρίζοντας τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων, μικροπλάκες ELISA επικαλύφθηκαν με τα δείγματα της αποδεσμευμένης Οβαλβουμίνης, με αραίωση της με ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών pH 9.6 σε συγκέντρωση 5 µg/ml (100 µl/μικροφρέατιο, επώαση για 18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου). Σε διαφορετικά

μικροφρεάτια της πλάκας, πραγματοποιήθηκε επικάλυψη Οβαλβουμίνης (μη ενκαψακιωμένης) με τον ίδιο τρόπο. Ακολούθησε απόχυση των διαλυμάτων και έκπλυση των μικροφρεατίων με διάλυμα PBS (250 μl/μικροφρεάτιο). Στην συνέχεια έγινε κορεσμός των μικροφρεατίων με διάλυμα BSA 2% β/ο σε PBS που περιέχει 0.05% ο/ο Tween-20 (200 μl/μικροφρεάτιο, επώαση για 1 ώρα στους 37 °C). Το διάλυμα κορεσμού αποχύθηκε και το πλακίδιο εκπλύθηκε τρεις φορές με διάλυμα έκπλυσης όπως παραπάνω. Κατόπιν, έγινε πλήρωση των μικροφρεατίων με 100 μl αντιορού υπερανοσοποιημένων ζώων (BALB/c μυών) έναντι της Οβαλβουμίνης και πραγματοποιείται επώαση για 18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί έκπλυση της πλάκας τρεις φορές και προσθήκη 100 μl ανά μικροφρεάτιο ενζυματικώς επισημασμένης αντι-ανοσοσφαιρίνης μύος (IgG) σε αραιώση 1:3000 (επώαση για 2 ώρες στους 37°C). Πραγματοποιείται απόχυση και έκπλυση της πλάκας. Στην συνέχεια προστίθεται διάλυμα χρωμογόνου ενζυμικού υποστρώματος TMB (100μl/μικροφρεάτιο, επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου). Η αντίδραση τερματίζεται (χωρίς απόχυση) με προσθήκη 100μl H₂SO₄ 1M. Η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε στα 450nm με μετρητή Multiskan EX. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σαν ποσοστό διατήρησης της αντιγονικότητας με σύγκριση της απορρόφησης των δειγμάτων της ενκαψακιωμένης οβαλβουμίνης προς την απορρόφηση της ελεύθερης (φυσικής) οβαλβουμίνης.

2.4.3 Υπερανοσοποίηση και αιμοληψία από μύες

Τρεις θηλυκοί μύες BALB/c ανοσοποιήθηκαν υποδόρια σε δύο σημεία εκατέρωθεν στην βάση της ράχης του με 200 μg υδατικού διαλύματος Οβαλβουμίνης γαλακτωματοποιημένα με πλήρες ανοσοενισχυτικό Freud (CFA) (όγκος δείγματος 100μl ανά μυ). Κατόπιν διέλευσης δύο και τεσσάρων εβδομάδων από την αρχική χορήγηση, πραγματοποιείται χορήγηση ίσης ποσότητας αντιγόνου γαλακτωματοποιημένου σε Freud's incomplete ανοσοενισχυτικό (IFA). Την πέμπτη εβδομάδα από την αρχική χορήγηση πραγματοποιείται θανάτωση των υπερανοσοποιημένων μυών με εξάρθρωση του αυχένα και λήψη δειγμάτων αίματος από την καρδιά. Τα δείγματα του αίματος αφέθηκαν στην συντήρηση ψυγείου (≈4°C) για 18 ώρες. Στην συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 2000 rpm για 10 λεπτά και

συλλέχτηκε το υπερκείμενο. Ο αντιορός φυλάχθηκε στην συντήρηση ψυγείου στην περίπτωση άμεσης χρήσης ή στην κατάψυξη (-20°C) για μακροπρόθεσμη χρήση.

2.4.4 In vivo μελέτη της δυνατότητας διείσδυσης των νανοσφαιρών στο δέρμα μυών

Για την μελέτη της δυνατότητας διείσδυσης των νανοσφαιρών στο δέρμα μυών in vivo χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι ανίχνευσης τους, φθορίζον μικρόσκοπιο και συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης. Για την μελέτη χρησιμοποιήθηκαν φθορίζουσες PLA νανοσφαίρες.

Αρχικά πραγματοποιείται αναισθητοποίηση των μυών με υποδόρια ένεση διαλύματος ξυλαζίνης-κεταμίνης σε συγκεντρώσεις 110 μg κεταμίνη/g και 11 μg ξυλαζίνη/g. Στην συνέχεια απομακρύνεται το τρίχωμα από περιοχή της ράχης των μυών με την βοήθεια αρχικά ηλεκτρικής κουρευτικής μηχανής και κατόπιν με ξυράφι. Το ξύρισμα πραγματοποιείται προσεκτικά και στην συνέχεια γίνεται έλεγχος για πιθανές εκδορές στο δέρμα των μυών. Το δέρμα σκουπίζεται και αφήνεται να στεγνώσει. Με βοήθεια πιπέτας εφαρμόζονται 100 μl του εκάστοτε παρασκευάσματος στους αντίστοιχους μύες.

Χρήση φθορίζοντος μικροσκοπίου για την παρατήρηση των νανοσφαιρών στο δέρμα

Οι νανοσφαίρες που χρησιμοποιήθηκαν για αυτήν την μέθοδο είναι οι νανοσφαίρες με φθορίζον πολυμερές PLA-pyrene-butanol και οι νανοσφαίρες ενκαψακισμένης ροδαμίνης σε φθορίζον πολυμερές PLA-pyrene-butanol.

Τα δείγματα εφαρμόστηκαν στην ράχη των μυών για 0.5, 1 και 2 ώρες. Στην συνέχεια οι μύες θανατώθηκαν και το δέρμα στο σημείο όπου έγινε η εφαρμογή των νανοσφαιρών αφαιρείται (διαστάσεις περίπου 1.5 x 1.5 cm). Τα δείγματα βυθίζονται σε διάλυμα φορμόλης για 24 ώρες για την μονιμοποίηση τους (σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και προστατευμένα από το φως). Στην συνέχεια πραγματοποιείται η αφυδάτωση των ιστών με σταδιακή εμβάπτιση τους σε διαλύματα αιθανόλης-νερού,

αυξανομένης της συγκέντρωσης της αιθανόλης. Κατόπιν πραγματοποιείται η παραφινολοποίηση των ιστών με εμβάπτιση τους σε διαλύματα ξυλόλιου, ξυλόλιου-παραφίνης και καθαρής παραφίνης όπου και παραμένουν για 24 ώρες. Στην συνέχεια γίνεται η παρασκευή των κύβων παραφίνης οι οποίοι θα περιέχουν τους μονιμοποιημένους, παραφινολοποιημένους ιστούς (έναν ιστό ανά κύβο). Οι κύβοι ψύχονται στους -20°C . Ακολουθεί η πραγματοποίηση των τομών με την βοήθεια μικροτόμου παραφίνης, σε πάχος 4 μm και με κατεύθυνση κάθετη ως προς την επιφάνεια του ιστού. Οι τομές μεταφέρονται σε γυάλινους αντικειμενοφόρους και ακολουθούν τα στάδια της αποπαραφινολοποίησης, με εμβάπτιση των τομών σε ξυλόλη και ενυδάτωσης, με εμβάπτιση σε διαλύματα αιθανόλης-νερό, φθίνουσας συγκέντρωσης ως προς αιθανόλη. Τέλος πραγματοποιείται η βαφή των τομών με διαλύματα αιματοξυλίνης και ιοζίνης και ακολουθεί η παρατήρηση και φωτογράφιση στο φθορίζον μικροσκόπιο.

Στο μικροσκόπιο χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα για την διέγερση της πυρενοβουτανόλης στα μήκη κύματος μεταξύ 350-375 nm για την διέγερση και στα 402 nm για την εκπομπή. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα για την διέγερση της ροδαμίνης στα μήκη κύματος 510-560 nm και στα 590 nm για την εκπομπή.

Με την παρατήρηση μέσω του μικροσκοπίου ήταν δυνατόν να εντοπιστούν οι νανοσφαίρες στο εσωτερικό του δέρματος. Για σύγκριση υπήρξαν τομές δέρματος από μύες στους οποίους δεν είχαν εφαρμοστεί νανοσφαίρες. Επίσης στην περίπτωση με τις δύο φθορίζουσες ουσίες πραγματοποιήθηκε αλληλοεπικάλυψη των εκάστοτε φωτογραφιών που λήφθηκαν από το μικροσκόπιο για πιο σίγουρο εντοπισμό των νανοσφαιρών.

Χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης για την παρατήρηση των νανοσφαιρών στο δέρμα

Οι νανοσφαίρες που χρησιμοποιήθηκαν για αυτήν την μέθοδο είναι οι νανοσφαίρες PLA με ενκαψακλωμένη Albumin-FITC.

Τα δείγματα αφέθηκαν να εφαρμοστούν στην ράχη των μυών για 0.5 ώρες. Στην συνέχεια οι μύες θανατώθηκαν και το δέρμα στο σημείο όπου έγινε η εφαρμογή των νανοσφαιρών (διαστάσεις περίπου 1.5 x 1.5 cm) αφαιρείται. Τα δείγματα βυθίζονται σε κρύο ισοπεντάνιο (-60 °C) για πέντε λεπτά. Στην συνέχεια πραγματοποιούνται οι τομές του ιστού με βοήθεια κρυοτόμου Leica CM 1500 σε πάχος 20 μm με κατεύθυνση κάθετη στην επιφάνεια του ιστού. Οι τομές του ιστού μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρους όπου φυλάσσονται σε ξηρό, σκοτεινό περιβάλλον στους -20 °C. Πριν την παρατήρηση με το μικροσκόπιο, οι τομές καλύπτονται με μικρή ποσότητα Mowiol 4-88 και με γυάλινη καλυπτρίδα. Ακολουθεί η παρατήρηση και η φωτογράφιση του ιστού σε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης (μικροσκόπιο Leica DMI 6000B, σαρωτής/ανιχνευτής λέιζερ LEICA TCS SP5). Για σύγκριση χρησιμοποιήθηκε δέρμα μυών στους οποίους δεν είχαν εφαρμοστεί νανοσφαίρες

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε βασίστηκε στην σάρωση της τομής του ιστού και φωτογράφισης του σε δύο διαφορετικά μήκη κύματος, αρχικά στο μήκος κύματος των 488 nm που αποτελεί το μήκος διέγερσης του FITC και κατόπιν στα 568 nm, παρόλο που δεν υπάρχει ουσία που να φθορίζει με αυτό το μήκος κύματος. Με την αλληλεπικάλυψη των φωτογραφιών εμφανίζεται με κόκκινο ο αυτοφθορισμός του ιστού και των τριχών και με πράσινο οι νανοσφαίρες με FITC.

2.4.5 Μελέτη προσδιορισμού της βέλτιστης δόσης του ενκαψακιωμένου αντιγόνου

Ομάδες θηλυκών μυών BALB/c (3 πειραματόζωα ανά ομάδα) ανοσοποιήθηκαν διαδερμικά στην ράχη τους με νανοσφαίρες ενκαψακιωμένης οβαλβουμίνης. Σε κάποιες ομάδες χορηγήθηκε και ανοσοενισχυτικό τοξίνη της χολέρας σε διάλυμα. Ο τρόπος ανοσοποίησης είναι ίδιος όπως και στην περίπτωση της μελέτης της δυνατότητας διεύδυσης των νανοσφαιρών στο δέρμα. Οι συγκεντρώσεις που χορηγήθηκαν είναι οι εξής:

Πίνακας 2.2: Ποσότητες αντιγόνου και ανοσοενισχυτικού που χορηγήθηκαν στην εκάστοτε ομάδα μυών. Οι ποσότητες είναι σε μg ανά μυ.

Ομάδα μυών	Οβαλβουμίνη (μg)	Τοξίνη της Χολέρας (μg)
1	50	10
2	50	50
3	100	10
4	100	50
5	200	0
6	200	10
7	200	50
8	200	100

Επισημαίνεται ότι η ποσότητα του αντιγόνου που αναφέρεται σε όλες τις ομάδες βρίσκεται ενκαψακιωμένη σε PLA νανοσφαίρες ενώ το ανοσοενισχυτικό, όπου υπάρχει, είναι ελεύθερο (διαλυμένο στο νερό). Επίσης η χορήγηση έγινε ομοίως με 100 μl ανά μυ στη ξυρισμένη ράχη του μυ και εφαρμόστηκε με την βοήθεια πιπέτας.

Κατόπιν της διέλευσης 3 εβδομάδων, οι μύες θανατώθηκαν και συλλέχτηκαν οι σπλήνες για μελέτη πολλαπλασιασμού των σπληνοκυττάρων κατόπιν *in vitro* διέγερσης με το αντιγόνο (Παράγραφος 2.4.8).

2.4.6 Ανοσοποίηση

Για την μελέτη της διαδερμικής ανοσοποίησης των μυών έναντι του αντιγόνου Οβαλβουμίνη που βρίσκεται ενκαψακιωμένο σε νανοσφαίρες PLA πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα. Στο πρώτο πείραμα μελετήθηκε η δυνατότητα πρόκλησης ανοσοαπόκρισης κατόπιν επιδερμικής εφαρμογής των νανοσφαιρών («διαδερμική ανοσοποίηση»). Στο δεύτερο πείραμα μελετήθηκε η ανοσοαπόκριση

κατόπιν υποδόριας χορήγησης αντιγόνου σε μύες που είχαν προηγουμένως ανοσοποιηθεί διαδερμικώς και η σύγκριση των ανοσοαποκρίσεων τους με μύες που ανοσοποιήθηκαν υποδορίως χωρίς άλλη προηγούμενη ανοσοποίηση με το αντιγόνο.

1^ο Πείραμα

Ομάδες θηλυκών μυών BALB/c (πέντε πειραματόζωα ανά ομάδα) ανοσοποιήθηκαν διαδερμικά με Οβαλβουμίνη. Οι ομάδες ήταν οι εξής:

1. 200 μg Οβαλβουμίνη σε διάλυμα
2. 200 μg Οβαλβουμίνη σε διάλυμα και 100 μg τοξίνη της χολέρας σε διάλυμα
3. 200 μg Οβαλβουμίνη ενκαψακιωμένη σε PLA νανοσφαίρες
4. 200 μg Οβαλβουμίνη ενκαψακιωμένη σε PLA νανοσφαίρες και 100 μg τοξίνης της χολέρας σε διάλυμα
5. Καμία αναισθητοποίηση (Αρνητικοί μάρτυρες)

Οι ποσότητες που περιγράφονται πιο πάνω είναι σε 100 μl νερού ανά μυ.

Το πρωτόκολλο των χορηγήσεων και των δειγματοληψιών περιλάμβανε τα εξής στάδια:

Πίνακας 2.3: Στάδια πειραματικής διαδικασίας

Εβδομάδα	Εργασία
0	Πρώτη ανοσοποίηση
2	Πρώτη αναμνηστική δόση
4	Δειγματοληψία αίματος
5	Δεύτερη αναμνηστική δόση
7	Θανάτωση και δειγματοληψία αίματος και σπληνών

Η πειραματική διαδικασία της ανοσοποίησης περιελάμβανε τα εξής βήματα:

1. Παρασκευή νανοσφαιρών ενκαψακιωμένης Οβαλβουμίνης
2. Λυοφιλοποίηση νανοσφαιρών και μέτρηση χαρακτηριστικών τους ως προς μέγεθος, απόδοση και ποσότητας αντιγόνου

3. Ανασύσταση απαιτούμενης ποσότητας νανοσφαιρών στον αναγκαίο όγκο
4. Αναισθητοποίηση των μυών με διάλυμα ξυλαζίνης-κεταμίνης
5. Εύρισμα ράχης μυών
6. Εφαρμογή του διαλύματος του αντιγόνου ή αιωρήματος νανοσφαιρών με ή χωρίς ανοσοενισχυτικό

Οι αναμνηστικές δόσεις περιελάμβαναν τις ίδιες ποσότητες και την ίδια μορφή ανοσοποίησης με την αρχική ανοσοποίηση. Η δειγματοληψία της τέταρτης εβδομάδας πραγματοποιήθηκε με λήψη αίματος από όλους τους μυς από την ουρά. Συγκεκριμένα το πειραματόζωο εγκλωβιζόταν σε ειδική παγίδα με την ουρά να προεξέχει και με την βοήθεια λαβίδας και βάμβακος, που είχε εμβαπτιστεί σε χλιαρό νερό, προκλήθηκε αγγειοδιαστολή με απαλή εντριβή. Στην συνέχεια για την συλλογή του αίματος εισήχθη πεταλούδα G21 στην πιο μεγάλη φλέβα μέχρι να παρατηρηθεί μικρή είσοδος αίματος στο πλαστικό σωληνάκι της πεταλούδας. Παράλληλα συνεχίζονταν οι εντριβές με ελαφριά πίεση στην ουρά με κατεύθυνση από την βάση της ράχης του μυ προς την πεταλούδα έως ότου συλλεγεί ικανοποιητική ποσότητα αίματος. Το αίμα παράμενε για 18 ώρες στην συντήρηση ψυγείου και στην συνέχεια γινόταν φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 5 λεπτά για συλλογή του αντι-ορού.

Στη δειγματοληψία της έβδομης εβδομάδας, οι μύες θανατώνονταν με εξάρθρωση του αυχένα. Δείγματα αίματος συλλέχθηκαν από την καρδιά με την βοήθεια γυάλινων τριχοειδών. Επίσης πραγματοποιήθηκε λήψη των σπληνών.

Στους αντι-ορούς μετρήθηκαν μονάδες αντισωμάτων IgG έναντι του αντιγόνου της οβαλβουμίνης. Από τις σπλήνες συλλέχθηκαν σπληνοκύτταρα για την μέτρηση επιπέδων κυτταροκινών IFN- γ , IL-4, IL-10.

2^ο Πείραμα

Ομάδες θηλυκών μυών BALB/c (εφτά πειραματόζωα ανά ομάδα εκτός των περιπτώσεων που αναφέρονται στην συνέχεια) ανοσοποιήθηκαν αρχικά διαδερμικά με Οβαλβουμίνη και στην συνέχεια του πειράματος πραγματοποιήθηκε υποδόρια ένεση του αντιγόνου σε διάλυμα. Οι ομάδες είναι οι εξής:

1. 200 μg Οβαλβουμίνη σε διάλυμα
2. 200 μg Οβαλβουμίνη σε διάλυμα και 50 μg τοξίνη της χολέρας σε διάλυμα
3. 200 μg Οβαλβουμίνη ενκαψακιωμένη σε PLA νανοσφαίρες
4. 200 μg Οβαλβουμίνη ενκαψακιωμένη σε PLA νανοσφαίρες και 50 μg τοξίνης της χολέρας σε διάλυμα
5. Ανοσοποίηση μόνο με υποδόρια ένεση (4 μύες)
6. Καμία χορήγηση αντιγόνου (Αρνητικοί μάρτυρες, 3 μύες)

Οι ποσότητες που περιγράφονται παραπάνω για την διαδερμική ανοσοποίηση είναι σε 100 μl νερού ανά μυ. Η υποδόρια ένεση χορηγήθηκε στην ράχη των μυών και οι ποσότητες που χορηγήθηκαν ήταν 50 μl με 50 μg διαλυμένου αντιγόνου ανά πειραματόζωο.

Το πρωτόκολλο των χορηγήσεων και των δειγματοληψιών περιλάμβανε τα εξής στάδια:

Πίνακας 2.4: Στάδια πειραματικής διαδικασίας

Εβδομάδα	Εργασία
0	Πρώτη ανοσοποίηση (7 μύες/ομάδα)
2	Δειγματοληψία αίματος και αναμνηστική δόση
4	Δειγματοληψία αίματος από όλους τους μύες και θανάτωση και λήψη σπληνών από 3 μύες ανά ομάδα. Υποδόρια ένεση αντιγόνου στους εναπομείναντες 4 μύες/ομάδα
6	Θανάτωση όλων των μυών και λήψη δειγμάτων αίματος και σπληνών

Η πειραματική διαδικασία της ανοσοποίησης περιλάμβανε τα ίδια βήματα με το πρώτο πείραμα. Η αναμνηστική δόση περιλάμβανε τις ίδιες ποσότητες και την ίδια μορφή ανοσοποίηση με την αρχική ανοσοποίηση.

Η δειγματοληψία της δεύτερης εβδομάδας πραγματοποιήθηκε με λήψη αίματος από φλέβα της ουράς όλων των μυών με την ίδια μέθοδο που περιγράφηκε στο πρώτο πείραμα και εν συνέχεια χορηγήθηκε διαδερμικά η αναμνηστική δόση. Κατά τη δειγματοληψία της τέταρτης εβδομάδας συλλέχθηκαν δείγματα αίματος από όλους τους μύες. Συγκεκριμένα, συλλέχθηκε αίμα από την ουρά 4 μυών από κάθε ομάδα. Σε αυτούς τους μύες χορηγήθηκε υποδορίως το διάλυμα των 50 μ l του αντιγόνου. Οι υπόλοιποι 3 μύες της κάθε ομάδας θανατώθηκαν και συλλέχθηκε αίμα από την καρδιά και λήφθηκαν οι σπλήνες αυτών. Στην δειγματοληψία της έκτης εβδομάδας, οι εναπομείναντες μύες θανατώθηκαν, συλλέχθηκε αίμα από την καρδιά και πραγματοποιήθηκε λήψη των σπληνών.

Στους αντι-ορούς μετρήθηκαν τίτλοι αντισωμάτων IgG, IgG1 και IgG2a έναντι του αντιγόνου της οβαλβουμίνης. Επιπλέον, συλλέχθηκαν σπληνοκύτταρα από τις σπλήνες των μυών για μέτρηση των επιπέδων των κυτταροκινών IFN- γ , IL-2, IL-4 και IL-10 και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων κατόπιν *in vitro* διέγερσης τους με το αντιγόνο.

2.4.7 Ανάλυση μονάδων αντισωμάτων από αντιορούς που ελήφθησαν από ανοσοποιημένους μύες

Μικροπλάκες ELISA επικαλύφθηκαν με διάλυμα Οβαλβουμίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών με pH 9.6 σε συγκέντρωση 5 μ g/ml (100 μ l/μικροφρεάτιο, επώαση για 18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου). Ακολούθησε απόχυση των διαλυμάτων και έκπλυση των μικροφρεατίων με διάλυμα PBS (pH 7.4, 250 μ l/μικροφρεάτιο). Στην συνέχεια έγινε κορεσμός των μικροφρεατίων με διάλυμα BSA 2% β/ο σε PBS που περιέχει 0.05% ο/ο Tween-20 (200 μ l/μικροφρεάτιο, επώαση για 1 ώρα στους 37 °C). Το διάλυμα κορεσμού αποχύθηκε και το πλακίδιο εκπλύθηκε τρεις φορές με διάλυμα έκπλυσης όπως παραπάνω. Κατόπιν, έγινε πλήρωση των μικροφρεατίων με διαδοχικές αραιώσεις των προς έλεγχο αντιορών ή δειγμάτων αντιορών υπερανοσοποιημένων ζώων (100 μ l/μικροφρεάτιο, επώαση 18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου). Ακολουθεί έκπλυση της πλάκας τρεις φορές και προσθήκη 100 μ l ανά μικροφρεάτιο ενζυματικής επισημασμένης αντι-ανοσοσφαιρίνης μύος (IgG) σε αραιώση 1:3000 (επώαση για 2 ώρες στους 37°C).

Πραγματοποιείται απόχυση και έκπλυση της πλάκας. Στην συνέχεια προστίθεται διάλυμα χρωμογόνου ενζυμικού υποστρώματος TMB (100 μ l/μικροφρεάτιο, επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου). Υπήρξαν κελιά ελέγχου στην πλάκα, όπου είτε απουσιάζε το αντιγόνο, είτε το πρώτο αντίσωμα, είτε το δεύτερο αντίσωμα, είτε το χρωμογόνο με σκοπό την παρατήρηση πιθανών παρεμβολών. Η αντίδραση τερματίζεται (χωρίς απόχυση) με προσθήκη 100 μ l H_2SO_4 1M. Η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε στα 450 nm με μετρητή Multiskan EX.

Για την ανάλυση των ισοτύπων IgG1 και IgG2a χρησιμοποιήθηκε η ίδια μέθοδος όπως περιγράφηκε παραπάνω, με τη μόνη διαφορά ότι αντί να γίνει επώαση με ενζυμικώς επισημασμένη αντι-ανοσοσφαιρίνη μυός, χρησιμοποιήθηκαν ενζυματικώς επισημασμένα μονοκλωνικά αντισώματα κατά των ισοτύπων IgG1 (σε αραίωση 1:5000) και IgG2a (σε αραίωση 1:2000) αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε τίτλους αντισωμάτων με την βοήθεια υπερανοσοποιημένων ζώων σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\frac{\text{Απορρόφηση αγνώστου δείγματος αντιορού}}{\text{Απορρόφηση δείγματος υπερανοσοποιημένου ζώου}} \times 1000$$

2.4.8 Προσδιορισμός της ανοσολογικής απόκρισης σε κυτταρικό επίπεδο

Αφαίρεση και απομόνωση κυττάρων

Για την συλλογή του σπληνός μετά την θανάτωση, ο μυς τοποθετείται με την ράχη προς τον πάγκο. Με την βοήθεια χειρουργικών εργαλείων πραγματοποιήθηκε τομή στο στήθος και εντοπιζόταν ο σπλήνας. Με την βοήθεια αποστειρωμένων λαβίδων, ο σπλήνας αφαιρείται από το ζώο προσεκτικά χωρίς να διατηρηθεί, με σταδιακή αποκοπή ό,τι συνδετικού ιστού υπήρχε. Στην συνέχεια οι σπλήνες κάθε ομάδας τοποθετούνται σε ένα πλαστικό σωλήνα ο οποίος περιέχει θρεπτικό υλικό RPMI και εν συνεχεία φυλάσσονται σε πάγο μέχρι την περαιτέρω κατεργασία τους.

Για την συλλογή των σπληνοκυττάρων ακολουθούνταν τα εξής στάδια:

- Τα σπληνοκύτταρα απελευθερωνόντουσαν από τις σπλίνες με την βοήθεια αποστειρωμένων λαβίδων. Συγκεκριμένα σε πλάκα με 6 φρεάτια τοποθετούνταν οι σπλίνες των ομάδων ανοσοποίησης μαζί με ποσότητα θρεπτικού υλικού (1 φρεάτιο ανά ομάδα). Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε απελευθέρωση των σπληνοκυττάρων στον κύριο όγκο του υγρού προκαλώντας τριβή των σπληνών μεταξύ των λαβίδων και της εσωτερικής οδοντωτής επιφάνεια αυτών.
- Διήθηση για απομάκρυνση υπολειμμάτων ιστών
- Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 1600 rpm
- Απόχυση υπερκείμενου και επαναιώρηση με RPMI
- Δειγματοληψία του αιωρήματος των κυττάρων και μέτρηση του πληθυσμού με την βοήθεια αιματοκυτταρόμετρου Neubauer και οπτικού μικροσκοπίου. Τα δείγματα αραιώθηκαν 1:20 φορές με Trypan Blue
- Λαμβάνεται η ποσότητα των απαιτούμενων κυττάρων σε νέους πλαστικούς σωλήνες και πραγματοποιείται φυγοκέντρωση και επαναιώρηση στον απαιτούμενο όγκο. Τελική συγκέντρωση κυττάρων 5×10^6 κύτταρα/ml

Μελέτη του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων

Μικροπλάκες 96 θέσεων κοίλου πυθμένα πληρώθηκαν με κύτταρα (5×10^5 κύτταρα/μικροφρέατιο) σε συνολικό όγκο πλήρους RPMI 200 μl/μικροφρέατιο. Σε κάποια κελιά προστέθηκε οβαλβουμίνη σε τελική συγκέντρωση 50 μg/ml. Επίσης υπήρξαν κελιά χωρίς καμία πρόσθετη ουσία (αρνητικοί μάρτυρες) όπως επίσης και κελιά με Κονκαναβαλίνη Α σε συγκέντρωση 5μg/ml (θετικοί μάρτυρες). Όλα τα δείγματα έγιναν εις τετραπλούν. Στην συνέχεια έγινε επώαση για 48 ώρες σε κλίβανο 37 °C, παρουσία 5% CO₂ και υγρασίας. Κατά την διάρκεια της επώασης πραγματοποιήθηκε προσθήκη διαλύματος ³H θυμιδίνης (1 μCi σε 25 μl πλήρους θρεπτικού διαλύματος ανά μικροφρέατιο), συγκεκριμένα 18 ώρες πριν την ολοκλήρωση των 48 ωρών.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση των δειγμάτων (2000 rpm, 10 λεπτά) και απομάκρυνση υπερκείμενων με βοήθεια αντλίας κενού. Έπειτα, έγινε

προσθήκη 1ml PBS (pH 7.4, θερμοκρασίας 4°C), φυγοκέντρηση και απομάκρυνση υπερκείμενου. Κατόπιν, προστέθηκε σε κάθε δείγμα 1 ml διαλύματος τριχλωροοξικού οξέως (TCA 5% β/ο σε νερό, θερμοκρασία διαλύματος 4 °C) και τα δείγματα αφέθηκαν για 30 λεπτά στους 4 °C και εν συνεχεία επαναφυγοκεντρήθηκαν. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και προστέθηκε 0.5 ml NaOH (0.2 N) σε κάθε δείγμα για την διάλυση των στερεών υπολειμμάτων. Στην συνέχεια μετρήθηκε η ποσότητα της β-ραδιενέργειας σε μετρητή (Wallac 1410 liquid scintillation counter) με προσθήκη 400 μl του κάθε δείγματος σε 4 ml υγρού σπινθηρισμού, όπου εμμέσως μετράται η ένταση της β-ραδιενέργειας. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως δείκτης πολλαπλασιασμού (ραδιενέργεια στα δείγματα προς την ραδιενέργεια στους αρνητικούς μάρτυρες).

Μέτρηση των επιπέδων των κυτταροκινών

Τα επίπεδα των κυτταροκινών μετρήθηκαν σε δείγματα από υπερκείμενα καλλιιεργειών κυττάρων που ελήφθησαν μετά από φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση των κυττάρων. Συγκεκριμένα, μικροπλάκες 24 θέσεων πληρώθηκαν με κύτταρα (2.5×10^6 κύτταρα/μικροφρεάτιο) σε συνολικό όγκο RPMI 1ml/μικροφρεάτιο. Σε κάποια κελιά προστέθηκε οβαλβουμίνη σε τελική συγκέντρωση 100 μg/ml ενώ υπήρξαν επίσης κελιά χωρίς καμία πρόσθετη ουσία (αρνητικοί μάρτυρες) όπως επίσης και κελιά με Κονκαναβαλίνη Α σε συγκέντρωση 5 μg/ml (θετικοί μάρτυρες). Όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε επώαση για 48 ώρες σε κλίβανο 37 °C, παρουσία 5% CO₂ και υγρασίας. Τα δείγματα από κάθε κελιά συλλέχθηκαν, φυγοκεντρήθηκαν και φυλάχθηκαν τα υπερκείμενα.

ELISA mIFN-γ

Μικροπλάκες ELISA 96 μικροφρατίων επικαλυμμένες με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι IFN-γ μυσός πληρώθηκαν με 100 μl/μικροφρεάτιο πρότυπων διαλυμάτων (0, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 και 1000 pg/ml) και αγνώστων δειγμάτων. Κατόπιν προστέθηκε το βουτινυλιωμένο αντίσωμα anti-mIFN-γ (50 μl/μικροφρεάτιο) και

ακολούθησε επώαση για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια τα δείγματα αποχύθηκαν και το πλακίδιο εκπλύθηκε τρεις φορές με διάλυμα έκπλυσης. Ακολούθως, προστέθηκαν 100 μl/μικροφρεάτιον στρεπταβιδίνης-HRP και πραγματοποιήθηκε επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν πραγματοποιείται απόχυση, έκπλυση 3 φορές και προθήκη διαλύματος χρωμογόνου ενζυμικού υποστρώματος TMB (100 μl/μικροφρεάτιο). Οι ουσίες αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου να αντιδράσουν για περίπου 15 λεπτά και η αντίδραση τερματίζεται (χωρίς απόχυση) με προσθήκη 100 μl H₂SO₄ 1M σε κάθε μικροφρεάτιο. Η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε στα 450 nm με μετρητή Multiskan EX. Όλα τα δείγματα μετρήθηκαν εις διπλούν. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε pg/ml με την βοήθεια των πρότυπων δειγμάτων.

ELISA mIL-10

Μικροπλάκες ELISA 96 μικροφρατίων επικαλυμμένες με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι IL-10 μυός πληρώθηκαν με 100 μl/μικροφρεάτιο πρότυπων διαλυμάτων (0, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 και 1000 pg/ml) και αγνώστων δειγμάτων. Κατόπιν προστίθεται το βουτινυλιωμένο αντίσωμα anti-mIL-10 (50 μl/μικροφρεάτιο) και ακολούθησε επώαση για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια τα δείγματα αποχύθηκαν και το πλακίδιο εκπλύθηκε τρεις φορές με διάλυμα έκπλυσης. Ακολούθως προστέθηκαν 100 μl/μικροφρεάτιον στρεπταβιδίνης-HRP και έγινε επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν πραγματοποιείται απόχυση, έκπλυση 3 φορές και προστίθεται το διάλυμα χρωμογόνου ενζυμικού υποστρώματος TMB (100 μl/μικροφρεάτιο). Οι ουσίες αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου να αντιδράσουν για περίπου 15 λεπτά και η αντίδραση τερματίζεται (χωρίς απόχυση) με προσθήκη 100 μl H₂SO₄ 1M σε κάθε μικροφρεάτιο. Η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε στα 450 nm με μετρητή Multiskan EX. Όλα τα δείγματα μετρήθηκαν εις διπλούν. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε pg/ml με την βοήθεια των πρότυπων δειγμάτων.

ELISA mIL-4

Μικροπλάκες ELISA 96 μικροφρατίων επικαλυμμένες με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι IL-4 μυός πληρώθηκαν με 50μl/μικροφρεάτιο πρότυπων διαλυμάτων (0, 3.9, 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125 και 250 pg/ml) και αγνώστων δειγμάτων. Κατόπιν προστίθεται το βουτινυλιωμένο αντίσωμα anti-mIL-4 (50 μl/μικροφρεάτιο) και ακολουθήσε επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια τα δείγματα αποχύθηκαν και το πλακίδιο εκπλύθηκε τρεις φορές με διάλυμα έκπλυσης. Ακολούθως προστέθηκαν 100 μl/μικροφρεάτιον στρεπταβιδίνης-HRP και έγινε επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν πραγματοποιείται απόχυση, έκπλυση 3 φορές και προστίθεται το διάλυμα χρωμογόνου ενζυμικού υποστρώματος TMB (100 μl/μικροφρεάτιο). Οι ουσίες αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου να αντιδράσουν για περίπου 15 λεπτά και η αντίδραση τερματίζεται (χωρίς απόχυση) με προσθήκη 100 μl H₂SO₄ 1M σε κάθε μικροφρεάτιο. Η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε στα 450 nm με μετρητή Multiskan EX. Όλα τα δείγματα μετρήθηκαν εις διπλούν. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε pg/ml με την βοήθεια των πρότυπων δειγμάτων.

ELISA mIL-2

Μικροπλάκες ELISA 96 μικροφρατίων επικαλυμμένες με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι IL-2 μυός πληρώθηκαν με 100μl/μικροφρεάτιο πρότυπων διαλυμάτων (0, 15.6, 31.25, 62.5, 125, 250 και 500 pg/ml) και αγνώστων δειγμάτων. Κατόπιν προστίθεται το βουτινυλιωμένο αντίσωμα anti-mIL-2 (50 μl/μικροφρεάτιο) και ακολουθήσε επώαση για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια τα δείγματα αποχύθηκαν και το πλακίδιο εκπλύθηκε τρεις φορές με διάλυμα έκπλυσης. Ακολούθως προστέθηκαν 100 μl/μικροφρεάτιον στρεπταβιδίνης-HRP και έγινε επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν πραγματοποιείται απόχυση, έκπλυση 3 φορές και προστίθεται το διάλυμα χρωμογόνου ενζυμικού υποστρώματος TMB (100 μl/μικροφρεάτιο). Οι ουσίες αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου να αντιδράσουν για περίπου 15 λεπτά και η αντίδραση τερματίζεται (χωρίς απόχυση) με προσθήκη 100 μl H₂SO₄ 1M σε κάθε μικροφρεάτιο. Όλα τα δείγματα μετρήθηκαν εις διπλούν. Η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε στα 450 nm με μετρητή Multiskan EX.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ταυτοποίηση και καθαρότητα πολυμερών

Η ταυτότητα και καθαρότητα των πολυμερών διαπιστώθηκε με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^1H -NMR. Στις μετρήσεις δεν χρησιμοποιήθηκε εσωτερικό πρότυπο ενώ ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3). Στην Εικόνα 3.1 απεικονίζεται το ^1H -NMR του μονομερούς dl-lactide ενώ στην Εικόνα 3.2 απεικονίζεται το ^1H -NMR του PLA. Χαρακτηριστική κορυφή του πολυμερούς, που οφείλεται στο μεθινικό πρωτόνιο του γαλακτικού οξέος ($\text{O}-\text{CH}^*(\text{CH}_3)-\text{CO}-$)_x, εμφανίζεται στα 5.2 ppm. Τα φάσματα ^1H -NMR των πολυμερών μπορούν να αποκαλύψουν την ύπαρξη σε αυτά μονομερών γαλακτιδίου που δεν είχαν ακόμη αντιδράσει την στιγμή που τερματίστηκε ο πολυμερισμός. Έτσι το φάσμα ^1H -NMR ενός PLA πολυμερούς που δεν έχει υποβληθεί σε διαδικασία καθαρισμού, παρουσιάζει και κορυφές που οφείλονται στην ύπαρξη του γαλακτιδίου (στα 1.6-1.7 ppm και στα 5.0 και 5.1 ppm). Οι κορυφές αυτές εξαφανίζονται όταν τα πολυμερή καθαριστούν.

Ένα τυπικό φάσμα ^1H -NMR πολυμερούς PLA-πυρεν-βουτανόλη εμφανίζεται στην Εικόνα 3.3 με την αντίστοιχη χημική δομή του. Οι κορυφές στα 1.55 και 5.2 ppm αποδίδονται σε μεθυλικά και μεθινικά πρωτόνια των γαλακτικών μονάδων αντίστοιχα. Η μη πολυμερισμένη πυρέν-βουτανόλη-1 εμφανίζει σήμα στα 3.72 ppm που οφείλεται σε πρωτόνια των τελικών μεθυλικών ομάδων της βουτανόλης. Ο πολυμερισμός των dl-lactide και τη πυρέν-βουτανόλη-1 είχε σαν αποτέλεσμα την μετατόπιση της κορυφής των 3.72 ppm στα 4.20 ppm, το οποίο υποδηλώνει την δημιουργία ενός εστερικού δεσμού μεταξύ της πολυγαλακτικής αλυσίδας και της πυρέν-βουτανόλης-1.

Εικόνα 3.1: ^1H -NMR των μονομερών dl-lactide

Εικόνα 3.2: ^1H -NMR πολυμερούς PLA

Εικόνα 3.3: ^1H -NMR πολυμερούς PLA-pyrene butanol

Το χρωματογράφημα (χρωματογραφία διαπέρασης πηκτής, GPC) του PLA που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη εμφανίζεται στην Εικόνα 3.4 και σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη, το μοριακό βάρος του είναι 138.000.

Εικόνα 3.4: Γράφημα GPC για το πολυμερές του πολύ-γαλακτικού οξέως

3.2 Χαρακτηριστικά των νανοσφαιρών πολύ-γαλακτικού οξέως

Τα χαρακτηριστικά των νανοσφαιρών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα διαδερμικής ανοσοποίησης δίνονται στον Πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1: Χαρακτηριστικά νανοσφαιρών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα

Κατηγορία νανοσφαιρών	Φόρτωση σε αντιγόνο (% κατά βάρος)	Απόδοση νανοσφαιρών (%)	Μέγεθος (nm)	Δείκτης Πολυδιασποράς	ζ-δυναμικό (mV)
Νανοσφαίρες PLA Οβαλβουμίνης	10.26 ±1.99	48.37 ±12.82	155 ±14	0.154 ±0.064	-21.78±5.16
Νανοσφαίρες PLA οβαλβουμίνης με οξικό αιθυλεστέρα για οργανική φάση	8.98 ±2.45	33.05 ±12.51	151±6	0.142 ±0.019	-20,6±4.01
Νανοσφαίρες PLA οβαλβουμίνης με μίγμα οξικού αιθυλεστέρα-διχλωρομεθάνιου (1:1) για οργανική φάση	6.99 ±2.13	50.17 ±2.58	144 ±4	0.149 ±0.003	-22.4±2.9
Νανοσφαίρες PLA κενές		58.91±18.52	135±7	0.111 ±0.024	-38.2 ±13.6

Η μορφολογία των νανοσφαιρών PLA με ενκαψακωμένο αντιγόνο παρουσιάζεται στη Εικόνα 3.5 που λήφθηκε με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM).

Εικόνα 3.5: Μικροφωτογραφία νανοσφαιρών Οβαλβουμίνης από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης

Στην Εικόνα 3.6 εμφανίζονται οι νανοσφαίρες PLA με ενκαψακιωμένη οβαλβουμίνη όπως φαίνονται με Μικροσκόπιο Ατομικών Δυνάμεων (AFM).

Εικόνα 3.6: Νανοσφαίρες όπως φαίνονται στο AFM.

Όπως παρατηρείται από τις εικόνες του SEM (Εικόνα 3.5) και του AFM (Εικόνα 3.6), οι νανοσφαίρες PLA που παρήχθησαν είναι διακριτά σωματίδια σφαιρικού σχήματος με μέγεθος μέσα στα όρια των μετρήσεων που λήφθηκαν με δυναμικό σκεδασμό του φωτός.

3.3 Αποτελέσματα μελέτης διατήρησης της αντιγονικότητας της οβαλβουμίνης

Κατά την μελέτη της αντιγονικότητας της οβαλβουμίνης κατόπιν ενκαψακίωσης της σε νανοσφαίρες πολυγαλακτικού οξέος δοκιμάστηκαν διαφορετικές συνθήκες παρασκευής που εμφανίζονται στον Πίνακα 3.2 . Η διαφοροποίηση των παρασκευών έγκειται κυρίως στην αλλαγή της οργανικής φάσης (οξικός αιθυλεστέρας ή διχλωρομεθάνιο). Επιπρόσθετα μελετήθηκε η επίδραση της λυοφιλοποίησης των νανοσφαιρών στο ενκαψακιωμένο αντιγόνο, καθώς η λυοφιλοποίηση (ξήρανση μέσω

ψύξεως) αποτελεί αναγκαίο στάδιο για την αποθήκευση των νανοσφαιρών. Επισημαίνεται ότι στην λυοφιλοποίηση χρησιμοποιήθηκε λυοπροστατευτικό τριαλόζη σε αναλογία βαρών 2:1 τριαλόζη:νανοσφαίρες.

Πίνακας 3.2: Συνθήκες παρασκευής νανοσφαιρών που δοκιμάστηκαν στο πείραμα διατήρησης αντιγονικότητας

Νούμερο παρτίδας	PLA	Οργανική φάση (2ml)	Ποσότητα αντιγόνου στην εσωτερική φάση	Λυοφιλοποίηση
1	50mg	Et.ac.	10mg	OXI
2	50mg	dcm:et.ac (1:1)	10mg	OXI
3	50mg	dcm	10mg	OXI
4	50mg	dcm	10mg	NAI

Et.ac.= οξικός αιθυλεστέρας, dcm= διχλωρομεθάνιο

Τα αποτελέσματα της διατήρησης της αντιγονικότητας της αλβουμίνης μετά την εγκαψακίωσης της σε PLA νανοσφαίρες που παρασκευάστησαν με διαφορετικές συνθήκες (Πίνακας 3.2) εμφανίζονται στην Εικόνα 3.7 και εκφράζονται ως ποσοστό διατήρησης σε σύγκριση με το μη επεξεργασμένο αντιγόνο.

Εικόνα 3.7: Ποσοστό διατήρησης αντιγονικής δράσης της ενκαψακιωμένης οβαλβουμίνης για τις διάφορες παρασκευές των νανοσφαιρών

3.4 Αποτελέσματα μελέτης διείσδυσης νανοσφαιρών στο δέρμα μυών

3.4.1 Μελέτη με χρήση φθορίζοντος μικροσκοπίου

Στην μελέτη της ικανότητας διείσδυσης των νανοσφαιρών στο δέρμα με χρήση φθορίζοντος μικροσκοπίου χρησιμοποιήθηκαν δύο ειδών νανοσφαιρών, PLA νανοσφαίρες επισημασμένες με PLA-pyrene-butanol (μονο-επισημασμένες) και PLA νανοσφαίρες επισημασμένες με PLA-pyrene-butanol και με ενκαψακιωμένη ροδαμίνη (διπλο-επισημασμένες). Τα χαρακτηριστικά των νανοσφαιρών που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη αυτή παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3. Επίσης ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν μύες στους οποίους δεν χορηγήθηκαν νανοσφαίρες.

Πίνακας 3.3: Χαρακτηριστικά νανοσφαιρών που χορηγήθηκαν για την μελέτη διείσδυσης τους στο δέρμα με την χρήση φθορίζοντος μικροσκοπίου

Είδος νανοσφαιρών	Μέγεθος (nm)	Δείκτης πολυδιασποράς
Νανοσφαίρες PLA/PLA-pyrenebutanol	162±2	0.067±0.006
Νανοσφαίρες PLA/PLA-pyrenebutanol με ενκαψακιωμένη ροδαμίνη	133	0.1

Στις εικόνες που ακολουθούν (Εικόνες 3.8 – 3.11) εμφανίζονται οι ιστοί όπως παρατηρήθηκαν από το φθορίζον μικροσκόπιο. Επισημαίνεται ότι οι τομές κόπηκαν σε μικροτόμο με φορά κάθετη προς της επιφάνεια του δέρματος. Στην συνέχεια τοποθετήθηκαν πάνω στις αντικειμενοφόρους, οπότε στις φωτογραφίες παρατηρούνται από το πλάι όλα τα στρώματα από τα οποία αποτελείται ο ιστός και κατ' επέκταση μπορεί να εκτιμηθεί το βάθος που έχουν εισχωρήσει οι νανοσφαίρες.

Εικόνα 3.8: Δέρμα Αρνητικός Μάρτυρας. Α) σε απλό φώς, Β) στο μήκος κύματος της πυρεν-βουτανόλης-1

Εικόνα 3.9: Δέρμα με κενές νανοσφαίρες PLA – pyrene-butanol Α) σε απλό φώς, Β) στο μήκος κύματος της πυρεν-βουτανόλης-1

Εικόνα 3.10: Δέρμα με νανοσφαίρες PLA-pyrene-butanol που περιέχουν ενκαψακωμένη ροδαμίνη Α) σε απλό φώς, Β) στο μήκος κύματος της πυρεν-βουτανόλης-1, C) στο μήκος κύματος της ροδαμίνης D) αλληλοεπικάλυψη των φωτογραφιών Β και C

Εικόνα 3.11: Μεγέθυνση του κεντρικού τμήματος των φωτογραφιών Β και C αντίστοιχα της Εικόνας 3.10

Όπως παρατηρείται από τις φωτογραφίες του ιστού στο φθορίζον μικροσκόπιο (Εικόνες 3.8 – 3.11), οι νανοσφαίρες εμφανίζονται να έχουν εισχωρήσει στις εσωτερικές στοιβάδες του ιστού. Επιπρόσθετα ο συνδυασμός των δύο μηκών κύματος με την χρήση της ροδαμίνης επιβεβαιώνει ότι τα σημεία όπου υπάρχει έντονος φθορισμός στο μήκος κύματος της πυρεν-βουτανόλης οφείλεται πράγματι στις νανοσφαίρες καθώς ακριβώς στα ίδια σημεία εμφανίζεται και ο φθορισμός της ροδαμίνης.

3.4.2 Μελέτη με χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης

Στην μελέτη της οδού διεύθυνσης των νανοσφαιρών στο δέρμα με χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου χρησιμοποιήθηκαν νανοσφαίρες PLA που περιέχουν φθορίζουσα Albumin-FITC. Στις νανοσφαίρες πραγματοποιήθηκε μελέτη αποδέσμευσης της φθορίζουσας ουσίας καθώς η φθορίζουσα ουσία δεν πρέπει να διαφεύγει από τις νανοσφαίρες για να μπορεί να αποτελέσει αξιόπιστο μάρτυρα της θέσης των μικροσφαιρών στο δέρμα. Στις 24 ώρες της μελέτης μετρήθηκε πολύ μικρή (2.1%) αποδέσμευση της Albumin-FITC από τις νανοσφαίρες (Εικόνα 3.12).

Εικόνα 3.12: Καμπύλη αποδέσμευσης φθορίζουσας αλβουμίνης (FITC-albumin) από PLA νανοσφαίρες.

Στην Εικόνα 3.13 παρουσιάζεται ο ιστός στο μήκος κύματος του FITC (488 nm, χρώμα πράσινο) και στο μήκος κύματος των 568 nm (χρώμα ανοιχτό κόκκινο) παρόλο που δεν υπάρχει στα δείγματα φθορίζουσα που να φθορίζει σε αυτό το μήκος κύματος. Ο λόγος που γίνεται η λήψη φωτογραφιών με διέγερση στο μήκος κύματος των 568 nm είναι για τον αποκλεισμό του αυτοφθορισμού του δέρματος. Όπως είναι γνωστό το δέρμα περιέχει ουσίες που φθορίζουν σε διάφορα μήκη κύματος. Συγκεκριμένα όσο μειώνεται το μήκος κύματος διέγερσης, τόσο ελαττώνεται ο αυτοφθορισμός από τον ιστό και αυξάνεται από τις τρίχες, ενώ αντίστροφα όσο αυξάνεται το μήκος κύματος διέγερσης αυξάνεται επίσης και ο αυτοφθορισμός του

ιστού φτάνοντας στο μέγιστο στην περιοχή των 500 - 600 nm και μειώνεται ο αυτοφθορισμός των τριχών. Για την μελέτη λοιπόν με το συνεστιακό μικροσκόπιο ενός δείγματος ιστού που περιέχει την προς παρατήρηση φθορίζουσα, θα πρέπει με κάποιο τρόπο να απομονωθεί ο αυτοφθορισμός ή να παρουσιαστεί πιο τμήμα του φθορισμού οφείλεται στον αυτοφθορισμό και πιο όχι. Σε αυτή την μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο αυτοφθορισμός που παράγεται σε ένα μήκος κύματος για τον αποκλεισμό σε ένα άλλο μήκος κύματος. Επίσης με αυτόν τον τρόπο γίνεται εμφανής και η δομή του ιστού. Αυτό πραγματοποιήθηκε με τεχνική διπλού φθορισμού, που επιτρέπει την φωτογράφιση σε δυο διακριτά μήκη κύματος. Με αυτόν τον τρόπο, εικόνες της δομής του ιστού και του αυτοφθορισμού λήφθηκαν στο μήκος κύματος των 568 nm και αλληλεπικαλύφθηκαν με φωτογραφίες που λήφθηκαν στο μήκος κύματος του FITC (488 nm, Εικόνα 3.13). Επισημαίνεται ότι οι φωτογραφίες που αλληλεπικαλύφθηκαν βρισκόνταν στο ίδιο σημείο του ιστού, στο ίδιο εστιακό επίπεδο. Η διαδικασία της αλληλοεπικάλυψης πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του προγράμματος του συνεστιακού μικροσκοπίου.

Εικόνα 3.13: Τομές δέρματος μυος σε συνεστιακό μικροσκόπιο, A) Χωρίς νανοσφαίρες στο μήκος κύματος των 568 nm, B) Χωρίς νανοσφαίρες στα 488nm (FITC), C) Αλληλοεπικάλυψη των A και B, D) και G) με νανοσφαίρες στα 568 nm, E) και H) με νανοσφαίρες στα 488 nm, F) αλληλοεπικάλυψη των D και E, I) αλληλοεπικάλυψη των G και H

Όπως είναι γνωστό, το συνεστιακό μικροσκόπιο παρουσιάζει μεγαλύτερες δυνατότητες από το απλό φθορίζον μικροσκόπιο, τόσο σε μεγέθυνση όσο και σε ανάλυση της λαμβανόμενης εικόνας. Επιπρόσθετα η δυνατότητα φωτογράφησης με σάρωση σε συγκεκριμένο εστιακό επίπεδο, αποκλείει τυχόν παρεμβολές από άλλα εστιακά επίπεδα ή από διπλανά σημεία που φθορίζουν έντονα. Έτσι ήταν δυνατόν να ανιχνευθεί ο τρόπος εισχώρησης των νανοσφαιρών στο εσωτερικό του δέρματος. Με βάση τις φωτογραφίες που λήφθηκαν με το συνεστιακό μικροσκόπιο (Εικόνα 3.13),

οι νανοσφαίρες φαίνεται να έχουν την δυνατότητα να εισχωρούν στο δέρμα μέσω των θυλάκων των τριχών. Δεν παρατηρήθηκε στις φωτογραφίες που λήφθηκαν άλλη οδός εισόδου των νανοσφαιρών στο δέρμα. Σε χρόνο 30 min οι νανοσφαίρες έχουν εισχωρήσει σε βάθος μεγαλύτερο και των 90 μm, πάχος αρκετά μεγαλύτερο από το πάχος της κερατίνης στοιβάδας.

3.5 Αποτελέσματα μελέτης της βέλτιστης δόσης για την διαδερμική χορήγηση του ενκαψακιωμένου αντιγόνου

Στην συνέχεια παρατίθενται τα αποτελέσματα από τις μελέτες πολλαπλασιασμού των σπληνοκυττάρων που απομονώθηκαν από τα πειραματόζωα που ανοσοποιήθηκαν μία φορά διαδερμικά με νανοσφαίρες με ενκαψακιωμένο αντιγόνο (OVA), σε διάφορες ποσότητες του αντιγόνου και του ανοσοενισχυτικού (CT). Η εκτίμηση της ειδικότητας και της έκτασης του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων έγινε με τον δείκτη πολλαπλασιασμού (Proliferation index). Στους Πίνακες 3.4 και 3.5 παρουσιάζονται αρχικά οι ομάδες ανοσοποίησης, και κατόπιν τα αποτελέσματα που εξάχθηκαν από τις μετρήσεις των κρούσεων της θυμιδίνης κατόπιν in vitro διέγερσης των σπληνοκυττάρων με 50 μg/ml οβαλβουμίνης. Για κάθε ομάδα εμφανίζεται ο αρνητικός μάρτυρας (-) και το αποτέλεσμα της διέγερσης (+). Επίσης παρουσιάζεται δίπλα ο δείκτης πολλαπλασιασμού για την αντίστοιχη ομάδα. Στην συνέχεια ακολουθούν στην Εικόνα 3.14 τα αποτελέσματα των δεικτών πολλαπλασιασμού για κάθε ομάδα για άμεση σύγκριση.

Πίνακας 3.4: Ποσότητες αντιγόνου και ανοσοενισχυτικού που χορηγήθηκαν στο εκάστοτε ομάδα μυνών. Οι ποσότητες είναι σε μg ανά μν

Ομάδα μυνών	Οβαλβουμίνη (μg)	Τοξίνη της Χολέρας (μg)
1	50	10
2	50	50
3	100	10
4	100	50
5	200	0
6	200	10
7	200	50
8	200	100

Πίνακας 3.5: Αποτελέσματα του πολλαπλασιασμού των σπληνοκυττάρων κατόπιν in vitro διέγερση με 50μg/ml Οβαλβουμίνη

OVA:CT (μg/μg)	Κρούσεις ^3H -θυμιδίνης	Δείκτης Πολλαπλασιασμού
(-) 50:10	3633.9	
(+) 50:10	11897.7	3.27
(-) 50:50	3688.5	
(+) 50:50	16350.4	4.43
(-) 100:10	5304.8	
(+) 100:10	11501.7	2.16
(-) 100:50	5048.1	
(+) 100:50	16666.2	3.3
(-) 200:0	4997.4	
(+) 200:0	8820.5	1.76
(-) 200:10	239.6	
(+) 200:10	741.3	3.09
(-) 200:50	340.1	
(+) 200:50	2318.5	6.81
(-) 200:100	446.4	
(+) 200:100	2163.5	4.84

Εικόνα 3.14: Δείκτες πολλαπλασιασμού για κάθε ομάδα ποντικών. Οι ποσότητες στον οριζόντιο άξονα αναφέρονται στο αντιγόνο και το ανοσοενισχυτικό που χορηγήθηκαν ανά μν (μg:μg)

Οι θετικοί μάρτυρες, δηλαδή κύτταρα που διεγέρθηκαν *in vitro* με κονκαναβαλίνη Α, παρουσίασαν υψηλούς δείκτες πολλαπλασιασμού (τιμές μεταξύ 31 και 74). Τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος εμφανίζουν να υπάρχει σχετικά υψηλή ανοσοαπόκριση, σε κυτταρικό επίπεδο τουλάχιστον, στις αναλογίες αντιγόνου και ανοσοενυσχτικού 200:50 και 200:100.

3.6 Αποτελέσματα διαδερμικής ανοσοποίησης

3.6.1 1^ο Πείραμα

Προσδιορισμός μονάδων αντισωμάτων στους αντιορούς έναντι της Οβαλβουμίνης

Πρώτο βήμα της μελέτης αποτέλεσε ο προσδιορισμός των μονάδων των αντισωμάτων στους αντιορούς που συλλέχθηκαν από τα ζώα που ανοσοποιήθηκαν διαδερμικά με διάφορες μορφές του αντιγόνου και με βάση το πρωτόκολλο 2.4.6.

Εικόνα 3.15: Αποτελέσματα των ολικών ανοσοσφαιρινών IgG έναντι της Οβαλβουμίνης για κάθε μορφή ανοσοποίησης για τα δείγματα μετά την πρώτη αναμνηστική δόση (4^η εβδομάδα από την αρχική ανοσοποίηση)

Εικόνα 3.16: Αποτελέσματα των ολικών ανοσοσφαιρινών IgG έναντι της Οβαλβουμίνης για κάθε μορφή ανοσοποίησης για τα δείγματα μετά την δεύτερη αναμνηστική δόση (7^η εβδομάδα από την αρχική ανοσοποίηση).

Μετά την πρώτη αναμνηστική δόση (την τέταρτη εβδομάδα μετά την αρχική διαδερμική ανοσοποίηση), το διάλυμα της οβαλβουμίνης παρουσίασε υψηλότερη παραγωγή IgG από ότι το αιώρημα των νανοσφαιρών του ενκαψακιωμένου αντιγόνου ($p < 0.01$) και το διάλυμα της οβαλβουμίνης μαζί με την τοξίνη της χολέρας παρουσίασε υψηλότερη παραγωγή IgG από ότι το αιώρημα των νανοσφαιρών του ενκαψακιωμένου αντιγόνου και της τοξίνης της χολέρας ($p < 0.01$) (Εικόνα 3.15). Δύο εβδομάδες μετά την δεύτερη αναμνηστική δόση, (έβδομη εβδομάδα από την αρχική ανοσοποίηση), οι αποκρίσεις ήταν αυξημένες για όλες τις ομάδες σε σχέση με την πρώτη δειγματοληψία (Εικόνα 3.16). Οι νανοσφαίρες παρουσιάζουν τα ίδια επίπεδα IgG με το διάλυμα του αντιγόνου ($p > 0.05$). Παρόλα αυτά η ομάδα του αιωρήματος των νανοσφαιρών με το ανοσοενισχυτικό παρουσιάζει τα μεγαλύτερα επίπεδα IgG σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες και παρουσιάζει οριακά υψηλότερα επίπεδα IgG από το διάλυμα του αντιγόνου και του ανοσοενισχυτικού ($p > 0.05$). (Εικόνα 3.16)

Αναλύσεις σε κυτταρικό επίπεδο

Δύο εβδομάδες μετά την δεύτερη αναμνηστική δόση, απομονώθηκαν σπληνοκύτταρα από τις σπλήνες των πειραματόζωων. Τα σπληνοκύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία και απουσία του προς μελέτη αντιγόνου για 48 ώρες και μετρήθηκαν στα υπερκείμενα οι κυτταροκίνες IL-4, IL-10 και IFN- γ . Στους Πίνακες 3.6 – 3.8 των αποτελεσμάτων παριστάνονται με (-) τα δείγματα τα οποία δεν υπέστησαν in vitro διέγερση με το αντιγόνο ενώ με (+) τα κύτταρα που διεγέρθηκαν in vitro με αντιγόνο. Σε κάθε πλακίδιο 96 μικροφρατίων ELISA χρησιμοποιήθηκαν μικροφρεάτια για την δημιουργία πρότυπης καμπύλης της κυτταροκίνης με πρότυπα διαλύματα που παρέχονται από την εταιρεία. Ενδεικτικά θα παρουσιάζεται μια τέτοια πρότυπη καμπύλη για κάθε κυτταροκίνη στις Εικόνες 3.17, 3.19 και 3.21.

Ιντερφερόνη- γ (IFN- γ)

Η πρότυπη καμπύλη που ελήφθη για την IFN- γ παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.17 .

Εικόνα 3.17: Πρότυπη καμπύλη IFN- γ

Στον Πίνακα 3.6 φαίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων των επιπέδων της IFN- γ στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιεργιών.

Πίνακας 3.6: IFN- γ σε υπερκείμενα σπληνοκυττάρων

Μορφές χορήγησης	Μέση οπτική απορρόφηση	Συγκέντρωση (pg/ml)
(-) μη ανοσοποιημένα ζώα	0.085	11.65
(+) μη ανοσοποιημένα ζώα	0.846	392.07
(-) Διάλυμα Οβαλβουμίνης	0.086	10.97
(+) Διάλυμα Οβαλβουμίνης	0.855	396.55
(-) Διάλυμα ΟΒαλβουμίνης και Τοξίνης της Χολέρας	0.083	12.34
(+) Διάλυμα Οβαλβουμίνης και Τοξίνης της Χολέρας	0.361	149.97
(-) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης	0.085	11.77
(+) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης	1.118	528.09
(-) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης σε διάλυμα Τοξίνης της Χολέρας	0.086	12.44
(+) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης σε διάλυμα Τοξίνης της Χολέρας	1.333	635.93

Εικόνα 3.18: Επίπεδα IFN- γ στα υπερκείμενα των σπληνοκυττάρων για κάθε ομάδα ανοσοποίησης με και χωρίς in vitro διέγερση με το αντιγόνο

Ιντερλευκίνη 4 (IL-4)

Η πρότυπη καμπύλη που ελήφθη για την IL-4 παρουσιάζεται στη Εικόνα 3.19 .

Εικόνα 3.19: Πρότυπη καμπύλη IL-4

Στον Πίνακα 3.7 φαίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων των επιπέδων της IL-4 στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιιεργιών.

Πίνακας 3.7: IL-4 σε υπερκείμενα σπληνοκυττάρων

Μορφές χορήγησης	Μέση οπτική απορρόφηση	Συγκέντρωση (pg/ml)
(-) μη ανοσοποιημένα ζώα	0.105	2.95
(+) μη ανοσοποιημένα ζώα	0.107	3.22
(-) Διάλυμα Οβαλβουμίνης	0.107	3.21
(+) Διάλυμα Οβαλβουμίνης	0.112	3.78
(-) Διάλυμα ΟΒαλβουμίνης και Τοξίνης της Χολέρας	0.107	3.22
(+) Διάλυμα Οβαλβουμίνης και Τοξίνης της Χολέρας	0.120	4.81
(-) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης	0.107	3.22
(+) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης	0.112	3.83
(-) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης σε διάλυμα Τοξίνης της Χολέρας	0.106	3.05
(+) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης σε διάλυμα Τοξίνης της Χολέρας	0.129	5.98

Εικόνα 3.20: Επίπεδα IL-4 στα υπερκείμενα των σπληνοκυττάρων για κάθε ομάδα ανοσοποίησης με και χωρίς in vitro διέγερση με το αντιγόνο

Ιντερλευκίνη 10 (IL-10)

Η πρότυπη καμπύλη που ελήφθη για την IL-10 παροσιάζεται στην Εικόνα 3.21.

Εικόνα 3.21: Πρότυπη καμπύλη IL-10

Στον Πίνακα 3.8 φαίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων των επιπέδων της IL-10 στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιιεργιών.

Πίνακας 3.8: IL-10 σε υπερκείμενα σπληνοκυττάρων

Μορφές χορήγησης	Μέση οπτική απορρόφηση	Συγκέντρωση (pg/ml)
(-) μη ανοσοποιημένα ζώα	0.233	25.7
(+) μη ανοσοποιημένα ζώα	0.306	63
(-) Διάλυμα Οβαλβουμίνης	0.237	27.54
(+) Διάλυμα Οβαλβουμίνης	0.311	64.69
(-) Διάλυμα Οβαλβουμίνης και Τοξίνης της Χολέρας	0.240	29.02
(+) Διάλυμα Οβαλβουμίνης και Τοξίνης της Χολέρας	0.314	66.4
(-) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης	0.241	29.97
(+) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης	0.316	67.19
(-) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης σε διάλυμα Τοξίνης της Χολέρας	0.249	33.71
(+) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης σε διάλυμα Τοξίνης της Χολέρας	0.318	68.33

Εικόνα 3.22: Επίπεδα IL-10 στα υπερκείμενα των σπληνοκυττάρων για κάθε ομάδα ανοσοποίησης με και χωρίς in vitro διέγερση με το αντιγόνο

Από τα αποτελέσματα σε κυτταρικό επίπεδο φαίνεται ότι τα επίπεδα των κυτταροκινών IL-10 και IL-4 ήταν χαμηλά για όλες τις ομάδες ανοσοποιημένων μυών και δεν διέφεραν ουσιαστικά από τα επίπεδα IL-10 και IL-4 που λήφθηκαν με τα μη-ανοσοποιημένα ζώα, με εξαίρεση την ομάδα των νανοσφαιρών με το ανοσοενισχυτικό η οποία εμφάνισε ελαφρώς υψηλότερα επίπεδα IL-4 σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες (Εικόνες 3.20 και 3.22). Για την IFN- γ παρατηρείται αυξημένη παραγωγή της στις ομάδες με τις νανοσφαίρες και ειδικά στην ομάδα των νανοσφαιρών με το ανοσοενισχυτικό η οποία εμφάνισε την μεγαλύτερη παραγωγή IFN- γ από όλες τις άλλες μορφές χορήγησης (Εικόνα 3.18). Η ομάδα που ανοσοποιήθηκε με το διάλυμα του αντιγόνου συν ανοσοενισχυτικό παρουσιάζει την μικρότερη παραγωγή IFN- γ από όλες τις άλλες μορφές χορήγησης.

3.6.2 2^ο Πείραμα

Προσδιορισμός των επιπέδων των αντισωμάτων στους αντιορούς έναντι της Οβαλβουμίνης

Στις Εικόνες 3.23 – 3.27 παρουσιάζονται τα επίπεδα ολικής ανοσοσφαιρίνης IgG και οι λόγοι IgG1 προς IgG2a για τα εκάστοτε δείγματα. Επίσης στα γραφήματα παρουσιάζονται για άμεση σύγκριση και οι τρεις δειγματοληψίες, η πρώτη δειγματοληψία δύο εβδομάδες μετά την πρώτη ανοσοποίηση, η δεύτερη δειγματοληψία δύο εβδομάδες μετά την αναμνηστική δόση και η τρίτη δειγματοληψία δύο εβδομάδες μετά την υποδόρια αναμνηστική δόση, δηλαδή στην 2^η, την 4^η και 6^η εβδομάδα από την αρχική ανοσοποίηση αντίστοιχα.

Εικόνα 3.23 Μέτρηση των ολικών ανοσοσφαιρινών IgG έναντι της Οβαλβουμίνης 2 εβδομάδες μετά την αρχική ανοσοποίηση

Εικόνα 3.24: Μέτρηση των ολικών ανοσοσφαιρινών IgG έναντι της Οβαλβουμίνης 2 εβδομάδες μετά την αναμνηστική δόση (4^η εβδομάδα από την αρχική ανοσοποίηση).

Εικόνα 3.25: Μέτρηση των ολικών ανοσοσφαιρινών IgG έναντι της Οβαλβουμίνης 2 εβδομάδες μετά την υποδόρια ανοσοποίηση (6^η εβδομάδα από την αρχική ανοσοποίηση).

Εικόνα 3.26: Λόγος IgG1/IgG2a για τα δείγματα της 2^{ης} εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση.

Εικόνα 3.27: Λόγος IgG1/IgG2a για τα δείγματα της 4^{ης} εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση, δηλαδή κατόπιν της αναμνηστικής δόσης

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Εικόνων 3.23 – 3.27, παρατηρείται ότι δύο εβδομάδες μετά την αρχική διαδερμική ανοσοποίηση, οι νανοσφαίρες με το ενκαψακιωμένο αντιγόνο προκάλεσαν ελαφρώς υψηλότερη παραγωγή IgG από το διάλυμα της οβαλβουμίνης ($p > 0.05$) και το διάλυμα της οβαλβουμίνης μαζί με την τοξίνη της χολέρας παρουσίασε υψηλότερη παραγωγή IgG από ότι το αιώρημα των νανοσφαιρών του ενκαψακιωμένου αντιγόνου και της τοξίνης της χολέρας ($p < 0.001$). Δύο εβδομάδες μετά την αναμνηστική δόση, δηλαδή την τέταρτη εβδομάδα του πειράματος, οι αποκρίσεις ήταν αυξημένες για όλες τις ομάδες σε σχέση με την πρώτη δειγματοληψία, με την ομάδα του διαλύματος του αντιγόνου με το ανοσοενισχυτικό να παρουσιάζουν τα μεγαλύτερα επίπεδα αντισωμάτων σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες ($p < 0.001$). Δύο εβδομάδες κατόπιν της υποδόριας ανοσοποίησης, δηλαδή την έκτη εβδομάδα του πειράματος, οι αποκρίσεις αντισωμάτων IgG για όλες τις ομάδες ήταν αυξημένες σε σύγκριση με την δειγματοληψία της 4^{ης} εβδομάδας. Οι ποντικοί που ανοσοποιήθηκαν αρχικά διαδερμικά με τις διάφορες παρασκευές του αντιγόνου, παρουσίασαν μεγαλύτερη παραγωγή αντισωμάτων IgG κατόπιν της υποδόριας αναμνηστικής ανοσοποίησης, σε σύγκριση με τους ποντικούς που

δέχτηκαν μονάχα την υποδόρια. (Εικόνα 3.25). Όπως φαίνεται από τις εικόνες 3.26 και 2.27 όλες οι μορφές «εμβολίων» που χορηγήθηκαν εμφάνισαν IgG1/IgG2a λόγους κοντά στην μονάδα υποδεικνύοντας μία ισόρροπη ανοσοαπόκριση. Μοναδική εξαίρεση υπήρξε το διάλυμα οβαλβουμίνης με χολέρα τοξίνης που έδωσε υψηλούς σχετικά λόγους IgG1/IgG2a, υποδεικνύοντας μία ανοσοαπόκριση μετατοπισμένη προς Th2 κατεύθυνση.

Αναλύσεις σε κυτταρικό επίπεδο

Απομονώθηκαν σπληνοκύτταρα από τις σπλίνες των πειραματόζων που ανοσοποιήθηκαν διαδερμικά με διάφορες μορφές του αντιγόνου παρουσία ή απουσία ανοσοενισχυτικού. Τα σπληνοκύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία και απουσία του προς μελέτη αντιγόνου για 48 ώρες και μετρήθηκαν στα υπερκείμενα οι κυτταροκίνες IL-4, IL-10, IL-2 και IFN- γ . Στους Πίνακες 3.9 – 3.16 των αποτελεσμάτων παριστάνονται με (-) τα δείγματα τα οποία δεν υπέστησαν in vitro ενεργοποίηση με το αντιγόνο ενώ με (+) τα κύτταρα που διεγέρθηκαν in vitro με αντιγόνο. Επισημαίνεται ότι κυτταροκίνες και ο πολλαπλασιασμός των σπληνοκυττάρων μετρήθηκαν σε δύο στάδια του πειράματος, δηλαδή την 4^η και την 6^η εβδομάδα από την αρχική ανοσοποίηση.

Ιντερφερόνη- γ (IFN- γ)

Στον Πίνακα 3.9 φαίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων των επιπέδων της IFN- γ στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιεργιών για τα δείγματα της τέταρτης εβδομάδας.

Πίνακας 3.9: IFN- γ σε υπερκείμενα σπληνοκυττάρων των δειγμάτων της τέταρτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (2 εβδομάδες μετά την αναμνηστική δόση)

Μορφές χορήγησης	Μέση οπτική απορρόφηση	Συγκέντρωση (pg/ml)
(-) μη ανοσοποιημένα ζώα	0.117	10.2
(+) μη ανοσοποιημένα ζώα	0.129	16.46
(-) Διάλυμα Οβαλβουμίνης	0.116	9.97
(+) Διάλυμα Οβαλβουμίνης	0.596	249.51
(-) Διάλυμα Οβαλβουμίνης και Τοξίνης της Χολέρας	0.116	9.74
(+) Διάλυμα Οβαλβουμίνης και Τοξίνης της Χολέρας	0.226	84.77
(-) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης	0.116	9.80
(+) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης	0.501	202.34
(-) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης σε διάλυμα Τοξίνης της Χολέρας	0.117	10.26
(+) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης σε διάλυμα Τοξίνης της Χολέρας	1.093	497.8

Εικόνα 3.28 Επίπεδα IFN- γ στα υπερκείμενα των σπληνοκυττάρων για κάθε ομάδα ανοσοποίησης με και χωρίς in-vitro διέγερση με το αντιγόνο για τα δείγματα της τέταρτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (δείγματα δύο εβδομάδες μετά την αναμνηστική δόση)

Στον Πίνακα 3.10 φαίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων των επιπέδων της IFN- γ στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιιεργιών για τα δείγματα της έκτης εβδομάδας.

Πίνακας 3.10: IFN- γ σε υπερκείμενα σπληνοκυττάρων των δειγμάτων της έκτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (2 εβδομάδες μετά την υποδόρια ανοσοποίηση)

Μορφές χορήγησης	Μέση οπτική απορρόφηση	Συγκέντρωση (pg/ml)
(-) ανοσοποιημένα ζώα μόνο με υποδόρια ένεση	0.087	7.43
(+) ανοσοποιημένα ζώα μόνο με υποδόρια ένεση	0.110	18.63
(-) Διάλυμα Οβαλβουμίνης	0.086	6.58
(+) Διάλυμα Οβαλβουμίνης	0.104	15.83
(-) Διάλυμα Οβαλβουμίνης και Τοξίνης της Χολέρας	0.084	5.87
(+) Διάλυμα Οβαλβουμίνης και Τοξίνης της Χολέρας	0.243	82.28
(-) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης	0.085	6.06
(+) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης	0.132	29.81
(-) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης σε διάλυμα Τοξίνης της Χολέρας	0.086	6.94
(+) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης σε διάλυμα Τοξίνης της Χολέρας	0.408	167.74

Εικόνα 3.29: Επίπεδα IFN- γ στα υπερκείμενα των σπληνοκυττάρων για κάθε ομάδα ανοσοποίησης με και χωρίς in-vitro διεγερση με το αντιγόνο για τα δείγματα της έκτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (δύο εβδομάδες μετά την υποδόρια ανοσοποίηση)

Ιντερλευκίνη-4 (IL-4)

Στον Πίνακα 3.11 φαίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων των επιπέδων της IL-4 στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιιεργιών για τα δείγματα της τέταρτης εβδομάδας.

Πίνακας 3.11: IL-4 σε υπερκείμενα σπληνοκυττάρων των δειγμάτων της τέταρτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (2 εβδομάδες μετά την αναμνηστική δόση)

Μορφές χορήγησης	Μέση οπτική απορρόφηση	Συγκέντρωση (pg/ml)
(-) μη ανοσοποιημένα ζώα	0.075	3.56
(+) μη ανοσοποιημένα ζώα	0.076	3.66
(-) Διάλυμα Οβαλβουμίνης	0.074	3.37
(+) Διάλυμα Οβαλβουμίνης	0.076	3.68
(-) Διάλυμα Οβαλβουμίνης και Τοξίνης της Χολέρας	0.074	3.37
(+) Διάλυμα Οβαλβουμίνης και Τοξίνης της Χολέρας	0.081	4.78
(-) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης	0.075	3.56
(+) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης	0.080	4.45
(-) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης σε διάλυμα Τοξίνης της Χολέρας	0.083	5.06
(+) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης σε διάλυμα Τοξίνης της Χολέρας	0.097	8.01

Εικόνα 3.30: Επίπεδα IL-4 στα υπερκείμενα των σπληνοκυττάρων για κάθε ομάδα ανοσοποίησης με και χωρίς in-vitro διεγερση με το αντιγόνο για τα δείγματα της τέταρτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (δείγματα δύο εβδομάδες μετά την αναμνηστική δόση)

Στον Πίνακα 3.12 φαίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων των επιπέδων της IL-4 στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιιεργιών για τα δείγματα έκτης εβδομάδας.

Πίνακας 3.12: IL-4 σε υπερκείμενα σπληνοκυττάρων των δειγμάτων της έκτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (2 εβδομάδες μετά την υποδόρια ανοσοποίηση)

Μορφές χορήγησης	Μέση οπτική απορρόφηση	Συγκέντρωση (pg/ml)
(-) ανοσοποιημένα ζώα μόνο με υποδόρια ένεση	0.147	3.47
(+) ανοσοποιημένα ζώα μόνο με υποδόρια ένεση	0.149	3.66
(-) Διάλυμα Οβαλβουμίνης	0.144	3.22
(+) Διάλυμα Οβαλβουμίνης	0.147	3.47
(-) Διάλυμα Οβαλβουμίνης και Τοξίνης της Χολέρας	0.142	3
(+) Διάλυμα Οβαλβουμίνης και Τοξίνης της Χολέρας	0.159	4.45
(-) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης	0.139	2.79
(+) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης	0.152	3.84
(-) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης σε διάλυμα Τοξίνης της Χολέρας	0.142	3
(+) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης σε διάλυμα Τοξίνης της Χολέρας	0.176	5.86

Εικόνα 3.31: Επίπεδα IL-4 στα υπερκείμενα των σπληνοκυττάρων για κάθε ομάδα ανοσοποίησης με και χωρίς in-vitro διέγερση με το αντιγόνο για τα δείγματα της έκτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (δύο εβδομάδες μετά την υποδόρια ανοσοποίηση)

Ιντερλευκίνη-10 (IL-10)

Στον Πίνακα 3.13 φαίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων των επιπέδων της IL-10 στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιιεργιών για τα δείγματα της τέταρτης εβδομάδας.

Πίνακας 3.13: IL-10 σε υπερκείμενα σπληνοκυττάρων των δειγμάτων της τέταρτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (2 εβδομάδες μετά την αναμνηστική δόση)

Μορφές χορήγησης	Μέση οπτική απορρόφηση	Συγκέντρωση (pg/ml)
(-) μη ανοσοποιημένα ζώα	0.189	28.97
(+) μη ανοσοποιημένα ζώα	0.194	33.88
(-) Διάλυμα Οβαλβουμίνης	0.190	29.18
(+) Διάλυμα Οβαλβουμίνης	0.201	40.53
(-) Διάλυμα Οβαλβουμίνης και Τοξίνης της Χολέρας	0.187	26.98
(+) Διάλυμα Οβαλβουμίνης και Τοξίνης της Χολέρας	0.2	39.55
(-) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης	0.186	25.34
(+) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης	0.201	40.32
(-) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης σε διάλυμα Τοξίνης της Χολέρας	0.184	23.87
(+) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης σε διάλυμα Τοξίνης της Χολέρας	0.204	42.01

Εικόνα 3.32: Επίπεδα IL-10 στα υπερκείμενα των σπληνοκυττάρων για κάθε ομάδα ανοσοποίησης με και χωρίς in-vitro διεγερση με το αντιγόνο για τα δείγματα της τέταρτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (δύο εβδομάδες μετά την αναμνηστική δόση)

Στον Πίνακα 3.14 φαίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων των επιπέδων της IL-10 στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιεργιών για τα δείγματα της έκτης εβδομάδας.

Πίνακας 3.14: IL-10 σε υπερκείμενα σπληνοκυττάρων των δειγμάτων της έκτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (2 εβδομάδες μετά την υποδόρια ανοσοποίηση)

Μορφές χορήγησης	Μέση οπτική απορρόφηση	Συγκέντρωση (pg/ml)
(-) ανοσοποιημένα ζώα μόνο με υποδόρια ένεση	0.163	43.32
(+) ανοσοποιημένα ζώα μόνο με υποδόρια ένεση	0.172	57.11
(-) Διάλυμα Οβαλβουμίνης	0.162	40.36
(+) Διάλυμα Οβαλβουμίνης	0.167	49.09
(-) Διάλυμα Οβαλβουμίνης και Τοξίνης της Χολέρας	0.156	31.98
(+) Διάλυμα Οβαλβουμίνης και Τοξίνης της Χολέρας	0.168	50.99
(-) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης	0.155	30.33
(+) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης	0.165	46.17
(-) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης σε διάλυμα Τοξίνης της Χολέρας	0.156	31.22
(+) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης σε διάλυμα Τοξίνης της Χολέρας	0.169	51.83

Εικόνα 3.33: Επίπεδα IL-10 στα υπερκείμενα των σπληνοκυττάρων για κάθε ομάδα ανοσοποίησης με και χωρίς in-vitro διέγερση με το αντιγόνο για τα δείγματα της έκτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (δυο εβδομάδες μετά την υποδόρια ανοσοποίηση)

Ιντερλευκίνη-2 (IL-2)

Στη Εικόνα 3.34 παρουσιάζεται ενδεικτικά πρότυπη καμπύλη για την IL-2.

Πρότυπη καμπύλη IL-2

Εικόνα 3.34: Πρότυπη καμπύλη IL-2

Στον Πίνακα 3.15 φαίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων των επιπέδων της IL-2 στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιιεργιών για τα δείγματα της τέταρτης εβδομάδας.

Πίνακας 3.15: IL-2 σε υπερκείμενα σπληνοκυττάρων των δειγμάτων της τέταρτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (2 εβδομάδες μετά την αναμνηστική δόση)

Μορφές χορήγησης	Μέση οπτική απορρόφηση	Συγκέντρωση (pg/ml)
(-) μη ανοσοποιημένα ζώα	0.093	12.17
(+) μη ανοσοποιημένα ζώα	0.097	14.04
(-) Διάλυμα Οβαλβουμίνης	0.104	17.50
(+) Διάλυμα Οβαλβουμίνης	0.142	36.93
(-) Διάλυμα Οβαλβουμίνης και Τοξίνης της Χολέρας	0.107	19.49
(+) Διάλυμα Οβαλβουμίνης και Τοξίνης της Χολέρας	0.226	78.87
(-) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης	0.123	27.43
(+) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης	0.191	61.36
(-) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης σε διάλυμα Τοξίνης της Χολέρας	0.268	99.84
(+) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης σε διάλυμα Τοξίνης της Χολέρας	0.567	248.95

Εικόνα 3.35: Επίπεδα IL-2 στα υπερκείμενα των σπληνοκυττάρων για κάθε ομάδα ανοσοποίησης με και χωρίς in-vitro διέγερση με το αντιγόνο για τα δείγματα της τέταρτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (δύο εβδομάδες μετά την αναμνηστική δόση)

Στον Πίνακα 3.16 φαίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων των επιπέδων της IL-2 στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιιεργιών για τα δείγματα της έκτης εβδομάδας.

Πίνακας 3.16: IL-2 σε υπερκείμενα σπληνοκυττάρων των δειγμάτων της έκτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (2 εβδομάδες μετά την υποδόρια ανοσοποίηση)

Μορφές χορήγησης	Μέση οπτική απορρόφηση	Συγκέντρωση (pg/ml)
(-) ανοσοποιημένα ζώα μόνο με υποδόρια ένεση	0.098	20.98
(+) ανοσοποιημένα ζώα μόνο με υποδόρια ένεση	0.109	31.14
(-) Διάλυμα Οβαλβουμίνης	0.097	19.76
(+) Διάλυμα Οβαλβουμίνης	0.104	26.16
(-) Διάλυμα Οβαλβουμίνης και Τοξίνης της Χολέρας	0.093	15.92
(+) Διάλυμα Οβαλβουμίνης και Τοξίνης της Χολέρας	0.122	44.68
(-) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης	0.098	20.62
(+) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης	0.114	36.05
(-) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης σε διάλυμα Τοξίνης της Χολέρας	0.106	28.64
(+) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης σε διάλυμα Τοξίνης της Χολέρας	0.183	105.19

Εικόνα 3.36: Επίπεδα IL-2 στα υπερκείμενα των σπληνοκυττάρων για κάθε ομάδα ανοσοποίησης με και χωρίς in-vitro διέγερση με το αντιγόνο για τα δείγματα της έκτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (δυο εβδομάδες μετά την υποδόρια ανοσοποίηση)

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα για τα δείγματα της τέταρτης εβδομάδας (2 εβδομάδες μετά την αναμνηστική δόση) φαίνεται ότι οι φορτωμένες με αντιγόνο νανοσφαίρες παρουσιάζουν τα ίδια επίπεδα IL-2 και IFN- γ με το διάλυμα του αντιγόνου. Αντιθέτα οι φορτωμένες με αντιγόνο νανοσφαίρες με την τοξίνη της χολέρας εμφανίζουν σημαντικά μεγαλύτερες αποκρίσεις κυτταροκινών IL-2 και IFN- γ και λίγο μεγαλύτερα επίπεδα IL-4 από το διάλυμα του αντιγόνου συν το ανοσοενισχυτικό (Εικόνες 3.28, 3.30, 3.35). Όσον αφορά την IL-10 όλες οι ομάδες κυμαίνονται σε χαμηλά, παρόμοια μεταξύ τους επίπεδα (Εικόνα 3.32).

Μετά την υποδόρια ανοσοποίηση, τα επίπεδα των κυτταροκινών IL-2 και IFN- γ ήταν πολύ μεγαλύτερα για τις φορτωμένες με αντιγόνο νανοσφαίρες συν το ανοσοενισχυτικό σε σύγκριση με τις άλλες μορφές χορήγησης του αντιγόνου (Εικόνες 3.29, 3.36). Επίσης οι φορτωμένες με αντιγόνο νανοσφαίρες εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα IL-2 και IFN- γ από το διάλυμα του αντιγόνου απουσία του ανοσοενισχυτικού (Εικόνες 3.29, 3.36). Οι φορτωμένες με αντιγόνο νανοσφαίρες συν το ανοσοενισχυτικό εμφάνισαν λίγο υψηλότερα επίπεδα IL-4 από τις άλλες μορφές

χορήγησης του αντιγόνου (Εικόνα 3.31). Τα επίπεδα της κυτταροκίνης IL-10 ήταν για όλες τις ομάδες ουσιαστικά ίδια. (Εικόνα 3.33). Όλες οι ομάδες που είχαν υποστεί διαδερμική ανοσοποίηση, πλην αυτής στην οποία χορηγήθηκε διάλυμα οβαλβουμίνης (χωρίς ανοσοενισχυτικό), εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα IFN- γ και IL-2 (Εικόνες 3.29, 3.36) μετά την υποδόρια ανοσοποίηση σε σύγκριση με την ομάδα που υπέστη μόνο υποδόρια ανοσοποίηση.

Μελέτη πολλαπλασιασμού σπληνοκυττάρων κατόπιν in vitro διέγερσης

Στο Πίνακα 3.17 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που εξάχθηκαν από τις μετρήσεις των κρούσεων της θυμιδίνης κατόπιν in vitro διέγερσης των σπληνοκυττάρων με 50 $\mu\text{g/ml}$ της οβαλβουμίνης για τα δείγματα της τέταρτης (δύο εβδομάδες μετά την αναμνηστική διαδερμική δόση) και έκτης εβδομάδα του πειράματος (δύο εβδομάδες μετά την υποδόρια δόση). Για κάθε ομάδα εμφανίζεται ο αρνητικός μάρτυρας (-) και το αποτέλεσμα της διέγερσης (+). Επίσης παρουσιάζεται ο δείκτης πολλαπλασιασμού για την αντίστοιχη ομάδα.

Στο Πίνακα 3.17 και στην Εικόνα 3.37 παρατίθενται τα αποτελέσματα από τις μελέτες πολλαπλασιασμού των σπληνοκυττάρων που απομονώθηκαν από τα πειραματόζωα που ανοσοποιήθηκαν διαδερμικά. Η εκτίμηση της ειδικότητας και της έκτασης του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων έγινε με τον δείκτη πολλαπλασιασμού (Proliferation index).

Πίνακας 3.17: Αποτελέσματα του πολλαπλασιασμού των σπληνοκυττάρων της δειγματοληψίας της 4^{ης} εβδομάδας (2 εβδομάδες μετά την αναμνηστική δόση) κατόπιν in-vitro διέγερση με 50μg/ml Οβαλβουμίνη

Μορφές χορήγησης	Κρούσεις ³ H-θυμιδίνης	Δείκτης Πολλαπλασιασμού
(-) μη ανοσοποιημένα ζώα	1062.5	
(+) μη ανοσοποιημένα ζώα	1246,5	1.17
(-) Διάλυμα Οβαλβουμίνης	1970.7	
(+) Διάλυμα Οβαλβουμίνης	7.886.5	4
(-) Διάλυμα Οβαλβουμίνης και Τοξίνης της Χολέρας	1705.2	
(+) Διάλυμα Οβαλβουμίνης και Τοξίνης της Χολέρας	7543.8	4.42
(-) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης	3725.2	
(+) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης	10278.3	2.75
(-) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης σε διάλυμα Τοξίνης της Χολέρας	7301.2	
(+) Νανοσφαίρες Οβαλβουμίνης σε διάλυμα Τοξίνης της Χολέρας	36160.5	4.95

Εικόνα 3.37: Δείκτες πολλαπλασιασμού για κάθε ομάδα ανοσοποίησης για τα δείγματα της 4^{ης} εβδομάδας (2 εβδομάδες μετά την αναμνηστική δόση).

Με βάση τα αποτελέσματα του πολλαπλασιασμού των σπληνοκυττάρων ανοσοποιημένων πειραματόζώων μετά από *in vitro* διέγερση με το αντιγόνο (οβαλβουμίνη) φαίνεται πως με όλες τις μορφές χορήγησης οβαλβουμίνης που μελετήθηκαν αναπτύχθηκε ειδική ανοσοαπόκριση έναντι της οβαλβουμίνης.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το δέρμα αποτελεί τμήμα του επιθηλιακού συστήματος του σώματος, το οποίο λειτουργεί σαν φραγμός ενάντια σε ένα πιθανό εχθρικό περιβάλλον. Ως ένα ανοσολογικό εμπόδιο, το δέρμα λειτουργεί σαν πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στα αντιγόνα και παθογόνα του περιβάλλοντος. Για την επίτευξη αυτού του ρόλου, η επιφάνεια του δέρματος (η κερατίνη στοιβάδα) έχει ειδική δομή που αποτρέπει την είσοδο ξένων ουσιών στο δέρμα. Παράλληλα στο δέρμα υπάρχουν κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα κύτταρα Langerhans, που βρίσκονται σε μεγάλο πληθυσμό και αποτελούν τα δενδριτικά κύτταρα του δέρματος. Τα κύτταρα Langerhans συμμετέχουν στη ανοσολογική απόκριση λειτουργώντας ως αντιγονο-παρουσιαστικά κύτταρα με την πρόσληψη και επεξεργασία των αντιγόνων και την παρουσίαση αντιγονικών πεπτιδίων (επιτόπων) στα T βοηθητικά κύτταρα στους λεμφοαδένες.

Αν και είναι γενικά παραδεκτό ότι το δέρμα δεν είναι περατό από μεγαλομοριακές ενώσεις, και συνεπώς δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως οδός χορήγησης αντιγόνων, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το δέρμα μπορεί να αποτελέσει οδό για την χορήγηση αντιγόνων [77,82-85]. Οι Glenn και συνεργάτες [82] έδειξαν για πρώτη φορά το 1999 ότι η χορήγηση οραλβουμίνης βοός (BSA) και τοξίνης της διφθερίτιδας (DT) οδήγησε στην ανάπτυξη ισχυρών ανοσοαποκρίσεων όταν παράλληλα με το αντιγόνο συνχορηγείτο κατάλληλο ανοσοενισχυτικό, όπως η τοξίνη της χολέρας. Επιπρόσθετα, η τοξίνη της χολέρας δεν εμφανίζει σημάδια τοξικότητας όταν εφαρμόζεται σε άθικτο δέρμα. Η οδός διείσδυσης των ουσιών έχει προταθεί ότι είναι μέσω των θυλάκων των τριχών, καθώς η κερατίνη στοιβάδα όπως αναφέρθηκε δεν επιτρέπει την είσοδο ουσιών με μοριακά βάρη μεγαλύτερα των 500 Dalton [77]. Παράλληλα η χολέρα τοξίνη λειτουργεί και ως ανοσοενισχυτικό αλλά μεταβάλλει ταυτοχρόνως την διαπερατότητα της κερατίνης στοιβάδας, υποβοηθώντας την είσοδο μεγαλομορίων.

Η διαδερμική χορήγηση εμβολίων εμφανίζει αρκετά πλεονεκτήματα [225], όπως:

- 1ο. Αποφεύγεται η χρήση ενέσεων, μειώνοντας τον κίνδυνο μολύνσεων προερχόμενων από το αίμα όπως ο ιός της ηπατίτιδας B
- 2ο. Δεν απαιτείται ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό για την χορήγηση του εμβολίου
- 3ο. Είναι πιο οικονομική

Στις διάφορες μορφές διαδερμικής χορήγησης που έχουν ήδη μελετηθεί, έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετοί φορείς όπως τα λιποσώματα, τα βιροσώματα (viroosomes), τα τρανσφεροσώματα (tranferosomes) και οι μικροσφαίρες [61]. Για παράδειγμα, λιποσώματα με διάμετρο μεταξύ των 20 και 200 nm βρέθηκαν ότι είναι ικανοί φορείς για τοπική εφαρμογή φαρμάκων με στόχο την ζωντανή επιδερμίδα μέσα από τα διάκενα των κερατινοποιημένων κυττάρων της κερατίνης στοιβάδας [78,79]. Σε μια άλλη περίπτωση, κατόπιν απομάκρυνσης των ανωτέρω στρωμάτων της επιδερμίδας και αφαίρεση των τριχών χρησιμοποιώντας κυανοακρυλική μεμβράνη, η εφαρμογή μικρών νανοσωματιδίων (40nm) οδήγησε στην εισχώρηση τους στους ανοιχτούς θύλακες των τριχών

Η χορήγηση υποδορίως αντιγόνων εγκλεισμένων σε PLGA μικροσφαίρες και νανοσφαίρες έχει ευρεθεί ότι επάγει ισχυρή και μακράς διάρκειας ανοσοαπόκριση. Αυτό οφείλεται για παράδειγμα ότι τα αντιγόνα προφυλάσσονται και δεν αποικοδομούνται από τα βιολογικά υγρά. Επίσης το μικροσωματίδιο λειτουργεί ως δεξαμενή και προκαλεί μια αργή και σταθερή αποδέσμευση του εγκλωβισμένου αντιγόνου. Παράλληλα έχει δείχθει ότι τα μικροσωματίδια προσλαμβάνονται από μια ποικιλία φαγοκυτταρικών αντιγονοπαρουσιαστικών κύτταρων, με αποτέλεσμα μεγαλύτερη ποσότητα του αντιγόνου να εισάγεται σε αυτά [89-92].

Μέχρι σήμερα δεν έχει μελετηθεί η δυνατότητα διαδερμικής χορήγησης αντιγόνων εγκλεισμένων σε πολυμερικά νανοσωματίδια, όπου θα επιφέρει αρκετά πλεονεκτήματα, όπως η προστασία του αντιγόνου κατά την πορεία του προς τα κατώτερα στρώματα του δέρματος και ότι τα νανοσωματίδια θα λειτουργούν ως δεξαμενές αργής αποδέσμευσης του αντιγόνου. [50, 51]. Έτσι, στην παρούσα μελέτη μελετήθηκε η ανοσοαπόκριση που λαμβάνεται μετά την διαδερμική χορήγηση οβαλβουμίνης (OVA) εγκλεισμένης σε νανοσφαίρες πολύ-γαλακτικού οξέως (PLA) σε BALB/c μύες. Επίσης διερευνήθηκε ο πιθανός μηχανισμός εισόδου των νανοσφαιρών στο άθικτο δέρμα των μυών.

Η οβαλβουμίνη (45 kDa) έχει χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο αντιγόνο σε αρκετές ανοσολογικές μελέτες στις οποίες μελετάται η επίδραση του συστήματος χορήγησης όπως τα λιποσώματα και οι πολυμερικές μικροσφαίρες [207,232]. Αποτελεί μια

γλυκοπρωτεΐνη που βρίσκεται στο ασπράδι του αυγού. Η δομή της έχει μελετηθεί πλήρως και ανήκει δομικά στην οικογένεια αναστολέων πρωτεάσης σερίνης, αλλά δεν επιδεικνύει καμιά αναστολή πρωτεασών. Η τοξίνη της χολέρας (86 kDa) είναι μια πρωτεϊνική εντεροτοξίνη που προέρχεται από το βακτήριο *vibrio cholerae*. Αποτελείται από δύο υπομονάδες, την υπομονάδα A και υπομονάδα B. Η υπομονάδα B είναι ένα πενταμερές, δηλαδή αποτελείται από πέντε πανομοιότυπα πολυπεπτίδια (11.6 kDa). Έχει σαν σκοπό την σύνδεση του μορίου στα κύτταρα και υποβοηθά την είσοδο την υπομονάδας A (28 kDa) στο εσωτερικό του κυττάρου, η οποία αποτελεί το τοξικό κομμάτι του μορίου. Η τοξίνη της χολέρας διαθέτει ισχυρές ανοσοενισχυτικές ιδιότητες όταν εφαρμόζεται στους βλεννογόνους (αναφορές) ενώ πρόσφατα, όπως έχει ήδη αναφερθεί, βρέθηκε ότι δρα ως ισχυρό ανοσοενισχυτικό αντιγόνων που χορηγούνται διαδερμικά [82-85].

Για τη παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σε πρώτο στάδιο σύνθεση πολυγαλακτικού οξέος (PLA) το οποίο χαρακτηρίστηκε ως προς το μοριακό του βάρος (139.000) με χρωματογραφία διαπέρασης πηκτής και ως προς την καθαρότητα του με πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό ($^1\text{H-NMR}$). Επίσης νανοσφαίρες PLA με ενκαψακωμένη οβαλβουμίνη παρασκευάστηκαν με την μέθοδο του διπλού γαλακτώματος και χαρακτηρίστηκαν ως προς την μορφολογία με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, το μέγεθος με την τεχνική σκέδασης φωτός και ως προς την φόρτωση σε αντιγόνο με την μέθοδο του δικιγχονικού οξέος (BCA).

Σε προκαταρκτικά πειράματα ελέγχθηκε η διατήρηση της αντιγονικότητας της οβαλβουμίνης με εξειδικευμένη ανοσοενζυμομετρική μέθοδο ELISA για να ελεγχθεί αν η διαδικασία ενκαψακίωσης της επηρεάζει την αντιγονικότητα της. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι η ενκαψακίωση της οβαλβουμίνης στις νανοσφαίρες προκάλεσε περίπου 30% μείωση της αντιγονικότητας της πρωτεΐνης. Οι έντονες διατμητικές δυνάμεις που δημιουργούνται κατά την υπερήχηση και η έκθεση σε διεπιφάνεια υδατικού/οργανικού διαλύτη κατά τη διάρκεια της γαλακτοματοποίησης θεωρούνται οι κύριοι λόγοι για την μερική απώλεια της αντιγονικότητας της ενκαψακωμένης οβαλβουμίνης. Η μέθοδος παρασκευής των νανοσφαιρών που τελικώς επιλέχθηκε, δηλαδή με την χρήση του διχλωρομεθανίου ως οργανική φάση, παρουσίασε ικανοποιητική διατήρηση της αντιγονικής δράσης της οβαλβουμίνης, μεγαλύτερη φόρτωση των νανοσφαιρών σε αντιγόνο και καλή

απόδοση της παρασκευής σε τελική ποσότητα νανοσφαιρών που παραλαμβάνονται. Οι διαφορές στο (μέσο) μέγεθος των νανοσφαιρών που παρασκευάστηκαν κάτω από διαφορετικές μεθόδους υπήρξαν μικρές (Εικόνα 3.7).

Στην συνέχεια μελετήθηκε η ικανότητα των νανοσφαιρών να εισχωρούν στο δέρμα μυών. Για αυτή την μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αρχικά κενές νανοσφαίρες φθορίζοντος πολυμερούς PLA-pyren-butanol (μονο-επισημασμένες) και νανοσφαίρες φθορίζοντος πολυμερούς PLA-pyren-butanol με ενκαψακωμένη ροδαμίνη (διπλά-επισημασμένες). Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια φθορίζοντος μικροσκοπίου, όπου σε άθικτο δέρμα μυών εφαρμόστηκαν οι νανοσφαίρες και κατόπιν δείγματα του ιστού επεξεργάστηκαν και κόπηκαν με την βοήθεια μικροτόμου παραφίνης για την παρατήρηση όλων των στοιβάδων του ιστού στο μικροσκόπιο. Σύμφωνα με την Εικόνες 3.8 – 3.11 παρατηρείται ότι οι νανοσφαίρες έχουν εισχωρήσει στις εσωτερικές στοιβάδες του ιστού, σε στοιβάδες αρκετά πιο βαθιά από την κερατίνη στοιβάδα. Επειδή στο μήκος κύματος που διεγείρεται η πυρεν-βουτανόλη, ο αυτοφθορισμός από το δέρμα είναι ελάχιστος, με εξαίρεση τις τρίχες και τους θύλακες τους (Εικόνα 3.8), η παρατήρηση των νανοσφαιρών στο εσωτερικό του ιστού είναι εφικτή (Εικόνα 3.9). Παρόλα αυτά η διπλή επισήμανση των νανοσφαιρών με δύο φθορίζουσες ουσίες διευκόλυνε στην πιο ακριβή αξιολόγηση των εικόνων, κάνοντας φανερό ότι στα σημεία όπου υπάρχει ο φθορισμός στο μήκος κύματος της πυρεν-βουτανόλης, οφείλεται πράγματι στις νανοσφαίρες, καθώς στα ίδια σημεία υπάρχει έντονος φθορισμός και στο μήκος κύματος της ροδαμίνης (Εικόνες 3.10 – 3.11), επιβεβαιώνοντας ότι οι νανοσφαίρες έχουν την δυνατότητα να εισχωρούν στο δέρμα.

Στην συνέχεια μελετήθηκε η οδός που επιλέγουν οι νανοσφαίρες για την είσοδο τους στο δέρμα. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκαν νανοσφαίρες PLA με ενκαψακωμένη φθορίζουσα FITC-albumin. Η μελέτη περιελάμβανε την εφαρμογή των νανοσφαιρών επί άθικτου δέρματος μυών, την λήψη των ιστών από τους μύες και χωρίς επεξεργασία των ιστών, την κοπή τους με την βοήθεια κρυοτόμου. Στην μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης (confocal laser microscopy). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.13 οι νανοσφαίρες εμφανίστηκαν ικανές να διεισδύουν στο εσωτερικό του δέρματος μέσω των θυλάκων των τριχών του ιστού ενώ δεν παρατηρήθηκε άλλη οδός εισόδου των νανοσφαιρών στο εσωτερικό του

δέρματος. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με αποτελέσματα προηγούμενων *in vitro* μελετών σε χοίρειο και ανθρώπινο δέρμα [227]. Στην παρούσα μελέτη όμως γίνεται για πρώτη φορά απόδειξη της ικανότητας των νανοσφαιρών να εισέρχονται στο δέρμα μέσω των θυλάκων των τριχών με *in vivo* πειράματα.

Γνωρίζοντας πλέον ότι η ενκαψακίωση της OVA στις PLA νανοσφαίρες δεν συνοδεύεται από μεγάλες απώλειες στην αντιγονικότητα της και ότι οι νανοσφαίρες έχουν την δυνατότητα να εισχωρήσουν στο εσωτερικό του δέρματος των μυών, προχωρήσαμε στην μελέτη της ανοσοαπόκρισης που λαμβάνεται μετά από διαδερμική χορήγηση OVA εγκαψακισμένης σε PLA μικροσφαίρες. Οι βέλτιστες δόσεις του αντιγόνου και του ανοσοενισχυτικού που είναι κατάλληλες για τα πρωτόκολλα ανοσοποίησης καθορίστηκαν με την μέτρηση του πολλαπλασιασμού των σπληνοκυττάρων μυών 3 εβδομάδες κατόπιν διαδερμικής εφαρμογής διαφορετικών ποσοτήτων εγκαψακισμένου αντιγόνου και ανοσοενισχυτικού. Οι αναλογίες που παρουσίασαν τον μεγαλύτερο πολλαπλασιασμό των σπληνοκυττάρων βρέθηκαν ότι είναι 200 μ g οβαλβουμίνης και 50 ή 100 μ g της τοξίνης της χολέρας, (Εικόνα 3.14). Αυτές οι αναλογίες αντιγόνου/ανοσοενισχυτικού επιλέχτηκαν για την μελέτη της ανοσοαπόκρισης που λαμβάνεται κατόπιν διαδερμικής χορήγησης εγκαψακισμένου σε PLA νανοσφαίρες αντιγόνου.

Για την ανίχνευση της ειδικής ανοσοαπόκρισης μελετήθηκαν αντιοροί προς την ολική IgG και των ισοτύπων IgG1 και IgG2a έναντι της οβαλβουμίνης. Επίσης πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε κυτταρικό επίπεδο στα σπληνοκύτταρα που ελήφθησαν από τους μύες οι οποίοι ανοσοποιήθηκαν διαδερμικά, με την μέτρηση του πολλαπλασιασμού των σπληνοκυττάρων. Παράλληλα μετρήθηκαν τα επίπεδα των κυτταροκινών (IL-4, IL-10, IFN- γ και IL-2) στα υπερκείμενα καλλιέργειών των σπληνοκυττάρων κατόπιν *in-vitro* διέγερσης με το αντιγόνο. Τα επίπεδα των αντισωμάτων μετρήθηκαν με ειδικές ανοσοενζυμομετρικές αναλύσεις ELISA και πραγματοποιήθηκε σύγκριση τους με τα επίπεδα των αντισωμάτων από αντιορούς υπερανοσοποιημένων ζώων, από όπου εξάχθηκαν οι μονάδες των αντισωμάτων (antibody units). Τα επίπεδα των κυτταροκινών μετρήθηκαν επίσης με ανοσοενζυμομετρικές μεθόδους ELISA ειδικές για κάθε κυτταροκίνη. Η ικανότητα πολλαπλασιασμού των σπληνοκυττάρων κατόπιν διέγερσης με το αντιγόνο μελετήθηκε μετά από ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης. Ως αρνητικοί μάρτυρες

υπήρξαν τα κύτταρα χωρίς την παρουσία του αντιγόνου και ως θετικοί μάρτυρες τα κύτταρα με διέγερση με μιτογόνο κονκαναβαλίνη A.

Στο πρώτο πείραμα ανοσοποίησης των μυών με διαφορετικές μορφές αντιγόνου (ενκαψακιωμένο ή ελεύθερο, παρουσία ή απουσία ανοσοενισχυτικού), οι νανοσφαίρες με το αντιγόνο παρουσίασαν παρόμοια επίπεδα ολικών αντισωμάτων IgG με την οβαλβουμίνη σε διάλυμα (Εικόνες 3.15, 3.16). Επιπρόσθετα και με τις δύο μορφές χορήγησης του αντιγόνου (διάλυμα και νανοσφαίρες) η συγχορήγηση της τοξίνης της χολέρας προκάλεσε αύξηση της παραγωγής αντισωμάτων IgG. Μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε στην περίπτωση των νανοσφαιρών (Εικόνες 3.15, 3.16). Όσον αφορά την διαδερμική χορήγηση του ελεύθερου αντιγόνου, το αποτέλεσμα της αύξησης της παραγωγής των αντισωμάτων με την συγχορήγηση του ανοσοενισχυτικού έρχεται σε συμφωνία με αποτελέσματα παλαιότερων μελετών με διαφορετικά αντιγόνα [82-85]. Φαίνεται πάντως από τα αποτελέσματα που λήφθηκαν και με το ενκαψακιωμένο αντιγόνο ότι η παρουσία του ανοσοενισχυτικού είναι απαραίτητη για την επαγωγή ισχυρής χυμικής ανοσοαπόκρισης. Επίσης τα επίπεδα των αντισωμάτων από τους μύες στους οποίους χορηγήθηκε αντιγόνο υπήρξαν αρκετά μεγαλύτερα σε σύγκριση με τα επίπεδα των αντισωμάτων από μύες που δεν ανοσοποιήθηκαν με καμία μορφή του αντιγόνου, υποδεικνύοντας την ειδικότητα της ανοσοαπόκρισης (Εικόνες 3.15, 3.16) .

Τα αποτελέσματα του πειράματος σε κυτταρικό επίπεδο δείχνουν ότι οι νανοσφαίρες με ενκαψακιωμένο αντιγόνο παρουσίασαν ελαφρώς υψηλότερα επίπεδα παραγωγής IFN- γ από το διάλυμα του αντιγόνου και παρόμοια επίπεδα IL-4 και IL-10 με το διάλυμα του αντιγόνου (Εικόνες 3.18, 3.20, 3.22). Σε αντίθεση οι νανοσφαίρες με το ενκαψακιωμένο αντιγόνο συν το ανοσοενισχυτικό προκάλεσαν αρκετά υψηλότερες αποκρίσεις IFN- γ σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες μορφές χορήγησης. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν υπεροχή του ενκαψακιωμένου αντιγόνου σε σύγκριση με το ελεύθερο όσο αφορά τις κυτταρικές αποκρίσεις.

Στο δεύτερο μέρος της μελέτης διερευνήθηκε πρωταρχικά η ικανότητα της διαδερμικής χορήγησης ενκαψακιωμένου και μη-ενκαψακιωμένου αντιγόνου (OVA) να επάγει αυξημένη ανοσοαπόκριση μετά από μετέπειτα «πρόκληση» με το αντιγόνο (priming efficiency) και δευτερευόντως η ανοσοαπόκριση που λαμβάνεται με την

συνχορήγηση μικρότερης δόσης ανοσοενισχυτικού (50μg τοξίνης της χολέρας ανά μν αντί για 100 μg που ήταν στο πρώτο μέρος της μελέτης). Διαπιστώθηκε ότι η συνχορήγηση έστω και μικρότερης δόσης ανοσοενισχυτικού προκαλεί βελτίωση της ανοσοαπόκρισης σε αντισώματα, ιδιαίτερα στην περίπτωση του ελεύθερου αντιγόνου (διάλυμα OVA) (Εικόνες 3.23 και 3.24). Πιο σημαντικό όμως ίσως είναι ότι τα επίπεδα ολικής IgG μετά από υποδόρια χορήγηση OVA (δόση «πρόκλησης» 50 μg ανά μν) σε μύες που είχαν ήδη ανοσοποιηθεί με δύο διαδερμικές δόσεις ενκαψακιωμένης και μη-ενκαψακιωμένης OVA ήταν υψηλότερα (περίπου διπλάσια με όλες τις μορφές χορήγησης) από τα επίπεδα ολικής IgG που λήφθηκαν από μύες που δέχτηκαν μονάχα την υποδόρια δόση με το αντιγόνο (Εικόνα 3.25). Αυτό υποδεικνύει ότι πράγματι η διαδερμική χορήγηση αντιγόνου, είτε σε μορφή υδατικού διαλύματος είτε ενκαψακιωμένου σε PLA νανοσφαίρες, επάγει αυξημένη ανοσοαπόκριση μετά από μετέπειτα «πρόκληση» με το αντιγόνο, δηλαδή φαίνεται να είναι ικανή να επάγει ανοσολογική μνήμη έναντι του αντιγόνου.

Σε κυτταρικό επίπεδο, οι νανοσφαίρες παρουσίασαν ελαφρώς υψηλότερα επίπεδα παραγωγής IFN-γ και IL-2 από το διάλυμα του αντιγόνου ενώ επέδειξαν παρόμοια επίπεδα IL-4 και IL-10 με το διάλυμα του αντιγόνου (Εικόνες 3.28-3.33, 3.35, 3.36). Τα επίπεδα των IFN-γ και IL-2 που μετρήθηκαν για τις νανοσφαίρες με το αντιγόνο συν το ανοσοενισχυτικό ήταν σημαντικά υψηλότερα από όλες τις άλλες μορφές χορήγησης του αντιγόνου (Εικόνες 3.28, 3.29, 3.35, 3.36). Με βάση τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι σε κυτταρικό επίπεδο η διαδερμική χορήγηση του αντιγόνου ενκαψακιωμένου σε PLA νανοσφαίρες πλεονεκτεί της χορήγησης του ελεύθερου αντιγόνου (δηλ. υπό μορφή υδατικού διαλύματος). Τα αυξημένα επίπεδα IFN-γ και IL-2 με την ενκαψακιωμένη μορφή του αντιγόνου είναι πιθανόν να σχετίζονται με αλλαγή της ισορροπίας της ανοσοαπόκρισης προς μία περισσότερο Th1 κατεύθυνση. Οι διαφορές που προκύπτουν στην ανοσογονική συμπεριφορά μεταξύ της ενκαψακιωμένης οβαλβουμίνης στις νανοσφαίρες και της ελεύθερης οβαλβουμίνης μπορεί να οφείλονται στον διαφορετικό τρόπο πρόσληψης και παρουσίας του αντιγόνου από τα ανοσοπαρουσιαστικά κύτταρα, καθώς με κάθε νανοσφαίρα που λαμβάνεται από τα κύτταρα περισσότερη ποσότητα αντιγόνου εισχωρεί σε αυτά και η ενδοκυτταρική πορεία και επεξεργασία του αντιγόνου είναι διαφορετική [89-92]. Για να μπορούν να εκδηλωθούν αυτές οι διαφορές στην ανοσογονική συμπεριφορά μεταξύ του ελεύθερου και του ενκαψακιωμένου αντιγόνου θα πρέπει από την στιγμή

της χορήγησης μέχρι την πρόσληψη του από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα το αντιγόνο να παραμένει ενκαψακιωμένο μέσα στις νανοσφαίρες, δηλαδή να μην διαρρέει από αυτές. Πράγματι, με βάση τα αποτελέσματα που λήφθηκαν *in vitro* (Εικόνα 3.12), οι φορτωμένες με αντιγόνο (οβαλβουμίνη) PLA νανοσφαίρες είχαν πολύ μικρή απώλεια αντιγόνου μέσα σε μία περίοδο 24 ωρών.

Η διαδερμική χορήγηση του αντιγόνου ενκαψακιωμένου σε PLA νανοσφαίρες δεν παρείχε σημαντικό πλεονέκτημα όσον αφορά την χυμική ανοσοαπόκριση (παραγωγή αντισωμάτων) σε σύγκριση με την διαδερμική χορήγηση ελεύθερου αντιγόνου. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η διαδικασία της ενκαψακίωσης της οβαλβουμίνης προκάλεσε μείωση της αντιγονικότητάς της κατά 30% περίπου (Εικόνα 3.7), είναι πιθανόν με την βελτιστοποίηση της παρασκευής των νανοσφαιρών ώστε να μην συμβαίνει απώλεια της αντιγονικότητας του αντιγόνου να μπορούν να ληφθούν ακόμη ισχυρότερες χυμικές αποκρίσεις με το ενκαψακιωμένο στις PLA νανοσφαίρες αντιγόνο.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με βάση τα αποτελέσματα που λήφθηκαν στην παρούσα μελέτη μπορούν να εξαχθούν τα παρακάτω συμπεράσματα:

- 1) Οι PLA νανοσφαίρες με μέσο μέγεθος περίπου 150 nm είναι ικανές να εισχωρούν στο δέρμα μυών *in vivo* μέσω των θυλάκων των τριχών.
- 2) Οι νανοσφαίρες με ενκαψακιωμένη οβαλβουμίνη, όταν χορηγούνται διαδερμικά, προκαλούν χυμικές αποκρίσεις (παραγωγή αντισωμάτων) συγκρίσιμες με αυτές που λαμβάνονται με ίδια δόση οβαλβουμίνης σε υδατικό διάλυμα, παρά το ότι η ενκαψακίωση του αντιγόνου βρέθηκε να οδηγεί σε μερική απώλεια της αντιγονικότητας του.
- 3) Η διαδερμική χορήγηση αντιγόνου, είτε σε μορφή υδατικού διαλύματος είτε ενκαψακιωμένου σε PLA νανοσφαίρες, βρέθηκε να επάγει αυξημένη ανοσοαπόκριση μετά από μετέπειτα «πρόκληση» με το αντιγόνο, δηλαδή φαίνεται να είναι ικανή να επάγει ανοσολογική μνήμη έναντι του αντιγόνου.
- 4) Τα σπληνοκύτταρα μυών που ανοσοποιήθηκαν διαδερμικά με PLA νανοσφαίρες οβαλβουμίνης συν το ανοσοενισχυτικό παρήγαγαν σχετικά υψηλά επίπεδα IFN- γ και IL-2, κατόπιν *in vitro* διέγερσης με το αντιγόνο. Αυτή η κατά προτίμηση διέγερση της παραγωγής IFN- γ και IL-2 με την διαδερμική χορήγηση του αντιγόνου ενκαψακιωμένου σε πολυμερικές νανοσφαίρες μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στην αντιμετώπιση ενδοκυτταρικών παθογόνων.
- 5) Γενικά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το σύστημα διαδερμικής χορήγησης του αντιγόνου (η σύνθεση του διαδερμικού «εμβολίου») έχει σημαντική επίδραση στην λαμβανόμενη ανοσοαπόκριση και δικαιολογούν την περαιτέρω μελέτη της χρησιμότητας των PLA νανοσφαιρών στην διαδερμική χορήγηση αντιγόνων.

6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

6.1 Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1.1: Παρουσίαση της σταθερής και της μεταβλητής περιοχής ενός αντισώματος.....	19
Εικόνα 1.2: Δομή αντισώματος IgG2a.....	21
Εικόνα 1.3: Μόρια MHC I (αριστερά) και II (δεξιά).....	25
Εικόνα 1.4: Τα οπτικά ισομερή του γαλακτικού οξέως.....	36
Εικόνα 1.5: Οι διαστερεοϊσομερείς μορφές του γαλακτιδίου.....	37
Εικόνα 1.6: Πολυμερισμός πολύ(γαλακτικού οξέως).....	38
Εικόνα 1.7: Πιθανός μηχανισμός κατάλυσης του 2-(2-αίθυλ-εξανοϊκός) κασσίτερος.....	39
Εικόνα 1.8: Βήματα παρασκευής νανοσωματιδίων με την μέθοδο γαλακτώματος/εξάτμισης διαλύτη.....	48
Εικόνα 1.9: Βήματα παρασκευής νανοσωματιδίων με την μέθοδο εκτόπισης διαλύτη.....	50
Εικόνα 1.10: Βήματα παρασκευής νανοσωματιδίων με την μέθοδο εξαλάτωσης.....	51
Εικόνα 1.11: Δομή του δέρματος.....	62
Εικόνα 1.12: Δομή κερατίνης στοιβάδας. Οι δύο οδοί εισχώρησης ουσιών διαμέσω αυτής.....	64
Εικόνα 1.13: Μέθοδοι χορήγησης εμβολίων στο δέρμα, το οποίο είναι πλούσιο σε αντιγονοπαροσιαστικά κύτταρα.....	66
Εικόνα 1.14: Δομή μορίου οβαλβουμίνης.....	73
Εικόνα 1.15: Δομή του μορίου της τοξίνης της χολέρας.....	75
Εικόνα 2.1: Πρότυπη καμπύλη του λογάριθμου των μοριακών βαρών ως προς τον χρόνο έκλυσης.....	88
Εικόνα 2.2: Πρότυπη καμπύλη BCA του αντιγόνου Οβαλβουμίνη σε διαλύτη NaOH 0.2N.....	92
Εικόνα 3.1: ^1H -NMR των μονομερών dl-lactide.....	111
Εικόνα 3.2: ^1H -NMR πολυμερούς PLA.....	111
Εικόνα 3.3: ^1H -NMR πολυμερούς PLA-pyrene butanol.....	112
Εικόνα 3.4: Γράφημα GPC για το πολυμερές του πολύ-γαλακτικού οξέως.....	112
Εικόνα 3.5: Μικροφωτογραφία νανοσφαιρών Οβαλβουμίνης από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.....	114
Εικόνα 3.6: Νανοσφαίρες όπως φαίνονται στο AFM.....	115

Εικόνα 3.7: Ποσοστό διατήρησης αντιγονικής δράσης της ενκαψακιωμένης οβαλβουμίνης για τις διάφορες παρασκευές των νανοσφαιρών.....	116
Εικόνα 3.8: Δέρμα Αρνητικός Μάρτυρας. Α) σε απλό φώς, Β) στο μήκος κύματος της πυρεν-βουτανόλης-1	118
Εικόνα 3.9: Δέρμα με κενές νανοσφαίρες PLA – pyrene-butanol Α) σε απλό φώς, Β) στο μήκος κύματος της πυρεν-βουτανόλης-1	118
Εικόνα 3.10: Δέρμα με νανοσφαίρες PLA-pyrene-butanol που περιέχουν ενκαψακιωμένη ροδαμίνη Α) σε απλό φώς, Β) στο μήκος κύματος της πυρεν-βουτανόλης-1, C) στο μήκος κύματος της ροδαμίνης D) αλληλοεπικάλυψη των φωτογραφιών Β και C.....	119
Εικόνα 3.11: Μεγέθυνση του κεντρικού τμήματος των φωτογραφιών Β και C αντίστοιχα της Εικόνας 3.10.....	119
Εικόνα 3.12: Καμπύλη αποδέσμευσης φθορίζουσας αλβουμίνης (FITC-albumin) από PLA νανοσφαίρες.	120
Εικόνα 3.13: Τομές δέρματος μυος σε συνεστικάκό μικροσκόπιο, Α) Χωρίς νανοσφαίρες στο μήκος κύματος των 568 nm, Β) Χωρίς νανοσφαίρες στα 488nm (FITC), C) Αλληλοεπικάλυψη των Α και Β, D) και G) με νανοσφαίρες στα 568 nm, E) και H) με νανοσφαίρες στα 488 nm, F) αλληλοεπικάλυψη των D και E, I) αλληλοεπικάλυψη των G και H	122
Εικόνα 3.14: Δείκτες πολλαπλασιασμού για κάθε ομάδα ποντικών. Οι ποσότητες στον οριζόντιο άξονα αναφέρονται στο αντιγόνο και το ανοσοενισχυτικό που χορηγήθηκαν ανά μυ (μg:μg).....	124
Εικόνα 3.15: Αποτελέσματα των ολικών ανοσοσφαιρινών IgG έναντι της Οβαλβουμίνης για κάθε μορφή ανοσοποίησης για τα δείγματα μετά την πρώτη αναμνηστική δόση (4 ^η εβδομάδα από την αρχική ανοσοποίηση)	125
Εικόνα 3.16: Αποτελέσματα των ολικών ανοσοσφαιρινών IgG έναντι της Οβαλβουμίνης για κάθε μορφή ανοσοποίησης για τα δείγματα μετά την δεύτερη αναμνηστική δόση (7 ^η εβδομάδα από την αρχική ανοσοποίηση).	126
Εικόνα 3.17: Πρότυπη καμπύλη IFN-γ	127
Εικόνα 3.18: Επίπεδα IFN-γ στα υπερκείμενα των σπληνοκυττάρων για κάθε ομάδα ανοσοποίησης με και χωρίς in vitro διέγερση με το αντιγόνο	128
Εικόνα 3.19: Πρότυπη καμπύλη IL-4	129
Εικόνα 3.20: Επίπεδα IL-4 στα υπερκείμενα των σπληνοκυττάρων για κάθε ομάδα ανοσοποίησης με και χωρίς in vitro διέγερση με το αντιγόνο.....	130

Εικόνα 3.21: Πρότυπη καμπύλη IL-10	131
Εικόνα 3.22: Επίπεδα IL-10 στα υπερκείμενα των σπληνοκυττάρων για κάθε ομάδα ανοσοποίησης με και χωρίς in vitro διέγερση με το αντιγόνο.....	131
Εικόνα 3.23 Μέτρηση των ολικών ανοσοσφαιρινών IgG έναντι της Οβαλβουμίνης 2 εβδομάδες μετά την αρχική ανοσοποίηση	133
Εικόνα 3.24: Μέτρηση των ολικών ανοσοσφαιρινών IgG έναντι της Οβαλβουμίνης 2 εβδομάδες μετά την αναμνηστική δόση (4 ^η εβδομάδα από την αρχική ανοσοποίηση).	133
Εικόνα 3.25: Μέτρηση των ολικών ανοσοσφαιρινών IgG έναντι της Οβαλβουμίνης 2 εβδομάδες μετά την υποδόρια ανοσοποίηση (6 ^η εβδομάδα από την αρχική ανοσοποίηση).....	134
Εικόνα 3.26: Λόγος IgG1/IgG2a για τα δείγματα της 2 ^{ης} εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση.	134
Εικόνα 3.27: Λόγος IgG1/IgG2a για τα δείγματα της 4 ^{ης} εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση , δηλαδή κατόπιν της αναμνηστικής δόσης.....	135
Εικόνα 3.28 Επίπεδα IFN-γ στα υπερκείμενα των σπληνοκυττάρων για κάθε ομάδα ανοσοποίησης με και χωρίς in-vitro διέγερση με το αντιγόνο για τα δείγματα της τέταρτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (δείγματα δύο εβδομάδες μετά την αναμνηστική δόση)	137
Εικόνα 3.29: Επίπεδα IFN-γ στα υπερκείμενα των σπληνοκυττάρων για κάθε ομάδα ανοσοποίησης με και χωρίς in-vitro διέγερση με το αντιγόνο για τα δείγματα της έκτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (δύο εβδομάδες μετά την υποδόρια ανοσοποίηση).....	138
Εικόνα 3.30: Επίπεδα IL-4 στα υπερκείμενα των σπληνοκυττάρων για κάθε ομάδα ανοσοποίησης με και χωρίς in-vitro διέγερση με το αντιγόνο για τα δείγματα της τέταρτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (δείγματα δύο εβδομάδες μετά την αναμνηστική δόση)	139
Εικόνα 3.31: Επίπεδα IL-4 στα υπερκείμενα των σπληνοκυττάρων για κάθε ομάδα ανοσοποίησης με και χωρίς in-vitro διέγερση με το αντιγόνο για τα δείγματα της έκτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (δύο εβδομάδες μετά την υποδόρια ανοσοποίηση).....	140
Εικόνα 3.32: Επίπεδα IL-10 στα υπερκείμενα των σπληνοκυττάρων για κάθε ομάδα ανοσοποίησης με και χωρίς in-vitro διέγερση με το αντιγόνο για τα δείγματα της	

τέταρτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (δύο εβδομάδες μετά την αναμνηστική δόση)	141
Εικόνα 3.33: Επίπεδα IL-10 στα υπερκείμενα των σπληνοκυττάρων για κάθε ομάδα ανοσοποίησης με και χωρίς in-vitro διέγερση με το αντιγόνο για τα δείγματα της έκτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (δυο εβδομάδες μετά την υποδόρια ανοσοποίηση).....	142
Εικόνα 3.34: Πρότυπη καμπύλη IL-2	143
Εικόνα 3.35: Επίπεδα IL-2 στα υπερκείμενα των σπληνοκυττάρων για κάθε ομάδα ανοσοποίησης με και χωρίς in-vitro διέγερση με το αντιγόνο για τα δείγματα της τέταρτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (δύο εβδομάδες μετά την αναμνηστική δόση)	144
Εικόνα 3.36: Επίπεδα IL-2 στα υπερκείμενα των σπληνοκυττάρων για κάθε ομάδα ανοσοποίησης με και χωρίς in-vitro διέγερση με το αντιγόνο για τα δείγματα της έκτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (δυο εβδομάδες μετά την υποδόρια ανοσοποίηση).....	145
Εικόνα 3.37: Δείκτες πολλαπλασιασμού για κάθε ομάδα ανοσοποίησης για τα δείγματα της 4 ^{ης} εβδομάδας (2 εβδομάδες μετά την αναμνηστική δόση).	147

6.2 Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 2.1: Συνθήκες παρασκευής νανοσφαιρών	94
Πίνακας 2.2: Ποσότητες αντιγόνου και ανοσοενισχυτικού που χορηγήθηκαν στην εκάστοτε ομάδα μυών. Οι ποσότητες είναι σε μg ανά μυ.	99
Πίνακας 2.3: Στάδια πειραματικής διαδικασίας	100
Πίνακας 2.4: Στάδια πειραματικής διαδικασίας	102
Πίνακας 3.1: Χαρακτηριστικά νανοσφαιρών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα	113
Πίνακας 3.2: Συνθήκες παρασκευής νανοσφαιρών που δοκιμάστηκαν στο πείραμα διατήρησης αντιγονικότητας.....	116
Πίνακας 3.3: Χαρακτηριστικά νανοσφαιρών που χορηγήθηκαν για την μελέτη διείσδυσης τους στο δέρμα με την χρήση φθορίζοντος μικροσκοπίου	117
Πίνακας 3.4: Ποσότητες αντιγόνου και ανοσοενισχυτικού που χορηγήθηκαν στο εκάστοτε ομάδα μυών. Οι ποσότητες είναι σε μg ανά μυ	123
Πίνακας 3.5: Αποτελέσματα του πολλαπλασιασμού των σπληνοκυττάρων κατόπιν in vitro διέγερση με $50\mu\text{g/ml}$ Οβαλβουμίνη	124
Πίνακας 3.6: IFN- γ σε υπερκείμενα σπληνοκυττάρων.....	128
Πίνακας 3.7: IL-4 σε υπερκείμενα σπληνοκυττάρων	129
Πίνακας 3.8: IL-10 σε υπερκείμενα σπληνοκυττάρων	131
Πίνακας 3.9: IFN- γ σε υπερκείμενα σπληνοκυττάρων των δειγμάτων της τέταρτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (2 εβδομάδες μετά την αναμνηστική δόση)	137
Πίνακας 3.10: IFN- γ σε υπερκείμενα σπληνοκυττάρων των δειγμάτων της έκτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (2 εβδομάδες μετά την υποδόρια ανοσοποίηση).....	138
Πίνακας 3.11: IL-4 σε υπερκείμενα σπληνοκυττάρων των δειγμάτων της τέταρτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (2 εβδομάδες μετά την αναμνηστική δόση)	139
Πίνακας 3.12: IL-4 σε υπερκείμενα σπληνοκυττάρων των δειγμάτων της έκτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (2 εβδομάδες μετά την υποδόρια ανοσοποίηση).....	140

Πίνακας 3.13: IL-10 σε υπερκείμενα σπληνοκυττάρων των δειγμάτων της τέταρτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (2 εβδομάδες μετά την αναμνηστική δόση)	141
Πίνακας 3.14: IL-10 σε υπερκείμενα σπληνοκυττάρων των δειγμάτων της έκτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (2 εβδομάδες μετά την υποδόρια ανοσοποίηση)	142
Πίνακας 3.15: IL-2 σε υπερκείμενα σπληνοκυττάρων των δειγμάτων της τέταρτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (2 εβδομάδες μετά την αναμνηστική δόση)	143
Πίνακας 3.16: IL-2 σε υπερκείμενα σπληνοκυττάρων των δειγμάτων της έκτης εβδομάδας από την αρχική ανοσοποίηση (2 εβδομάδες μετά την υποδόρια ανοσοποίηση)	144
Πίνακας 3.17: Αποτελέσματα του πολλαπλασιασμού των σπληνοκυττάρων της δειγματοληψίας της 4 ^{ης} εβδομάδας (2 εβδομάδες μετά την αναμνηστική δόση) κατόπιν in-vitro διέγερση με 50μg/ml Οβαλβουμίνη	147

6.3 Συντμήσεις

Ab(s) : Αντισώματα

Ig(s) : Ανοσοσφαιρίνες

APC : Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα

TNF : Παράγοντας νέκρωσης όγκου

IL- : Ιντερλευκίνη

CD : Ομάδα διαφοροποίησης για τα λεμφοκύτταρα

MHC I και II: Μείζον συμπλέγμα ιστοσυμβατότητας τάξης I και II

Con A : Κονκαναβαλίνη A

IFN-γ : Ιντερφερόνη γ

LT : Λυμφοτοξίνη

GM-CSF : Παράγοντα διέγερσης μακροφάγων

IFA : Μη πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freud

CFA : Πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freud

PLGA : Πολύ (γαλακτικό οξύ- γλυκολικό οξύ)

PLA : Πολύ (γαλακτικό οξύ)

TT : Τοξίνη του τετάνου

PMMA : Πολύ-(μεθυλμεθανοκρυλικό)

PECA : Πολύ(αιθυλκυανοακρυλικό)

PVA : Πολύ (βυνιλική αλκοόλη)

SEM : Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης

AFM : Μικροσκόπιο ατομικών δυνάμεων

PCS : Φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων

MPS : Μονοπυρηνικό φαγοκυτταρικό σύστημα

Cdm : διχλωρομεθάνιο

DMSO : Διμεθυλοσουλφοξείδιο

OVA : Οβαλβουμίνη

CT : Χολέρα τοξίνη

PBS : Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων

NMR : Πυρηνικό μαγνητικών συντονισμός

GPC : Χρωματογραφία διαπέρασης πηκτής

Et.ac. : Οξικός αιθυλεστέρας

Nsp: Nanospheres, νανοσφαίρες

Nps: nanoparticles, νανοσωματίδια

6.4 Βιβλιογραφία

- [1] Ehrlich, P. 1900. Proc. Royal Soc. London. 66:424.
- [2] Jerne, N.K. 1955. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 41:849.
- [3] Jerne, N.K. 1976. The immune system: a web of Vdomains. In The Harvey Lectures 70. Academic Press. New York, New York, USA. 93–110.
- [4] Burnet, F.M. 1957. Australian Journal of Science. 20:67–69.
- [5] Alt, F.W., Blackwell, T.K., DePinho, R.A., Reth, M.G., and Yancopoulos, G.D. 1986. Immunol. Rev. 89:5–30.
- [6] Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Σωκράτης Τζάρτος, Αυγή Μαμαλάκη, Μιχάλης Σαμάρκος, Βασική ανοσολογία: Λειτουργίες και δυσλειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη
- [7] Γεώργιος Ο. Δημητρακόπουλος, Βασικές αρχές ανοσολογίας, Α' μέρος, Εκδόσεις Παπαντωνόπουλος
- [8] Clerici, M. and Shearer, C.M., 1994. Immunol. Today, 15: 575.
- [9] Finkelstein, F.D. and Holmes, J., 1990. Annu. Rev. Immunol., 8: 303.
- [10] Haig, D.M., McImres, C.J., Wood, P.R. and Seow. H.-F., 1994. In: Cell-Mediated Immunity in Ruminants. (eds. B. Gaddeeris and I. Morrison) CRC Press, Boca Raton, p. 75.
- [11] Kelso, A., Trout, A.B., Mamskosky, E., Gough, N.M., Morris, L., Pech, M.H. and Thomson, J.A., 1991. Immunol. Rev., 123: 85.
- [12] Paliard, X., de Waal Malefijt, R., Yssel, H., Blanchard, D., Chretien, J., Abrams. J., de Vries, J. and Spits, H., 1988. J. Immunol.. 141: 849.
- [13] Street, N.E., Schumacher, J.H., Fong, A.T., Bass, H., Fiorentino, D.F., Leverah. J.A. and Mosmann, T.R., 1990. Immunology. 144: 1629.
- [14] Hsieh, C.S., Heimberger, A.B., Gold, J.S. and O'Garra, A., 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 6065.
- [15] Mocci, S. and Coffman, R.L., 1995. J. Immunol.. 154: 3779.
- [16] Murtaugh, M.P., 1994. Vet. Immunol. Immunopathol., 43: 37.
- [17] Scott. P. and Kaufmann, S.H.E.. 1991. Immunol. Today, 12: 346.
- [18] Seder, R.A., Paul, W.E., Davis, M.M. and Fazekas de St Groth, B., 1992. J. Exp. Med., 176: 1091.
- [19] Trinchieri, G.. 1995. Annu. Rev. Immunol., 13: 251.

- [20] Yvonne Perrie, Afzal R. Mohammed, Daniel J. Kirby, Sarah E. McNeil, Vincent W. Bramwell, Vaccine adjuvant systems: Enhancing the efficacy of subunit protein antigens, *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, In press
- [21] Rajesh K. Gupta and George R. Siber, *Vaccine*, Vol. 13, No. 14, pp. 1263-1276, 1995
- [22] Ramon, G. *Bull. Soc. Cent. Med. Vet.* 1925, 101, 227-234
- [23] Ramon, G. *Ann. Institut Pasteur* 1926, 40, 1-10
- [24] Derek T. O'Hagan^{1,3} and Rino Rappuoli, *Pharmaceutical Research*, Vol. 21, No. 9, September 2004
- [25] J.C. Aguilar, E.G. Rodriguez, *Vaccine* 25 (2007) 3752–3762
- [26] Lindblad EB. Aluminium adjuvants. In: Stewart-Tull DES, editor.
- [27] *The theory and practical application of adjuvants.* John Wiley & Sons Ltd.; 1995. p. 21–35.
- [28] Byars NE, Allison AC. In: Zola H, editor. *Laboratory Methods in Immunology.* 1990. p. 39–51.
- [29] Edelman R. *Rev Infect Dis* 1980;2:370–83.
- [30] Neutra MR, Pringault E, Kraehenbuhl JP. *Annu Rev Immunol* 1996;14:275–300.
- [31] Warren HS, Chedid LA. *CRC Crit Rev Immunol* 1986;4:369–88.
- [32] Edelman R. *Res Hum Retroviruses* 1992;8:1409–11.
- [33] Allison AC, Byars NE. *Mol Immunol* 1991;28:279–84.
- [34] Waters RV, Terrell TG, Jones GH. *Infect Immunol* 1986;51:816–25.
- [35] Brewer JM, Conacher M, Satoskar A, Bluethmann H, Alexander J. *Eur J Immunol* 1996;26:2062–6.
- [36] Blagowechensky NN. *Rev Immunol Paris* 1938;4:161.
- [37] Gupta RK, Rost BE, Relyveld E, Siber GR.. In: Powell MF, Newman MJ, editors. *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach.* New York: Plenum Press; 1995. p. 229–48.
- [38] Butler NR, Voyce MA, Burland WL, Hilton ML. *Br Med J* 1969;1:663–6.
- [39] Audibert FM, Lise LD. *Immunol Today* 1993;14:281–4.
- [40] Bomford R. In: Gregoriadis G, Allison AC, Poste G, editors. *Immunological adjuvants and vaccines.* New York: Plenum Press; 1989. p. 35–41.
- [41] Goto N, Kato H, Maeyama J-I, Eto K, Yoshihara S *Vaccine* 1993;11:914–8.
- [42] Hilleman MR, Woodhour AF, Friedman A, Phelps AH. *Ann Allergy* 1972;30:477–80.

- [43]Smith JWG, Fletcher WB, Peters M, Westwood M, Perkins FT. J Hyg (Camb) 1975; 74:251–5.
- [44]Weibel RE, McLean A, Woodhour AF, Friedman A, Hilleman MR. Proc Soc Exp Biol Med 1973;143:1053–6.
- [45]Freund J. Adv Tuberc Res 1956;7:50–5.
- [46]Woodard LF, Jasman RL. Vaccine 1985;3:57–61.
- [47] Kimura J, Nariuchi H, Watanabe T, Matuhasi T, Okayasu I, Hatakeyama S. Jpn J Exp Med 1978;48:149–52.
- [48]Freestone DS, Hamilton-Smith S, Schild GC, Buckland R, Chinn S, Tyrrel DAJ. J Hyg (Camb) 1972;70:351–5.
- [49]Taylor PJ, Miller CL, Pollock TM, Perkins FT, Westwood MA. J Hyg (Camb) 1969;67:485–90.
- [50]Storni T, Kundig TM, Senti G, Johansen P. Adv Drug Deliv Rev 2005;57:333–55.
- [51]Bramwell VW, Perrie Y. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 2005;22:151–214.
- [52]Lynch JM, Briles DE, Metzger DW. Infect Immun 2003;71:4780–8.
- [53]Bradney CP, Sempowski GD, Liao HX, Haynes BF, Staats HF. J Virol 2002;76:517–24.
- [54]Cooper PD. In: Powell MF, Newman MJ, editors. Vaccine design: the subunit and adjuvant approach. New York: Plenum Press; 1995. p. 559–80.
- [55]Laura J. Peek, C. Russell Middaugh, Cory Berkland, Advanced Drug Delivery Reviews 60 (2008) 915–928
- [56]J. Panyam, V. Labhasetwar, Adv. Drug Deliv. Rev. 55 (2003) 329–347.
- [57]M.E. Lutsiak, G.S. Kwon, J. Samuel, J. Pharm. Pharmacol. 58 (2006) 739–747.
- [58]J. Wendorf, M. Singh, J. Chesko, J. Kazzaz, E. Soewanan, M. Ugozzoli, D. O'Hagan, J. Pharm. Sci. 95 (2006) 2738–2750.
- [59]R.J. Raghuvanshi, A. Mistra, G.P. Talwar, R.J. Levy, V. Labhasetwar, J. Microencapsul. 18 (2001) 723–732.
- [60]P. Elamanchili, M. Diwan, M. Cao, J. Samuel, Vaccine 22 (2004) 2406–2412.
- [61]Behazine Combadiere, Brice Mahe, Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases 31 (2008) 293–315
- [62]Raz E, Carson DA, Parker SE, Parr TB, Abai AM, Aichinger G, et al. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91(20):9519–23.

- [63] Iwasaki A, Stiernholm BJ, Chan AK, Berinstein NL, Barber BH. *J Immunol* 1997;158(10):4591–601.
- [64] Stan AC, Casares S, Brumeanu TD, Klinman DM, Bona CA. *Eur J Immunol* 2001;31(1):301–10.
- [65] Torres CA, Iwasaki A, Barber BH, Robinson HL. *J Immunol* 1997;158(10):4529–32.
- [66] Barouch DH, Santra S, Tenner-Racz K, Racz P, Kuroda MJ, Schmitz JE, et al. *J Immunol* 2002;168(2):562–8.
- [67] Sumida SM, McKay PF, Truitt DM, Kishko MG, Arthur JC, Seaman MS, et al. *J Clin Invest* 2004;114(9):1334–42.
- [68] Bos JD, Kapsenberg ML. *Immunol Today* 1993;14(2):75–8.
- [69] Banchereau J, Steinman RM. *Nature* 1998;392(6673): 245–52.
- [70] Charest AF, McDougall J, Goldstein MB. *Am J Kidney Dis* 2000;36(5):976–82.
- [71] Egemen A, Aksit S, Kurugol Z, Erensoy S, Bilgic A, Akilli M. *Vaccine* 1998;16(16):1511–5.
- [72] Sabchareon A, Chantavanich P, Pasuralertsakul S, Pojjaroen-Anant C, Prarinyanupharb V, Attanath P, et al. *Pediatric Infect Dis J* 1998;17(11):1001–7.
- [73] Streilein JW, Taylor JR, Vincek V, Kurimoto I, Shimizu T, Tie C, et al. *Immunol Today* 1994;15(4):174–9.
- [74] Sallusto F. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001;1(5):441–8.
- [75] Vogt A, Combadiere B, Hadam S, Stieler KM, Lademann J, Schaefer H, et al. *J Invest Dermatol* 2006;126(6):1316–22.
- [76] Lenz A, Heine M, Schuler G, Romani N. *J Clin Invest* 1993;92(6):2587–96.
- [77] Bos JD, Meinardi MM. *Exp Dermatol* 2000;9(3):165–9.
- [78] Schaefer H, Stuttgen G, Zesch A, Schalla W, Gazith J. *Curr Probl Dermatol* 1978;7:80–94.
- [79] Vogt A, Mandt N, Lademann J, Schaefer H, Blume-Peytavi U. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2005;10(3):252–5.
- [80] Schaefer H, Lademann J. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001;14(Suppl. 1):23–7.
- [81] Lademann J, Otberg N, Richter H, Weigmann HJ, Lindemann U, Schaefer H, et al. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001; 14(Suppl. 1):17–22.
- [82] Glenn GM, Rao M, Matyas GR, Alving CR. *Nature* 1998;391(6670):851.

- [83] Glenn GM, Schariton-Kersten T, Vassell R, Mallett CP, Hale TL, Alving CR. *J Immunol* 1998;161(7):3211–4.
- [84] Glenn GM, Taylor DN, Li X, Frankel S, Montemarano A, Alving CR. *Nat Med* 2000;6(12):1403–6.
- [85] Frech SA, Kenney RT, Spyr CA, Lazar H, Viret JF, Herzog C, et al. *Vaccine* 2005;23(7):946–50.
- [86] Peachman KK, Rao M, Alving CR. *Methods* 2003;31(3):232–42.
- [87] Watabe S, Xin KQ, Ihata A, Liu LJ, Honsho A, Aoki I, et al. *Vaccine* 2001;19(31):4434–44.
- [88] Seo N, Tokura Y, Nishijima T, Hashizume H, Furukawa F, Takigawa M. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(1):371–6.
- [89] O’Hagan DT, Singh M, Dong C, Ugozzoli M, Berger K, Glazer E, et al. *Vaccine* 2004;23(5):672–80.
- [90] O’Hagan DT, Rappuoli R. *Pharm Res* 2004;21(9):1519–30.
- [91] O’Hagan DT, Singh M, Ulmer JB. *Immunol Rev* 2004;199:191–200.
- [92] Kanke M, Sniecinski I, DeLuca PP. *J Parenteral Sci Technol* 1983;37(6):210–7.
- [93] Tabata Y, Ikada Y. *Biomaterials* 1988;9(4):356–62.
- [94] Foged C, Brodin B, Frokjaer S, Sundblad A. *Int J Pharm* 2005;298(2):315–22.
- [95] Florence AT. *Pharm Res* 1997;14(3):259–66.
- [96] Lademann J, Richter H, Schaefer UF, Blume-Peytavi U, Teichmann A, Otberg N, et al. *Skin Pharmacol Physiol* 2006;19(4):232–6.
- [97] Lademann J, Ilgevicus A, Zurbau O, Liess HD, Schanzer S, Weigmann HJ, et al. *J Biomed Opt* 2006;11(5):054026.
- [98] Langer R, Cleland JL, Hanes J. *Adv Drug Deliv Rev* 1997;28(1):97–119.
- [99] Gupta RK, Alroy J, Alonso MJ, Langer R, Siber GR. *Vaccine* 1997;15(16):1716–23.
- [100] Hedley ML, Curley J, Urban R. *Nat Med* 1998;4(3):365–8.
- [101] Denis-Mize KS, Dupuis M, MacKichan ML, Singh M, Doe B, O’Hagan D, et al. *Gene Ther* 2000;7(24):2105–12.
- [102] Lamalle-Bernard D, Munier S, Compagnon C, Charles MH, Kalyanaraman VS, Delair T, et al. *J Control Release* 2006;115(1):57–67.
- [103] Ataman-Onal Y, Munier S, Ganee A, Terrat C, Durand PY, Battail N, et al. *J Control Release* 2006;112(2):175–85.

- [104] Munier S, Messai I, Delair T, Verrier B, Ataman-Onal Y. *Colloids Surf* 2005;43(3–4):163–73.
- [105] Panyam J, Labhasetwar V. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55(3):329–47.
- [106] Jiang G, Joshi SB, Peek LJ, Brandau DT, Huang J, Ferriter MS, et al. *J Pharm Sci* 2006;95(1):80–96.
- [107] Kwon YJ, James E, Shastri N, Frechet JM. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(51):18264–8
- [108] Streilein JW, Lonsberry LW, Bergstresser PR. *J Exp Med* 1982;155(3):863–71
- [109] Scharton-Kersten T, Glenn GM, Vassell R, Yu J, Walwender D, Alving CR. *Vaccine* 1999;17(Suppl. 2):S37–43.
- [110] Tang DC, Shi Z, Curiel DT. *Nature* 1997;388(6644):729–30.
- [111] Kaiserlian D, Etchart N. *Eur J Dermatol* 1999;9(3):169–76.
- [112] Fan H, Lin Q, Morrissey GR, Khavari PA. *Nat Biotechnol* 1999;17(9):870–2.
- [113] Guebre-Xabier M, Hammond SA, Ellingsworth LR, Glenn GM. *J Virol* 2004;78(14):7610–8.
- [114] Guarena-Burgueno F, Hall ER, Taylor DN, Cassels FJ, Scott DA, Wolf MK, et al. *Infect Immun* 2002;70(4):1874–80.
- [115] De Creus A, Van Beneden K, Taghon T, Stolz F, Debacker V, Plum J, et al. *J Immunol* 2000;165(2):645–53.
- [116] Ghazizadeh S, Kalish RS, Taichman LB. *Mol Ther* 2003;7(3):296–303.
- [117] Guebre-Xabier M, Hammond SA, Epperson DE, Yu J, Ellingsworth L, Glenn GM. *J Virol* 2003;77(9): 5218–25.
- [118] Baca-Estrada ME, Foldvari M, Ewen C, Badea I, Babiuk LA. *Vaccine* 2000;18(17):1847–54.
- [119] Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA. *Nat Rev Immunol* 2005;5(8):617–28.
- [120] Lori F, Trocio J, Bakare N, Kelly LM, Lisziewicz J.. *Vaccine* 2005;23(17–18):2030–4.
- [121] Lisziewicz J, Trocio J, Whitman L, Varga G, Xu J, Bakare N, et al. *J Invest Dermatol* 2005;124(1):160–9.
- [122] Altin JG, van Broekhoven CL, Parish CR. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4(11):1735–47.
- [123] Van Broekhoven CL, Parish CR, Demangel C, Britton WJ, Altin JG. *Cancer Res* 2004;64(12):4357–65.

- [124] Hammond SA, Tsonis C, Sellins K, Rushlow K, Schar-ton-Kersten T, Colditz I, et al. *Adv Drug Deliv Rev* 2000;43(1):45–55.
- [125] Schar-ton-Kersten T, Yu J, Vassell R, O’Hagan D, Alving CR, Glenn GM. *Infect Immun* 2000;68(9):5306–13.
- [126] Konstantinos Avgoustakis, *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering* DOI: 10.1081/E-EBBE-120013950
- [127] Wise, D.L.; Fellman, T.D.; Sanderson, J.E.; Wentworth, R.L In *Drug Carriers in Biology and Medicine*; Gregoriadis, G., Ed.; Academic Press: New York, 1979; 237–270.
- [128] Chabot, F.; Vert, M.; Chapelle, S.; Granger, P. *Polymer* 1983, 24 (2), 53–59.
- [129] Gilding, D.K.; Reed, A.M. *Polymer* 1979, 20 (12), 137–143.
- [130] Dittrich, W.; Schulz, R.C. *Angew. Macromol. Chem.* 1971, 15, 109–126.
- [131] Kowalski, A.; Duda, A.; Penczek, S. *Macromolecules* 2000, 33, 7359–7370.
- [132] Avgoustakis, K.; Nixon, J.R. *Int. J. Pharm.* 1991, 70, 77–85.
- [133] Hyon, S.H.; Jamshidi, K.; Ikada, Y. *Biomaterials* 1997, 18 (22), 1503–1508.
- [134] Pitt, C.G.; Gu, Z. *J. Controlled Release* 1987, 4, 283–292.
- [135] Tracy, M.A.; Ward, K.L.; Firouzbadian, L.; Wang, Y.; Dong, N.; Qian, R.; Zhang, Y. *Biomaterials* 1999, 20, 1057–1062.
- [136] Catarina Pinto Reis, PhD, Ronald J. Neufeld, PhD, Antonio J. Ribeiro, PhD, Francisco Veiga, PhD, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2 (2006) 8– 21
- [137] Couvreur P, Dubernet C, Puisieux F. *Eur J Pharm Biopharm* 1995;41:2 - 13.
- [138] Couvreur P. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1988;5:1 - 20.
- [139] Alle’mann E, Gurny R, Doekler E. *Eur J Pharm Biopharm* 1993;39:173- 91.
- [140] Benoit JP, Couvreur P, Devissaguet J-P, Fessi H, Puisieux F, Roblot- Treupel L. *J Pharm Belg* 1986;41:319- 29.
- [141] Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. *J Control Release* 2001;70:1 - 20.
- [142] El-Samaligy MS, Rohdewald P, Mahmoud HA. *J Pharm Pharmacol* 1986;38:216 -8.
- [143] Vauthier C, Dubernet C, Fattal E, Pinto-Alphandary H, Couvreur P. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:519- 48.
- [144] Kreuter J. *J Polym Sci* 1982;20:543- 5.
- [145] Kreuter J. London 7 CRC Press Boca Raton; 1992. p. 125- 48.

- [146] Couvreur P, Barrat G, Fattal E, Legrand P, Vauthier C. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2002;19:99- 134.
- [147] Al Khouri N, Roblot-Treupel L, Fessi H, Devissaguet JP, Puisieux F. *Int J Pharm* 1986;28:125- 32.
- [148] Watnasirichaikul S, Davies NM, Rades T, Tucker IG. *Pharm Res* 2000;17:684- 9.
- [149] Aprahamian M, Michel C, Humbert W, Devissaguet J-P, Dange C. *Biol Cell* 1987;61: 69- 76.
- [150] Lambert G, Fattal E, Pinto-Alphandary H, Gulik A, Couvreur P. *Pharm Res* 2000;17:707- 14.
- [151] Montasser I, Fessi H, Coleman AW. *Eur J Pharm Biopharm* 2002;54:281- 4.
- [152] Bouchemal K, Briancon S, Perrier E, Fessi H, Bonnet I, Zydowicz N. *Int J Pharm* 2004;269:89- 100.
- [153] Tice TR, Gilley RM. *J Control Release* 1985;2:343 - 52.
- [154] Aftabrouchard D, Dorlker E. *STP Pharma Sci* 1992;2:365 - 80.
- [155] Gurny R, Peppas NA, Harrington DD, Banker GS. *Drug Dev Ind Pharm* 1981;7:1 - 25.
- [156] Ueda H, Kreuter J. *J Microencapsul* 1997;14:593- 605.
- [157] Tabata J, Ikada Y. *Pharm Res* 1989;6:296 - 301.
- [158] Bodmeier R, Chen H. *J Control Release* 1990;12:223- 33.
- [159] Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, Trubetskoy V, Torchilin V, Langer R. *Science* 1994;263:1600- 3.
- [160] Kumar MVR. *J Pharm Sci* 2000;3:234 - 58.
- [161] Lemarchand C, Gref R, Passirani C, Garcion E, Petri B, Muller R. *Biomaterials* 2006;27:108 - 18.
- [162] Fessi H, Puisieux F, Devissaguet J-P, Ammoury N, Benita S *Int J Pharm* 1989;55:R1- R4.
- [163] Barichello JM, Morishita M, Takayama K, Nagai T. *Drug Dev Ind Pharm* 1999;25:471- 6.
- [164] Galindo-Rodriguez S, Alle'mann E, Fessi H, Doelker E. *Pharm Res* 2004;21:1428- 39.
- [165] Ganachaud F, Katz JL. *Chem Phys Chem* 2005;6: 209- 16.
- [166] Patil GV. *Drug Dev Res* 2003;58:219- 47.
- [167] Widder KJ, Flouret G, Senye A *J Pharm Sci* 1979;68:79 - 82.

- [168] Yoshioka T, Hashida M, Muranishi S, Sezaki H. *Int J Pharm* 1981;8:131 - 41.
- [169] Konstantinos Avgoustakis, *Current Drug Delivery*, 2004, Vol. 1, No. 4
- [170] Cleland, J.L.; Jones, A.J.S. *Pharm. Res.*, 1996, 13, 1464-1474.
- [171] Morlock, M.; Koll, H.; Winter, G.; Kissel, T. E. J. *Pharm.Biopharm.*, 1997, 43, 29-36.
- [172] Takeuchi, H.; Yamamoto, H.; Kawashima, Y. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, 47, 39-54.
- [173] Niwa, T.; Takeuchi, H.; Hino, T.; Kunou, N.; Kawashima, Y. *J. Control. Release*, 1993, 25, 89-98.
- [174] Allemann, E.; Gurny, R.; Dolker, E. *Int. J. Pharm.*, 1992, 87, 247-253.
- [175] Konan, Y.N.; Gurny, R.; Allemann, E. *Int. J. Pharm.*, 2002, 233, 239-252.
- [176] Quintanar-Guerrero, D.; Allemann, E.; Fessi, H.; Dolker, E. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 1998, 24, 1113-1128.
- [177] Hans, M.L.; Lowman, A.M. *Curr. Opinion Solid State Mater. Sci.*, 2002, 6, 319-327.
- [178] VJ Mohanraj and Y Chen, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, June 2006; 5 (1): 561-573
- [179] Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. *J. Appl. Polymer Sci.* 1997; 63: 125-132.
- [180] Panyam J, Labhasetwar V. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55: 329-47.
- [181] Kroll RA, Pagel MA, Muldoon LL, Roman-Goldstein S, Fiamengo SA, Neuwelt EA. *Neurosurgery* 1998; 43: 879-86; discussion 886-9.
- [182] Redhead HM, Davis SS, Illum L. *J Control Release* 2001; 70: 353-363.
- [183] Muller RH, Wallis KH. *Int. J. Pharm.* 1993; 89: 25-31.
- [184] Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002; 54: 631-651.
- [185] Grislain L, Couvreur P, Lenaerts V, Roland M, Deprez- Decampeneere D, Speiser P. *Int. J. Pharm.* 1983; 15: 335-345.
- [186] Couvreur P, Barratt G, Fattal E, Legrand P, Vauthier C. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2002; 19: 99-134.
- [187] Govender T, Stolnik S, Garnett MC, Illum L, Davis SS. *J. Control. Rel.* 1999; 57: 171-185.
- [188] Govender T, Riley T, Ehtezazi T, Garnett MC, Stolnik S, Illum L, Davis SS. *Int J Pharm* 2000; 199: 95-110.

- [189] Panyam J, Williams D, Dash A, Leslie-Pelecky D, Labhasetwar V. *J Pharm Sci* 2004; 93: 1804-14.
- [190] Chen Y, McCulloch, RK, Gray BN. *J Control Release* 1994; 31: 49-54.
- [191] Chen Y, Mohanraj VJ, Parkin JE. *Letters in Peptide Science* 2003; 10: 621-627.
- [192] Fresta M, Puglisi G, Giammona G, Cavallaro G, Micali N, Furneri PM. *J. Pharm. Sci.* 1995; 84: 895-902.
- [193] Donald E. Owens III a, Nicholas A. Peppas, *International Journal of Pharmaceutics* 307 (2006) 93–102
- [194] Frank, M., Fries, L., 1991. *Immunol. Today* 12, 322–326.
- [195] Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M.T., Trubetskoy, V., Torchilin, V., Langer, R., 1994. *Science* 263, 1600–1603.
- [196] Illum, L., Hunneyball, I.M., Davis, S.S., 1986. *Int. J. Pharm.* 29, 53–65.
- [197] Peracchia, M.T., Fattal, E., Desmaele, D., Besnard, M., Noel, J.P., Gomis, J.M., Appel, M., d'Angelo, J., Couvreur, P., 1999a. *J. Control. Release* 60, 121–128.
- [198] Plard, J.P., Bazile, D., 1999. *Colloid Surf. B-Biointerfaces* 16, 173–183.
- [199] Tobias Warger, Hansjorg Schild, Gerd Rechtsteiner, *Immunology Letters* 109 (2007) 13–20
- [200] Mora M, Veggi D, Santini L, Pizza M, Rappuoli R. *Drug Discov Today* 2003;8(10):459–64.
- [201] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. *Cell* 2006;124(4):783–801.
- [202] Lademann, J., Richter, H., Teichmann, A., Otberg, N., Blume-Peytavi, U., Luengo, J., Weiß, B., Schaefer, U. F., Lehr, C. M., Wepf, R., Sterry, W., 2007. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66, 159–164.).
- [203] T. Scharton-Kersten, J. Yu, R. Vassell, D. O'Hagan, C.R. Alving, G.M. Glenn, *Infect. Immun.* 68 (2000), pp. 5306–5313].
- [204] S.A. Hammond, D. Walwender, C.R. Alving, G.M. Glenn, *Vaccine* 19 (2001) 2701–2707.
- [205] R. Kahlon, Y. Hu, C.H. Orteu, A. Kifayet, J.D. Trudeau, *Vaccine* 21 (2003) 2890–2899.
- [206] C.D. Partidos, A-S. Beignon, J-P. Briand, S. Muller, *Vaccine* 22 (2004) 2385-2390.
- [207] D.T. O'Hagan, H. Jeffry, S.S. Davis, *Vaccine* 11 (1993) 965–969.

- [208] Y. Men, B. Gander, H.P. Merkle, G. Vaccine 14 (1996) 1442–1450.
- [209] M. Igartua, R.M. Hernandez, A. Esquisabel, A.R. Gascon, M.B. Calvo, J.L. Pedraz, J. Control. Release 56 (1998) 63–73.
- [210] J.E. Rosas, J.L. Pedraz, R.M. Hernandez, A.R. Gascon, M. Igartua, F. Guzman, R. Rodriguez, J. Cortes, M.E. Patarroyo, Vaccine 20 (2002) 1707–1710.
- [211] K.N. Nikou,, N. Stivaktakis, K. Avgoustakis, P.A. Sotiropoulou, S.A. Perez, C.N. Baxevanis, M. Papamichail, L. Leondiadis, Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects 1725 (2005) 182-189.
- [212] R. Alvarez-Roman, A. Naik, Y.N. Kalia, R.H. Guy, H. Fessi, Journal of Control. Release 99 (2004) 53–62.
- [213] A.K. Kohli, H.O. Alpar, Int. J. Pharm. 275 (2004) 13–17.
- [214] A. Vogt, B. Combadiere, S. Hadam, K. M. Stieler, J. Lademann, H. Schaefer, B. Autran, W. Sterry, U. Blume-Peytavi, J. Invest. Dermatol. 126 (2006) 1316–1322.
- [215] Reddy ST, Swartz MA, Hubbell JA. Trends Immunol 2006;27(12):573–9.
- [216] Chabot, F., Vert, M., Chapelle, S. and Granger, P., Polymer, 1983, 24, 53-59
- [217] Magenheim B, Levy MY, Benita S. Int. J. Pharm. 1993; 94: 115-123.
- [218] P.R. Wood, H.-F. Seow, Veterinary Immunology and Immunopathology 54 (19%) 33-44
- [219] Banchereau J., Bazan F., Blanchard D., Brirre F., Galizzi J.P., van Kooten C., Liu Y.J., Rousset F. and Saeland S. 1994 Annu. Rev. Immunol. 12:881.
- [220] Walters, K. A. and Roberts, M. S. (2002) The structure and function of skin, in K. A. Walters, ed., Dermatological and Transdermal Formulations: Drugs and the Pharmaceutical Sciences, v. 119: New York, Marcel Dekker, Inc., p. 1-39.
- [221] Naik, A., et al, Pharmaceutical Science & Technology Today, 2000, 3 (9): 318-326.
- [222] Cevc, G. Advanced Drug Delivery Reviews, 2004, 56 (5): 675-711.
- [223] Roberts, M. S. and Cross, S. E. (2002) Skin transport, in K. A. Walters, ed. Dermatological and transdermal formulations: Drugs and the Pharmaceutical Sciences, v. 119: New York, Marcel Dekker, Inc., p. 89 - 195.
- [224] Cleary, G. W. Drug Delivery Technology, 2003, 3 (5): 35-40.
- [225] Thomas, B. J. and Finnin, B. C. Drug Discovery Today, 2004, 9 (16): 697-703.

- [226] Hadgraft, J. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2004,58 (2): 291-299.
- [227] Alvarez-Román, R., et al., Pharmaceutical Research, 2004,21 (10): 1818-1825.
- [228] Langer, R. Advanced Drug Delivery Reviews, 2004,56 (5): 557-558.
- [229] Barry, B. W. (2006) Penetration enhancer classification, in E. W. Smith and H. I. Maibach, eds., Percutaneous Penetration Enhancers: Boca Raton, Taylor & Francis Group, p. 3-15.
- [230] Prausnitz, M. R. Microneedles, Advanced Drug Delivery Reviews, 2004, 56 (5): 581-587.
- [231] Hong Jiang and Leonard Chess, The Journal of Clinical Investigation, Volume 114 Number 9 November 2004, 1198-1208
- [232] S.M. Atif [a](#), N. Salamb, N. Ahmadc, I.M. Hasand, H.S. Jamalb, A. Sudhanshue, V. Azevedof, M. Owais, Vaccine 26 (2008) 5874–5882
- [233] Yoshinori Mine, and Marie Yang, J. Agric. Food Chem., 2008, 56 (13), 4874-4900
- [234] Sack, D.A. et al. (2004) Cholera. Lancet 363, 223–233
- [235] Jay R. Thiagarajah and A.S. Verkman, TRENDS in Pharmacological Sciences Vol.26 No.4 April 2005, 172 - 175