



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών  
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑΚΩΝ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΩΝ»**

**ΜΑΡΙΑ ΚΩΤΣΑΡΙΔΗ**

**ΒΙΟΛΟΓΟΣ, BSc**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ**

**Παναγιώτα Παπαζαφείρη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας**

**ΑΘΗΝΑ 2020**

## **ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ**

Παναγιώτα Παπαζαφείρη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας, ΕΚΠΑ

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Αικατερίνη Γαϊτανάκη

Καθηγήτρια Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Παναγιώτα Παπαζαφείρη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Ευδοκία Καραγκούνη

Ερευνήτρια Α', Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Με τον όρο λεισμανίαση, περιγράφεται μια ομάδα ασθενειών που προκαλούνται από πρωτόζωα παράσιτα του γένους *Leishmania*, και ενδημεί στις τροπικές περιοχές της Αφρικής και της Αμερικής, στην Ινδία και στις περιοχές της Μεσογείου και της Νοτιοδυτικής Ασίας.

Πρόκειται για μια ομάδα ασθενειών με ένα φάσμα κλινικών εκδηλώσεων που κυμαίνονται από τα αυτογενή δερματικά έλκη μέχρι σοβαρή ασθένεια με μαζική καταστροφή ιστών. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας την έχει καταχωρήσει στις παραμελημένες τροπικές ασθένειες. Τα διαθέσιμα φάρμακα έναντι της νόσου εμφανίζουν αρκετά προβλήματα. Έχει φανεί ότι κατά τη χρήση τους το παράσιτο εμφανίζει αντοχή σε αυτά και το επίπεδο τοξικότητάς τους είναι υψηλό. Επίσης η διάρκεια της θεραπείας που απαιτείται είναι χρονοβόρα και για το λόγο αυτό, θεωρείται επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης ενός εμβολίου για την πρόληψη της λεισμανίασης. Εξελίξεις στη νανοτεχνολογία, τα τελευταία χρόνια, παρέχουν νέες προσεγγίσεις στη θεραπεία της λεισμανίασης. Συγκεκριμένα αρκετές μελέτες έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους στη χρήση νανοσωματιδίων ως φορείς αντιγόνου.

Τα αυτο-γαλακτοποιούμενα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων (SNEDDS) είναι ένα ισοτροπικό μίγμα ελαίων / λιπιδίων, επιφανειοδραστικών ουσιών, περιστασιακά συν-διαλυτών ή συν-γαλακτωματοποιητών και φαρμάκων. Το μικρό μέγεθός τους τα βοηθά να περάσουν αποτελεσματικά μέσω διαφορετικών φραγμών του γαστρεντερικού σωλήνα και έτσι καταφέρνουν να εξαπλωθούν αποτελεσματικά μέσω του βλεννογόνου. Έχει βρεθεί πως χρήση των νανοσωματιδίων SNEDDS, συμβάλει στη βελτίωση της διαλυτότητας, στην ενίσχυση της βιοδιαθεσιμότητας και στη μείωση της μεταβλητότητας των φαρμάκων. Εξαιτίας των παραπάνω χαρακτηριστικών, η πιθανή χρήση τους στην ανάπτυξη εμβολίων παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας, ήταν η διερεύνηση της ικανότητας των SNEDDS, να χρησιμοποιηθούν ως φορείς αντιγόνου για την ανάπτυξη εμβολίου έναντι της πειραματικής σπλαγχνικής λεισμανίασης.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μελέτη της πιθανής κυτταροτοξικής δράσης των νανοφορέων SNEDDS και, αποδείχθηκε πως αυτά δεν ήταν τοξικά κάτω από μία συγκεκριμένη συγκέντρωση για τα μακροφάγα της κυτταρικής σειράς J774A.1. Στη συνέχεια, η μελέτη πρόσληψης, *in vitro*, σημασμένων νανοφορέων έδειξε ότι τα SNEDDS

προσλαμβάνονται τόσο από τα μακροφάγα όσο και από τα δενδριτικά κύτταρα. Ακολούθησε μελέτη της πιθανής ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων μετά από την επίδραση των νανοφορέων SNEDDS. Η μελέτη αυτή κρίθηκε αναγκαία, καθώς τα δενδριτικά κύτταρα κατέχουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των ανοσολογικών αποκρίσεων. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι οι νανοφορείς δεν επάγουν την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων.

Μετά από *in vivo* χορήγηση (ενδομυϊκή και υποδόρια) των νανοφορέων SNEDDS, σε ποντικούς BALB/c, είδαμε πως τα SNEDDS εντοπίζονταν στα λεμφικά όργανα, σπλήνα και λεμφαδένες. Παράλληλα, φάνηκε πως η ενδομυϊκή χορήγηση ήταν πιο αποτελεσματική ως προς την πρόσληψη των νανοφορέων από τα κύτταρα.

Τέλος, προσδιορίστηκε η ικανότητα 3 πεπτιδίων του παρασίτου *Leishmania*, να επάγουν επιθυμητού τύπου ανοσολογικές αποκρίσεις (κυτταρική και χυμική απόκριση). Τα πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν, από πρωτεΐνες του παρασίτου, έχουν αναλυθεί με *in silico* προσέγγιση, και φαίνεται πως αναγνωρίζονται από MHC I και MHC II μόρια του ποντικού. Επίσης σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά (ισοηλεκτρικό σημείο και υδροφοβικότητα) να είναι κατάλληλα για την ενσωμάτωσή τους στα SNEDDS, τα οποία είναι υδρόφοβα. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως μόνο το πεπτίδιο 2 είναι ικανό να επάγει παραγωγή ολικών αντισωμάτων IgG καθώς και λεμφοκυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Συμπερασματικά, τα νανωματίδια SNEDDS είναι ικανά να χρησιμοποιηθούν ως φορείς αντιγόνου σε υποψήφια εμβόλια έναντι της λεισμανίασης. Επιπλέον, το πεπτίδιο 2 είναι ένα πιθανό αντιγόνο που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε μελλοντικές μελέτες.

## SUMMARY

The term leishmaniasis describes a group of diseases caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*, endemic to the tropic environments of Africa, America, India, and the Mediterranean and southwest Asia.

It is a group of diseases with a range of clinical manifestations ranging from autochthonous skin ulcers to severe disease with massive tissue destruction. The World Health Organization has even registered it in neglected tropical diseases. The available drugs against the disease have several shortcomings. It was shown that the parasite develops resistance to the drugs and the toxicity levels rise. Also, the duration of treatment required is time consuming and therefore the need to develop a vaccine to prevent leishmaniasis is imperative. Developments in nanotechnology in recent years provide new approaches to the treatment of leishmaniasis. In particular, several studies have focused on the use of nanoparticles as antigen carriers.

Self-emulsifying drug delivery systems (SNEDDS) are an isotropic mixture of oils / lipids, surfactants, occasional co-solvents or co-emulsifiers and drugs. Their small size helps them pass effectively through different blocks of the gastrointestinal tract and thus manage to spread effectively through the mucosa. The use of SNEDDS nanoparticles has been found to help improve solubility, enhance bioavailability and reduce drug variability. Due to the above characteristics, their possible use in the development of vaccines is of particular interest.

The aim of the present master thesis was to evaluate the ability of SNEDDS to be used as antigen vectors for vaccine development against experimental visceral leishmaniasis.

Initially, a study of the potential cytotoxic activity of SNEDDS nanocarriers was performed, which showed that they were not toxic below a specific concentration for macrophages in the J774A.1 cell line. Subsequently, the *in vitro* uptake study of labeled nanocarriers showed that SNEDDS are uptaken by both macrophages and dendritic cells. The effect of SNEDDS nanocarriers on dendritic cells maturation was studied, since dendritic cells play a critical role in activating immune responses. The results showed that the nanocarriers did not appear to induce dendritic maturation.

After *in vivo* administration (intramuscular and subcutaneous) of SNEDDS nanocarriers in BALB/c mice, it was shown that SNEDDS were located in the lymphatic organs, spleen and

lymph nodes. The study also showed that the intramuscular administration is more effective in uptake of nanocarriers.

Finally, the ability of 3 peptides of the Leishmania parasite to induce desired type of immune responses (cellular and humoral response) was determined. The peptides used, from parasite proteins, have been analyzed by *in silico* approach and appear to be recognized by mouse MHC I and MHC II molecules. They were also designed in such a way that their physicochemical characteristics (isoelectric point and hydrophobicity) are suitable for their incorporation into SNEDDS, which are hydrophobic. The results showed that only peptide 2 is capable of inducing the production of total IgG antibodies as well as lymphocyte proliferation.

In conclusion, the SNEDDS nanocarriers are capable of being used as antigen carriers in candidate vaccines against leishmaniasis. Also, a possible antigen that could be used in future studies is peptide 2.

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας Λοιμώξεων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, με σκοπό την διεκπεραίωση της διπλωματικής μου εργασίας κατά την διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών κατά το ακαδημαϊκό έτος 2019 - 2020.

Ευχαριστώ πολύ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παναγιώτα Παπαζαφείρη, που μου έκανε την τιμή να είναι η επιβλέπουσα καθηγήτρια της εργασίας μου και την Καθηγήτρια Αικατερίνη Γαϊτανάκη για τη συμμετοχή της στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επιστημονική Υπεύθυνη και Ερευνήτρια Α΄, Ευδοκία Καραγκούνη, για τη δυνατότητα που μου έδωσε να μελετήσω ένα σύγχρονο και ενδιαφέρον θέμα στο εργαστήριό της, την επιστημονική της καθοδήγηση κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων και τις πολύτιμες γνώσεις που αποκόμισα από αυτή την εμπειρία. Είμαι ευγνώμων για την άριστη συνεργασία μας, καθώς και το συνεχές ενδιαφέρον του και τη στήριξη κατά την υλοποίηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Ιδιαίτερως θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ Μαρίτσα Μαργαρώνη για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε για τον σχεδιασμό των πειραμάτων, καθώς και για τις γνώσεις, τις συμβουλές και τις υποδείξεις που μου παρείχε κατά την εκπαίδευσή μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, Δρ Μαρία Αγάλλου, Δρ Δήμητρα Τουμπανάκη, Δρ Αντωνία Ευσταθίου και τη συμφοιτήτρια μου Ιωάννα Παππά, για το φιλικό κλίμα συνεργασίας κατά την εκπόνηση της ερευνητικής μου μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για τη στήριξή τους και την αγάπη τους σε αυτή τη σημαντική φάση της ζωής μου.

Μαρία Κωτσαρίδη

Νοέμβριος 2020

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Η συμβολή της νανοτεχνολογίας στην Ιατρική.....	1
1.2 Αυτο-γαλακτοποιούμενα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων ..... (Self-NanoemulsifyingDrugDeliverySystem, SNEDDS) .....	2
1.2.1 Σύνθεση νανοσωματιδίων SNEDDS.....	3
1.3 Εμβολιασμός και πρόληψη λοιμωδών νοσημάτων .....	5
1.3.1 Η ανοσολογία των εμβολίων .....	6
1.3.2 Η χρήση των SNEDDS στην ανάπτυξη εμβολίων.....	7
1.4 Η λεισμανίαση ως μοντέλο νοσήματος .....	8
1.4.1 Συστηματική κατάταξη παρασίτου <i>Leishmania</i> .....	8
1.4.2 Μορφολογία παρασίτου.....	9
1.4.3 Βιολογικός κύκλος ζωής και τρόπος μετάδοσης .....	10
1.4.4 Κλινικές μορφές του νοσήματος .....	12
1.4.5 Γεωγραφική κατανομή της λεισμανίασης .....	16
1.4.6 Θεραπεία του νοσήματος .....	18
1.4.7 Εμβόλια κατά της <i>Leishmania</i> .....	19
1.5 Ανοσοενισχυτικά .....	21
1.6 Ανοσολογική απόκριση έναντι του παρασίτου <i>Leishmaniaspp</i> .....	21
1.6.1 Τύποι ανοσολογικής απόκρισης.....	22
1.6.2 Th1-Th2 πόλωση.....	23
1.6.3 Τα κύτταρα στόχοι του παρασίτου .....	25
1.7 Δενδριτικά κύτταρα.....	28
1.7.1 Τύποι δενδριτικών κυττάρων.....	28
1.7.2 Ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων.....	29
1.7.3 Αλληλεπίδραση των δενδριτικών κυττάρων με τα T λεμφοκύτταρα.....	30
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	32
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	33
3.1 Κυτταροκαλλιέργειες.....	33
3.1.1 Απομόνωση και καλλιέργεια δενδριτικών κυττάρων από μυελό οστών ποντικού .....	33
3.1.2 Καλλιέργεια μακροφάγων της κυτταρικής σειράς J774A.1 .....	35
3.1.3 Κατάψυξη και ανάκτηση κυττάρων .....	36
3.2 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας .....	36



3.3 Κυτταρομετρία ροής.....	39
3.3.1 Μελέτη της <i>in vitro</i> πρόσληψης των νανοφορέων SNEDDS από μακροφάγα.....	39
3.3.2 Μελέτη της <i>in vitro</i> πρόσληψης των νανοφορέων SNEDDS από δενδριτικά κύτταρα.....	40
3.3.3 Ωρίμανη δενδριτικών κυττάρων .....	41
3.3.4 Μελέτη της οργανικής κατανομής των νανοφορέων SNEDDS .....	42
3.4 Αντιγονικότητα πεπτιδίων του παρασίτου <i>L. infantum</i> .....	43
3.4.1 Πρωτόκολλο ανασοποιήσεων .....	43
3.4.2 Ενζυμική δοκιμασία ανοσοπροσρόφησης (ELISA) .....	44
3.4.3 Μελέτη πολλαπλασιασμού λεμφοκυττάρων (Lymphoproliferation) .....	47
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	49
4.1 Μελέτη της δράσης νανοφορέων SNEDDS <i>in vitro</i> .....	49
4.1.1 Χαρακτηρισμός νανοφορέων SNEDDS .....	49
4.1.2 Αλληλεπίδραση νανοφορέων SNEDDS με μακροφάγα κυτταρικής σειράς J774A.1 .....	49
4.1.3 Μελέτη της πρόσληψης των νανοφορέων <i>in vitro</i> .....	51
4.1.4 Επίδραση των νανοφορέων SNEDDS στην ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων .....	57
4.2 <i>In vivo</i> μελέτη των νανοφορέων SNEDDS.....	60
4.2.1 Μελέτη της οργανικής κατανομής των νανοφορέων.....	60
4.3 Μελέτη αντιγονικότητας πεπτιδίων του παρασίτου <i>Leishmania</i> .....	63
4.3.1 Μελέτη χυμικών αποκρίσεων στους εμβολιασμένους ποντικούς.....	63
4.3.2 Μελέτη κυτταρομεσολαβητικών αποκρίσεων στους εμβολιασμένους ποντικούς .....	65
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	67
5.1 Δράση νανοφορέων SNEDDS <i>in vitro</i> .....	69
5.1.1 Κυτταροτοξικότητα νανοφορέων SNEDDS.....	69
5.1.2 Πρόσληψη των νανοφορέων .....	70
5.1.3. Επίδραση των νανοφορέων SNEDDS στην ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων .....	71
5.2. Δράση νανοφορέων SNEDDS <i>in vivo</i> .....	71
5.2.1. Οργανική κατανομή και κυτταρική πρόσληψη νανοφορέων SNEDDS.....	72
5.3 Μελέτη αντιγονικότητας πεπτιδίων του παρασίτου <i>Leishmania</i> .....	72
5.3.1 Μελέτη χυμικών αποκρίσεων στους εμβολιασμένους ποντικούς.....	74
5.3.2 Μελέτη κυτταρομεσολαβητικών αποκρίσεων στους εμβολιασμένους ποντικούς .....	75
5.4 Συμπεράσματα .....	76
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	77

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

Σύντμηση	Αγγλικός όρος	Ελληνικός όρος
<b>ACK</b>	Ammonium-Chloride-Potassium Lysing Buffer	Διάλυμα λύσης χλωριούχου αμμωνίου – καλίου
<b>AmB</b>	Amphotericin B	Αμφοτερικίνη Β
<b>APCs</b>	Antigen Presenting Cells	Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin	Αλβουμίνη ορού μόσχου
<b>BM-DCs</b>	Bone Marrow Derived Dendritic Cells	Μυελογενούς προέλευσης δενδριτικά
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation	Σύμπλεγμα διαφοροποίησης
<b>CDC</b>	Centers for Disease Control and Prevention	Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών
<b>CD40L</b>	CD40 ligand	Μόριο-προσδέτης του CD40
<b>ConA</b>	Concanavalin A	Κονκαναβαλίνη Α
<b>CPM</b>	Counts per minute	Κρούσεις ανά λεπτό
<b>CTL</b>	Cytotoxic T Lymphocyte	Κυτταροτοξικό Τ λεμφοκύτταρο
<b>CL</b>	Cutaneous Leishmaniasis	Δερματική Λεισμανίαση
<b>DC(s)</b>	Dendritic Cell(s)	Δενδριτικό(ά) κύτταρο(α)
<b>DCL</b>	Diffuse cutaneous leishmaniasis	Διάχυτη δερματική λεισμανίαση
<b>DMSO</b>	Dimethyl sulfoxide	Διμεθυλοσουλφοξειδίο
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	Ενζυμική δοκιμασία ανοσοπροσρόφησης
<b>FACS</b>	Fluorescence-activated Cell Sorter	Ανάλυση με Κυτταρομετρία Ροής
<b>FBS</b>	Fet al Bovine Serum	Ορός εμβρύου μόσχου
<b>FoxP3</b>	Forkhead box P3	Μεταγραφικός παράγοντας FoxP3
<b>GATA3</b>	GATA binding protein 3	Μεταγραφικός παράγοντας GATA3
<b>GIT</b>	gastrointestinal tract	Γαστρεντερικός σωληνας
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte/macrophage colony stimulating factor	Παράγοντας διέγερσης σχηματισμού αποικιών κοκκιοκυττάρων/μακροφάγων
<b>HLA</b>	Human Leukocyte Antigen	Ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο
<b>IgG</b>	Immunoglobulin G	Ανοσοσφαιρίνη γ
<b>IFN<math>\alpha</math></b>	Interferon $\alpha$	Ιντερφερόνη $\alpha$
<b>IFN<math>\beta</math></b>	Interferon $\beta$	Ιντερφερόνη $\beta$
<b>IL-1,4,6,10,12,13</b>	Interleukin 1,4,6,10,12,13	Ιντερλευκίνη 1,4,6,10,12,13
<b>iNOS</b>	Inducible Nitric Oxide Synthase	Επαγόμενη συνθετάση οξειδίου του αζώτου
<b>iTreg</b>	Inducible regulatory T cell	Επαγόμενα ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide	Λιποπολυσακχαρίτης
<b>MCL</b>	Mucocutaneous Leishmaniasis	Βλεννογονοδερματική λεισμανίαση

## Πίνακας Συντμήσεων

<b>MFI</b>	Mean Fluorescence Intensity	Μέση ένταση φθορισμού
<b>MHC I, II</b>	Major Histocompatibility Complex I, II	Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας I, II
<b>MLR</b>	Mixed Lymphocyte Reaction	Μεικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση
<b>NK</b>	Natural Killer	Φυσικά φονικά (κύτταρα)
<b>NP</b>	Nanoparticle	Νανοδομή
<b>NO</b>	Nitric Oxide	Οξείδιο του νατρίου
<b>PBS</b>	Phosphate-buffered Saline	Διάλυμα φωσφορικών αλάτων
<b>PE</b>	Phycoerythrin	Φυκοερυθρίνη
<b>PKDL</b>	Post Kala azar Dermal Leishmaniasis	Μετά-καλά-αζάρ δερματική λεισμανίαση
<b>PM</b>	Paromomycin	Παρομομυκίνη
<b>PMN</b>	Polymorphonuclear leukocytes	Πολυμορφοπυρηνικά λευκοκύτταρα
<b>RORγ</b>	Related orphan receptor gamma	Σχετικός ορφανός υποδοχέας γάμμα
<b>rpm</b>	Rounds per minute	Στροφές ανά λεπτό
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute	Ινστιτούτο Roswell Park Memorial
<b>SNEDDS</b>	Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System	Αυτό-γαλακτοποιούμενα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων
<b>T-bet</b>		Μεταγραφικός παράγοντας T-bet
<b>Tc</b>	Cytotoxic T cell	Κυτταροτοξικό T κύτταρο
<b>T<sub>fh</sub></b>	T Follicular Helper Cells	Θυλακικά βοηθητικά T κύτταρα
<b>T<sub>H</sub></b>	T helper	T βοηθητικό κύτταρο
<b>T<sub>H1</sub></b>	T helper 1	T βοηθητικό κύτταρο τύπου 1
<b>T<sub>H2</sub></b>	T helper 2	T βοηθητικό κύτταρο τύπου 2
<b>TLR(s)</b>	Toll-like Receptor(s)	Υποδοχέας(εις) τύπου Toll
<b>TMB</b>	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-τετραμεθυλοβενζιδίνη
<b>TNFα</b>	Tumor Necrosis Factor α	Παράγοντας νέκρωσης όγκων α
<b>Tr1</b>	Type 1 regulatory cells	Κύτταρα ρυθμιστικού τύπου 1
<b>UV</b>	Ultraviolet	Υπεριώδης
<b>VL</b>	Visceral Leishmaniasis	Σπλαγχνική λεισμανίαση
<b>WHO</b>	World Health Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ)

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Η συμβολή της νανοτεχνολογίας στην Ιατρική

Η νανοτεχνολογία είναι ένα σχετικά νέο διεπιστημονικό πεδίο της σύγχρονης επιστήμης, στα σύνορα μεταξύ φυσικής, χημείας, βιολογίας και μηχανολογικών επιστημών, που ασχολείται με υλικά και αλληλεπιδράσεις σε μοριακό ή ακόμη και ατομικό επίπεδο, μεγέθους 0,1-100 nm. Λόγω του μικρού μεγέθους τους, είναι γνωστό ότι αυτά τα υλικά έχουν διαφορετικές φυσικές και χημικές ιδιότητες από αυτά της μεγαλύτερης κλίμακας (μαγνητισμός, αγωγιμότητα, οπτικές ιδιότητες, χημικές αλληλεπιδράσεις κ.λπ.) (Nikalje A. P., 2015, Akbari M. et al., 2017). Οι εφαρμογές τους στον τομέα της ιατρικής (για διαγνωστικούς, θεραπευτικούς και προφυλακτικούς σκοπούς) έχουν φέρει επαναστατικές επιτυχίες σε πολλούς τομείς, όπως η θεραπεία του καρκίνου και του διαβήτη, οι αντι-μολυσματικοί παράγοντες και η χορήγηση εμβολίων (Nikolova M. et al., 2020).

Στη καθημερινότητά μας, συναντάμε πολλά φυσικά νανοσωματίδια, όπως είναι τα σώματα πετρελαίου, τα μυκήλια καζεΐνης, τα κυτταρικά οργανίδια, ακόμη και ιοί (McClements D. J. and Xiao H., 2017). Τα νανοσωματίδια αυτά, σχηματίζονται από μοριακά συζεύγματα και κατά την είσοδο τους στο ανθρώπινο σώμα, υποβάλλονται σε υποβάθμιση ή επηρεάζουν το ζωντανό κύτταρο (όπως οι ιοί). Από την άλλη πλευρά, τα τεχνητά νανοσωματίδια αντιπροσωπεύουν έναν νέο εισβολέα για το σώμα μας και έτσι τα κύτταρα δεν έχουν συγκεκριμένη προσαρμοστική απόκριση εναντίον τους. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυτταρικών δομών και των συνθετικών νανοσωματιδίων δεν είναι καλά κατανοητές και παραμένουν πολλές αναπάντητες ερωτήσεις. Επομένως, πολλά ζητήματα ηθικής και ασφάλειας στη χρήση της νανοτεχνολογίας στην ιατρική πρέπει να λυθούν (Nikolova M. et al., 2020). Τα μελλοντικά νανοσωματίδια θα πρέπει να λειτουργούν ως συστήματα μεταφοράς και στόχευσης φαρμάκων.

Λόγω του μικρού τους μεγέθους, τα νανοσωματίδια, δεν αναγνωρίζονται από το ανθρώπινο σώμα και έτσι μπορούν να μεταναστεύουν μέσω κυτταρικών μεμβρανών, ακόμα και να περάσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Υπάρχουν διάφορα είδη νανοσωματιδίων που είναι κατάλληλα για τη μεταφορά φαρμάκων και γονιδίων, για την ανίχνευση DNA δομών,

κλπ, και κατηγοριοποιούνται ως: λιποσώματα, νανοσωματίδια πολυμερών (νανοσφαίρες και νανοκάψουλες), στερεά νανοσωματίδια λιπιδίων, νανοκρύσταλλοι, πολυμερή θεραπευτικά όπως δενδριμερή και ανόργανα νανοσωματίδια (π.χ. νανοσωματίδια χρυσού ή νανοσωματίδια με μαγνητικές ιδιότητες) (Logothetidis S., 2006). Στο πίνακα 1 που ακολουθεί, αναγράφονται οι κύριες χρήσεις των νανοσωματιδίων στην ιατρική.

**Πίνακας 1: Νανοσωματίδια και εφαρμογές στην ιατρική (Idrees M., 2015, Nikalje A. P., 2015).**

Τύπος νανοσωματιδίων	Μέγεθος (nm)	Χρήση
<b>Νανοσωλήνες άνθρακα</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Διάμετρο 0.5–3</li> <li>• Μήκος 20–100</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ανίχνευση αλλαγών DNA ή/και βιοδείκτες πρωτεΐνης</li> </ul>
<b>Δενδριμερή</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;10</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκου</li> </ul>
<b>Νανοκρύσταλλοι</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2–9.5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Βελτίωση διαλυτότητας του φαρμάκου</li> <li>• Εντοπισμός καρκινικών κυττάρων</li> <li>• Εντοπισμός μεταλλαγμένου DNA</li> <li>• Οπτικοποίηση όγκου και λεμφαδένα</li> </ul>
<b>Νανο-κελύφη</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Διάφορα</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Απεικόνιση όγκου</li> <li>• Εκτομή όγκου</li> </ul>
<b>Νανوسύρματα</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Διάφορα</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ανίχνευση προϊόντων έκφρασης γονιδίων</li> </ul>
<b>Νανοσωματίδια</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10–100</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Παράγοντες αντίθεσης (μαγνητική τομογραφία και υπερηχογράφημα)</li> <li>• Στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων</li> <li>• Ενισχυτές διαπέρασης</li> <li>• Ανίχνευση απόπτωσης και αγγειογένεσης</li> </ul>
<b>Λιποσώματα, μυκήλια, γαλακτώματα</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Διάφορα</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Μεταφορά φαρμάκων</li> <li>• Τα λιποσώματα είναι μη τοξικά!</li> </ul>

## 1.2 Αυτο-γαλακτωματοποιούμενα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων

### (Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System, SNEDDS)

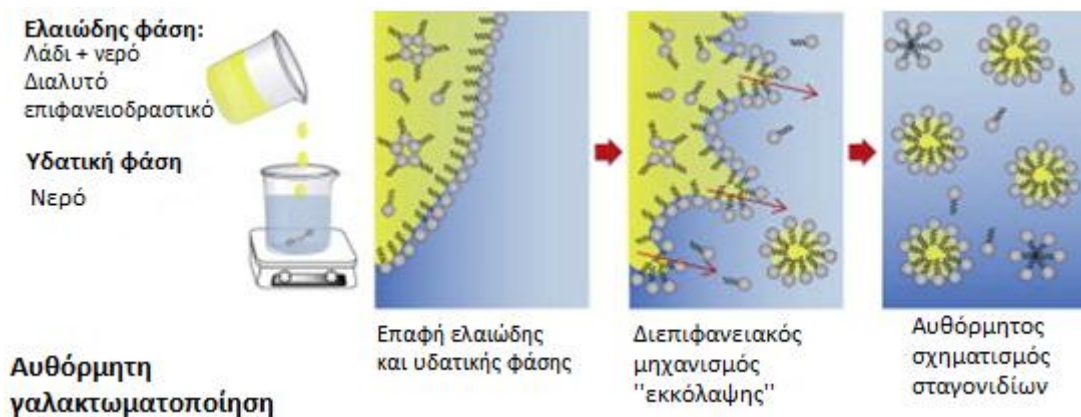
Τα αυτο-γαλακτωματοποιούμενα συστήματα χορήγησης φαρμάκων (SNEDDS) έχουν μέγεθος σταγονιδίων <100 nm και χρησιμοποιούνται για να αυξήσουν τη βιοδιαθεσιμότητα

των φαρμάκων και για να μειώσουν μειώσουν την τοξικότητά τους. Με το τρόπο αυτό βοηθούν στη χορήγηση του φαρμάκου από το στόμα ή άλλες μη επεμβατικές οδούς. Τα SNEDDS είναι ένα ισοτροπικό μίγμα ελαίων / λιπιδίων, επιφανειοδραστικών ουσιών, περιστασιακά συν-διαλυτών ή συν-γαλακτωματοποιητών και φαρμάκων (Khan M. et al., 2019). Τα σκευάσματα SNEDDS γαλακτωματοποιούνται υπό συνθήκες ήπιας ανάδευσης, όμοιες με αυτές που επικρατούν στο γαστρεντερικό σωλήνα (GIT) (Zurančič O. et al., 2015). Αυτά τα σκευάσματα μπορούν επίσης να γαλακτωματοποιηθούν στους ιστούς του σώματος που έχουν κάποιο περιβάλλον υγρής διασποράς όπως κολπικό, στοματικό, ρινικό και βλεννογόνο του οφθαλμού. Το μικρό μέγεθος τους, τα βοηθά να περάσουν αποτελεσματικά μέσω διαφορετικών φραγμών του γαστρεντερικού σωλήνα. Αυτή η ιδιότητα τα βοηθά επίσης να εξαπλωθούν αποτελεσματικά μέσω του βλεννογόνου, που καλύπτει διάφορες ανατομικές θέσεις (Fricker D. et al., 2010, Khan M. et al., 2019).

Στη παρούσα διπλωματική, διερευνήθηκε η ικανότητα των αυτο-γαλακτωματοποιούμενων συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων (Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System, SNEDDS), μεγέθους  $27.31 \pm 0.70$  nm, να χρησιμοποιηθούν ως φορείς αντιγόνου για την ανάπτυξη εμβολίου έναντι της πειραματικής σπλαγχνικής λειψμανίας.

### 1.2.1 Σύνθεση νανοσωματιδίων SNEDDS

Η μέθοδος της αυτογαλακτωματοποίησης, έχει τραβήξει τη προσοχή επιστημόνων από διάφορους τομείς (συμπεριλαμβανομένων των φαρμακευτικών επιστημών), καθώς παράγει νανογαλακτώματα σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς τη χρήση οργανικού διαλύτη και θερμότητας. Έχει παρατηρηθεί ότι τα κινητικά σταθερά νανογαλακτώματα με μικρό μέγεθος σταγονιδίων (περίπου 50 nm) μπορούν να παραχθούν με τη σταδιακή προσθήκη νερού σε διάλυμα επιφανειοδραστικού σε λάδι, με ήπια ανάδευση και σε σταθερή θερμοκρασία (εικόνα 1) (Forgiarini A. et al., 2001).



**Εικόνα 1: Διαδικασία αυτό-γαλακτοποίησης (YangY. et al., 2012).**

Η επιτυχής διαμόρφωση του SNEDDS εξαρτάται από την πλήρη κατανόηση της διαδικασίας της αυθόρμητης νανογαλακτωματοποίησης και επίσης από τις φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες των συστατικών που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή των SNEDDS. Οι παράγοντες που επηρεάζουν το φαινόμενο της αυτο-νανογαλακτωματοποίησης είναι (DateA. A. et al., 2010):

- Η φυσικοχημική φύση και η συγκέντρωση ελαιώδους φάσης, τασιενεργού και συν-γαλακτωματοποιητή ή συν-επιφανειοδραστικού ή διαλυτοποιητή (εάν περιλαμβάνεται)
- Ο λόγος των συστατικών, ιδίως ο λόγος του τασιενεργού ελαίου
- Η θερμοκρασία και το pH της υδατικής φάσης όπου θα συνέβαινε νανογαλακτωματοποίηση
- Φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου, όπως υδροφιλία / λιποφιλία, pKa και πολικότητα.

Επίσης, είναι ζωτικής σημασίας, τα συστατικά που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό των νανοφορέων SNEDDS να είναι βιοσυμβατά, μη τοξικά και κλινικά αποδεκτά. Τα βασικά συστατικά για την ανάπτυξη του SNEDDS είναι (Muzaffar F. et al., 2013):

- Ελαιώδης φάση
- Επιφανειοδραστική ουσία
- Συν-επιφανειοδραστική ουσία
- Υδατική φάση
- Θεραπευτικός παράγοντας.

### 1.3 Εμβολιασμός και πρόληψη λοιμωδών νοσημάτων

Επιστημονικές και φαρμακευτικές επιχειρήσεις έχουν αναπτύξει εμβόλια για την προστασία των ανθρώπων από δεκάδες ασθένειες και επομένως, το αντίκτυπο που είχαν τα εμβόλια και παρόμοια προγράμματα ανοσοποίησης στην ανθρώπινη υγεία και ευεξία ήταν μεγάλο. Μεγάλη πρόοδος, στη παραγωγή εμβολίων, επιτεύχθηκε τα τελευταία 50 χρόνια στον ανεπτυγμένο κόσμο, ωστόσο η πρόοδος αυτή συχνά καθυστερεί, κατά δεκαετίες, σε περιβάλλον με χαμηλούς πόρους (Schuchat A., 2011).

Ακολουθούν οι ιδιότητες που πρέπει να διαθέτει ένα ιδανικό εμβόλιο (Karki G., 2019):

- Ασφαλές: Το εμβόλιο πρέπει να είναι ασφαλές και δεν πρέπει να προκαλεί ασθένεια ή θάνατο
- Προστατευτικό: Το εμβόλιο πρέπει να προστατεύει από ασθένειες που οφείλονται στην έκθεση σε ζωντανά παθογόνα
- Βιώσιμη προστασία: η προστασία από ασθένειες πρέπει να διαρκεί χρόνια
- Συμβολή στη παραγωγή εξουδερωτικών αντισωμάτων και ενεργοποίηση προστατευτικών Τ κυττάρων
- Χαμηλό κόστος
- Βιολογική σταθερότητα
- Ευκολία χορήγησης
- Χωρίς παρενέργειες ή με πολύ λίγες παρενέργειες

Υπάρχει μια ποικιλία εμβολίων που είτε χρησιμοποιούνται ή βρίσκονται σε εξέλιξη για την πρόληψη μολυσματικών ασθενειών και διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες (Karki G., 2019):

- Εμβόλια που αποτελούνται από ζωντανούς μικροοργανισμούς: Τα εμβόλια αυτά περιέχουν ζωντανούς μικροοργανισμούς που έχουν αποδυναμωθεί στο εργαστήριο και δεν μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες
- Εμβόλια που αποτελούνται από νεκρούς μικροοργανισμούς: Οι μικροοργανισμοί που προκαλούν ασθένειες σκοτώνονται με χημικές ουσίες, θερμότητα ή ακτινοβολία. Τέτοια



εμβόλια είναι πιο σταθερά και ασφαλέστερα από τα ζωντανά εμβόλια, επειδή οι νεκροί μικροοργανισμοί δεν μπορούν να μεταλλαχθούν στην κατάσταση που προκαλούν ασθένειες

• Εμβόλια υπομονάδας: Αντί για ολόκληρους τους μικροοργανισμούς, τα εμβόλια υπομονάδας περιλαμβάνουν μόνο τα αντιγόνα που διεγείρουν καλύτερα το ανοσοποιητικό σύστημα και χρησιμοποιούνται στη παρασκευή εμβολίων. Τα εμβόλια αυτά διακρίνονται σε περαιτέρω κατηγορίες:

- Εμβόλιο πολυσακχαρίτη με κάψουλα: Η μολυσματικότητα ορισμένων παθογόνων βακτηρίων εξαρτάται κυρίως από την αντι-φαγοκυτταρική ιδιότητα της υδρόφοβης κάψουλας πολυσακχαρίτη τους
- Εμβόλια με τοξίνες: Για ορισμένα βακτήρια που εκκρίνουν τοξίνες ή επιβλαβείς χημικές ουσίες, παρασκευάζεται ένα εμβόλιο τοξίνων
- Εμβόλια DNA: Το εμβόλιο DNA είναι αλληλουχία DNA που χρησιμοποιείται ως εμβόλιο
- Ανασυνδυασμένο εμβόλιο: Τα εμβόλια ανασυνδυασμένου φορέα είναι πειραματικά εμβόλια παρόμοια με τα εμβόλια DNA, αλλά χρησιμοποιούν εξασθενημένο ιό ή βακτήριο για την εισαγωγή μικροβιακού DNA σε κύτταρα του σώματος
- Συνθετικό πεπτιδικό εμβόλιο: Η ανάπτυξη συνθετικών πεπτιδίων που μπορεί να είναι χρήσιμα ως εμβόλια, εξαρτάται από την ταυτοποίηση ανοσογόνων θέσεων.

### 1.3.1 Η ανοσολογία των εμβολίων

Τα εμβόλια, όπως και οι φυσικές λοιμώξεις, δρουν ξεκινώντας μια έμφυτη ανοσοαπόκριση, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί μια αντιγονοειδική προσαρμοστική ανοσοαπόκριση (Siegrist C. A. et al., 2013). Η έμφυτη ανοσία είναι η πρώτη γραμμή άμυνας έναντι παθογόνων που έχουν εισέλθει στο σώμα. Ενεργοποιείται μέσα σε λίγες ώρες, αλλά δεν είναι ειδική για ένα συγκεκριμένο παθογόνο και δεν παρουσιάζει μνήμη (Clem A. S., 2011). Η προσαρμοστική ανοσία παρέχει μια δεύτερη γραμμή άμυνας, γενικά σε μεταγενέστερο στάδιο μόλυνσης, που χαρακτηρίζεται από ένα εξαιρετικά διαφορετικό σύνολο λεμφοκυττάρων και αντισωμάτων ικανών να αναγνωρίζουν και να εξαλείφουν σχεδόν όλα τα γνωστά παθογόνα. Κάθε παθογόνο (ή εμβόλιο) εκφράζει (ή περιέχει) αντιγόνα που προκαλούν κυτταρική ανοσία ενεργοποιώντας εξαιρετικά ειδικά υποσύνολα T λεμφοκυττάρων και χυμική ανοσία διεγείροντας B λεμφοκύτταρα για παραγωγή

συγκεκριμένων αντισωμάτων (Siegrist C. A. et al., 2013). Μετά την εξουδετέρωση του παθογόνου, το ανοσοποιητικό σύστημα μέσω της προσαρμοστικής ανοσίας δημιουργεί ανοσολογική μνήμη. Αυτή η ανοσολογική μνήμη - η βάση της μακροχρόνιας προστασίας και ο στόχος του εμβολιασμού - χαρακτηρίζεται από την επιμονή των αντισωμάτων και τη δημιουργία κυττάρων μνήμης που μπορούν να επανενεργοποιηθούν γρήγορα μετά από επακόλουθη έκθεση στο ίδιο παθογόνο (Siegrist C. A. et al., 2013, Vetter V. et al., 2018).

### 1.3.2 Η χρήση των SNEDDS στην ανάπτυξη εμβολίων

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα παραδοσιακά εμβόλια περιλαμβάνουν ζωντανά εξασθενημένα νεκρά μικρόβια ή συστατικά μικροβίων. Αν και πολλά από αυτά τα εμβόλια διαδραμάτισαν κεντρικό ρόλο στον έλεγχο των μολυσματικών ασθενειών, ορισμένα δεν παρέχουν καλή προστασία έναντι των ασθενειών. Επιπλέον, ορισμένα ζωντανά εμβόλια δεν είναι ασφαλή για χρήση στον αυξανόμενο πληθυσμό ατόμων με ανοσοκαταστολή. Για την αντιμετώπιση αυτών των προκλήσεων αναπτύσσεται μια σειρά εμβολίων με βάση απομονωμένες πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες ή γυμνό DNA που κωδικοποιεί ένα προστατευτικό αντιγόνο. Ενώ αυτά μπορεί να είναι ασφαλέστερα από πολλά υπάρχοντα εμβόλια, είναι συχνά φτωχά ανοσογόνα και απαιτούν ανοσοενισχυτικά για να ενισχύσουν την αποτελεσματικότητά τους. Για το λόγο αυτό, η προσοχή στράφηκε προς τη χρησιμότητα των νανοσωματιδίων ως φορέων αντιγόνων εμβολίων. Το αντιγόνο είτε εγκλείεται εντός των νανοσωματιδίων είτε εντοπίζεται στην επιφάνειά τους. Εγκλείοντας ή ενσωματώνοντας αντιγονικό υλικό, τα NPs παρέχουν μια μέθοδο για την μεταφορά αντιγόνων τα οποία διαφορετικά μπορεί να αποικοδομηθούν γρήγορα κατά την ένεση ή να προκαλέσουν βραχύβια, εντοπισμένη ανοσοαπόκριση. Η σύζευξη αντιγόνων με τα νανοσωματίδια μπορεί να επιτρέψει την παρουσίαση του ανοσογόνου στο ανοσοποιητικό σύστημα με τον ίδιο τρόπο που θα παρουσιάζεται από το παθογόνο, προκαλώντας έτσι μια παρόμοια απόκριση (Gregory A. E. et al., 2013).

Τα νανοσωματίδια SNEDDS είναι αρκετά υποσχόμενα ως προς την χρήση τους για τη δημιουργία εμβολίων. Αρχικά έχουν αναδειχθεί αρκετά αποτελεσματικά για τη μεταφορά φαρμάκων με χαμηλή υδατοδιαλυτότητα (Tran T. et al., 2016, Hassan S. et al., 2017, Kiyani M. M. et al., 2019). Τα SNEDDS είναι γνωστά για τη δυνατότητά τους να ενισχύσουν τη

διαλυτότητα και την απορρόφηση των λιπόφιλων φαρμάκων (Sanna V. et al., 2007), αυξάνοντας την επιφάνεια και μειώνοντας το μέγεθος των σταγονιδίων ελαίου που είναι εύπεπτα και ενσωματώνοντας τα σε μικτά μυκήλια που μπορούν να περάσουν τον εντερικό αυλό (Gurta S. et al., 2011). Επιπλέον, τα SNEDDS προστατεύουν τα φάρμακα από την ενζυμική αποδόμηση, ενισχύουν τον υπερκορεσμό, την προκαλούμενη από τασιενεργό μεμβράνη ρευστότητα και τη διαπερατότητα (Hussain A. et al., 2015). Όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά, όπως είναι η σταθερότητα, η συμμόρφωση των ασθενών, η μείωση της δόσης και η ευκολία της σύνθεσης τους, μπορούν να βοηθήσουν και στην ενσωμάτωση αντιγόνων (Baloch J. et al., 2019).

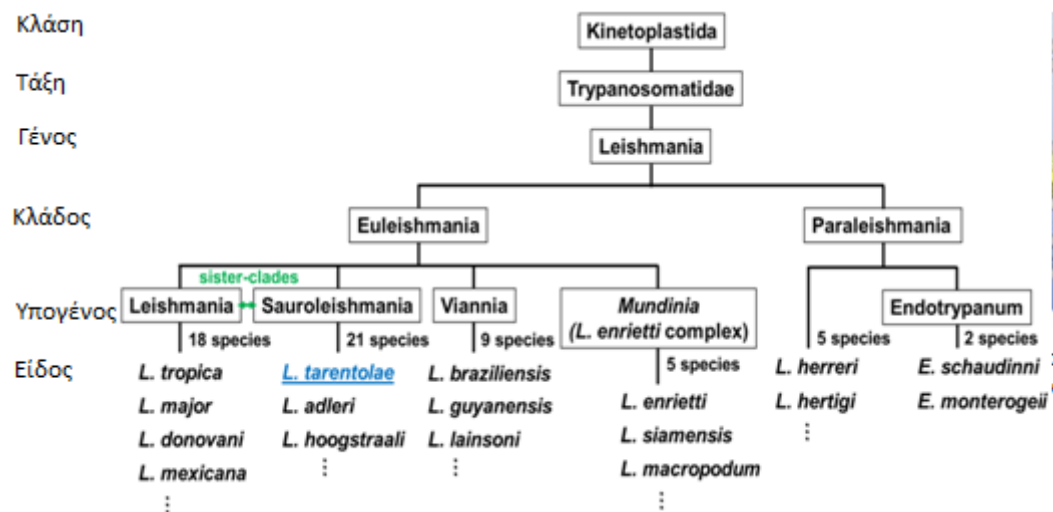
### 1.4 Η λείσμανίαση ως μοντέλο νοσήματος

Με τον όρο λείσμανίαση, περιγράφεται μια ομάδα ασθενειών που προκαλούνται από πρωτόζωα παράσιτα του γένους *Leishmania*, σύμφωνα με το Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ, World Health Organization, WHO). Τα παράσιτα αυτά παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά από τον Cunningham το 1885 και τα περιέγραψαν για πρώτη φορά οι Leishman το 1900 και Donovan το 1903. Η λείσμανίαση είναι ενδημική στις τροπικές περιοχές της Αφρικής και της Αμερικής, στην Ινδία και στις περιοχές της Μεσογείου και της Νοτιοδυτικής Ασίας. Πρόκειται για μια ομάδα ασθενειών με ένα φάσμα κλινικών εκδηλώσεων που κυμαίνονται από τα αυτογενή δερματικά έλκη μέχρι σοβαρή ασθένεια με μαζική καταστροφή ιστών και ακόμη και θάνατο (Handman E., 1999). Η πειραματική απόδειξη της μετάδοσης στον άνθρωπο από τις σκνίπες που ανήκαν στο γένος *Phlebotomus* αποδείχθηκε από τους αδελφούς Sergent το 1921. Ωστόσο ο πραγματικός τρόπος μόλυνσης, μέσω του δαγκώματος της σκνίπας, έγινε κατανοητός το 1941 (Cox F. E. G., 2002).

#### 1.4.1 Συστηματική κατάταξη παρασίτου *Leishmania*

Αρχικά, τα εξωγενή κριτήρια όπως τα κλινικά, γεωγραφικά και βιολογικά χαρακτηριστικά συνέβαλαν στη ταξινόμηση των ειδών του παρασίτου. Από τη δεκαετία του 1970 ωστόσο, για το καθορισμό των ειδών *Leishmania*, χρησιμοποιούνται τα εγγενή κριτήρια, όπως τα

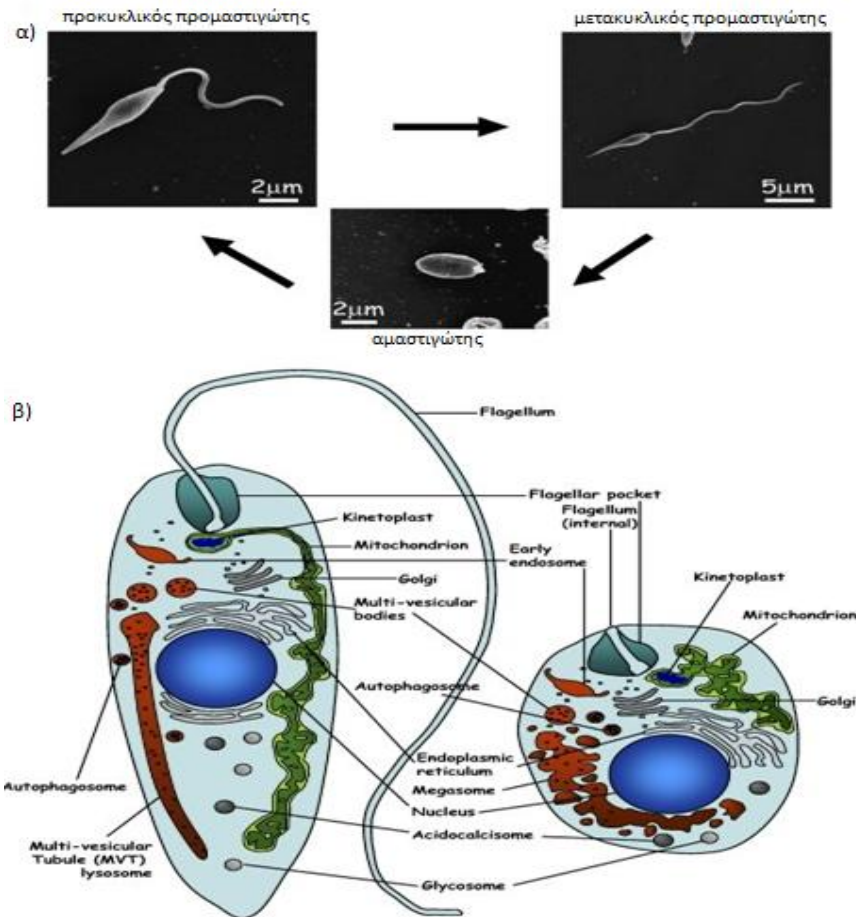
ανοσολογικά, βιοχημικά και γενετικά (Bañuls A. L. et al., 2007). Μια απλουστευμένη ταξινόμηση του γένους *Leishmania* παρουσιάζεται παρακάτω (εικόνα 2) (Klattet al., 2019).



Εικόνα 2: Ταξινόμηση του γένους *Leishmania*.

#### 1.4.2 Μορφολογία παρασίτου

Τα πρωτόζωα παράσιτα του γένους *Leishmania* παρουσιάζουν ένα πολύπλοκο κύκλο ζωής, που περιλαμβάνει διάφορες αναπτυξιακές μορφές (εικόνα 3α). Αυτές οι μορφές αντιπροσωπεύουν μια προσαρμογή στις μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες που συναντούν τα παράσιτα μέσα στους δύο οικοδεσπότες τους: το ξενιστή και το φορέα. Στο φορέα, που είναι η φλεβοτόμος, αναπαράγονται ως εξωκυτταρικά και ενεργά κινητικά φλεγμονώδη κύτταρα γνωστά ως προμαστιγώτα (εικόνα 3β, αριστερά), που βρίσκονται κυρίως στο πεπτικό σύστημα του εντόμου. Δύο κύριες μορφές μπορούν να διακριθούν: 1) οι πολλαπλασιαστικοί μη μολυσματικοί, προκυκλικοί προμαστιγώτες, οι οποίοι υπάρχουν στο ενδιάμεσο έντερο του εντόμου και 2) οι μη διαιρούμενοι, αλλά μολυσματικοί μετακυκλικοί προμαστιγώτες στην προβοσκίδα της σκνίπας. Οι μετακυκλικοί προμαστιγώτες, όταν εμβολιάζονται σε ξενιστή θηλαστικών, καθώς τρέφεται η φλεβοτόμος σκνίπα, διαφοροποιούνται, αφού πρώτα φαγοκυτταρωθούν από μακροφάγα, στον ενδοκυτταρικό αμαστιγώτη (εικόνα 3β, δεξιά) (Besteiro S. et al., 2007).



Εικόνα 3: Μεταβολές του κυτταρικού σχήματος κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής *Leishmania* (Besteiro S. et al., 2007).

### 1.4.3 Βιολογικός κύκλος ζωής και τρόπος μετάδοσης

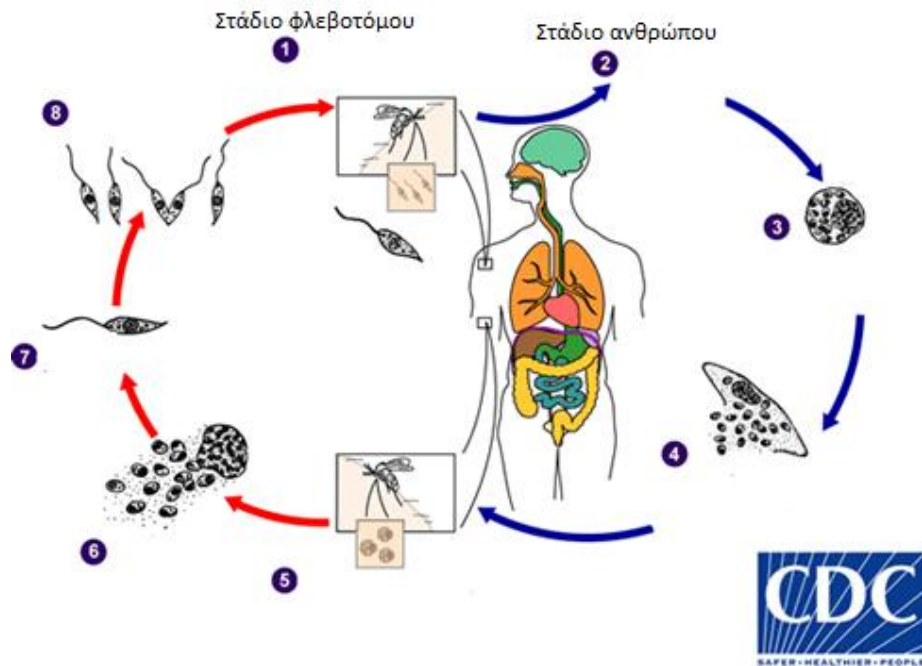
Τα ενδοκυτταρικά παράσιτα όπως αυτά του γένους *Leishmania* μεταδίδονται από ξενιστή σε ξενιστή μέσω ενός φορέα και η μετάδοση μπορεί να είναι είτε από άνθρωπο σε φορέα και στη συνέχεια σε ζώο ή αντίστροφα (ζωονοτική μετάδοση), είτε από άνθρωπο σε φορέα και στη συνέχεια σε άνθρωπο (ανθρωπονοτική μετάδοση) (Avila-García et al., 2014). Οι φορείς είναι μικρά έντομα της τάξης Diptera, που ανήκουν στην υποοικογένεια Phlebotominae. Αυτά ονομάζονται συνήθως φλεβοτόμοι σκνίπες και τα είδη *Lutzomyia* και *Phlebotomus* είναι γνωστά από καιρό ως οι κύριοι ξενιστές λείσμανιάσης (Bañuls A. L. et al., 2007).

Ο κύκλος ζωής αρχίζει όταν μια θηλυκή φλεβοτόμος, η οποία παρασιτείται (εικόνα 4) τρέφεται με αίμα από ένα σπονδυλωτό ξενιστή. Κατά την διάρκεια αυτή, οι μολυσματικές

προμαστιγιωτικές μορφές (μετακυκλικοί προμαστιγιώτες) εισέρχονται στο σπονδυλωτό ξενιστή (Bañuls A. L. et al., 2007). Στο χόριο του ξενιστή, τα παράσιτα φαγοκυτταρώνονται από μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα. Μετά την πρόσληψη και εσωτερικοποίηση των προμαστιγιωτών σε ένα φαγόσωμα, γίνεται συγχώνευση με τα λυσοσώματα, όπου και τα παράσιτα καταφέρνουν να επιβιώνουν μέσα σε αυτά. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας οι προμαστιγιώτες γρήγορα μετατρέπονται σε αμαστιγιώτες εντός 12-24 ωρών και συνεχίζουν να αναπτύσσονται και να διαιρούνται εντός του φαγολυσωματικού διαμερίσματος. Εκεί αυξάνονται σε αριθμό έως ότου τελικά εκρήγνυται και έπειτα μολύνουν άλλα φαγοκυτταρικά κύτταρα για να συνεχίσουν τον κύκλο ζωής τους. Όταν μία άλλη φλεβοτόμος τραφεί από έναν μολυσμένο σπονδυλωτό ξενιστή, απορροφά τα μακροφάγα και τα μονοκύτταρα που περιέχουν την αμαστιγιωτή μορφή. Οι αμαστιγιώτες απελευθερώνονται στο έντερο όπου και μετατρέπονται σε θρυμματισμένους προμαστιγιώτες (Singh H. P. et al., 2006). Αυτοί περνούν από μια διαδικασία που ονομάζεται μετακυκλογένεση, στην οποία αποκτάται η διαχωριστική, μη αποτελεσματική προκυκλική μορφή και να μεταμορφωθεί σε μια μη διαχωριστική, μολυσματική μετακυκλική μορφή (Da Silva R. and Sacks D. L. 1987). Οι μετακυκλικοί προμαστιγιωτες μεταναστεύουν στο φάρυγγα και στη στοματική κοιλότητα, προκειμένου να είναι έτοιμοι για μετάδοση κατά τη διάρκεια ενός επόμενου γεύματος (Cunningham A. C. 2002, Van Assche et al., 2011) (εικόνα 5).



Εικόνα 4: Θηλυκή φλεβοτόμος σκνίπα (Mans et al., 2017).



**Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής του παρασίτου *Leishmania spp.*** Η λείσμανίαση μεταδίδεται από το δάγκωμα των μολυσμένων θηλυκών φλεβοτόμων. **1)** Οι φλεβοτόμοι εγχέουν το μολυσματικό στάδιο (δηλαδή προμαστιγώτες) από το προβοσκίδα τους κατά τη διάρκεια των γευμάτων του αίματος. **2)** Οι προμαστιγώτες που φθάνουν στην πληγή διάτρησης φαγοκυτταρώνονται από μακροφάγα και άλλους τύπους μονοπύρηνων φαγοκυτταρικών κυττάρων. **3)** Οι προμαστιγώτες μετασχηματίζονται μέσα στα κύτταρα σε αμαστιγώτες, **4)** πολλαπλασιάζονται με απλή διαίρεση και μολύνουν άλλα μονοπύρηννα φαγοκυτταρικά κύτταρα. **5,6)** Οι φλεβοτόμοι μολύνονται με τη λήψη μολυσμένων κυττάρων κατά τη διάρκεια των γευμάτων του αίματος. **7)** Οι αμαστιγώτες μετασχηματίζονται σε προμαστιγώτες, αναπτύσσονται στο έντερο και **8)** μεταναστεύουν στην προβοσκίδα (CDC, 2019).

#### 1.4.4 Κλινικές μορφές του νοσήματος

Υπάρχουν τρεις κύριες μορφές λείσμανίασης που μπορούν να παρουσιαστούν ανάλογα με το είδος του παρασίτου που προσβάλλει το ξενιστή και την ανοσολογική του απάντηση (WHO, 2015):

- Δερματική λείσμανίαση (Cutaneous leishmaniasis, CL)
- Βλεννογονοδερματική λείσμανίαση (Mucocutaneous leishmaniasis, MCL)
- Σπλαχνική λείσμανίαση (Visceral leishmaniasis, VL)

Επίσης εκτός από τις 3 κύριες μορφές, εμφανίζονται και κάποιες παραλλαγές αυτών (Reithinger R. et al., 2007):

- Η μετά Καλά-αζαρ δερματική λεισμανίαση (Post kalaazar dermal leishmaniasis, PKDL)
- Η διάχυτη δερματική λεισμανίαση (Diffusecutaneousleishmaniasis - DCL)
- Η σπλαγχνοτροπική λεισμανίαση (Viscerotropicleishmaniasis).

Η ασθένεια επηρεάζει ορισμένους από τους φτωχότερους πληθυσμούς της γης και συνδέεται με τον υποσιτισμό, τον εκτοπισμό του πληθυσμού, τη κακή στέγαση, το αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα, την έλλειψη οικονομικών πόρων και τις περιβαλλοντικές αλλαγές. Υπολογίζεται ότι 700.000 έως 1 εκατομμύριο νέες περιπτώσεις καταγράφονται ετησίως και πως ένα μικρό ποσοστό των μολυσμένων ξενιστών από παράσιτα *Leishmania* τελικά θα αναπτύξει την ασθένεια (WHO, 2015).

### 1.4.4.1 Δερματική λεισμανίαση

Τα τελευταία χρόνια, η δερματική λεισμανίαση (CL) παρατηρείται όλο και περισσότερο στους μετανάστες, τους ταξιδιώτες και το στρατιωτικό προσωπικό. Λόγω της μεγάλης ικανότητας αυτής της μορφής να μιμείται άλλες δερματοπάθειες, μπορεί να παραπλανήσει τους επαγγελματίες, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε μη θεραπευμένες αλλοιώσεις που προκαλούν ουλές (εικόνα 6). Οι δερματικές βλάβες μπορεί να είναι είτε μία απλή, περιορισμένη βλάβη του δέρματος είτε πολλαπλές, μεγάλες, τοπικά καταστρεπτικές αλλοιώσεις του δέρματος (Blum et al., 2014). Κλινικές αλλοιώσεις εμφανίζονται μετά από μια περίοδο επώασης, η οποία συχνά μπορεί να είναι πολλοί μήνες. Οι βλάβες από CL συχνά εντοπίζονται σε μέρη του σώματος που είναι εκτεθειμένα στο περιβάλλον, όπως το πρόσωπο, οι βραχίονες και τα κάτω πόδια (Bilgic-Temel et al., 2019).





Εικόνα 6: Χαρακτηριστική δερματική βλάβη CL (Ramot Y. and Zlotogorski A., 2016).

#### 1.4.4.2 Βλεννογονοδερματική λεισμανίαση

Η βλεννογονοδερματική λεισμανίαση χαρακτηρίζεται από την ταυτόχρονη εμπλοκή τόσο του βλεννογόνου όσο και του δέρματος και οδηγεί σε ολική ή μερική καταστροφή των βλεννογόνων της μύτης, του στόματος και του λαιμού. Συνήθως εμφανίζεται σε ασθενείς με προϋπάρχουσα δερματική λεισμανίαση. Περίπου το 50% των βλαβών του βλεννογόνου αναπτύσσονται εντός δύο ετών από την εμφάνιση δερματικών βλαβών και 90% το κάνουν εντός 10 ετών. Περίπου το 15% των ασθενών δεν έχουν ιστορικό δερματικών βλαβών. Οι βλάβες του βλεννογόνου προκύπτουν είτε από άμεση επέκταση είτε από αιματογενή ή λεμφική εξάπλωση (Daulatabad D. et al., 2015).

#### 1.4.4.3 Σπλαχνική λεισμανίαση

Η σπλαχνική λεισμανίαση, γνωστή και ως kala-azar, είναι η πιο σοβαρή και συχνά θανατηφόρα ασθένεια. Τα κύρια είδη που είναι υπεύθυνα για τη σπλαχνική λεισμανίαση είναι: 1) *L. donovani*, 2) *L. infantum* και 3) *L. chagasi*. Αυτά κατοικούν σε σπλαχνικά όργανα και προκαλούν το σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από πυρετό, απώλεια βάρους, σπληνομεγαλία, ηπατομεγαλία και αναιμία (εικόνα 7). Εάν αφεθεί χωρίς θεραπεία, η ασθένεια έχει υψηλό ποσοστό θνησιμότητας. Μερικά άτομα αναπτύσσουν το σπάνιο σύνδρομο που είναι γνωστό ως μετά Καλα-αζαρ δερματική λεισμανίαση (PKDL), το οποίο εμφανίζεται μέσα σε λίγα χρόνια από την πλήρη θεραπεία του VL. Οι ασθενείς με PKDL

εμφανίζουν οζώδεις δερματικές βλάβες (εικόνα 8), οι οποίες περιέχουν μεγάλο αριθμό παρασίτων και θεωρούνται σημαντική πηγή παρασίτων για νέες μολύνσεις (Kedzierski L. et al., 2006).



Εικόνα 7: Ασθενής με VL όπου παρατηρείται διόγκωση του σπλήνα (Mans et al., 2017).



Εικόνα 8: PKDL- οζώδεις δερματικές βλάβες (Mondal D. et al., 2014).

Η σπλαχνική λεισμανίαση διακρίνεται σε δύο κατηγορίες, οι οποίες διαφέρουν στα χαρακτηριστικά μετάδοσης:

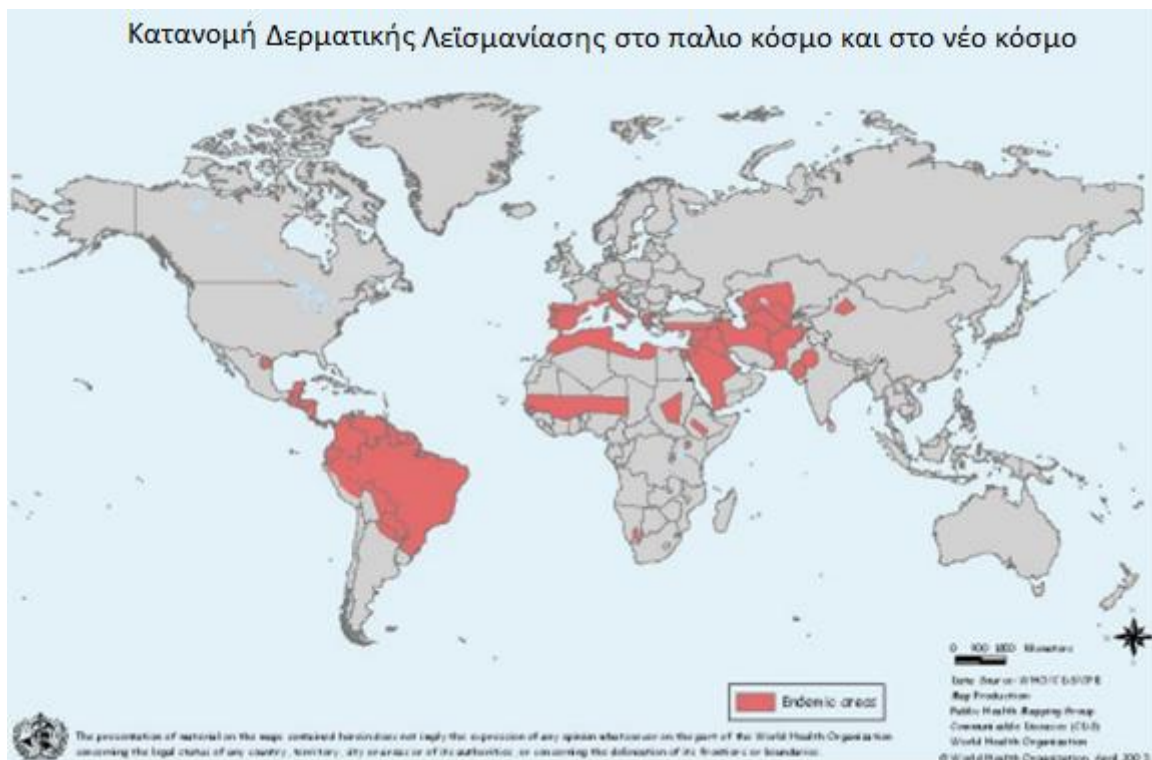
1. Ζωονοτική σπλαχνική λεισμανίαση : Προκαλείται από την *L. infantum* και μεταδίδεται από το ζώο στον ενδιάμεσο ξενιστή και έπειτα στον άνθρωπο. Στην Ελλάδα, ο πιο συχνός ενδιάμεσος ξενιστής είναι ο σκύλος και για το λόγο αυτό η λεισμανίαση αποτελεί σοβαρό κτηνιατρικό πρόβλημα στη χώρα μας.
2. Ανθρωπονοτική σπλαχνική λεισμανίαση: Προκαλείται από την *L. donovani* και μεταδίδεται από άνθρωπο σε φορέα και στη συνέχεια στον άνθρωπο.

### 1.4.5 Γεωγραφική κατανομή της λεισμανίασης

Η λεισμανίαση αποτελεί μια ποικίλη ομάδα κλινικών συνδρόμων που προκαλούνται από πρωτόζωα παράσιτα του γένους *Leishmania*. Εκτιμάται ότι 350 εκατομμύρια άνθρωποι διατρέχουν κίνδυνο σε 88 χώρες, με παγκόσμια επίπτωση 1-1,5 εκατομμυρίων περιστατικών δερματικής και 500,000 περιπτώσεων σπλαχνικής λεισμανίασης (Bhargava P. και SinghR., 2012). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO, 2020) περίπου 50.000 έως 90.000 νέες περιπτώσεις σπλαχνικής λεισμανίασης (VL) εμφανίζονται σε παγκόσμιο επίπεδο ετησίως. Μάλιστα, το 2018, περισσότερες από 95% των νέων περιπτώσεων που αναφέρθηκαν στον ΠΟΥ συνέβησαν σε 10 χώρες: Βραζιλία, Κίνα, Αιθιοπία, Ινδία, Ιράκ, Κένυα, Νεπάλ, Σομαλία, Νότιο Σουδάν και Σουδάν (εικόνα 9). Σχετικά με τη δερματική λεισμανίαση (CL) περίπου το 95% των κρουσμάτων εμφανίζεται στην Αμερική, τη Μεσογειακή λεκάνη, τη Μέση Ανατολή και την Κεντρική Ασία. Το 2018 το 85% των νέων κρουσμάτων CL εμφανίστηκε σε 10 χώρες: Αφγανιστάν, Αλγερία, Βολιβία, Βραζιλία, Κολομβία, Ιράν (Ισλαμική Δημοκρατία), Ιράκ, Πακιστάν, Αραβική Δημοκρατία της Συρίας και Τυνησία (εικόνα 10). Επίσης εκτιμάται ότι 600 000 έως 1 εκατομμύριο νέες περιπτώσεις εμφανίζονται παγκοσμίως σε ετήσια βάση. Τέλος στη περίπτωση της βλεννογονοδερματικής λεισμανίασης πάνω από το 90% των περιπτώσεων εμφανίζονται στη Βολιβία , τη Βραζιλία, την Αιθιοπία και το Περού.



Εικόνα 9: Παγκόσμια κατανομή της Σπλαχνικής Λείσημανίασης (αρχείο WHO).



Εικόνα 10: Παγκόσμια κατανομή της Δερματικής Λείσημανίασης (αρχείο WHO).

#### 1.4.6 Θεραπεία του νοσήματος

Η προσέγγιση της θεραπείας εξαρτάται από τους παράγοντες του ξενιστή και του παρασίτου. Ορισμένες προσεγγίσεις / θεραπευτικές αγωγές είναι αποτελεσματικές μόνο κατά ορισμένων ειδών / στελεχών *Leishmania* και μόνο σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές. Ειδικές ομάδες (όπως τα μικρά παιδιά, οι ηλικιωμένοι, οι έγκυες / θηλάζουσες γυναίκες και τα άτομα που είναι ανοσοκατασταλμένα) μπορεί να χρειαστούν διαφορετικά φάρμακα ή δοσολογίες (CDC, 2018).

##### 1.4.6.1 Διαθέσιμα φάρμακα για τη θεραπεία της λεισμανίασης

1. Πεντασθενές αντιμόνιο (pentavalentantimony, Sb) : θεωρείται φάρμακο πρώτης γραμμής για τη θεραπεία της νόσου της λεισμανίασης (Kedzierski et al., 2009). Ωστόσο, αυτά τα φάρμακα απαιτούν μακρές πορείες χορήγησης (εως και 30 ημέρες) και είναι πολύ τοξικά για τον άνθρωπο (Akbari M. et al., 2017)
2. Η αμφοτερικίνη Β ή η μυκηζόνη (Amphotericin b, AmB): είναι ένα αντιβιοτικό και αντιμυκητιακό φάρμακο και συνήθως χορηγείται ως θεραπεία δεύτερης γραμμής για τη λεισμανίαση. Ωστόσο, οι δυσμενείς παρενέργειες αποτελούν περιοριστικό παράγοντα χορήγησης της (Akbari M. et al., 2017)
3. Η μιλτεφοσίνη (miltefosine, MIL): είναι το πρώτο μη παρεντερικό φάρμακο και μπορεί να χορηγηθεί από το στόμα αλλά και τοπικά για τη θεραπεία της λεισμανίασης. Ωστόσο, εμφανίζει πολλές ανεπιθύμητες παρενέργειες, όπως εμετός, διάρροια και τοξικότητα (Organ A., 2015)
4. Η παρομομυκίνη (Paromomycin, PM): είναι ένα αντιβιοτικό το οποίο έχει χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία της VL σε ένα παρεντερικό σκεύασμα και της CL σε τοπικές και παρεντερικές συνθέσεις (Chakravarty J. and Sundar S., 2019).

Το γεγονός ότι τα παραπάνω φάρμακα εμφανίζουν αρκετά προβλήματα κατά τη χρήση τους, όπως είναι η τοξικότητα, η ανάπτυξη αντοχής από το παράσιτο καθώς και η διάρκεια της θεραπείας που απαιτείται, θεωρείται επιτακτική η ανάγκη εύρεσης νέων μεθόδων για την καταπολέμηση της νόσου.

Επίσης, ως εναλλακτικές θεραπευτικές προσεγγίσεις, μπορούν να χρησιμοποιηθούν η θερμοθεραπεία και η κρυοθεραπεία. Η θερμοθεραπεία στηρίζεται στο γεγονός ότι τα παράσιτα *Leishmania* δεν πολλαπλασιάζονται σε θερμοκρασίες  $> 39^{\circ} \text{C}$  *in vitro* (Chakravarty J. and Sundar S., 2019) και η κρυοθεραπεία μέσω του σχηματισμού πάγου, προκαλεί ενδοκυτταρική καταστροφή κυττάρων που οδηγεί σε εντοπισμένη ισχαιμική νέκρωση (López-Carvajal L. et al., 2016).

Τέλος, εξελίξεις στη νανοτεχνολογία, τα τελευταία χρόνια, παρέχουν νέες προσεγγίσεις στη θεραπεία της λεισμανίασης. Η νανοτεχνολογία συμβάλει μέσω δύο διαδικασιών στη θεραπεία αυτής της λοίμωξης. Η πρώτη προσέγγιση είναι ο σχεδιασμός συστημάτων νανοφαρμάκων για τα κοινά και συμβατικά φάρμακα. Αυτή η μέθοδος έχει λάβει σημαντική προσοχή στην τομέα της ανάπτυξης φαρμάκων και παρουσιάζει μια ελπιδοφόρα αντιλεισμανιακή θεραπεία, καθώς εμφανίζει: υψηλή αποτελεσματικότητα, υψηλή απόδοση στόχου, χαμηλή τοξικότητα, υψηλή συγκέντρωση, ελεγχόμενη απελευθέρωση συστήματος και παρατεταμένη συστηματική διάρκεια ζωής στη κυκλοφορία (de Carvalho R. F. et al., 2013). Η δεύτερη προσέγγιση είναι η ενσωμάτωση του φαρμάκου στα νανοσωματίδια. Τα μακροφαγα φαγοκυττάρωνουν τα νανοσωματίδια, καθώς τα αναγνωρίζουν ως ξένα σώματα, προκαλώντας έτσι την ειδική παράδοση των στόχων *Leishmania* εντός των μακροφάγων (Kumara R. et al., 2014).

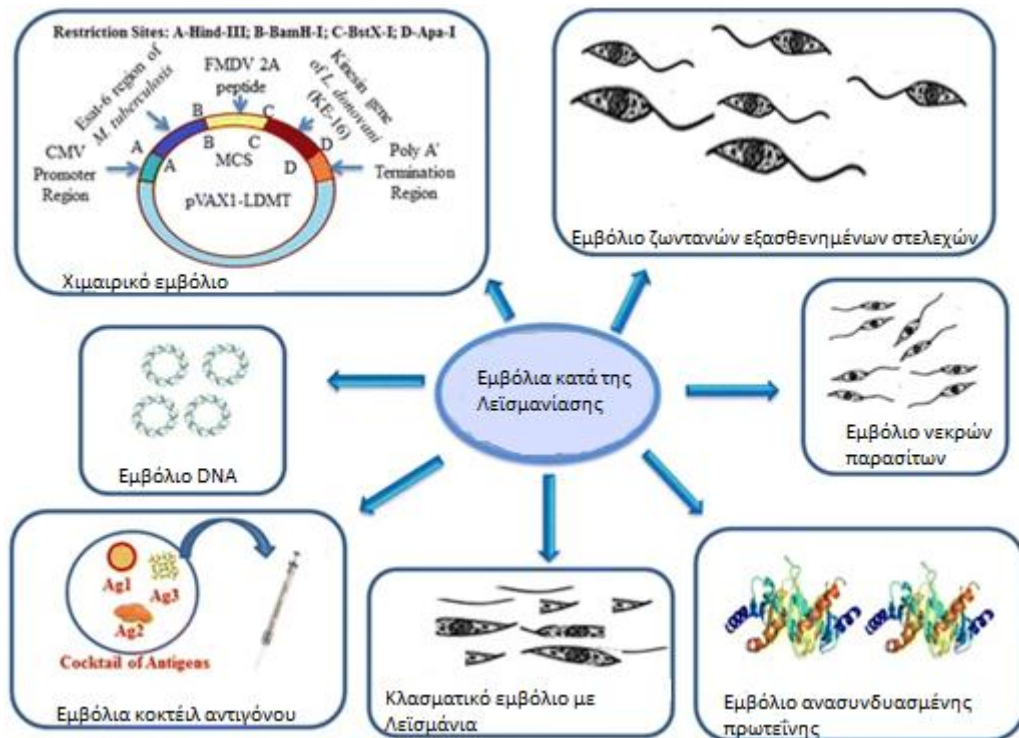
### 1.4.7 Εμβόλια κατά της *Leishmania*

Εκτεταμένες αποδείξεις από μελέτες σε ζωικά μοντέλα, κυρίως ποντίκια, δείχνουν ότι η σταθερή προστασία μπορεί να επιτευχθεί μετά την ανοσοποίηση με καθορισμένα εμβόλια πρωτεΐνης ή DNA (Kedzierki L. et al., 2006). Συνεπώς, αποτελεί επιτακτική ανάγκη, η ανακάλυψη ενός αποτελεσματικού εμβολίου, προκειμένου να επιτευχθεί ο έλεγχος και η εξάλειψη αυτής της νόσου (εικόνα 11).

Γενικά, τα εμβόλια για την προφύλαξη από λεισμανίαση, τα οποία βρίσκονται σε αναπτυξιακό στάδιο, μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες (Srivastava S. et al., 2016):

1. Εξασθενημένα εμβόλια *Leishmania*, συμπεριλαμβανομένων των νέων γενετικά τροποποιημένων στελεχών

2. Εμβόλια νεκρών παρασίτων που αποτελούνται από ολόκληρα σκοτωμένα παράσιτα *Leishmania* ή κλάσματα του παρασίτου
3. Καθορισμένα εμβόλια, δηλαδή αυτά που αποτελούνται από ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, εμβόλια DNA και συνδυασμούς αυτών.



**Εικόνα 11:** Δυνατότητες και προκλήσεις για την ανάπτυξη ενός επιτυχούς εμβολίου για λεισμανίαση (Srivastava S. et al., 2016).

Η ανάπτυξη ενός αποδοτικού εμβολίου δεν είναι εύκολη καθώς εγκυμονούν κίνδυνοι, όπως οι πολλές παρενέργειες που προκαλούν τα κατά τα άλλα αποτελεσματικά εμβόλια ζωντανών οργανισμών. Ακόμα και εκείνα που διαθέτουν τις πρωτεΐνες του παρασίτου, αν και ασφαλή, λόγω του ότι απομακρύνονται γρήγορα από τον οργανισμό, δεν προλαβαίνουν να συμβάλλουν στην ανάπτυξη επαρκούς ανοσοαπόκρισης και επομένως είναι απαραίτητη η συχνή χορήγηση τους. Προκειμένου να ξεπεραστούν αυτά τα εμπόδια, είναι απαραίτητη η χρήση των ανοσοενισχυτικών, ουσιών δηλαδή που ενισχύουν την ανοσοαπόκριση βοηθώντας στη παρουσίαση των αντιγόνων στα αντιγονοπαρουσιαστικά κυτταρα (Raman V. S. et al., 2012). Επίσης, με σκοπό να ελαττωθεί ο ρυθμός χορήγησης, χρησιμοποιούνται τα

νανοσωματίδια. Αυτά είναι στερεοί φορείς ουσιών μεγέθους μικρότερου από 1 μm, στους οποίους γίνεται η ενσωμάτωση των πρωτεϊνών/πεπτιδίων του παρασίτου *Leishmania*, με σκοπό να επιτευχθεί η στοχευμένη μεταφορά τους (Saleem K. et al., 2019).

### 1.5 Ανοσοενισχυτικά

Τα ανοσοενισχυτικά είναι παράγοντες που περιλαμβάνονται σε ένα εμβόλιο, για την ενίσχυση της ανοσοαπόκρισης έναντι ενός αντιγόνου. Μπορούν επίσης να αξιοποιηθούν για την προώθηση ταχύτερων και πιο μακράς διάρκειας ανοσολογικών απαντήσεων. Οι βιολογικές ιδιότητες των ανοσοενισχυτικών αναγράφονται παρακάτω (Guy B. and Burdin N., 2005, Riese P. et al., 2013):

- Δημιουργούν μια αντιγονική δεξαμενή για αργή απελευθέρωση του αντιγόνου
- Διευκολύνουν τη στόχευση του αντιγόνου σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα
- Προωθούν την επεξεργασία αντιγόνου και παρουσίαση αυτού
- Δημιουργούν μικροπεριβάλλον που ευνοεί την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και την ενίσχυση της προκαλούμενης ανοσοαπόκρισης
- Δεν παρουσιάζουν ανοσολογικές ιδιότητες και τοξικά αποτελέσματα
- Είναι βιοαποικοδομήσιμα και φτηνά στη παραγωγή.

### 1.6 Ανοσολογική απόκριση έναντι του παρασίτου *Leishmaniaspp.*

Η δημιουργία προστατευτικής ανοσίας έναντι του παρασίτου *Leishmania* απαιτεί τη συνεργασία μεταξύ της έμφυτης και της προσαρμοστικής/επίκτητης ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή (Martínez-López M. et al., 2018). Η έμφυτη ανοσολογική απόκριση μεσολαβεί πρώτη και δεν διαθέτει ειδικότητα, ενώ διαρκεί για μικρό χρονικό διάστημα. Σε αυτήν περιλαμβάνονται οι ανατομικοί και φυσιολογικοί φραγμοί και κάποια από τα κύτταρα που ενεργοποιούνται είναι τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα (PMN), τα μακροφάγα (ΜΦ) και τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα (NK, natural killers). Το επίκτητο ανοσολογικό σύστημα, αν και αναπτύσσεται με πιο αργούς ρυθμούς, διαρκεί περισσότερο και αποτελείται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs), τα οποία είναι τα



μονοπύρηννα / μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα μαζί με τα προϊόντα τους, όπως τα αντισώματα.

### 1.6.1 Τύποι ανοσολογικής απόκρισης

#### Χυμική ανοσολογική απόκριση

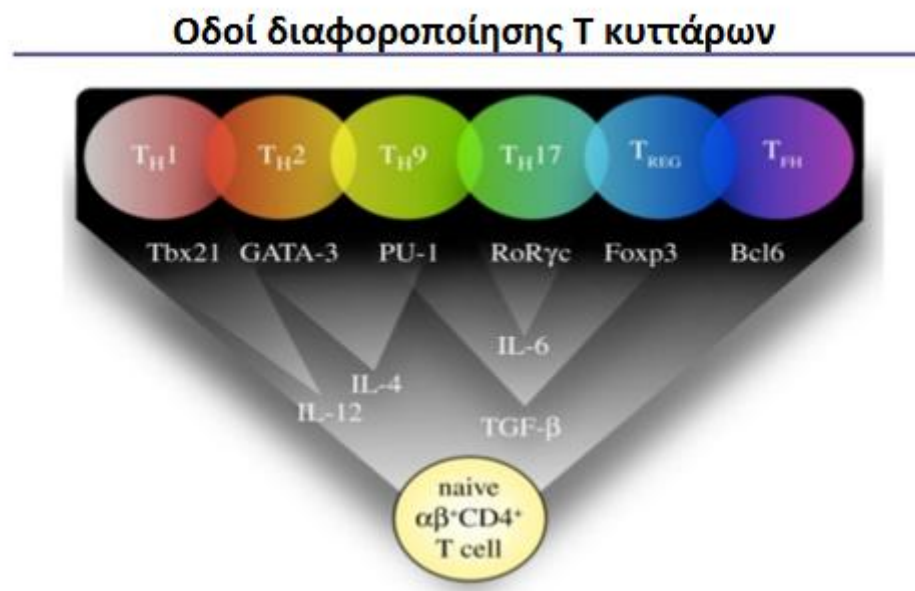
Η χυμική ανοσία μεσολαβείται από τα Β λεμφοκύτταρα και χαρακτηρίζεται από τη παραγωγή των αντισωμάτων. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα, είναι ότι από την ανάλυση υποομάδων IgG σε μολυσμένους από το παράσιτο σκύλους από *Leishmania* έχει αποδειχτεί ότι τα αντισώματα IgG2 σχετίζονται με ασυμπτωματική μόλυνση, ενώ τα IgG1 αντισώματα σχετίζονται με την ανάπτυξη της νόσου (Bourdoiseau G. et al., 1997).

#### Κυτταρική ανοσολογική απόκριση

Τα Τ-λεμφοκύτταρα είναι αυτά που μεσολαβούν στην κυτταρική ανοσία και μαζί με τα Β λεμφοκύτταρα, που μεσολαβούν στην χυμική ανοσία, παρέχουν προσαρμοστική ανοσία, η οποία λειτουργεί σε στενή συνεργασία με την έμφυτη ανοσία (Luckheeram R. V. et al., 2012). Τα Τ κύτταρα είναι ικανά να διαφοροποιούνται σε διάφορες λειτουργικές μορφές όπως Th-1, Th-2, Th-17, Treg και γδ-Τ κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά χαρακτηρίζονται από την παρουσία ειδικών δεικτών στην επιφάνεια τους όπως CD3, CD4 και CD8, την έκφραση παραγόντων μεταγραφής όπως GATA-3, Tbet, RORγ και Foxp3 κλπ. και αλληλεπιδρούν με μία ειδική κατηγορία MHC για αναγνώριση αντιγόνου όπως MHCI και MHCII για την παρουσίαση της ενδογενούς και εξωγενούς φύσης του αντιγόνου αντίστοιχα (João C. et al., 2006, Jawed J. J. et al., 2019). Κατά τη διάρκεια της σπλαχνικής λεισμανίασης, έχει βρεθεί ότι η επιτυχής καθιέρωση της μόλυνσης αυξάνεται με τον πληθυσμό των Th-2 και Treg κυττάρων, καθώς εκκρίνουν υψηλό επίπεδο των κυτοκινών IL-10 και TGF-β, οι οποίες αναπτύσσουν σοβαρή καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος. Από την άλλη πλευρά, ο αυξημένος πληθυσμός των Th-17 και Th-1 κυττάρων εκκρίνει διάφορες προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες που αντιστέκονται στην εμφάνιση της λοίμωξης (Jawed J. J. et al., 2019).

Τα CD4<sup>+</sup> Τ κύτταρα μαζί με CD8<sup>+</sup> Τ κύτταρα αποτελούν την πλειονότητα των Τ-λεμφοκυττάρων. Τα κύτταρα CD4<sup>+</sup>, αναγνωρίζουν αντιγόνα που είναι συνδεδεμένα με μόριο MHC τάξης II και λειτουργούν κυρίως ως βοηθητικά κύτταρα Τ που μπορούν να

κατηγοριοποιηθούν σε περαιτέρω υποπληθυσμούς (π.χ. Th1, Th2, Th17, Treg) (εικόνα 12). Η διαφοροποίηση των διαφορετικών γραμμών εξαρτάται από το σύνθετο δίκτυο ειδικών σηματοδοτών και μεταγραφικών παραγόντων κυτταροκίνης που ακολουθούνται από επιγενετικές τροποποιήσεις (Luckheeram R. V. et al., 2012). Όταν τα ανώριμα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα ενεργοποιούνται μετά από αλληλεπίδραση με το σύμπλεγμα MHC-class II-αντιγόνου, διαφοροποιούνται στον κλασικό τύπο Th-1 και Th-2 ανάλογα με το μικροπεριβάλλον (Jawed J. J. et al., 2019). Έχει βρεθεί ότι στη περίπτωση μόλυνσης από το παράσιτο *Leishmania*, το CD4<sup>+</sup> T κύτταρο εκκρίνει προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως η IL-12 και TNF-α που συνδέεται με σημαντικό προστατευτικό ρόλο του ξενιστή (Jawed J. J. et al., 2018).

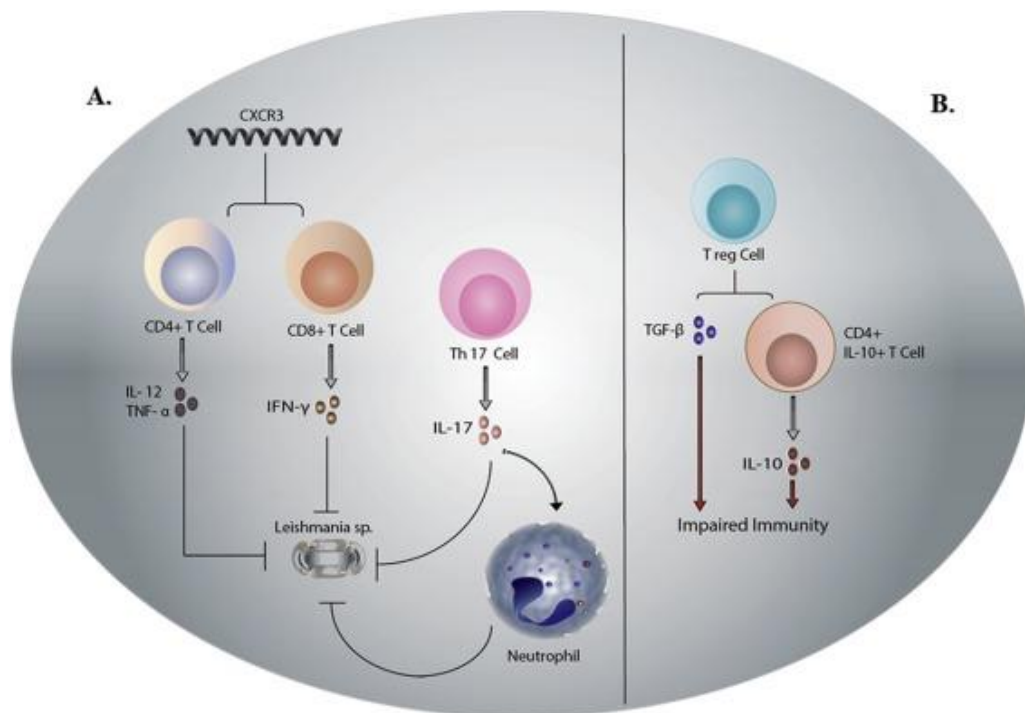


**Εικόνα 12: Διαδρομές διαφοροποίησης T-κυττάρων.** Μετά την πρόσδεση του TCR με την κατάλληλη συν-διέγερση, οι κυτοκίνες ενεργοποιούν ειδικές TF και ρυθμιστές μεταγραφής που καταλήγουν στη διαφοροποίηση των T κυττάρων σε διάφορες αναγνωρίσιμες καταστάσεις (Coomes S. M. et al., 2013).

### 1.6.2 Th1-Th2 πόλωση

Η διχοτόμηση των Th κυττάρων τύπου 1 και 2 βρίσκεται ως κεντρικό πρότυπο στην κυτταρική ανοσολογία και παρέχει το πλαίσιο για να κατανοηθεί η φύση μιας

ανοσοαπόκρισης που είναι ευεργετική ή επιβλαβής για τον ξενιστή (εικόνα 13). Τα κύτταρα Th1 και Th2 χαρακτηρίζονται από τα αμοιβαία αποκλειστικά πρότυπα έκφρασης των κυτταροκινών. Τα κύτταρα Th1 παράγουν IL-12, IL-2, TNF- $\alpha$  και IFN- $\gamma$  που ευνοούν την κυτταρική ανοσία και τη φαγοκυττάρωση των παθογόνων, ενώ τα κύτταρα Th2 παράγουν IL-4, IL-5, IL-13 και IL-10 (Mikhailkevich N. et al., 2016). Όταν ένα παθογόνο εισέλθει στο οργανισμό, προκαλείται διέγερση και έτσι τα επιφανειακά μόρια στα APC ή οι κυτταροκίνες στο περιβάλλον των ιστών παράγουν σήματα πώλωσης σε ανώριμα CD4 T κύτταρα. Τέτοια σήματα πολώσεως επάγουν ανοδική ρύθμιση παραγόντων μεταγραφής που οδηγούν τη διαφοροποίηση των κυττάρων Th1 και Th2. Συγκεκριμένα κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των κυττάρων Th1, ο παράγοντας μεταγραφής T-bet ρυθμίζεται προς τα επάνω (Szabo S. J. et al., 2000), ενώ ο παράγοντας GATA-3 ρυθμίζεται προς τα πάνω κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των κυττάρων Th2 (Zheng W. and Flavell R. A., 1997). Αυτοί οι δύο παράγοντες μεταγραφής, αντίστοιχα, λειτουργούν ως κύριοι ρυθμιστές της διαφοροποίησης των κυττάρων Th1 και Th2 (Mikhailkevich N. et al., 2016). Έχουν αναφερθεί αρκετές κυτοκίνες που ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση των κυττάρων Th, ωστόσο οι καλύτερα κατανοητές πολωτικές κυτοκίνες είναι οι IFN- $\gamma$ , IL-4 και IL-12. Είναι ενδιαφέρον ότι η IFN- $\gamma$  και η IL-4 είναι τόσο οι κυτταροκίνες τελεστές όσο και οι επαγωγείς της διαφοροποίησης των δικών τους παραγώγων (Le Gros G. et al., 1990). Στην πραγματικότητα, οι IL-12 και IL-4 είναι οι κυτταροκίνες που χρησιμοποιούνται συνήθως για in vitro διαφοροποίηση των Th1 και Th2 κυττάρων, αντίστοιχα (Mikhailkevich N. et al., 2016).



**Εικόνα 13: Διαφορικός ρόλος των υποομάδων T κυττάρων κατά τη σπλαχνική λείσμανίαση. Α)**

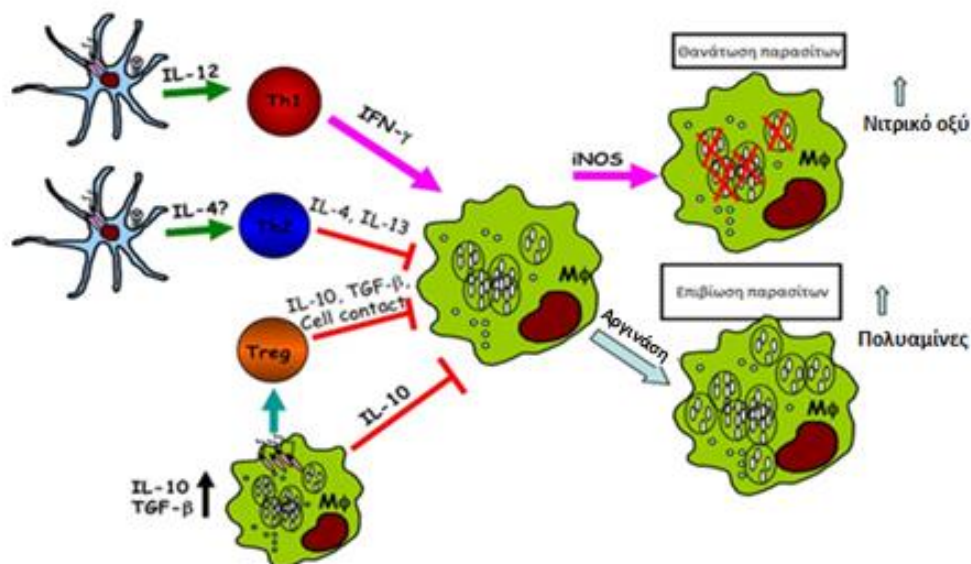
Μετά τη διέγερση, τα CD4 + T κύτταρα εκκρίνουν IL-12 και TNF $\alpha$ , τα κύτταρα CD8 + T εκκρίνουν IFN- $\gamma$  και Th-17 εκκρίνουν IL-17. Όλα αυτά μαζί βοηθούν στη θανάτωση του παρασίτου και παρέχουν προστατευτική ανοσοαπόκριση. Η IL-17 βοηθά επίσης στην ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων που αποτρέπουν την επιβίωση του παρασίτου. **Β)** Η μόλυνση που συμβάλλει στη διαφοροποίηση των κυττάρων Treg και των κυττάρων Th-2 (CD4 + T κύτταρα), οδηγούν στην έκφραση των IL-10 και TGF $\beta$  που τελικά επηρεάζουν την προστατευτική ανοσοαπόκριση του ξενιστή και βοηθούν στην εξέλιξη της μόλυνσης (Jawed J. J. et al., 2019).

### 1.6.3 Τα κύτταρα στόχοι του παρασίτου

Τα μακροφάγα αποτελούν το κυρίως κύτταρο στόχος που μολύνουν τα παράσιτα *Leishmania*. Ωστόσο, τα μονοκύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα και τα ουδετερόφιλα μπορούν να μολυνθούν και να συμβάλλουν διαφορετικά στην ανοσοαπόκριση και την έκβαση της λοίμωξης (Martínez-López M. et al., 2018). Μετά την αρχική πρόσληψη και εσωτερίκευση των προμαστιγωτών από μακροφάγα στο φαγόσωμα, ακολουθεί σύντηξη με λυσοσώματα και τα παράσιτα καταφέρνουν να επιβιώσουν και να πολλαπλασιαστούν (Dong L. and Uzzona J. E. 2012).

### 1.6.3.1 Αλληλεπίδραση του παρασίτου με τα μακροφάγα

Κατά τη διάρκεια της μετάδοσης του παρασίτου από τον φορέα του στον σπονδυλωτό ξενιστή, τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα στρατολογούνται γρήγορα στη θέση μετάδοσης (Podinowskaia M. and Descoteaux A., 2015). Οι πρωτεΐνοφωσφογλυκάνες που εκκρίνονται από το παράσιτο και εμβολιάζονται στον ξενιστή κατά τη διάρκεια της μετάδοσης, είναι ισχυροί διεγέρτες της πρόσληψης του από τα μακροφάγα (Rogers M. E. et al., 2010). Αρχικά, τα παράσιτα εντοπίζονται στα ουδετερόφιλα, μέσα στα οποία δεν καταφέρνουν να διαφοροποιηθούν σε αμαστιγώτες, και αργότερα σε μακροφάγα. (Beattie L. and Kaye P. M., 2011). Η αρχική αλληλεπίδραση του προμαστιγώτη με το μακροφάγο μπορεί να προκαλέσει την απελευθέρωση ενδοκυτταρικών παραγόντων επιβίωσης από το παράσιτο και την επακόλουθη διαφοροποίηση της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας των μακροφάγων (Podinowskaia M. and Descoteaux A., 2015). Γενικά τα μακροφάγα μπορούν να ενεργοποιηθούν από διαφορετικά σήματα, τα οποία τελικά οδηγούν στην ανάπτυξή τους σε λειτουργικά ξεχωριστά υποσύνολα με διαφορετικές επιπτώσεις της νόσου. Έτσι, η σωστή ενεργοποίηση μακροφάγων είναι ζωτικής σημασίας για την εξάλειψη αυτού του ενδοκυτταρικού παθογόνου (εικόνα 14) (Dong L. and Uzonna J. E., 2012).



**Εικόνα 14:** Τα δενδριτικά κύτταρα και τα μακροφάγα ρυθμίζουν το αποτέλεσμα της μόλυνσης από *Leishmania*. Μετά τη μόλυνση, τόσο τα μακροφάγα όσο και τα δενδριτικά κύτταρα

φαγοκυτταρώνουν *Leishmania* και οδηγούν σε διαφορετικά λειτουργικά αποτελέσματα. Τα μολυσμένα δενδριτικά κύτταρα παράγουν IL-12, το οποίο είναι κρίσιμο για την ανάπτυξη κυττάρων CD4<sup>+</sup> Th1, που παράγουν IFN-γ. Η IFN-γ δρα επί των μολυσμένων μακροφάγων που οδηγούν στην ενεργοποίησή τους (κλασική ενεργοποίηση), την αυξητική ρύθμιση της iNOS και την παραγωγή νιτρικού οξειδίου και άλλων ελεύθερων ριζών που είναι σημαντικές για τη θανάτωση ενδοκυτταρικού παρασίτου. Αντιθέτως, η παραγωγή IL-4 από άλλους κυτταρικούς τύπους υποστηρίζει την ανάπτυξη CD4<sup>+</sup> Th2. Τα κύτταρα Th2 παράγουν IL-4 και IL-13, τα οποία οδηγούν σε ρύθμιση της δραστηριότητας αργινάσης, την εναλλακτική ενεργοποίηση μακροφάγων και παραγωγή πολυαμινών που ευνοούν τον πολλαπλασιασμό του ενδοκυτταρικού παρασίτου. Επιπλέον, ρυθμιστικά T κύτταρα (Treg) και μολυσμένα μακροφάγα παράγουν επίσης μερικές ανοσορυθμιστικές κυτοκίνες που περιλαμβάνουν IL-10 και TGF-β, οι οποίες απενεργοποιούν τα μολυσμένα κύτταρα, οδηγώντας έτσι σε εξασθενημένη παρασιτική θανάτωση (Dong L. and Uzonna J. E., 2012).

### 1.6.3.2 Αλληλεπίδραση του παρασίτου με τα δενδριτικά κύτταρα

Τα DCs είναι αιματοποιητικά λευκοκύτταρα προερχόμενα από προγονικό μυελό των οστών τα οποία είναι εξαιρετικά ετερογενή και ευρέως διανεμημένα σε όλο το σώμα (Dong L. and Uzonna J. E., 2012). Ως επαγγελματικά και πιο ισχυρά APCs, οι DC εξειδικεύονται στην πρόσληψη, επεξεργασία και παρουσίαση αντιγόνων στα κύτταρα T. Παρόλο που τα μακροφάγα είναι επίσης επαγγελματίες APC και είναι ο κύριος ξενιστής για να φιλοξενήσουν παράσιτα *Leishmania* καθώς και δραστικό κύτταρο για τη θανάτωση παρασιτικών κυττάρων, δεν εκκρίνουν IL-12 (von Stebut E. et al., 1998) και συνεπώς δεν μπορούν να διεγείρουν CD4<sup>+</sup> Th1 κυτταρική απόκριση (Kima P. E. et al., 1996).

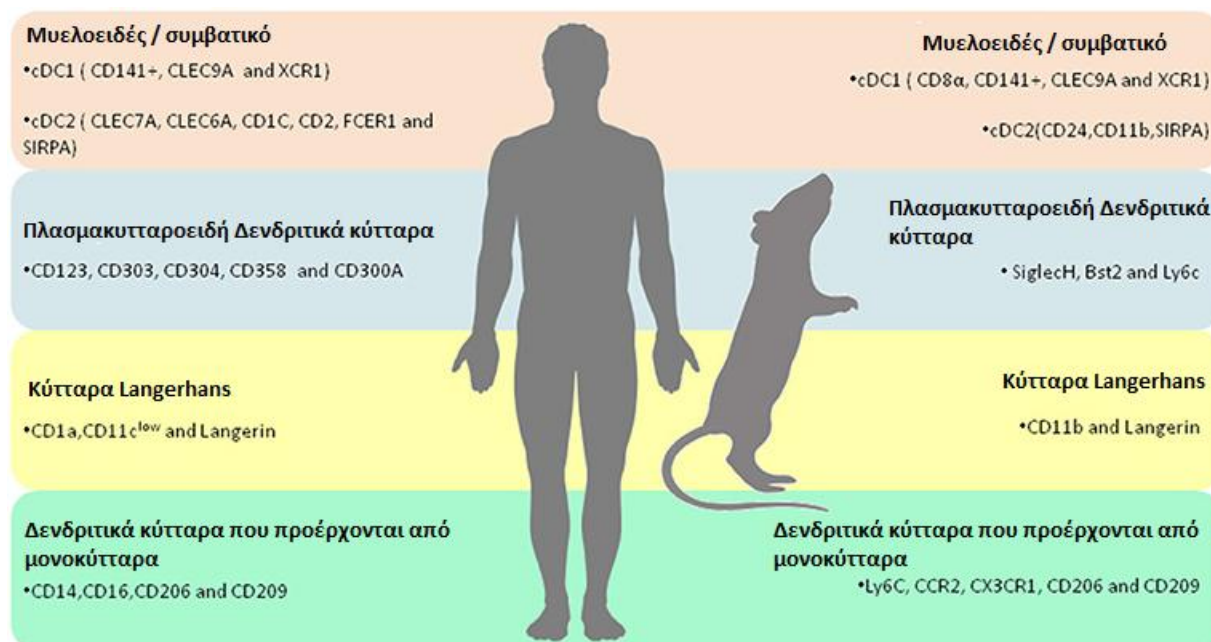
Τα DCs με την αναγνώριση μορίων προερχόμενων από παθογόνα, μεταναστεύουν σε λεμφοειδή ιστούς και υφίστανται μια διαδικασία "ωρίμανσης" που ενισχύει την επεξεργασία και παρουσίαση αντιγόνων, την έκφραση συνδιεγερτικών μορίων και την έκκριση κυτοκίνης, που διέπουν τη μοίρα της προσαρμοστικής ανοσίας (Martinez-Lopez M. et al., 2018). Πολλές *in vivo* μελέτες αποδεικνύουν τη σημασία των πλήρως ενεργοποιημένων μεταναστευτικών DCs (CD86<sup>high</sup>, CD40<sup>high</sup> και IL-12<sup>+</sup>) στην ενεργοποίηση των NK κυττάρων και στη δημιουργία προστατευτικών αποκρίσεων Th1 κατά των παρασίτων *Leishmania* (Soong L., 2008). Επομένως, η ατελής και καθυστερημένη ωρίμανση DC θα μπορούσε να ευνοήσει

την δημιουργία και την ενίσχυση της λοίμωξης από *Leishmania* πριν από την εμφάνιση των ανοσολογικών αποκρίσεων. Επομένως τα DCs αποτελούν γέφυρα μεταξύ του έμφυτου και του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος και έχουν εξέχοντα ρόλο στην ανάπτυξη της ανοσολογικής αντίδρασης έναντι του παρασίτου (Martinez-Lopez M. et al., 2018). Η μόλυνση των DCs με *Leishmania* έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή IL-12 (Marovich M. A. et al., 2000), μια βασική κυτταροκίνη για την πόλωση των ανώριμων κυττάρων προς την υποομάδα Th1 και την επακόλουθη παραγωγή IFN- $\gamma$  για τον έλεγχο της λοίμωξης (Heinzel F. P. et al., 1993, Sypek J. P. et al., 1993, von Stebut E. et al., 1998).

### 1.7 Δενδριτικά κύτταρα

#### 1.7.1 Τύποι δενδριτικών κυττάρων

Μια μεγάλη ποικιλία από υποσύνολα DC έχει περιγραφεί σε λεμφοειδή και μη λεμφοειδή όργανα ποντικών. Τα DCs στους λεμφοειδείς ιστούς μπορούν να χωριστούν σε υποπληθυσμούς CD8<sup>-</sup> και CD8<sup>+</sup>, οι οποίοι έχουν μελετηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια (Shortman K. and Liu Y. J., 2002). Τα CD8-DCs μπορούν περαιτέρω να υποδιαιρεθούν σε CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> και CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> υποσύνολα (Ardavin C., 2003). Επιπλέον, οι DC που εκφράζουν ενδιάμεσα επίπεδα CD8 (CD8<sup>int</sup> DCs) αποτελούν ένα υποσύνολο ειδικών για λεμφαδένες DCs. Στους περιφερειακούς λεμφαδένες, τα CD8<sup>int</sup> DCs φαίνεται να προέρχονται από τα επιδερμικά κύτταρα Langerhans (Anjume F. et al., 1999) και ίσως από δερματικά DCs. Τέλος, η έκφραση της CD45 ισομορφής B220 ορίζει το λειτουργικό αντίστοιχο του ανθρώπινου, πλασματοκυτοειδή DCs. Τα πλασματοκυτοειδή B220<sup>+</sup> DCs βρίσκονται σε όλα τα λεμφοειδή όργανα του ποντικού και χαρακτηρίζονται από τη δυνατότητά τους να παράγουν μεγάλες ποσότητες ιντερφερόνης τύπου I (IFN) σε απόκριση σε λοιμώξεις από ιούς (Asselin-Paturel C. et al., 2001, Ardavin C., 2003). Στην εικόνα 15 που ακολουθεί παρουσιάζεται μια επισκόπηση ανθρώπινων και μυϊκών υπότυπων DC.



Εικόνα 15: Επισκόπηση ανθρώπινων και μυϊκών υπότυπων DC - Περίληψη των μοριακών δεικτών που χαρακτηρίζουν κάθε υπότυπο ανθρώπινου και μυϊκού DC (Tibúrcio R. et al., 2019).

### 1.7.2 Ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων

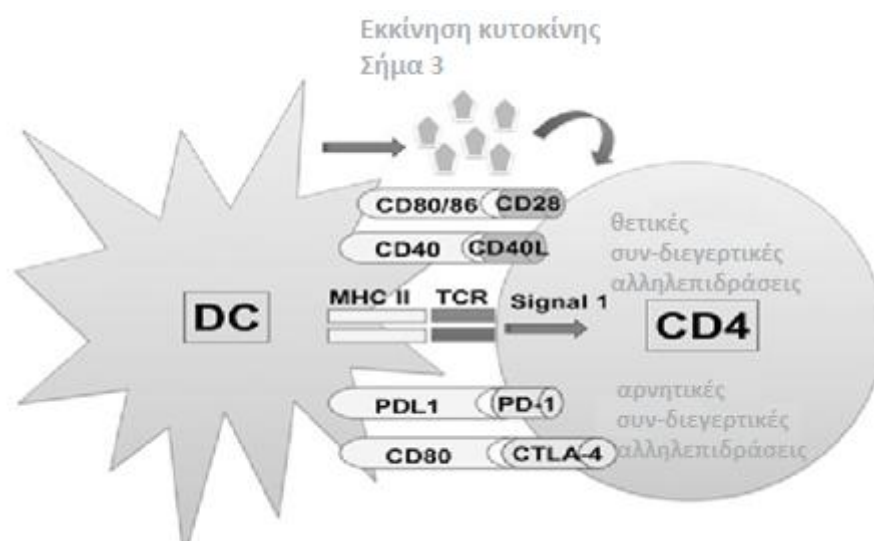
Με την αναγνώριση μορίων προερχόμενων από τα παθογόνα, τα DCs μεταναστεύουν σε λεμφοειδείς ιστούς και υφίστανται μια διαδικασία "ωρίμανσης" που ενισχύει την επεξεργασία και παρουσίαση αντιγόνων, την έκφραση συνδιεγερτικών μορίων και την έκκριση κυτοκίνης, που διέπουν τη μοίρα της προσαρμοστικής ανοσίας. Πολλές *in vivo* μελέτες αποδεικνύουν τη σημασία των πλήρως ενεργοποιημένων μεταναστευτικών DCs (CD86<sup>high</sup>, CD40<sup>high</sup> και IL-12<sup>+</sup>) στην ενεργοποίηση των NK κυττάρων και στη δημιουργία προστατευτικών αποκρίσεων Th1 κατά των παρασίτων *Leishmania* (Soong L., 2008).

Η ωρίμανση προκαλείται από ερεθίσματα, τα λεγόμενα "σήματα κινδύνου", τα οποία προειδοποιούν το DC. Τα σήματα ωρίμανσης προέρχονται είτε από φλεγμονώδη μόρια όπως CD40 συνδέτης (CD40-L που εντοπίζεται στην επιφάνεια των T λεμφοκυττάρων), TNFα (παράγοντας νέκρωσης όγκων α), τις ιντερλευκίνες IL-1, IL-6 και την ιντερφερόνη IFNα, είτε από μικροβιακά προϊόντα και μόρια που απελευθερώνονται από κατεστραμμένους ιστούς ξενιστών, οι οποίοι διεγείρουν υποδοχείς τύπου Toll (TLRs) (Skoberne M. et al., 2004).



### 1.7.3 Αλληλεπίδραση των δενδριτικών κυττάρων με τα T λεμφοκύτταρα

Μετά την αναγνώριση και την εσωτερίκευση των παθογόνων, τα DCs μεταναστεύουν σε δευτερογενή λεμφοειδή όργανα όπου καιεπεξεργάζονται τα αντιγόνα (Banchereau J. and Steinman R. M., 1998). Στη συνέχεια, μέσω της παρουσίας μικρών πεπτιδίων στα μόρια MHC κατηγορίας I ή τάξης II, ενεργοποιείται η προσαρμοστική ανοσία. Συγκεκριμένα, τα μόριαMHC I διαμεσολαβούν στην αναγνώριση ενδογενών πεπτιδίων από κυτταροτοξικά  $CD8^+T$  κύτταρα, ενώ τα μόριαMHC II, εμπλέκονταιστη παρουσίαση εξωγενών πεπτιδίων σε βοηθητικά κύτταρα  $CD4^+T$ . Η διαδικασία θραυσματοποίησης του αντιγόνου είναι πρωταρχικής σημασίας, για την κατάλληλη παρουσίαση αντιγόνου. Δεδομένου ότι τα μόρια MHC II παρουσιάζουν μόνο πεπτίδια με συγκεκριμένο αριθμό αμινοξέων (Rock K. L. et al., 2016), τα DCs είναι ικανά να κινητοποιήσουνμόρια MHC I προκειμένου να εμφανίσουν εξωγενώς, συστατικά προερχόμενα από αντιγόνα. Η διαδικασία αυτή είναιγνωστή ως διασταυρούμενη παρουσίαση (Gutiérrez-Martínez E. et al., 2015). Επιπροσθέτως, τα συν-διεγερτικά μόρια (όπως τα CD40, CD80 και CD86) είναι απαραίτητα για την αποτελεσματική παρουσίαση αντιγόνου, παρέχοντας δευτερεύοντα σήματα για την ενεργοποίηση των κυττάρων T και διαφοροποίηση τους (εικόνα 16) (Kaliński P. et al., 1999, Tibúrcio R. et al., 2019). Τα διάφορα είδη *Leishmania* χρησιμοποιούν ξεχωριστές στρατηγικές, μέσω των οποίων ρυθμίζουν την έκφραση των συν-διεγερτικών μορίων, επιβραδύνοντας έτσι τη διαδικασία παρουσίασης αντιγόνου (Ghosh M. and Bandyopadhyay S., 2004).



**Εικόνα 16: Ενισχυτικά μόρια και παρουσίαση αντιγόνου.** Ανοσολογική σύναψη μεταξύ δενδριτικού κυττάρου και  $CD4^+$  T κυττάρου. Το σχήμα απεικονίζει τα τρία σήματα μεταξύ των κυττάρων που

παρουσιάζουν αντιγόνο και των T κυττάρων που οδηγούν στην ενεργοποίηση των T κυττάρων. Το σήμα 1 παρουσιάζεται ως σύνδεση μεταξύ του πεπτιδίου-MHC συμπλόκου με τον υποδοχέα του T κυττάρου (TCR). Στο άνω μέρος παρουσιάζονται θετικές συν-διεγερτικές αλληλεπιδράσεις, ενώ στο κάτω μέρος εμφανίζονται οι αρνητικές συν-διεγερτικές αλληλεπιδράσεις. Τέλος, στο άνω μέρος του σχήματος, υποδεικνύεται το σήμα 3 ή η εκκίνηση κυτοκίνης. Ανάλογα με τον συνδυασμό κυτοκινών που παρέχονται από DC και T κύτταρα κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασής τους, θα προκύψουν διαφορετικοί τύποι ανοσοαποκρίσεων (Lichtenstein T. et al., 2012).

Εκτός από την παρουσίαση αντιγόνου σε T κύτταρα, τα ώριμα DC βοηθούν στο σχηματισμό της προσαρμοστικής ανοσοαπόκρισης με έκκριση κυτοκινών. Τα ενεργοποιημένα DC παράγουν τον παράγοντα νέκρωσης όγκου των κυτοκινών άλφα (TNF- $\alpha$ ), η οποία προκαλεί οξεία φλεγμονή και μια ποικιλία ιντερλευκινών, όπως IL-1b, IL-6, IL-8, IL-12 και IL-10. Ο συγκεκριμένος συνδυασμός κυτοκινών που απελευθερώνονται από ενεργοποιημένα DCs μπορεί να επηρεάσει την επακόλουθη απόκριση κυττάρων CD4<sup>+</sup>T. Το είδος της ανοσοαπόκρισης που δημιουργείται μετά την παρουσίαση αντιγόνου μπορεί να χαρακτηριστεί με μέτρηση των προφίλ κυτοκινών κατά την επαγωγή αντιγόνων ειδικών αντιδράσεων ανάκλησης (Wilson-Welder J. H. et al., 2009). Η παραγωγή κυτοκινών από DCs, είναι επίσης ένα κρίσιμο χαρακτηριστικό της αποτελεσματικής επαγωγής ανοσίας. Για παράδειγμα, η έκκριση της IL-1b επάγει την έκκριση της IL-2, η οποία διευκολύνει την ωρίμανση και τον πολλαπλασιασμό των ειδικών αντιγονοειδών T λεμφοκυττάρων. Αντιστρόφως, η παρουσίαση αντιγόνου απουσία αποτελεσματικής συνδιέγερσης (CD80 / 86, CD40) ή έκκρισης κυτοκίνης από DCs, προκαλεί αναποτελεσματική ενεργοποίηση T κυττάρων (Heath W. R. et al., 2004).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της ικανότητας των αυτο-γαλακτωματοποιούμενων συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων (SNEDDs), να χρησιμοποιηθούν ως φορείς αντιγόνου για την ανάπτυξη εμβολίου έναντι της πειραματικής σπλαγγνικής λεισμανίασης. Η χρήση συστημάτων απελευθέρωσης φαρμάκων με βάση λιπίδια, όπως είναι οι νανοφορείς SNEDDS, δείχνει μεγάλες δυνατότητες βελτίωσης της διαλυτότητας, της ενίσχυσης της βιοδιαθεσιμότητας και μείωσης της μεταβλητότητας των φαρμάκων (Cherniakon I. et al., 2015). Εξαιτίας των παραπάνω χαρακτηριστικών, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η πιθανή χρήση τους στην ανάπτυξη εμβολίων.

Αρχικά, στόχος της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, ήταν η μελέτη της δράσης των νανοφορέων SNEDDS, *in vitro*. Πιο συγκεκριμένα, πρώτος στόχος ήταν η διερεύνηση της πιθανής τοξικότητας *in vitro*. Ακολούθως, δεύτερος στόχος ήταν η μελέτη της πρόσληψης των νανοφορέων SNEDDS από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα. Στη συνέχεια, στα πλαίσια των *in vitro* πειραμάτων, εξετάστηκε η επίδραση των νανοφορέων SNEDDS στην ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτός στόχος προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης κατάλληλων επιφανειακών δεικτών.

Μετά τη μελέτη της δράσης των νανοφορέων SNEDDS, *in vitro*, ακολούθησε η μελέτη της δράσης τους *in vivo*. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού, διερευνήθηκε η οργανική κατανομή των νανοφορέων SNEDDS. Τέλος, προσδιορίστηκε η ικανότητα 3 πεπτιδίων του παρασίτου *Leishmania*, να επάγουν επιθυμητού τύπου ανοσολογικές αποκρίσεις (κυτταρική και χυμική απόκριση). Τα πεπτίδια αυτά, έχουν αναλυθεί στο εργαστήριο με *in silico* προσέγγιση, και φαίνεται πως αναγνωρίζονται από MHC I και MHC II μόρια του ποντικού.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Κυτταροκαλλιέργειες

Η καλλιέργεια των κυττάρων γίνεται υπό αυστηρά άσηπτες συνθήκες, προκειμένου να αποφευχθεί ο πολλαπλασιασμός άλλων μικροοργανισμών. Για το λόγο αυτό, όλες οι διαδικασίες που αφορούν τις κυτταροκαλλιέργειες γίνονται μέσα σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Πριν την έναρξη οποιασδήποτε εργασίας σε αυτόν, είναι υποχρωτική η ακτινοβόληση του με ακτίνες UV για περίπου 30 λεπτά. Επιπλέον, γίνεται ψεκασμός των αντικειμένων που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν καθώς και του ίδιου του θαλάμου όταν ολοκληρώνουμε την εργασία μας με διάλυμα αιθανόλης 70% (Freshney R. I., 1994).

#### 3.1.1 Απομόνωση και καλλιέργεια δενδριτικών κυττάρων από μυελό οστών ποντικού

##### 3.1.1.1 Υλικά

- Θρεπτικό RPMI-1640 (Biowest, France)
- Trypan Blue: 0,4% w/v σε PBS ή φυσικό ορό
- FBS (Fet al Bovine Serum) (Biowest, France)
- L-γλουταμίνη (Biowest, France)
- PEST (διάλυμα πενικιλίνης – Στρεπτομυκίνης) (Biowest, France)
- HEPES (Biowest, France)
- Παράγονταςδιέγερσηςσηματισμούαποικιώνκοκκιοκυττάρων / μακροφάγων (GM-CSF / Granulocyte Macrophage Cell Stimulating Factor) (Peprotech, London, UK)
- ACK (διάλυμαλύσηςχλωριούχουαμμωνίου - καλίου / Ammonium Chloride Potassium Lysing Buffer)
- Χλωριούχοαμμώνιο-NH<sub>4</sub>CL (Sigma, St. Louis, USA)
- Ώξινοανθρακικόκάλιο-KHCO<sub>3</sub> (Sigma, St. Louis, USA)
- Δινάτριοάλαστουαιθυλενοδιαμινοτετραοξικούοξέος-Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma, St. Louis, USA)

**Πίνακας 3.1.** Πρωτόκολλο παρασκευής πλήρους θρεπτικού υλικού RPMI, pH=7

Πλήρες θρεπτικό υλικό, pH=7	
RPMI-1640	1x
0.2 M L-γλουταμίνη	0,2 mM
PEST (πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη)	100 u/ml
HEPES	10 mM
FBS	10% (v/v)

**Πίνακας 3.2.** Πρωτόκολλο παρασκευής διαλύματος ACK, pH=7,2-7,4

Διάλυμα λύσης χλωριούχου αμμωνίου (ACK), pH=7,4	
NH <sub>4</sub> CL	0,15 M
KHCO <sub>3</sub>	1 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	0,1 mM

### 3.1.1.2 Μέθοδος

Για την απομόνωση και καλλιέργεια δενδριτικών κυττάρων από μυελό οστών ποντικού (Bone Marrow Derived Dendritic Cells-BMDCs) χρησιμοποιούνται δύο νεαρά ποντίκια (6-8 εβδομάδων) της φυλής BALB/c, τα οποία θανατώνονται με αυχενική εξάρθρωση. Ακολούθως απομονώνονται τα μηριαία και κνημιαία οστά, από τα οποία απομακρύνονται οι μύς που τα περιβάλλουν με τη χρήση λαβίδας και στείρας γάζας. Στη συνέχεια, στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (Telstar Life Sciences, Telassa, Spain) τα οστά αποστειρώνονται για 2-5 λεπτά σε αιθανόλη 70% και πλένονται με θρεπτικό RPMI-1640. Με την βοήθεια αποστειρωμένων εργαλείων, απομακρύνονται από τα οστά οι επιφύσεις και στη συνέχεια με τη βοήθεια μιας σύριγγας, που περιέχει διάλυμα RPMI, απομακρύνεται ο μυελός από τα οστά. Τα συσσωματώματα διασπώνται με τη χρήση πιπέτας και το ελαιώδη διηθείται με φίλτρο με διάμετρο πόρων 70 μm. Έπειτα, τα κύτταρα φυγοκεντρούνται (PrO-Research by Centurion Scientific, UK) για 10 λεπτά στις 1.300 στροφές (rpm) σε θερμοκρασία 4°C. Ακολουθεί πλύση με ACK, για λύση των ερυθρών κυττάρων, ανάδευση για 3 λεπτά, προσθήκη ίσου όγκου RPMI για τον τερματισμό της δράσης του ACK και φυγοκέντρηση (10 λεπτά, 1300 rpm, 4°C). Στο τέλος της φυγοκέντρησης, το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε θρεπτικό υλικό και πραγματοποιείται μέτρηση του αριθμού των

κυττάρων που απομονώθηκαν με χρήση της πλάκας Malassez (Marienfeld, Germany) και του διαλύματος Trypan Blue, το οποίο διαπερνά μόνο τα νεκρά κύτταρα και τα βάφει με χρώμα μπλε. Σε τρυβλίο petri που περιέχει 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού (RPMI / 10% FBS) εμπλουτισμένου με 20 ng/ml GM-CSF, προστίθενται  $3,5 \times 10^6$  κύτταρα. Τα κύτταρα επωάζονται σε κλίβανο (New Brunswick™ Galaxy® 170 S, New Zealand) στους 37 °C με 5% CO<sub>2</sub>. Τη τρίτη ημέρα πραγματοποιείται η πρώτη θρέψη, κατά την οποία προστίθενται στο τρυβλίο επιπλέον 10 ml θρεπτικού υλικού σύστασης: 9 ml RPMI, 1 ml FBS και 20 ng/ml GMCSF. Την έκτη ημέρα της καλλιέργειας, απομακρύνονται 10 ml από την καλλιέργεια και φυγοκεντρούνται στις 1300 στροφές για 10 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα επαναιωρείται σε 10 ml θρεπτικού υλικού (9 ml RPMI, 1 ml FBS και 20 ng/ml GMCSF), προστίθενται στο ίδιο τρυβλίο και αναδεύεται ήπια. Την έβδομη ημέρα τα κύτταρα συλλέγονται και φυγοκεντρούνται (10 λεπτά, 1300 rpm, 4°C). Το ίζημα εκπλένεται άλλες 3 φορές για να απομακρυνθούν ίχνη του GM-CSF και ακολούθως τα κύτταρα επαναιωρούνται σε θρεπτικό μέσο στην κατάλληλη συγκέντρωση (Lutz et al., 1999).

#### 3.1.2 Καλλιέργεια μακροφάγων της κυτταρικής σειράς J774A.1

##### 3.1.2.1 Υλικά

- Πλήρες θρεπτικό RPMI-1640/10% FBS (Biowest, France)
- Trypan Blue

##### 3.1.2.2 Μέθοδος

Η κυτταρική σειρά μακροφάγων, J774A.1 καλλιεργείται σε πλήρες θρεπτικό υλικό (RPMI/10% FBS) στους 37 °C με 5% CO<sub>2</sub>. Η καλλιέργεια παρατηρείται καθημερινά, έως ότου η κάλυψη της επιφάνειας της φλάσκας από τα μακροφάγα να προσεγγίσει το 70%-90%. Τότε είτε γίνεται ανακαλλιέργεια, είτε τα κύτταρα συλλέγονται και αποθηκεύονται στο άζωτο, είτε χρησιμοποιούνται για τα πειράματα.

### 3.1.3 Κατάψυξη και ανάκτηση κυττάρων

#### 3.1.3.1 Υλικά

- Πλήρες θρεπτικό RPMI-1640/FBS 10% (Biowest, France)
- Trypan Blue
- DMSO (Διμεθυλοσουλφοξείδιο / dimethylsulfoxide): κρυοπροστατευτικούλικό (Applichem Darmstadt, Germany).

#### 3.1.3.2 Μέθοδος

Για την κατάψυξη των κυττάρων, συλλέγονται  $2 \times 10^6$  κύτταρα και φυγοκεντρώνονται στις 1.300 στροφές (rpm) για 10 λεπτά στους 25°C. Στο τέλος της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 1 ml υλικού κατάψυξης που αποτελείται από 70% RPMI, 20% FBS και 10% DMSO και μεταφέρεται σε ειδικούς πλαστικούς σωλήνες ανθεκτικούς σε χαμηλές θερμοκρασίες. Οι σωλήνες τοποθετούνται σε ειδικό δοχείο, το οποίο περιβάλλεται από ισοπροπυλική αλκοόλη και τοποθετούνται στους -80 °C για 24 ώρες και ακολούθως στο υγρό άζωτο (-196 °C).

Σχετικά με τη διαδικασία της απόψυξης των κυττάρων, αυτή πρέπει να γίνει γρήγορα. Για το λόγο αυτό ο ειδικός σωλήνας, στον οποίο περιέχονται τα κύτταρα, απομακρύνεται από το άζωτο και μεταφέρεται απευθείας σε υδατόλουτρο (Biolin scientific, UK) στους 37°C. Όταν το διάλυμα που περιέχεται στο σωλήνα ξεπαγώσει, μεταφέρεται στη φλάσκα που περιέχει 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού (RPMI 1640 / FBS 10%). Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται στους 37 °C με 5% CO<sub>2</sub> για 2 ώρες. Μετά την πάροδο των 2 ωρών, προκειμένου να απομακρυνθεί το DMSO, απομακρύνεται το υλικό καλλιέργειας από την φλάσκα, προστίθενται 10 ml θερμού πλήρους θρεπτικού και ακολουθεί επώαση στους 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.2 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας

Για τα πειράματα που αφορούν τη διερεύνηση της κυτταροτοξικότητας των νανοσωματιδίων SNEDDs, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά μακροφάγων J774A.1. Για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας χρησιμοποιήθηκε είναι η μέθοδος MTT. Η μέθοδος MTT

(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) στηρίζεται στη δυνατότητα των μεταβολικών ενεργών κυττάρων, δηλαδή των ζωντανών, να ανάγουν με τη χρήση της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης (μιτοχονδριακό ένζυμο), ένα άλας του τετραζολίου με αποτέλεσμα να παράγονται ως προϊόν ιώδεις κρύσταλλοι. Αυτοί στη συνέχεια είναι δυνατό να διαλυτοποιηθούν με την χρήση κατάλληλων οργανικών διαλυτών και να προσδιοριστεί στη συνέχεια μέσω φασματοφωτομέτρησης η έκταση της αντίδρασης. Γενικά όσο περισσότερα είναι τα ζωντανά κύτταρα, τόσο πιο έντονος θα είναι και ο σχηματισμός των ιώδων κρυστάλλων και τόσο μεγαλύτερη η απορρόφηση που καταγράφεται σε μήκος κύματος 570 nm (van Meerloo J. et al., 2011).

### 3.2.1 Υλικά

- Πλήρες θρεπτικό RPMI-1640/FBS 10% (Biowest, France)
- Trypan Blue
- Λαουρυλοθειικό νάτριο-SDS (Sodium Dodecyl Sulfate): 0,01%
- MTT Cell Proliferation Assay Kit (V-13154) (Molecular probes): φυλάσσεται στους 4°C, στο σκοτάδι
- Αυτο-γαλακτοποιούμενα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων (SNEDDS-Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System)
- Υδροχλωρίο-HCl: 0,01 M
- Διάλυμα φωσφορικών αλάτων 1x-PBS 1x (Phosphate-buffered Saline)
- Χλωριούχο νάτριο-NaCl (Applichem Darmstadt, Germany)
- Χλωριούχο κάλιο-KCl (MERCK Darmstadt, Germany)
- Ώξινοφωσφορικό νάτριο- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (MERCK Darmstadt, Germany)
- Δισόξινοφωσφορικό κάλιο- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (MERCK Darmstadt, Germany)

**Πίνακας 3.3.** Πρωτόκολλο παρασκευής διαλύματος PBS 10X, pH=7,4

PBS (Phosphate Buffer Saline) 10x, pH=7,4	
NaCl	1.37 M
KCl	27 mM
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	43 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	14 mM



#### 3.2.2 Μέθοδος

##### 1<sup>η</sup> Ημέρα

Συλλέγονται τα μακροφάγα και μετράται ο αριθμός τους. Σε κάθε φρεάτιο μιας πλάκας 96 θέσεων με επίπεδο πυθμένα (96 well plate flat-bottom) μεταφέρεται διάλυμα 200 μl πλήρους θρεπτικού υλικού, το οποίο περιέχει  $5 \times 10^4$  κύτταρα. Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται στο κλίβανο στους 37°C για 24 ώρες.

##### 2<sup>η</sup> Ημέρα

Προστίθενται διαφορετικές συγκεντρώσεις των νανοφορέων SNEDDS. Οι συγκεντρώσεις αυτές προκύπτουν από διαδοχικές αραιώσεις σε θρεπτικό RPMI-1640 και το εύρος αυτών κυμαίνεται από 800 μg/ml-6,25 μg/ml. Ως αρνητικό δείγμα ελέγχου, χρησιμοποιούνται κύτταρα που επωάζονται μόνο με πλήρες θρεπτικό υλικό. Ακολουθεί επώαση στον κλίβανο στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub> για 24 ώρες.

##### 3<sup>η</sup> Ημέρα

Μετά από τις 24 ώρες ακολουθεί ο προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT. Αρχικά σε 2 φρεάτια της πλάκας, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό και προστίθενται 100 μl από το διάλυμα SDS 0,01% (τοξικό για τα κύτταρα) στο καθένα, ώστε να χρησιμοποιηθούν ως θετικά δείγματα ελέγχου. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για μισή ώρα. Στη συνέχεια, απομακρύνεται το θρεπτικό και σε κάθε φρεάτιο προστίθενται 100 μl PBS 1x και 10 μl διαλύματος MTT (5mg / ml σε PBS 1x). Έπειτα η πλάκα τοποθετείται στον κλίβανο στους 37°C για 4 ώρες, ώστε να σχηματιστούν οι κρύσταλλοι της φορμαζάνης από την αναγωγή του MTT. Μετά το πέρας των 4 ωρών, προστίθενται σε κάθε φρεάτιο 100 μl από το διάλυμα SDS-HCL, ώστε να διαλυτοποιηθούν οι κρύσταλλοι φορμαζάνης και ύστερα η πλάκα επωάζεται για 4 ώρες. Μόλις ολοκληρωθεί επώαση, πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης στα 570 nm με φίλτρο αναφοράς 630 nm (MRX, DYNATECH Laboratories, Guernsey, England). Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος:

% κυτταροτοξικότητα= [(αρνητικό δείγμα ελέγχου- δείγμα)/ αρνητικό δείγμα ελέγχου] x 100.

### 3.3 Κυτταρομετρία ροής

Η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής επιτρέπει την μελέτη κυτταρικών πληθυσμών μέσω ανάλυσης της σκέδασης του φωτός καθώς και της εκπομπής φθορισμού από τα κύτταρα. Η ανάλυση παρέχει πληροφορίες για το μέγεθος και το είδος των κυττάρων καθώς επίσης και για την έκφραση συγκεκριμένων μορίων δεικτών που εκφράζονται τόσο στη μεμβράνη των κυττάρων όσο και ενδοκυτταρικά (αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων συνδεδεμένων με φθορίζουσες χρωστικές) (Givan A. L., 1992). Στην παρούσα εργασία, η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε αρχικά για τον έλεγχο της πρόσληψης των νανοφορέων SNEDDS, διαφορετικών συγκεντρώσεων, από τα μακροφάγα (ΜΦ) και δενδριτικά (DCs) κύτταρα και στη συνέχεια για τον έλεγχο της ωρίμανσης των DCs μετά την επώαση τους με τα SNEDDS. Επίσης χρησιμοποιήθηκε ως μέσο ανάλυσης για το πείραμα της οργανικής κατανομής των νανοφορέων SNEDDS.

Η ανάλυση των δειγμάτων της κυτταρομετρίας ροής έγινε με τη χρήση του λογισμικού Cell QuestPro (Becton-Dickinson) και η ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη χρήση του λογισμικού FlowJo\_V10 (Tree Star Inc, Ashland, OR, USA).

#### 3.3.1 Μελέτη της *in vitro* πρόσληψης των νανοφορέων SNEDDS από μακροφάγα

##### 3.3.1.1 Υλικά

- Πλήρες θρεπτικό RPMI-1640/FBS 10% (Biowest, France)
- Trypan Blue
- SNEDDS σημεισμένα με τη χρωστική Cy5 (Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System / Cyanine 5)
- PBS 1x

##### 3.3.1.2 Μέθοδος

Σε πλάκα καλλιέργειας 24 θέσεων, προστίθενται  $4 \times 10^6$  κύτταρα σε τελικό όγκο 500 μl πλήρους θρεπτικού. Έπειτα η πλάκα επωάζεται στο κλίβανο στους 37°C για 2 ώρες. Μετά το πέρας των 2 ωρών, απομακρύνεται από την πλάκα το θρεπτικό και τα μακροφάγα

επωάζονται, με 100 µg/ml, 50 µg/ml και 25 µg/ml SNEDDs σε τελικό όγκο 500 µl για 4 ή 12 ώρες στους 37°C. Ως δείγματα αρνητικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που επώαστηκαν με σκέτο θρεπτικό. Μετά το τέλος της επώασης, απορρίπτεται το υπερκείμενο, προστίθενται 400 µl PBS 1x και ακολουθεί ήπια μηχανική αποκόλληση των κυττάρων με τη βοήθεια ενός ξύστρου. Μόλις αποκολληθούν τα κύτταρα, μεταφέρονται σε σωληνάκι erpendorf και φυγοκεντρούνται στις 3.500 rpm για 10 λεπτά, θερμοκρασία 4°C. Ακολουθεί μια πλύση με 200 µl PBS 1x. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 500 µl PBS και το κυτταρικό εναιώρημα αναλύεται άμεσα με κυτταρομετρία ροής.

#### 3.3.2 Μελέτη της *in vitro* πρόσληψης των νανοφορέων SNEDDs από δενδριτικά κύτταρα

##### 3.3.2.1 Υλικά

- Πλήρες θρεπτικό RPMI-1640/FBS 10%
- Trypan Blue
- SNEDDS σημεισμένα με τη χρωστική Cy5 (Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System / Cyanine 5)
- PBS 1x
- Αντίσωμα έναντι του μορίου CD11c του ποντικού (BD Biosciences): Αντίσωμα ειδικό για τα δενδριτικά κύτταρα, σημασμένο με φυκοερυθρίνη (Phycoerythrine, PE), η οποία διεγείρεται από ακτινοβολία μήκους 488 nm και εκπέμπει στα 575 nm (PE Hamster Anti-Mouse CD11c).

##### 3.3.2.2 Μέθοδος

Τα δενδριτικά κύτταρα που απομονώνονται σύμφωνα με την μέθοδο που αναγράφεται στη παράγραφο 3.1.1, χρησιμοποιούνται προκειμένου να μελετηθεί η πρόσληψη των νανοφορέων SNEDDs από αυτά. Έτσι την έβδομη ημέρα της καλλιέργειας, τα κύτταρα συλλέγονται και προστίθενται  $5 \times 10^5$  κύτταρα σε τελικό όγκο 500 µl πλήρους θρεπτικού, σε πλάκα καλλιέργειας 24 θέσεων. Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται για 2 ώρες, στο κλίβανο στους 37°C. Μετά το πέρας των 2 ωρών, απομακρύνεται από την πλάκα το θρεπτικό και τα κύτταρα επωάζονται, στους 37°C για 4 ή 12 ώρες, με 500 µl SNEDDs. Οι

συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: 100 µg/ml, 50 µg/ml και 25 µg/ml και προέκυψαν με διαδοχικές αραιώσεις. Ως δείγματα αρνητικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που επώαστηκαν με σκέτο θρεπτικό. Όταν ολοκληρωθεί η επώαση, τα κύτταρα από κάθε φρεάτιο μεταφέρονται σε σωληνάκια errendorf και φυγοκεντρούνται (10 λεπτά, 3.500 rpm). Στο τέλος της φυγοκέντρησης, το ίζημα επαναιωρείται σε 100 µl PBS 1x και μεταφέρεται σε φρεάτιο πλάκας 96 θέσεων με κωνικό πυθμένα (96 well plate V-bottom). Έπειτα η πλάκα φυγοκεντρείται στις 900 στροφές για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία 4°C. Όταν ολοκληρωθεί η φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο απορρίπτεται, το ίζημα επαναιωρείται σε 100 µl FACS buffer (PBS 1x / 3% FBS) και τα κύτταρα φυγοκεντρούνται (900 rpm, 5 λεπτά, 4°C). Στη συνέχεια, απορρίπτεται το υπερκείμενο και σε κάθε φρεάτιο προστίθενται 50 µl αντισώματος CD11c (αραίωση 1:100 σε διάλυμα FACS buffer). Τα κύτταρα επωάζονται με το αντίσωμα για 30 λεπτά στο σκοτάδι, στους 4°C. Μετά το πέρας της επώασης, γίνονται 2 εκπλύσεις, με FACS buffer και PBS 1x, αντίστοιχα. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 500 µl PBS και το κυτταρικό εναιώρημα αναλύεται άμεσα με κυτταρομετρία ροής.

#### 3.3.3 Ωρίμανη δενδριτικών κυττάρων

##### 3.3.3.1 Υλικά

- Πλήρες θρεπτικό RPMI-1640/FBS 10% (Biowest, France)
- Trypan Blue
- SNEDDS σημεισμένα με τη χρωστική Cy5 (Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System / Cyanine 5)
- PBS 1x
- SNEDDS με σκουαλένιο και τοκοφερόλη (ST3)
- SNEDDS μόνο με σκουαλένιο (S4)
- Λιποπολυσακχαρίτης-LPS (Lipopolysaccharide) (Sigma, St. Louis, USA)
- Αντισώματα έναντι των μορίων CD40, CD80, CD83, CD86 και MHCII (Biolegend): σημεισμένα με τη χρωστική φυκοερυθρίνη (Phycoerythrine, PE), η οποία διεγείρεται από ακτινοβολία μήκους 488 nm και εκπέμπει στα 575 nm (PE Rat Anti-Mouse CD40, CD83, CD86, MHCII) (PE Hamster Anti-Mouse CD80)

➤ Αντίσωμα έναντι του μορίου CD11c του ποντικού (BD Bioscience): Αντίσωμα ειδικό για τα δενδριτικά κύτταρα, σημασμένο με τη χρωστική αλλοφυκοκυανίνη (Allophycocyanin, APC), η οποία διεγείρεται από ακτινοβολία μήκους κύματος 635 nm και εκπέμπει στα 665 nm (APC Hamster Anti-Mouse CD11c)

#### 3.3.3.2 Μέθοδος

Απομονώνονται δενδριτικά κύτταρα, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της παραγράφου 3.1.1. Την έβδομη ημέρα της καλλιέργειας, σε πλάκα καλλιέργειας 24 θέσεων, προστίθενται  $5 \times 10^5$  κύτταρα σε τελικό όγκο 500 μl πλήρους θρεπτικού. Στο συγκεκριμένο πείραμα τα κύτταρα επώαστηκαν με 4 διαφορετικά υλικά:

1. Πλήρες θρεπτικό υλικό
2. Λιποπολυσακχαρίτη-LPS
3. Νανοσωματίδια SNEDDS-ST3
4. Νανοσωματίδια SNEDDS-S4

Τα κύτταρα, στη συνέχεια επωάζονται στο κλίβανο στους 37°C για 24 ώρες. Την όγδοη ημέρα, τα δείγματα προετοιμάζονται για την κυτταρομετρία ροής. Η διαδικασία είναι παρόμοια με αυτή της παραγράφου 3.3.2, με την μόνη διαφορά ό,τι εδώ εκτός από την επώαση με το αντίσωμα CD11c (αραίωση 1:100), πραγματοποιείται και επώαση με τα αντισώματα έναντι των μορίων CD40, CD80, CD83, CD86 (αραίωση 1:100) και MHCII (αραίωση 1:200) ώστε να δούμε διπλά σημασμένο πληθυσμό.

#### 3.3.4 Μελέτη της οργανικής κατανομής των νανοφορέων SNEDDS

##### 3.3.4.1 Υλικά

- Πλήρες θρεπτικό RPMI-1640/FBS 10% (Biowest, France)
- Trypan Blue
- SNEDDS σημεσμένα με τη χρωστική Cy5
- PBS 1x
- ACK

#### 3.3.4.2 Μέθοδος

Για τη μελέτη της βιοκατανομής των νανοφορέων χρησιμοποιούνται ποντικοί BALB/c (6-8 εβδομάδων) στα οποία χορηγούνται, υποδόρια και ενδομυϊκά, SNEDDS σημασμένα με φθορίζουσα χρωστική (SNEDDS-Cy5). Οι συγκεντρώσεις των νανοφορέων που χορηγούνται είναι 5 mg και 10 mg σε 100 μl PBS 1x. Μετά από 30 λεπτά, 1 ώρα και 3 ώρες, τα ποντίκια θανατώνονται και λαμβάνονται κατά την ενδομυϊκή χορήγηση (im) οι επιχώριοι λεμφαδένες (βουβωνικοί και οπισθογονατιαίοι) και ο σπλήνας και κατά την υποδόρια χορήγηση (sc) οι επιχώριοι μασχालιαίοι λεμφαδένες και ο σπλήνας. Στη συνέχεια συλλέγονται τα λευκοκύτταρα από τους λεμφαδένες και το σπλήνα με μηχανική ομογενοποίηση και εκπλένονται με θρεπτικό υλικό RPMI-1640, φυγοκεντρώντας για 10 λεπτά στους 4°C και στις 1300 στροφές (rpm). Στη περίπτωση των λευκοκυττάρων που συλλέγονται από το σπλήνα, αυτά υπόκεινται σε μία επιπλέον διαδικασία, κατά την οποία εκπλένονται με διάλυμα ACK. Τόσο τα κύτταρα από τους λεμφαδένες, όσο και από το σπλήνα, καταμετρούνται με χρήση της πλάκας Malassez και του διαλύματος Trypan Blue, ώστε να ελεγχθεί η βιωσιμότητά τους. Έπειτα τα κύτταρα ( $1 \times 10^6$ /δείγμα) προετοιμάζονται για ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.

#### 3.4 Αντιγονικότητα πεπτιδίων του παρασίτου *L. infantum*

##### 3.4.1 Πρωτόκολλο ανασοποιήσεων

Για το πρωτόκολλο ανασοποιήσεων (εικόνα 3.1) και τη μελέτη της κυτταρικής και χυμικής απόκρισης, χρησιμοποιήθηκαν ομάδες ποντικών της φυλής BALB/c (n=8/ομάδα). Οι ομάδες αυτές εμβολιάζονται (ενδομυϊκά) 2 φορές, με ενδιάμεσο διάστημα 15 ημερών, με μείγμα των πεπτιδίων σε συνδυασμό με το ανοσοενισχυτικό Addavax. Συγκεκριμένα τα ποντίκια εμβολιάστηκαν με 1) μείγμα 10μg από το κάθε πεπτίδιο (C1), 2) μείγμα 5 μg από το κάθε πεπτίδιο (C2) και 3) μείγμα 2 μg από το κάθε πεπτίδιο (C3). Στη συνέχεια τα ποντίκια θανατώνονται και λαμβάνονται αίμα και σπλήνας. Από το αίμα απομονώνεται ο ορός, μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα και φυγοκέντρηση σε 4000 rpm για 5 λεπτά. Ως ομάδες ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ποντικοί που εμβολιάστηκαν με PBS 1x και ποντικοί που εμβολιάστηκαν μόνο με το ανοσοενισχυτικό Addavax. Τα πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν, από πρωτεΐνες του παρασίτου, έχουν αναλυθεί με *in silico* προσέγγιση,

και φαίνεται πως αναγνωρίζονται από MHC I και MHC II μόρια του ποντικού. Επίσης σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά (ισοηλεκτρικό σημείο και υδροφοβικότητα) να είναι κατάλληλα για την ενσωμάτωση τους στα SNEDDS, τα οποία είναι υδρόφοβα.

Το μέγεθος και το μοριακό βάρος (MW) του κάθε πεπτιδίου ήταν:

- Πεπτίδιο 1: μέγεθος 40 αα, MW: 4548.25, προερχόμενο από την πρωτεΐνη branch point binding protein
- Πεπτίδιο 2: μέγεθος 56 αα, MW: 6310.36, προερχόμενο από την πρωτεΐνη Rieskeiron-sulfurmitochondrial precursor
- Πεπτίδιο 3: μέγεθος 50 αα, MW: 5452.25, προερχόμενο από υποθετική πρωτεΐνη

#### 3.4.2 Ενζυμική δοκιμασία ανοσοπροσρόφησης (ELISA)

Η ενζυμική ανοσοδοκιμασία ELISA (ή Δοκιμασία Ενζυμο Συζευγμένης Ανοσοπροσρόφησης) είναι μια μέθοδος που επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων, αντιγόνων, κυτταροκινών, χημικών ουσιών, ορμονών σε βιολογικά υγρά με τη χρήση ενζυμο-συζευγμένων αντισωμάτων και χρωμογόνου υποστρώματος. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ειδική αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Υπάρχουν αρκετές παραλλαγές αυτής της μεθόδου και τα βασικά στοιχεία που τη χαρακτηρίζουν είναι: (1) η πρόσδεση και ακινητοποίηση αντιγόνου ή αντισώματος σε στερεή επιφάνεια (Ανοσοπροσρόφηση, ImmunoSorbent), (2) η χρήση ενζυμο-συζευγμένου (Enzyme-Linked) αντισώματος και (3) η χρήση χρωμογόνων υποστρωμάτων, τα οποία μετά από αντίδραση με το ένζυμο παράγουν διαλυτό προϊόν (χρώμα ή φθορισμό) επιτρέποντας την ποσοτικοποίηση της αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος (Ternynck T. and Avrameas S., 1990).

##### 3.4.2.1 Υλικά

- Μείγμα πεπτιδίων
- Ανοσοενισχυτικό Addavax (InvivoGen, France)
- Διττανθρακικό διάλυμα κάλυψης (Carbonatebuffer): Διατηρείται στους 4 °C/ 15 ημέρες
- Ανθρακικό νάτριο- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Sigma, St. Louis, USA)
- Διττανθρακικό νάτριο- $\text{NaHCO}_3$  (Merck Darmstadt, Germany)

- Tween-20 (Sigma, St. Louis, USA)
- PBS 1x
- Αλβουμίνη Βόειου Ορού-BSA (BovineSerumAlbumin) (ApplichemDarmstadt, Germany)
- Αντίσωμα IgG (AbDSerotec, Oxford, UK). Το αντίσωμα είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση (HRPGoatantimouseIgG).
- TMB (3,3',5,5'τετραμεθυλοβενζιδίνη-tetramethylbenzidine) Substrate Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Θεικόξύ- $H_2SO_4$  (Applichem Darmstadt, Germany)

**Πίνακας 3.4.** Πρωτόκολλο παρασκευής διαλύματος διττανθρακικού διαλύματος κάλυψης<sup>1</sup>

Carbonate Buffer, pH=9,6	
$Na_2CO_3$	15 mM
$NaHCO_3$	35mM

**Πίνακας 3.5.** Πρωτόκολλο παρασκευής διαλύματος έκπλυσης ELISA

Διάλυμα έκπλυσης ELISA	
PBS	1x
Tween-20	0.05%

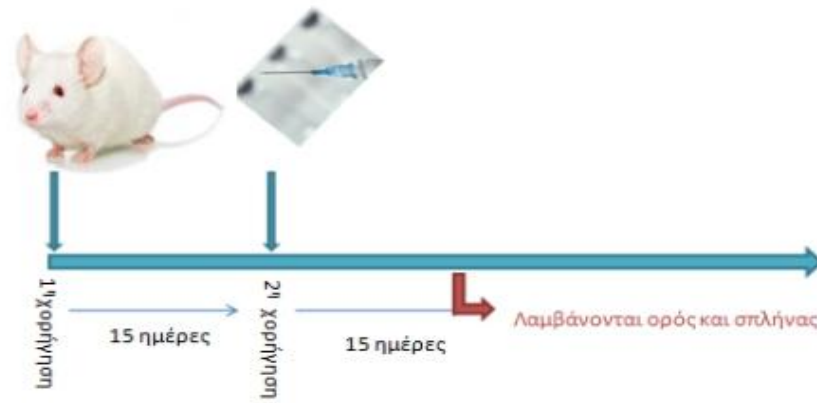
**Πίνακας 3.6.** Πρωτόκολλο παρασκευής διαλύματος δέσμησης μη ειδικών θέσεων

Διάλυμα δέσμησης μη ειδικών θέσεων	
PBS	1x
BSA	2 %

**Πίνακας 3.7.** Πρωτόκολλο παρασκευής διαλύματος αραιώσης αντιγόνου

Διάλυμα αραιώσης αντιγόνου	
PBS	1x
BSA	1 %





**Εικόνα 3.1:** Σχηματική απεικόνιση του πρωτοκόλλου ανασοποίησης

#### 3.4.2.2 Μέθοδος

##### 1<sup>η</sup> Ημέρα

Σε κάθε φρεάτιο πλάκας 96 θέσεων (High-binding) προστίθενται 5 µg/ml, από το μείγμα των πεπτιδίων ή από το πεπτίδιο, το οποίο είναι αραιωμένο σε 100 µl διττανθρακικού διαλύματος κάλυψης (Carbonate buffer). Στη συνέχεια η πλάκα καλύπτεται και επωάζεται για 18 ώρες στους 4 °C.

##### 2<sup>η</sup> Ημέρα

Αρχικά, το διάλυμα κάλυψης μαζί με το μη προσκολλημένο αντιγόνο απομακρύνεται και η πλάκα εκπλένεται 3 φορές με διάλυμα έκπλυσης (PBS 1x / Tween-20 0,05%). Ακολούθως, σε κάθε φρεάτιο τοποθετούνται 200 µl διαλύματος δέσμευσης μη ειδικών θέσεων (PBS / 2% BSA) και η πλάκα επωάζεται σε κλίβανο στους 37 °C για 1,5 ώρα. Μόλις ολοκληρωθεί η επώαση, πραγματοποιείται απομάκρυνση του διαλύματος και έκπλυση της πλάκας 3 φορές. Στα αντίστοιχα φρεάτια τοποθετούνται 100 µl διαδοχικών αραιώσεων ορού ποντικού σε διάλυμα (PBS / 1% BSA), ο οποίος περιέχει τα αντισώματα έναντι του προσκολλημένου αντιγόνου και γίνεται επώαση στους 37 °C για 1,5 ώρα. Ακολουθεί έκπλυση της πλάκας, προσθήκη 100 µl διαλύματος αντισώματος ολικών IgG (Goat anti-mouse IgG) (αραίωση 1:5000 σε PBS 1x / Tween-20 0,05%) που είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση και επώαση για 1 ώρα στους 37 °C. Η περίσσεια του υγρού απομακρύνεται και γίνονται 3 διαδοχικές εκπλύσεις. Στη συνέχεια, προκειμένου να ελεγχθεί η ενεργότητα της υπεροξειδάσης, προστίθενται 100 µl διαλύματος υποστρώματος TMB / υπεροξειδίου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Το ένζυμο αντιδρά με το διάλυμα αυτό και ανάγεται δίδοντας διαλυτά και έγχρωμα προϊόντα. Ο τερματισμός της αντίδρασης γίνεται με την προσθήκη 100 μl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M σε κάθε φρεάτιο και η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των προϊόντων γίνεται σε φασματοφωτόμετρο στα 450 nm.

#### 3.4.3 Μελέτη πολλαπλασιασμού λεμφοκυττάρων (Lymphoproliferation)

##### 3.4.3.1 Υλικά

- Πλήρες θρεπτικό RPMI-1640/FBS 10% (Biowest, France)
- Trypan Blue
- PBS 1x
- Κονκαβαλίνη A – ConA (Concavalin A) (Sigma, St. Louis, USA): Μιτογόνος παράγοντας που επάγει τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων.
- Τριτιωμένη θυμιδίνη [methyl-<sup>3</sup>H]-Thymidine (Δημόκριτος, Ελλάδα).
- Υγρό σπινθηρισμού (Scintillation fluid) (Perkin Elmer, Massachusetts, USA)

##### 3.4.3.2 Μέθοδος

Προκειμένου να μελετηθεί ο πολλαπλασιασμός των λεμφοκυττάρων απομονώνονται κύτταρα από σπλήνα ποντικού (6-8 εβδομάδων) της φυλής BALB/c. Ο σπλήνας ομογενοποιείται, διηθείται, φυγοκεντρείται στις 1300 στροφές για 10 λεπτά και ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων. Ακολούθως προστίθενται 2×10<sup>5</sup> κύτταρα σε τελικό όγκο 200 μl θρεπτικού υλικού, σε πιάτο 96 θέσεων (96 well plate u-bottom). Τα κύτταρα στη συνέχεια διαγείρονται με:

1. Το πεπτίδιο 1, σε συγκέντρωση 5 μg/ml
2. Το πεπτίδιο 2, σε συγκέντρωση 5 μg/ml
3. Το πεπτίδιο 3, σε συγκέντρωση 5 μg/ml
4. Μείγμα των παραπάνω πεπτιδίων (2 μg/ml από το κάθε πεπτίδιο)
5. Κονκαβαλίνη A 6 μg/ml
6. Σκέτο θρεπτικό υλικό

Η ConA χρησιμοποιείται ως θετικό δείγμα ελέγχου και ως αρνητικό δείγμα χρησιμοποιούνται κύτταρα που καλλιεργούνται σε σκέτο θρεπτικό υλικό. Η καλλιέργεια των κυττάρων διαρκεί 96 ώρες και 18 ώρες πριν την ολοκλήρωση της, προστίθεται 1  $\mu\text{Ci}$  τριτιωμένης θυμιδίνης (3HTdR) σε κάθε φρεάτιο. Η τριτιωμένη θυμιδίνη προσδένεται στο DNA των κυττάρων, επομένως καθώς το κύτταρο πολλαπλασιάζεται αυξάνεται το ποσοστό ενσωμάτωσής της. Στις 96 ώρες της καλλιέργειας τα κύτταρα συλλέγονται σε κυτταροσυλλέκτη (Skatron, USA). Ο κυτταροσυλλέκτης έχει την ιδιότητα να σπάει τα κύτταρα και να προσδένει το DNA τους σε ειδικά φίλτρα. Στη συνέχεια τα φίλτρα αυτά εμποτίζονται σε υγρό σπινθιρισμού και γίνεται μέτρηση σε μηχάνημα που μετρά β ακτινοβολία (Trilux Beta Counter, Wallac, USA). Το μηχάνημα αυτό μετράει τις κρούσεις που δίνει η ενσωματωμένη θυμιδίνη. Έτσι, οι κρούσεις που παίρνουμε αντιστοιχούν στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στην καλλιέργεια (Nielsen H. B. and Pedersen B. K., 1997).

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Μελέτη της δράσης νανοφορέων SNEDDS *in vitro*

Στον 21ο αιώνα, οι μολυσματικές ασθένειες έχουν αναδειχθεί ως σοβαρή απειλή για την υγεία εκατομμυρίων ανθρώπων σε ολόκληρο τον κόσμο (Christopher D., 2014). Η κύρια πρόκληση για την καταπολέμηση τέτοιων ασθενειών είναι η εύρεση εμβολίου. Μία εύλογη προσέγγιση θα μπορούσε να βασίζεται στην παρασκευή εμβολίου με βάση τους νανοφορείς (Pati R. et al., 2018). Στη παρούσα διπλωματική εργασία, διερευνήθηκε η ικανότητα των αυτο-γαλακτοποιούμενων συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων (SNEDDS), να χρησιμοποιηθούν ως φορείς αντιγόνου για την ανάπτυξη εμβολίου έναντι της πειραματικής σπλαγγχνικής λεισμανίασης.

#### 4.1.1 Χαρακτηρισμός νανοφορέων SNEDDS

Οι νανοφορείς SNEDDS που χρησιμοποιήθηκαν, είχαν μέγεθος  $27.31 \pm 0.70$  nm και αποτελούνταν από:

1. Επιφανειοδραστική ουσία Kolliphor HS15
2. Συνεπιφανειοδραστική ουσία Labrafil M1944CS
3. Σκουαλένιο και  $\alpha$ -Τοκοφερόλη (βιταμίνη Ε): Συστατικά με ανοσοενισχυτική δράση

Επίσης ορισμένα SNEDDS, για πειραματικούς σκοπούς, ήταν σημασμένα με την χρωστική Cy5 (Cyanine-5) (διέγερση 633 nm/εκπομπή 670 nm).

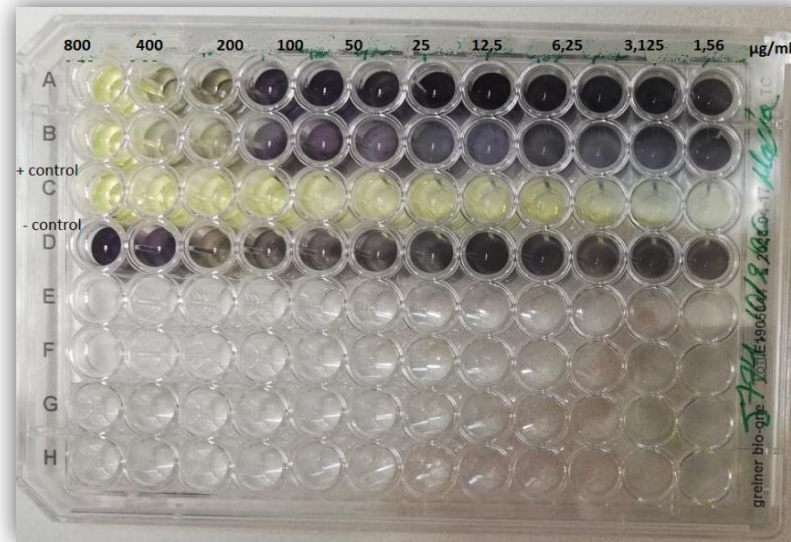
#### 4.1.2 Αλληλεπίδραση νανοφορέων SNEDDS με μακροφάγα κυτταρικής σειράς J774A.1

Μακροφάγα της σειράς J774A.1 επώαστηκαν σε συγκεντρώσεις νανοσωματιδίων SNEDDS από 0,39 έως 800  $\mu\text{g/ml}$ , για 24 ώρες και προσδιορίστηκε η κυτταροτοξικότητα με τη μέθοδο ΜΤΤ. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων, μετά από φασμαφωτομέτρηση, έδειξε ότι η έκθεση

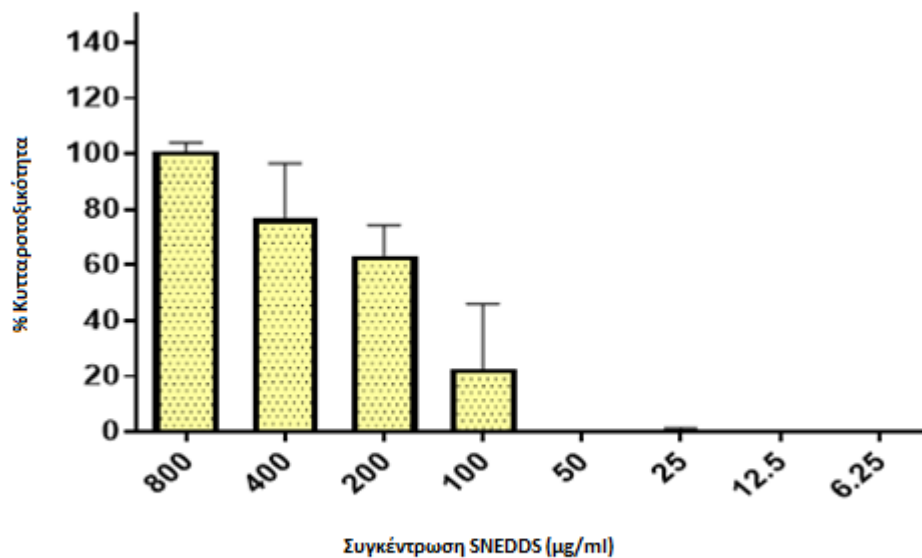
## 4. Αποτελέσματα

των μακροφάγων στους νανοφορείς SNEDDS, δεν επηρέασε τη βιωσιμότητά των κυττάρων σε συγκεντρώσεις  $\leq 100$   $\mu\text{g/ml}$  (εικόνα 4.1).

A)



B)



Εικόνα 4.1: Προσδιορισμός κυτταροτοξικής δράσης των νανοσωματιδίων SNEDDS έναντι μακροφάγων με χρήση της μεθόδου MTT και ανάλυση με φασματοφωτομετρία, σε μήκος κύματος 570 nm. A) Πλάκα 96 θέσεων, η οποία περιέχει τα κύτταρα που επώαστηκαν με τα SNEDDS

## 4. Αποτελέσματα

και που επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο MTT. Το μωβ χρώμα αντιπροσωπεύει τα μεταβολικά ενεργά κύτταρα, δηλαδή τα ζωντανά. Ως αρνητικό δείγμα ελέγχου, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που επώαστηκαν σε σκέτο θρεπτικό υλικό, ενώ ως θετικό δείγμα ελέγχου κύτταρα που επώαστηκαν με διάλυμα SDS 0,01%. **B)** Διάγραμμα που παρουσιάζει τα ποσοστά των νεκρών κυττάρων μετά από έκθεσή τους σε συγκεντρώσεις νανοφορέων SNEDDS  $\leq 100$   $\mu\text{g/ml}$ . Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο  $\pm$  sd τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι νανοσχηματισμοί SNEDDS παρουσίασαν ποσοστά εξαρτώμενης από τη συγκέντρωση τοξικότητας. Συγκεκριμένα, η επώαση των μακροφάγων σε συγκεντρώσεις νανοφορέων 800, 400 και 200  $\mu\text{g/ml}$  είχε ως αποτέλεσμα υψηλά ποσοστά κυτταροτοξικότητας:  $101,02 \pm 2,96\%$ ,  $76,67 \pm 19,94\%$  και  $63,53 \pm 10,75\%$ , αντίστοιχα. Σε αντίθεση με τα παραπάνω ποσοστά, η % κυτταροτοξικότητα, όταν τα μακροφάγα επώαστηκαν σε συγκέντρωση νανοφορέων 100  $\mu\text{g/ml}$ , ήταν  $10,8 \pm 15,27\%$ . Συμπερασματικά, επιβεβαιώθηκε η βιοσυμβατότητα των SNEDDS και η ασφάλεια χρήσης τους σε εύρος συγκεντρώσεων  $\leq 100$   $\mu\text{g/ml}$ .

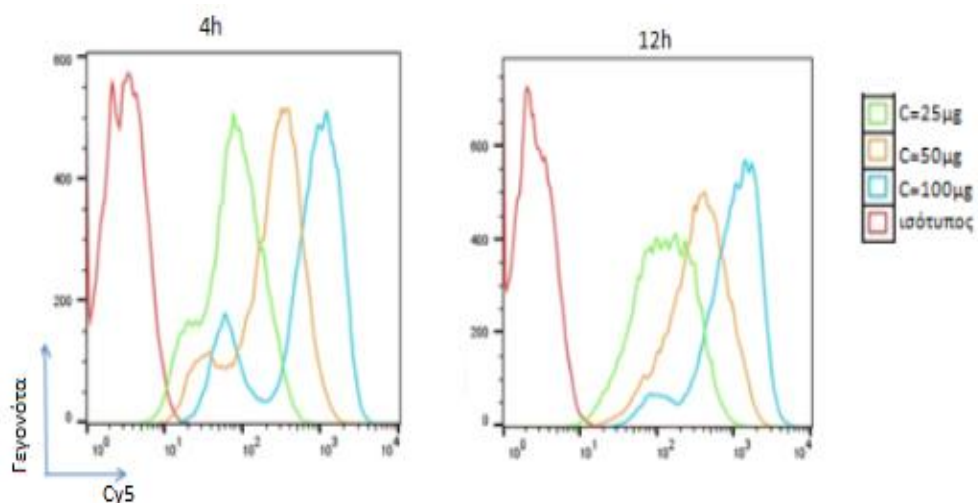
### 4.1.3 Μελέτη της πρόσληψης των νανοφορέων *in vitro*

Η πρόσληψη των νανοφορέων SNEDDS μελετήθηκε αρχικά στη κυτταρική σειρά μακροφάγων, J774A.1 και στη συνέχεια στα δενδριτικά κύτταρα (ΔΚ). Τα μακροφάγα είναι τα κύτταρα που λειτουργούν ως κύριοι ξενιστές του παρασίτου *Leishmania*, ενώ τα δενδριτικά κύτταρα ως κύρια αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα παίζουν κρίσιμο ρόλο στη διαμεσολάβηση της αντίστασης και της ευαισθησίας κατά τη διάρκεια της μόλυνσης από *Leishmania*. Τα μακροφάγα αν και αποτελούν τα κύτταρα-στόχους του παρασίτου, συμβάλουν και στην εξάλειψη της μόλυνσης. Ωστόσο, η αποτελεσματική αντιμετώπιση των παρασίτων από μακροφάγα εξαρτάται από την ενεργοποίηση της κατάλληλης ανοσοαπόκρισης, η οποία συνήθως ξεκινά από τα ΔΚ (Liu D. and Uzonova J. E., 2012).

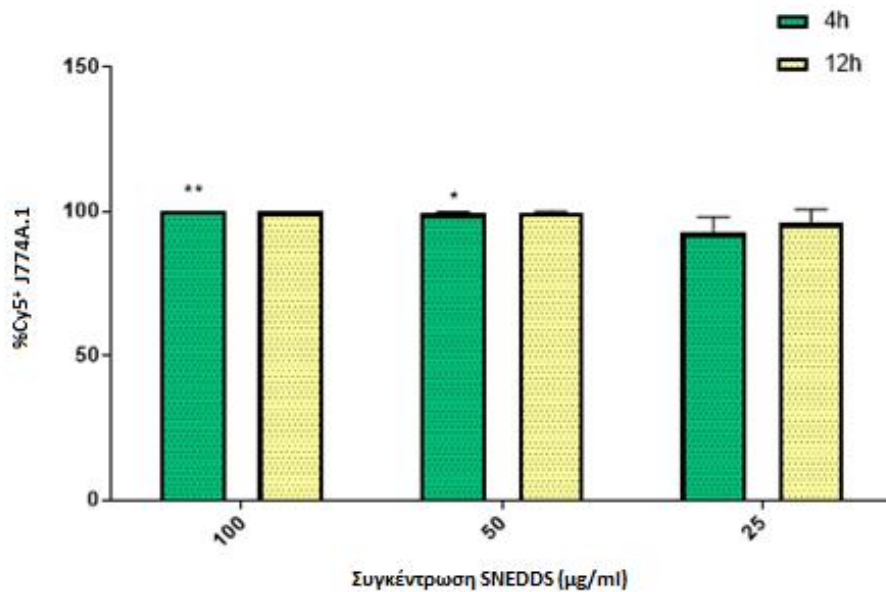
#### 4.1.3.1 Πρόσληψη από μακροφάγα κύτταρα

Για την αξιολόγηση της ικανότητας των μακροφάγων να προσλαμβάνουν νανοσωματίδια SNEDDS και την εκτίμηση του βαθμού πρόσληψης, τα κύτταρα αυτά εκτέθηκαν σε συγκεντρώσεις: 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  και 100  $\mu\text{g/ml}$ , σημασμένων νανοσωματιδίων (SNEDDS-Cy5) για 4 και 12 ώρες και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής (εικόνα 4.2 A). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, μετά από έκθεση για 4 ώρες στους νανοφορείς, η αυξανόμενη συγκέντρωση των νανοφορέων έως τη συγκέντρωση των 100  $\mu\text{g/ml}$  είχε ως αποτέλεσμα τη σταδιακή αύξηση του ποσοστού των μακροφάγων που προσέλαβαν τα νανοσωματίδια, η οποία φάνηκε να φτάνει στο  $99,9\% \pm 0,03$  του πληθυσμού των κυττάρων. Ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα της έκθεσης των μακροφάγων σε νανοσωματίδια SNEDDS για 12 ώρες, όπου η αύξηση στη συγκέντρωση των νανοσωματιδίων SNEDDS είχε ως αποτέλεσμα, τη σταδιακή αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που προσέλαβαν τα νανοσωματίδια, η οποία έφτασε έως και το  $99,9\% \pm 0,10$  του πληθυσμού των κυττάρων (εικόνα 4.2 B).

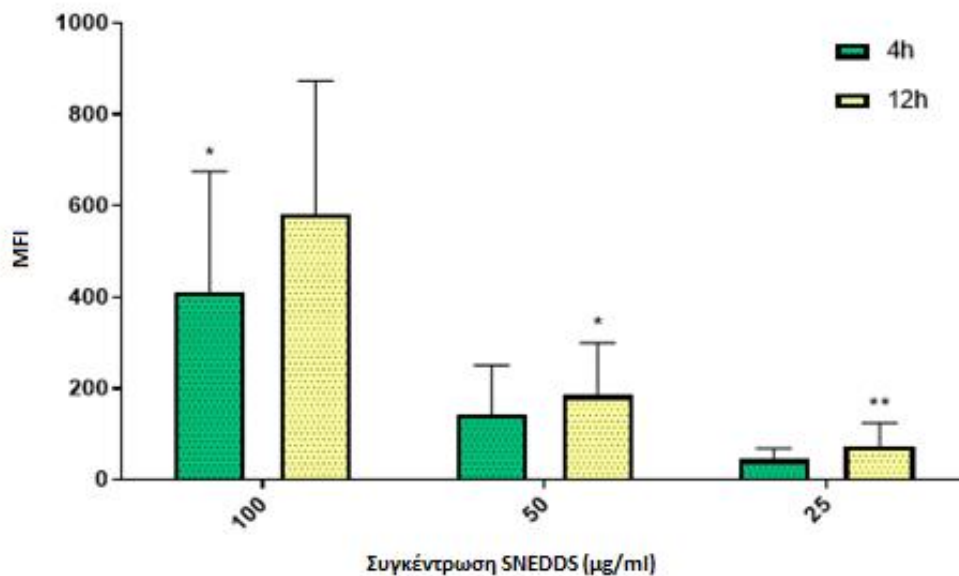
A)



B)



Γ)



**Εικόνα 4.2** Κινητική πρόσληψης των νανοφορέων από μακροφάγα *in vitro* σε σχέση με τη συγκέντρωση. Μακροφάγα καλλιεργήθηκαν παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων, από 25 έως 100 µg/ml νανοφορέων SNEDDS για 4 και 12 ώρες στους 37 °C, σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub>. **A)** Αντιπροσωπευτικό ιστόγραμμα (histogram plot), το οποίο απεικονίζει την πρόσληψη των νανοφορέων με τιμές της μέσης έντασης φθορισμού (MFI) για τις τρεις συγκεντρώσεις, στα δύο χρονικά σημεία. Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική 3 πειραμάτων. **B)** Διάγραμμα που απεικονίζει το



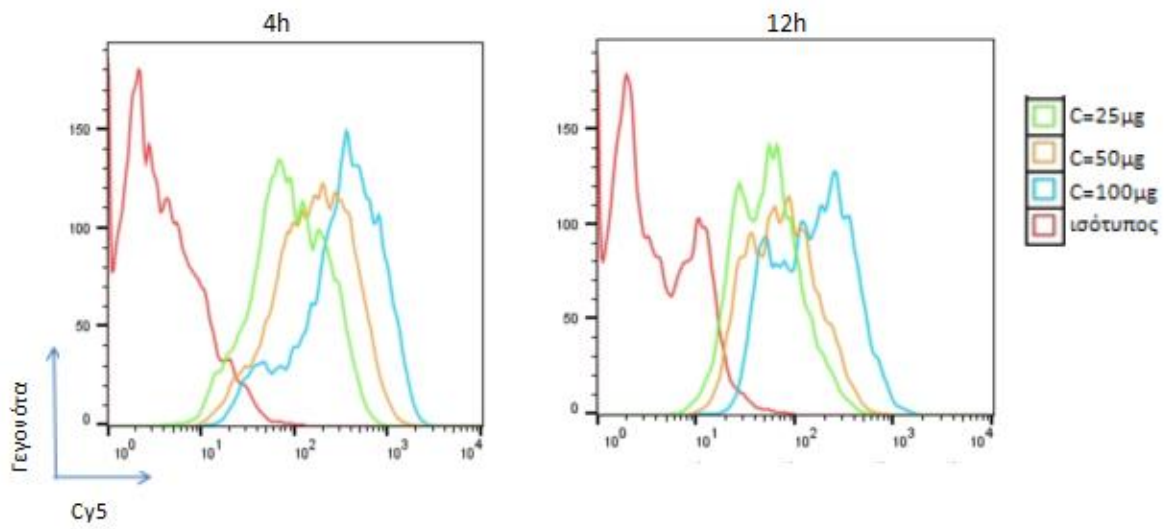
ποσοστό (%) των Cy5<sup>+</sup> J774A.1. **Γ) Διάγραμμα** που απεικονίζει τη μέση ένταση φθορισμού (MFI) των Cy5<sup>+</sup> J774. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο  $\pm$  SD των Cy5<sup>+</sup> J774A.1 από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων στο ίδιο χρονικό σημείο συμβολίζονται με \* ( $P < 0,05$ ) ή \*\* ( $P < 0,01$ ).

Σχετικά με τη μέση ένταση φθορισμού (Mean Fluorescence Intensity, MFI) (εικόνα 4.2 Γ), που αντιπροσωπεύει, έμμεσα, τον αριθμό των νανοσωματιδίων που προσέλαβε κάθε κύτταρο, παρατηρούμε πως είναι εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση των SNEDDS, όσο και από το χρόνο επώασης. Συγκεκριμένα, μετά από 4 ώρες επώασης με 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  νανοσωματιδίων, ο δείκτης MFI ήταν  $43,9 \pm 29,8$ , ενώ στη συγκέντρωση 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  η τιμή ήταν  $144,1 \pm 128,6$ . Στη μέγιστη συγκέντρωση νανοφορέων με την οποία επώαστηκαν τα μακροφάγα, δηλαδή 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , η τιμή MFI ήταν  $410 \pm 307,8$ . Οι αντίστοιχες τιμές για την επώαση των 12 ωρών με συγκεντρώσεις 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ήταν  $72,7 \pm 62,6$ ,  $185,1 \pm 134,2$  και  $581,2 \pm 358,1$ .

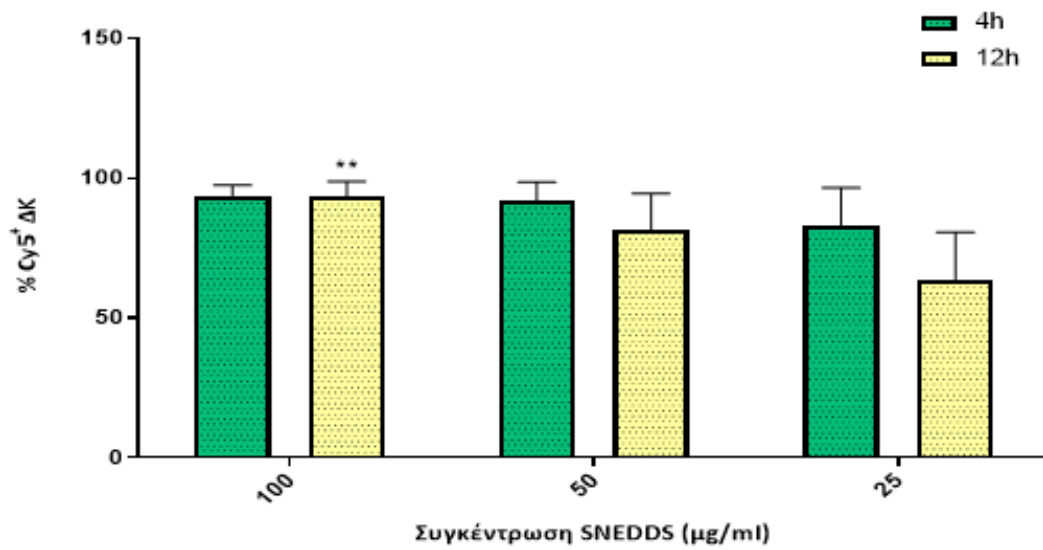
### 4.1.3.2 Πρόσληψη από δενδριτικά κύτταρα

Προκειμένου να προσδιοριστεί αν οι νανοφορείς SNEDDS προσλαμβάνονται από τα δενδριτικά κύτταρα, αυτά επώαστηκαν με συγκεντρώσεις: 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  και 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  νανοσωματιδίων σημασμένων με τη χρωστική Cy5 (SNEDDS-Cy5) για 4 και 12 ώρες και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής (εικόνα 4.3 A). Τα δενδριτικά κύτταρα που διαφοροποιούνται από τον μυελό των οστών ποντικών φέρουν στην επιφάνειά τους το μόριο CD11c. Επομένως, για να προσδιοριστούν τα δενδριτικά κύτταρα που προσέλαβαν τους νανοφορείς έγινε χρώση των κυττάρων που επώαστηκαν με αυτούς με αντίσωμα έναντι του μορίου CD11c. Η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής έδειξε ότι ήδη από τις 4 ώρες επώασης, στη μέγιστη συγκέντρωση το  $94,4 \pm 4,15\%$  των δενδριτικών κυττάρων είχε προσλάβει τους υπό μελέτη νανοφορείς. Το ποσοστό αυτό παρέμεινε ίδιο και στις 12 ώρες επώασης ( $95,02 \pm 6,47\%$ ) (εικόνα 4.3 B).

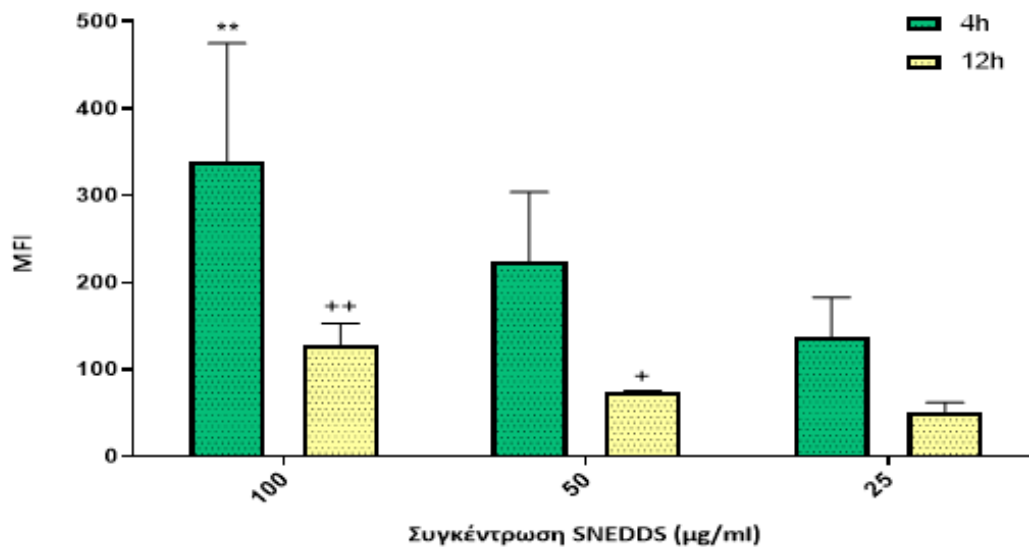
A)



B)



Γ)



**Εικόνα 4.3:** Κινητική πρόσληψης των νανοφορέων από δενδριτικά κύτταρα *in vitro* σε σχέση με τη συγκέντρωση. Δενδριτικά κύτταρα, καλλιεργήθηκαν παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων, από 25 έως 100 µg/ml νανοφορέων SNEDDS για 4 και 12 ώρες στους 37 °C, σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub>. **A)** Αντιπροσωπευτικό ιστόγραμμα (historam plot), το οποίο απεικονίζει την πρόσληψη των νανοφορέων με τιμές της μέσης έντασης φθορισμού (MFI) για τις τρεις συγκεντρώσεις, στα δύο χρονικά σημεία. Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική 3 πειραμάτων. **B)** Διάγραμμα που απεικονίζει το ποσοστό (%) των Cy5<sup>+</sup> ΔΚ. **Γ)** Διάγραμμα που απεικονίζει το μέση ένταση φθορισμού (MFI) των Cy5<sup>+</sup> ΔΚ. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ± SD των Cy5<sup>+</sup> ΔΚ από 2 ανεξάρτητα πειράματα. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων των νανοφορέων στο ίδιο χρονικό σημείο συμβολίζονται με \* (P<0,05) ή \*\* (P<0,01), ενώ μεταξύ των συγκεντρώσεων στα δύο διαφορετικά χρονικά σημεία συμβολίζονται με ++(P<0,01).

Σχετικά με τη ποσότητα των νανοσωματιδίων που προσέλαβε κάθε κύτταρο (MFI) (εικόνα 4.3 Γ), φαίνεται πως αυτή είναι εξαρτώμενη τόσο από τη συγκέντρωση των SNEDDS όσο και από το χρόνο επώασης. Συγκεκριμένα, μετά από 4 ώρες επώασης με 25 µg/ml νανοσωματιδίων, ο δείκτης MFI ήταν 139,78±47,52 ενώ στη συγκέντρωση 50 µg/ml οι τιμές ήταν 215,5±83,02. Στη μέγιστη συγκέντρωση νανοφορέων με την οποία επώαστηκαν τα δενδριτικά κύτταρα, δηλαδή 100 µg/ml, η τιμή MFI ήταν 347,83±164,04. Οι αντίστοιχες τιμές για την επώαση των 12 ωρών σε συγκεντρώσεις 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml ήταν 53,75±10,96, 73,77±0,17 και 121,25±30,05.

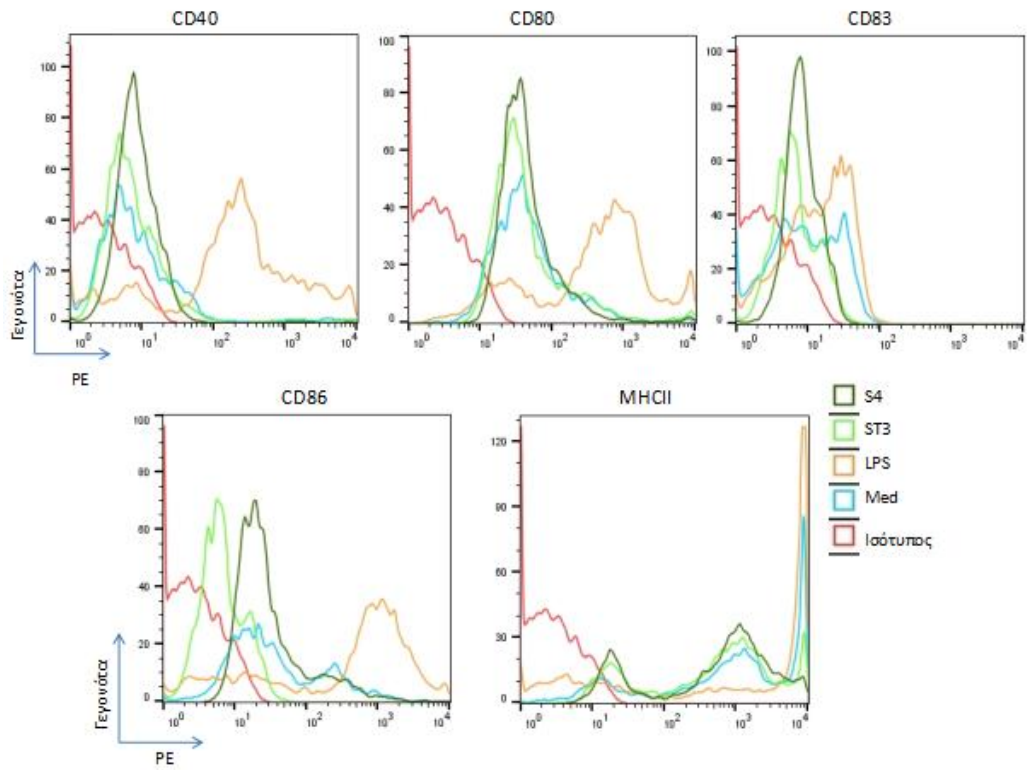
#### 4.1.4 Επίδραση των νανοφορέων SNEDDS στην ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων

Προκειμένου να αξιολογηθεί η ικανότητα των νανοφορέων SNEDDS να λειτουργούν ως φορείς αντιγόνων, δενδριτικά κύτταρα που απομονώθηκαν από τον μυελό των οστών BALB/c ποντικών και συλλέχθηκαν μετά από 7 ημέρες καλλιέργειας, εκτέθηκαν σε νανοφορείς SNEDDS που περιείχαν 1) σκουαλένιο και τοκοφερόλη (ST3) ή 2) μόνο σκουαλένιο (S4) και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής (εικόνα 4.4 Α) ως προς τα επίπεδα έκφρασης των δεικτών ωρίμανσης CD40, CD80, CD83, CD86 και MHC τάξης II. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δείγμα δενδριτικών κυττάρων που καλλιεργήθηκε σε σκέτο θρεπτικό μέσο, ενώ ως θετικός μάρτυρας ελέγχου χρησιμοποιήθηκε δείγμα δενδριτικών κυττάρων που καλλιεργήθηκε παρουσία 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS (προσδέτης του TLR4 που επάγει την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων).

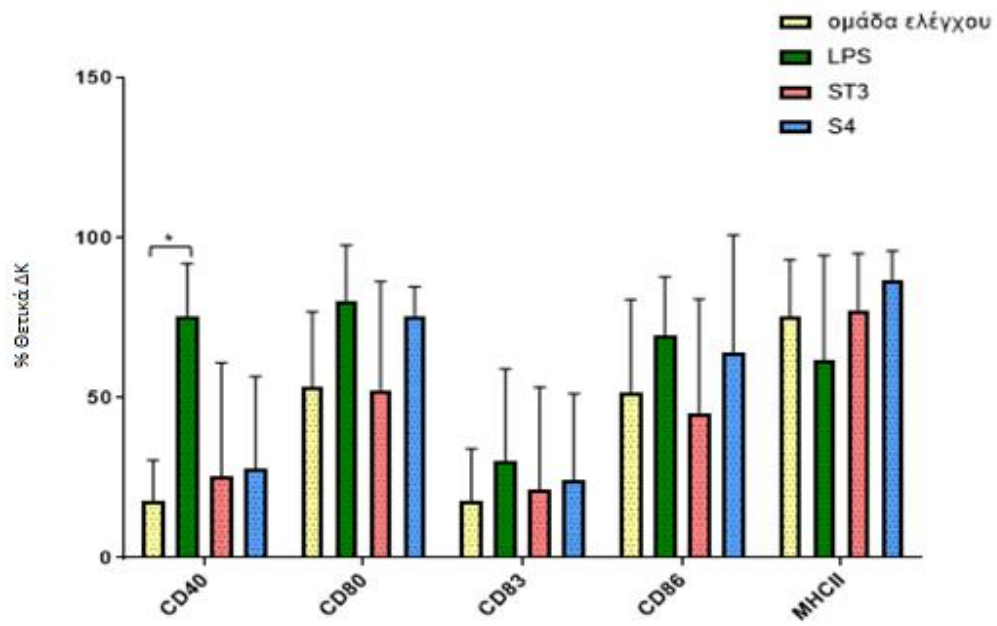
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η έκθεση των δενδριτικών κυττάρων στους νανοφορείς SNEDDS δεν οδήγησε σε αύξηση, στατιστικά σημαντική, των δεικτών ωρίμανσης σε σύγκριση με την έκθεση των κυττάρων σε σκέτο θρεπτικό υλικό, ως προς το ποσοστό των κυττάρων που εξέφραζαν τους δείκτες ωρίμανσης στην επιφάνειά τους (εικόνα 4.4 Β) και ως προς τη μέση ένταση φθορισμού, δηλαδή τον αριθμό των μορίων στην επιφάνεια κάθε κυττάρου (MFI)(εικόνα 4.4 Γ).

Συγκεκριμένα, τα ποσοστά των δενδριτικών κυττάρων, τα οποία ήταν θετικά ως προς τα υπό μελέτη μόρια, που είχαν καλλιεργηθεί σε σκέτο θρεπτικό υλικό σε σύγκριση με τα δενδριτικά που είχαν καλλιεργηθεί παρουσία SNEDDSST3 και S4 ήταν: CD40<sup>+</sup>: 18,03±12,50% έναντι 25,33±35,67% και 27,75±28,92%, CD80<sup>+</sup>: 53,47±23,50% έναντι 52,57±33,82% και 75,6±9,19%, CD83: 17,66±16,38% έναντι 21,49±31,93% και 24,55±26,80%, CD86<sup>+</sup>: 51,77±28,91% έναντι 45,47±35,47% και 64,4±36,47% και MHCII<sup>+</sup>: 75,43±17,79% έναντι 77,07±18,03% και 86,8±9,05%. Τέλος, τα ποσοστά των δενδριτικών κυττάρων που καλλιεργήθηκαν σε LPS και ήταν θετικά ως προς τα υπό μελέτη μόρια ήταν τα εξής: CD40<sup>+</sup>: 75,47±16,56%, CD80<sup>+</sup>: 79,95±17,72%, CD83: 30,09±29,01%, CD86<sup>+</sup>: 69,4%±18,46 και MHCII<sup>+</sup>: 61,57±33,07%.

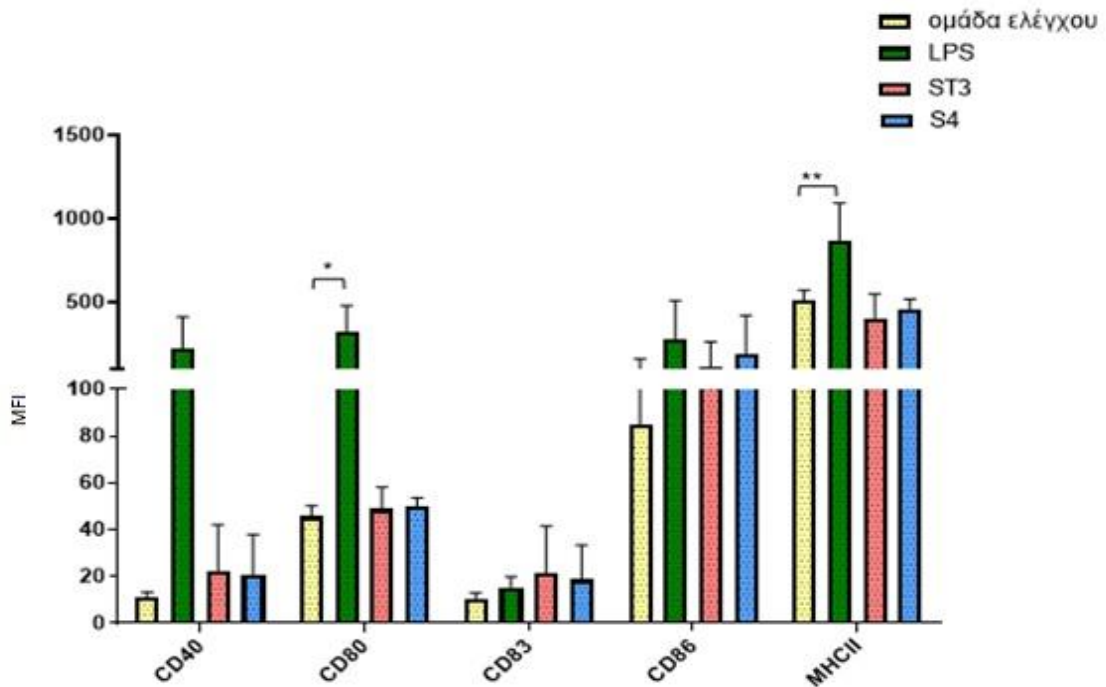
A)



B)



Γ)



**Εικόνα 4.4:** Δενδριτικά κύτταρα ποντικού καλλιεργήθηκαν παρουσία SNEDDSST3 και S4 για 24 ώρες, στους 37 °C, σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub>. Δενδριτικά κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσο και κύτταρα που επώαστηκαν με 1 µg/ml LPS αποτέλεσαν τον αρνητικό και θετικό μάρτυρας, αντίστοιχα. **A)** Αντιπροσωπευτικό ιστογράμμο (histogram plot), το οποίο απεικονίζει την επίδραση των νανοφορέων SNEDDS στην ωρίμανση των ΔΚ. Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική 3 πειραμάτων. **B)** Διάγραμμα που απεικονίζει το ποσοστό (%) των δενδριτικών κυττάρων που εκφράζουν τους δείκτες CD40, CD80, CD83, CD86 και MHC τάξης II. **Γ)** Διάγραμμα που απεικονίζει τη μέση ένταση φθορισμού (MFI) των δενδριτικών κυττάρων που εκφράζουν τους δείκτες CD40, CD80, CD83, CD86 και MHC τάξης II. Τα αποτελέσματα αντιστοιχούν στον μέσο όρο ± SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές συμβολίζονται με \* (P<0,05) ή \*\* (P<0,01).

Οι τιμές του δείκτη MFI για τις τρεις προαναφερθείσες ομάδες αναφέρονται παρακάτω. Τα επίπεδα του MFI στα δενδριτικά κύτταρα, τα οποία ήταν θετικά ως προς τα υπό μελέτη μόρια, που είχαν καλλιεργηθεί σε σκέτο θρεπτικό υλικό σε σύγκριση με τα δενδριτικά που είχαν καλλιεργηθεί παρουσία SNEDDSST3 και S4 ήταν: CD40<sup>+</sup>: 11,44±1,93 έναντι 22,55±19,58 και 20,9±16,97, CD80<sup>+</sup>: 45,67±4,56 έναντι 48,9±9,36 και 49,7±3,96, CD83: 10,53±2,49 έναντι 21,52±20 και 18,74±14,66, CD86<sup>+</sup>: 85±77,10 έναντι 117±148,11 και

194,65±229,60 και MHCII<sup>+</sup>: 515±59,43 έναντι 407,33±144,03 και 462,5±57,27 .Τέλος, τα ποσοστά των δενδριτικών κυττάρων που καλλιεργήθηκαν σε LPS και ήταν θετικά ως προς τα υπό μελέτη μόρια ήταν τα εξής: CD40<sup>+</sup>: 228,37±185,79, CD80<sup>+</sup>: 322,33±160,12, CD83: 15,43±4,50, CD86<sup>+</sup>: 284,97±227,56 και MHCII<sup>+</sup>: 869,33±224,81.

Συμπερασματικά, η επώαση των δενδριτικών κυττάρων με τους νανοφορείς SNEDDS δεν οδήγησε σε επαγωγή της ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων, ανεξάρτητα από την ενσωμάτωση της τουκοφερόλης.

### 4.2 *In vivo* μελέτη των νανοφορέων SNEDDS

#### 4.2.1 Μελέτη της οργανικής κατανομής των νανοφορέων

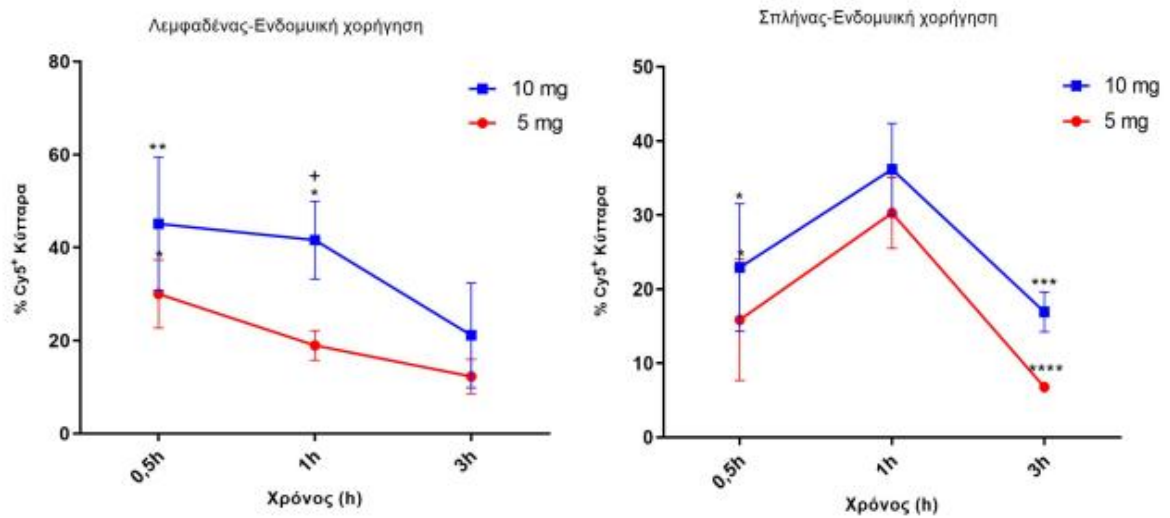
Επειδή σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν διερεύνηση της ικανότητας των νανοφορέων SNEDDS, να χρησιμοποιηθούν ως φορείς αντιγόνου για την ανάπτυξη εμβολίου έναντι της πειραματικής σπλαγγικής λεϊσμανίασης, ήταν σκόπιμο να προσδιοριστεί η οργανική κατανομή τους σε σχέση με την οδό χορήγησης, καθώς και η βέλτιστη οδός και δόση των χορηγήσεων. Για το λόγο αυτό έγινε μελέτη της οργανικής κατανομής των νανοφορέων SNEDDS σημασμένων με φθορίζουσα χρωστική.

##### 4.2.1.1 Οργανική κατανομή νανοφορέων SNEDDS

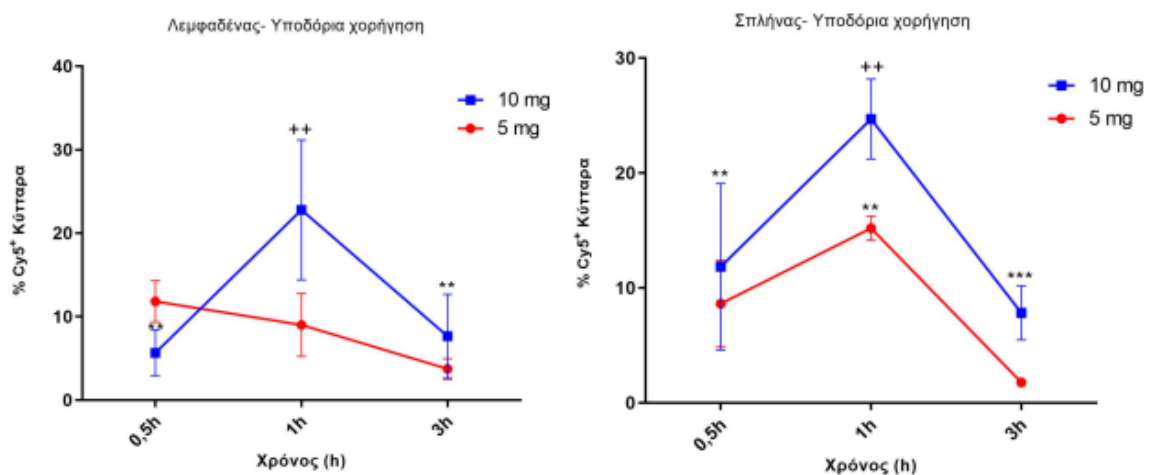
Για να προσδιοριστεί η οργανική κατανομή των νανοφορέων, χορηγήθηκαν ενδομυϊκά και υποδόρια, σε BALB/c ποντικούς, 5 ή 10 mg των νανοφορέων SNEDDS σημασμένων με Cy5 (SNEDDS-Cy5). Μετά από 30 λεπτά, 1 και 3 ώρες οι ποντικοί ευθανατώθηκαν και συλλέχθηκαν κατά την ενδομυϊκή χορήγηση (im) οι επιχώριοι λεμφαδένες (βουβωνικοί και οπισθογονατιαίοι) και ο σπλήνας και κατά την υποδόρια χορήγηση (sc) οι επιχώριοι μασχάλιοι λεμφαδένες και ο σπλήνας. Οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν και τα κυτταρικά ελαιώδη αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.5 A και B, οι νανοφορείς SNEDDS προσλαμβάνονται από τα λεμφικά όργανα, λεμφαδένες και σπλήνα, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση.

A)



B)



**Εικόνα 4.5: Οργανική κατανομή νανοφορέων SNEDDS. Σε ομάδες ποντικών BALB/c χορηγήθηκαν Α) ενδομυϊκά και Β) υποδόρια, 5 και 10 mg νανοφορέων SNEDDS και σε προκαθορισμένα χρονικά σημεία προσδιορίστηκε το ποσοστό (%) των Cy5<sup>+</sup> κυττάρων στους λεμφαδένες και στο σπλήνα με κυτταρομετρία ροής. Τα σημεία στα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο  $\pm$  SD από 4 ποντικούς για κάθε ομάδα. Οι στατιστικές σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων στο ίδιο χρονικό σημείο επισημαίνονται με\* (P<0,05), \*\* (P<0,01), \*\*\* (P<0,001) ή**



\*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ), ενώ οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο χρονικών σημείων επισημαίνονται με ++ ( $P < 0,01$ ).

### 4.2.1.2 Προσδιορισμός βέλτιστης δόσης χορήγησης

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (εικόνα 4.4 A, B), τόσο κατά την υποδόρια όσο και κατά την ενδομυϊκή χορήγηση, μεγαλύτερο ποσοστό των νανοφορέων SNEDDS προσελήφθη από τα λευκοκύτταρα τόσο των λεμφαδένων όσο και του σπλήνα, 1 ώρα μετά τη χορήγηση της μέγιστης δόσης (10 mg / ζώο).

Συγκεκριμένα το ποσοστό των θετικών κυττάρων στους λεμφαδένες 1 ώρα μετά την υποδόρια χορήγηση, ήταν: 5 mg:  $9,00 \pm 3,78\%$ , 10 mg:  $22,78 \pm 8,38\%$  και στο σπλήνα ήταν: 5 mg:  $15,19 \pm 1,05\%$ , 10 mg:  $24,69 \pm 3,47\%$ . Επίσης, το ποσοστό των θετικών κυττάρων στους λεμφαδένες 1 ώρα μετά την ενδομυϊκή χορήγηση, ήταν: 5 mg:  $18,94 \pm 3,2\%$ , 10 mg:  $41,6 \pm 0,38\%$  και στο σπλήνα ήταν: 5 mg:  $30,25 \pm 4,8\%$ , 10 mg:  $36,18 \pm 6,21\%$ .

### 4.2.1.3 Προσδιορισμός βέλτιστης οδού χορήγησης

Όπως αναφέρθηκε, χρησιμοποιήθηκαν 2 οδοί χορήγησης: 1) ενδομυϊκή και 2) υποδόρια. Από τα δεδομένα που προέκυψαν, φαίνεται πως μεγαλύτερο ποσοστό κυττάρων προσλαμβάνει τα SNEDDS μετά την ενδομυϊκή χορήγηση σε σύγκριση με την υποδόρια χορήγηση. Συγκεκριμένα, το ποσοστό των θετικών κυττάρων στους λεμφαδένες 30 λεπτά μετά την ενδομυϊκή χορήγηση, για τη συγκέντρωση 10 mg, ήταν  $45,14 \pm 14,37\%$ , ενώ μετά την υποδόρια χορήγηση ήταν  $9,2 \pm 8,7\%$ . Επίσης, παρατηρείται διαφορά και στο ποσοστό των θετικών κυττάρων στο σπλήνα, όπου 1 ώρα μετά την ενδομυϊκή χορήγηση για τη συγκέντρωση 5mg, ήταν  $30,26 \pm 4,8\%$ , ενώ κατά την υποδόρια χορήγηση ήταν  $15,19 \pm 1,05\%$ .

Συμπερασματικά, παρατηρούμε ότι οι νανοφορείς SNEDDS προσλαμβάνονται από τους λεμφαδένες και το σπλήνα και πως η βέλτιστη ποσότητα χορήγησης είναι αυτή των 10 mg. Επίσης η μέγιστη πρόσληψη γίνεται μετά από 1 ώρα και στις δύο χορηγήσεις. Τέλος, η ενδομυϊκή χορήγηση φαίνεται πως είναι πιο αποτελεσματική για την πρόσληψη των νανοφορέων.

### 4.3 Μελέτη αντιγονικότητας πεπτιδίων του παρασίτου *Leishmania*

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, εκτός από τη μελέτη των ιδιοτήτων των νανοφορέων SNEDDS, εξετάστηκε και η αντιγονικότητα 3 πεπτιδίων, από αντίστοιχες πρωτεΐνες του παρασίτου. Για το σχεδιασμό των πεπτιδίων αυτών προσδιορίστηκαν, σε τρέχουσα μελέτη του Εργαστηρίου Ανοσολογίας Λομώξεων του ΕΙΠ, με *insilico* ανάλυση αντιγονικές πρωτεΐνες του παρασίτου και ακολούθως επίτοποι που να αναγνωρίζονται από μόρια MHC I και MHC II. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα σχεδιάστηκαν τα τρία πεπτίδια (pt1, pt2 και pt3), τα οποία μελετώνται και στην παρούσα εργασία. Το πρωτόκολλο των ανοσοποιήσεων αναγράφεται στη παράγραφο 3.4.1. Συγκεκριμένα εμβολιάστηκαν (ενδομυϊκά) 2 φορές, ομάδες ποντικών BALB/c, με ενδιάμεσο διάστημα 15 ημερών, με μείγμα των πεπτιδίων σε συνδυασμό με το ανοσοενισχυτικό Addavax. Στα πλαίσια των πειραμάτων αυτών εξετάστηκε εάν εγείρεται κυτταρική και χυμική ανοσία έναντι των πεπτιδίων

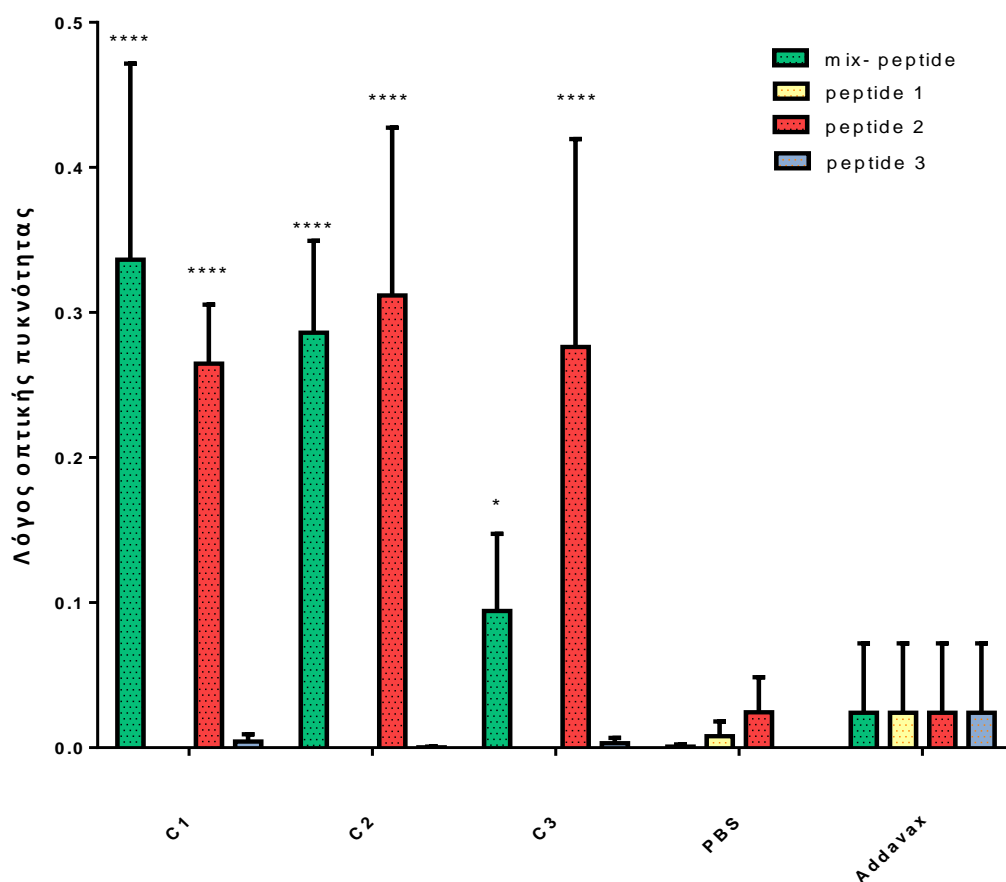
#### 4.3.1 Μελέτη χυμικών αποκρίσεων στους εμβολιασμένους ποντικούς

Πρώτο βήμα ήταν η μελέτη του χυμικού σκέλους της ανοσολογικής απόκρισης, όπου προσδιορίστηκαν τα ολικά IgG αντισώματα που αναπτύχθηκαν στον ορό των ποντικών έναντι του μείγματος των πεπτιδίων pt1, pt2 και pt3 καθώς και του κάθε πεπτιδίου ξεχωριστά. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι στους ποντικούς που εμβολιάστηκαν και με τις τρεις συγκεντρώσεις του μείγματος των πεπτιδίων ανιχνεύθηκαν ειδικά αντισώματα IgG έναντι του μείγματος των πεπτιδίων αφού η παραγωγή των αντισωμάτων ήταν στατιστικά σημαντική σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (PBS). Συγκεκριμένα για το μείγμα πεπτιδίων, οι τιμές OD ήταν: C1:  $0,336 \pm 0,135$  vs PBS:  $0 \pm 0,012$ , C2:  $0,286 \pm 0,063$  vs PBS:  $0 \pm 0,012$  και C3:  $0,165 \pm 0,104$  vs PBS:  $0 \pm 0,012$ . Μελετώντας την παραγωγή αντισωμάτων IgG έναντι του κάθε πεπτιδίου ξεχωριστά διαπιστώσαμε ότι αυτή οφείλονταν αποκλειστικά στο πεπτίδιο 2 (C1: :  $0,265 \pm 0,041$  vs PBS:  $0,013 \pm 0,054$ , C2:  $0,312 \pm 0,116$  vs PBS:  $0,013 \pm 0,054$  και C3:  $0,276 \pm 0,143$ ) ( $p$ -Value < 0,0001). Επίσης, όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα τα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι του μείγματος δεν

## 4. Αποτελέσματα

εξαρτώνται από τη συγκέντρωση των πεπτιδίων με την οποία εμβολιάστηκαν οι ποντικοί (C1=10μg, C2=5μg και C3=2μg). Τέλος, η τιμές που πήραμε μετά την προσθήκη ορού που προέρχονταν από τα ποντίκια που εμβολιάστηκαν μόνο με το ανοσοενισχυτικό Addavax ήταν:  $0,019 \pm 0,052$ . Αξίζει να σημειωθεί, ότι μετά από μελέτη των οπτικών απορροφήσεων, επιλέξαμε τις οπτικές απορροφήσεις στην αραιώση 1/819200, επειδή είναι στο γραμμικό κομμάτι της καμπύλης.

Τα παραπάνω δεδομένα, υποδηλώνουν ό,τι το πεπτίδιο 2 είναι αυτό που εμφανίζει αντιγονικότητα και έναντι αυτού αναπτύσσονται τα αντισώματα IgG.



**Εικόνα 4.6:** Παραγωγή ολικών αντισωμάτων IgG από ποντικούς εμβολιασμένους με πεπτίδια του παρασίτου *Leishmania*. Ομάδες ποντικών εμβολιάστηκαν 2 φορές (ενδομυϊκά) με ενδιάμεσο διάστημα 15 ημερών, με μείγμα πεπτιδίων σε συνδυασμό με το ανοσοενισχυτικό Addavax. Ποντίκια που εμβολιάστηκαν με PBS ή Addavax χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα αρνητικού ελέγχου. 15 ημέρες μετά από το δεύτερο εμβολιασμό προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των ολικών IgG αντισωμάτων στον

ορό του αίματος με τη χρήση ELISA. Στα διαγράμματα απεικονίζεται ο μέσος όρος  $\pm$  SD από πέντε ποντικούς για κάθε ομάδα. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων συμβολίζονται με\* ( $P<0,05$ ) ή \*\*\*\* ( $p<0,0001$ ).

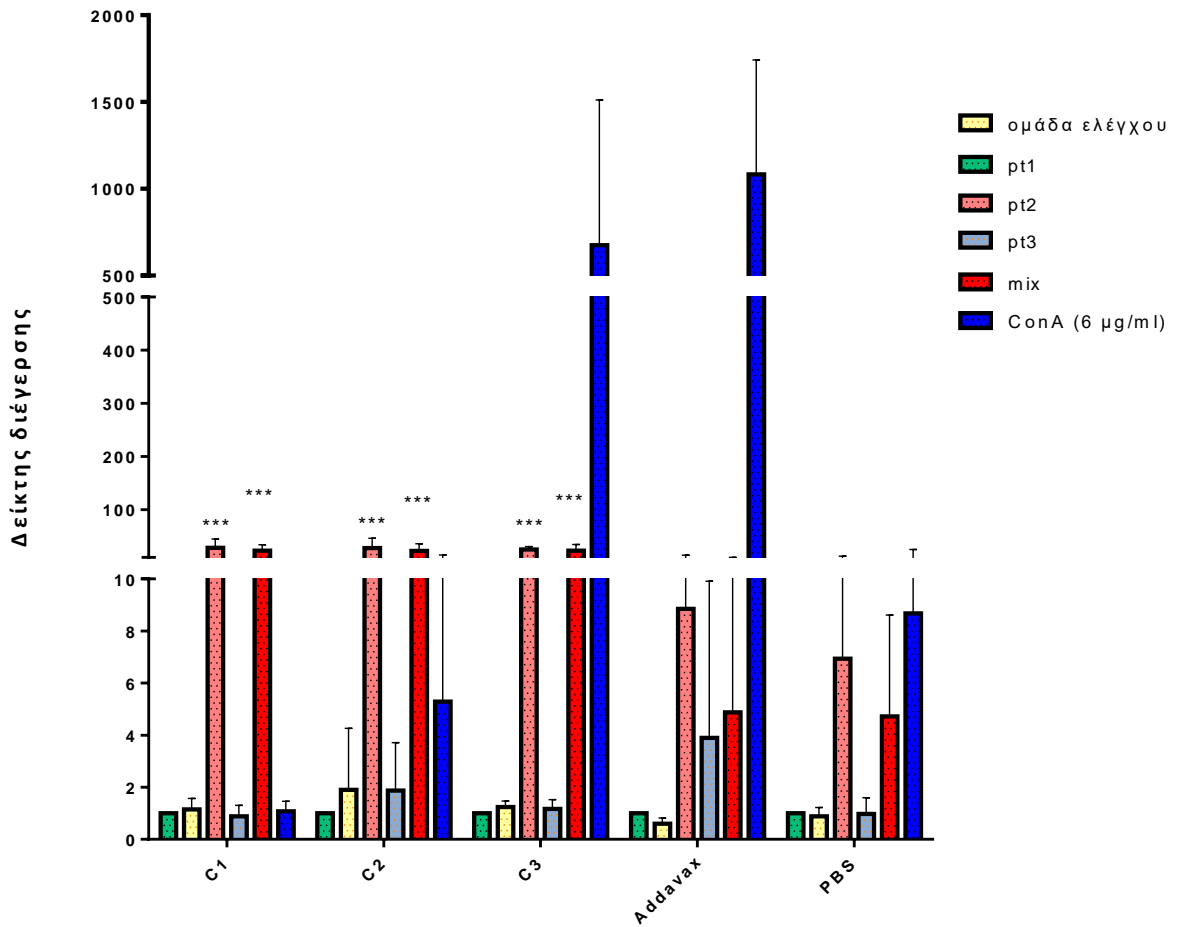
### 4.3.2 Μελέτη κυτταρομεσολαβητικών αποκρίσεων στους εμβολιασμένους ποντικούς

Προκειμένου να αξιολογηθεί η ικανότητα των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, που εκτέθηκαν στο μείγμα των πεπτιδίων του παρασίτου, να επάγουν πολλαπλασιασμό λεμφοκυτταρικών πληθυσμών, απομονώθηκαν κύτταρα από σπλήνα των BALB/c ποντικών που εμβολιάστηκαν με 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις μείγματος των πεπτιδίων (παράγραφος 3.4.2). Ως αρνητικός μάρτυρας ελέγχου χρησιμοποιήθηκε δείγμα κυττάρων σπλήνα, τα οποία επώαστηκαν με σκέτο θρεπτικό υλικό, ενώ ως θετικός μάρτυρας ελέγχου χρησιμοποιήθηκε δείγμα κυττάρων σπλήνα τα οποία ενεργοποιήθηκαν με το μιτογόνο των T κυττάρων ConA σε συγκέντρωση 6  $\mu\text{g/ml}$ . Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως  $SI \pm SD$  (Δείκτης διέγερσης/ Δείκτης διέγερσης ομάδας ελέγχου).

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι τα κύτταρα που διεγέρθηκαν με το μείγμα των πεπτιδίων, προκάλεσαν λεμφοκυτταρικό πολλαπλασιασμό στατιστικά σημαντικά υψηλότερο σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (med). Συγκεκριμένα για το μείγμα πεπτιδίων, οι τιμές SI ήταν: C1:  $22,7 \pm 11,5$  vs med:  $1 \pm 0$ , C2:  $22,5 \pm 13,3$  vs med:  $1 \pm 0$  και C3:  $19,7 \pm 13,6$  vs med:  $1 \pm 0$ . Μελετώντας το λεμφοκυτταρικό πολλαπλασιασμό που προκαλείται μετά τη διέγερση με το κάθε πεπτίδιο ξεχωριστά, διαπιστώσαμε ότι αυτός οφείλονταν αποκλειστικά στο πεπτίδιο 2 (C1:  $28,2 \pm 17,7$  vs med:  $1 \pm 0$ , C2:  $27,6 \pm 18,6$  vs med:  $1 \pm 0$  και C3:  $22,0 \pm 10,1$  vs med:  $1 \pm 0$ ) (εικόνα 4.7).

Τέλος, παρατηρούμε ότι στα κύτταρα των ποντικών που εμβολιάστηκαν με PBS, δεν προκλήθηκε λεμφοκυτταρικός πολλαπλασιασμός μετά τη διέγερση με το μείγμα πεπτιδίων ή το κάθε πεπτίδιο ξεχωριστά ( SI για pt1:  $0,9 \pm 0,1$ , pt2:  $7 \pm 5,5$ , pt3:  $1 \pm 0,6$  και mix:  $4,7 \pm 3,9$ ).

Τα παραπάνω δεδομένα, υποδηλώνουν ότι το πεπτίδιο 2 είναι αυτό που προκαλεί το λεμφοκυτταρικό πολλαπλασιασμό.



**Εικόνα 4.7:** Επαγωγή λεμφοκυτταρικού πολλαπλασιασμού κυττάρων σπλήνα BALB/c ποντικών ευαισθητοποιημένα με τα πεπτίδια 1, 2 και 3 και το μείγμα αυτών. Ομάδες ποντικών εμβολιάστηκαν 2 φορές (ενδομυϊκά) με ενδιάμεσο διάστημα 15 ημερών, με μείγμα πεπτιδίων σε συνδυασμό με το ανοσοενισχυτικό Addavax. Οι ποντικοί που εμβολιάστηκαν με PBS ή Addavax χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα αρνητικού ελέγχου. 15 ημέρες μετά από το δεύτερο εμβολιασμό, απομονώθηκαν κύτταρα από σπλήνα των BALB/c ποντικών που εμβολιάσαμε. Τα κύτταρα στη συνέχεια διαγέρθηκαν με το πεπτίδιο 1, το πεπτίδιο 2, το πεπτίδιο 3, μείγμα των παραπάνω πεπτιδίων, κονκαβαλίνη A και με σκέτο θρεπτικό υλικό. Ως αρνητικός μάρτυρας ελέγχου χρησιμοποιήθηκε δείγμα κυττάρων σπλήνα, τα οποία επώαστηκαν με σκέτο θρεπτικό υλικό, ενώ ως θετικός μάρτυρας ελέγχου χρησιμοποιήθηκε δείγμα κυττάρων σπλήνα τα οποία ενεργοποιήθηκαν με το μιτογόνο των T κυττάρων ConA σε συγκέντρωση 6 µg/ml. Ο λεμφοκυτταρικός πολλαπλασιασμός προσδιορίστηκε από το βαθμό πρόσληψης 3 [H]-TdR, 18 ώρες πριν τον τερματισμό της καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε  $SI \pm SD$  και οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές επισημαίνονται με \*\*\* ( $P < 0,001$ ).

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η σπλαχνική λειψμανίαση (VL), είναι μια από τις πιο θανατηφόρες παρασιτικές ασθένειες στον κόσμο, που προκαλεί περισσότερους από 50.000 θανάτους ανθρώπων κάθε χρόνο και πλήττει εκατομμύρια ανθρώπους σε όλη τη Νότια Αμερική, την Ανατολική Αφρική, τη Νότια Ασία και τη Μεσόγειο (Bik. et al., 2018). Το 2015, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας ταξινόμησε τη VL ως μια παραμελημένη τροπική ασθένεια (Neglected tropical disease, NTD). Για τη θεραπεία αυτής της ασθένειας, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως η χημειοθεραπεία, ωστόσο έχουν παρατηρηθεί προβλήματα που σχετίζονται με την ανάπτυξη αντοχής στα παράσιτα και παρενέργειες που σχετίζονται με τις χημικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Επομένως, η ανάπτυξη εμβολίων για την πρόληψη της VL είναι ένα εφικτό και επιθυμητό μέτρο για τον έλεγχο της νόσου. Πρόσφατα έχουν διατεθεί στην αγορά εμβόλια για την προστασία των σκύλων, τα οποία βασίζονται στον συνδυασμό κλασμάτων παρασίτων ή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με ανοσοενισχυτικά που μπορούν να προκαλέσουν κυτταρικές ανοσοαποκρίσεις. Ωστόσο, η μερική αποτελεσματικότητά τους και η απουσία εμβολίου για την προστασία από την ανθρώπινη λειψμανίαση υπογραμμίζουν την ανάγκη ανάπτυξης νέων υποψηφίων εμβολίων (Duarte M. C. et al., 2016). Η ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού εμβολίου βασίζεται στην επιλογή του κατάλληλου αντιγόνου και του σωστού φορέα χορήγησης.

Η νανοτεχνολογία έχει αναδειχθεί ως μια ελκυστική λύση λόγω της βελτιωμένης βιοδιαθεσιμότητας και της χαμηλότερης τοξικότητας των προϊόντων της, ενώ η χρήση σκευασμάτων που βασίζονται στη νανοτεχνολογία για τη θεραπεία της λειψμανίασης έχει δείξει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα (Gutiérrez V. et al., 2016). Αρκετοί τύποι νανοσχηματισμών, όπως τα λιποσώματα, τα πολυμερή και οι νανοσφαίρες έχουν αποδειχθεί ότι είναι πολύ σημαντικά για τη διανομή φαρμάκων ως νανο-φορείς. Ως ιδανικά συστήματα χορήγησης εμβολίων, έχουν αναδειχθεί τα πολυμερή σκευάσματα μικρο- και νανοσωματιδίων. Συγκεκριμένα, τα βιοαποικοδομήσιμα νανοσωματίδια PLGA λόγω της βιοσυμβατότητάς τους έχουν ήδη εγκριθεί από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) και τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (EMA), έχουν αποδειχθεί ως σημαντικοί φορείς φαρμάκων (Danhier F. et al., 2012). Μελέτες έχουν δείξει ότι αυτά τα συστήματα διανομής νανο-μεγέθους μπορούν να προκαλέσουν τόσο χυμικές όσο και

κυτταρικές μεσολαβούμενες ειδικές ανοσοαποκρίσεις μέσω ενεργοποίησης δενδρικών κυττάρων σε ζώα σε συνδυασμό με παρασιτικά μόρια (Moon J. J. et al., 2012, Margaroni M. et al., 2017).

Στη παρούσα διπλωματική εργασία, εξετάστηκε αν οι νανοφορείς SNEDDS μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς αντιγόνου, για τη παρασκευή εμβολίου έναντι της VL. Τα SNEDDS, που αποτελούν σκευάσματα με βάση τα λιπίδια, θεωρούνται ως πολλά υποσχόμενη τεχνολογία για τη βελτίωση του ρυθμού και της έκτασης της απορρόφησης ασθενώς υδατοδιαλυτών φαρμάκων (Singh S. K. et al., 2010, Hong J. Y. et al., 2006). Τα συστήματα αυτά, είναι ισοτροπικά μείγματα φαρμάκων, λιπιδίων και επιφανειοδραστικών, συνήθως με έναν ή περισσότερους υδρόφιλους συνδιαλύτες ή συν-γαλακτωματοποιητές που σχηματίζουν λεπτό λάδι σε νανογαλακτώματα νερού μετά από ήπια ανάδευση σε υδατικό μέσο με μεγέθη σταγονιδίων που κυμαίνονται από 20 έως 200 nm (Mou D. et al., 2008, Porter C. H. J. et al., 2008). Στο περιβάλλον της γαστρεντερικής οδού τα συστήματα αυτά γαλακτωματοποιούνται αυθόρμητα (Nazzari S. et al., 2002, Devani M. et al., 2004, Patel A. R. and Vania P. R., 2007). Μπορούν να βελτιώσουν τη βιοδιαθεσιμότητα όταν χορηγούνται από το στόμα με την αύξηση της διαλυτοποίησης του φαρμάκου (το υδατοδιαλυτό φάρμακο διαλύεται συνήθως στη φάση του ελαίου), ενισχύοντας τη διείσδυση κατά μήκος της εντερικής μεμβράνης μέσω μιας ευρείας κατανομής στο GIT (Wang Z. et al., 2010, Ke W. T. et al., 2005, Villar A. M. S. et al., 2012).

Παράλληλα εξετάστηκε η αντιγονικότητα τριών πεπτιδίων του παρασίτου *Leishmania*. Για το σχεδιασμό των πεπτιδίων αυτών προσδιορίστηκαν, σε τρέχουσα μελέτη του Εργαστηρίου Ανοσολογίας Λομώξεων του ΕΙΠ, με *insilico* ανάλυση αντιγονικές πρωτεΐνες του παρασίτου και ακολούθως επίτοποι που να αναγνωρίζονται από μόρια MHC I και MHC II. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού εμβολίου βασίζεται στην επιλογή του κατάλληλου αντιγόνου και του σωστού φορέα χορήγησης. Τα τελευταία χρόνια η γονιδιωματική, η πρωτεομική και η ανάλυση μεταγράφων αποτελούν ένα σημαντικό εργαλείο για την ανακάλυψη υποψήφιων εμβολίων και το σχεδιασμό αντιγόνων. Τα εργαλεία αυτά σε συνδυασμό με τεχνολογίες υψηλής απόδοσης της βιοπληροφορικής, προσφέρουν γόνιμο έδαφος για το σχεδιασμό εμβολίων που βασίζονται σε πεπτίδια (peptide-based vaccines), δηλαδή εμβολίων που περιλαμβάνουν μόνο το πεπτιδικό τμήμα κυρίως μίας

πρωτεΐνης βακτηριακής, ιικής ή παρασιτικής προέλευσης, ικανό για την ενεργοποίηση κατάλληλης ανοσολογικής απόκρισης (Purcell A. W. et al., 2007).

### 5.1 Δράση νανοφορέων SNEDDS *in vitro*

#### 5.1.1 Κυτταροτοξικότητα νανοφορέων SNEDDS

Με το ραγδαία αυξανόμενο ενδιαφέρον για την έρευνα νανοσωματιδίων, η τοξικότητα των νανοσωματιδίων γίνεται όλο και πιο σημαντικό ζήτημα στη νανοτεχνολογία. Αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει την τοξικότητα των νανοσωματιδίων με βάση διάφορα χαρακτηριστικά, όπως σχήμα, μέγεθος, επιφανειακή χημεία, χημική σύνθεση, επιφανειακή δραστηριότητα και διαλυτότητα. Επομένως, είναι αντιληπτό πως, καθώς τα διαφορετικά νανοσωματίδια μπορούν να προκαλέσουν διακριτικές βιολογικές αποκρίσεις, είναι σημαντικό να διεξάγονται μελέτες κυτταροτοξικότητας για κάθε τύπο νανοσωματιδίων (Kong B. et al., 2011). Για το λόγο αυτό, το πρώτο βήμα για τη διερεύνηση της ικανότητας των νανοφορέων SNEDDS να χρησιμοποιηθούν ως φορείς αντιγόνου για την ανάπτυξη εμβολίου έναντι της πειραματικής σπλαγχνικής λεισμανίασης, ήταν ο έλεγχος της κυτταροτοξικότητας τους.

Με τη βοήθεια της μεθόδου MTT, αποδείξαμε πως τα νανοσωματίδια SNEDDS σε συγκεντρώσεις  $\leq 100$   $\mu\text{g}/\text{ml}$  δεν είναι τοξικά για τα μακροφάγα κυτταρικής σειράς J774A.1. Τα αποτελέσματα αυτά, επιβεβαιώνουν προηγούμενα ευρήματα που υποστηρίζουν ότι τα νανοσωματίδια SNEDDS είναι ασφαλή. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους Karamanidou T. et al, φάνηκε πως τα SNEDDS, μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ασφάλεια μόνο μέχρι τη συγκέντρωση 0,25  $\text{mg}/\text{ml}$ , έναντι των κυττάρων Caco-2 (Karamanidou T. et al., 2015). Επίσης έχει αποδειχθεί ότι όσο υψηλότερη είναι η αναλογία αραίωσης των συνθέσεων SNEDDS, τόσο καλύτερη ήταν η βιωσιμότητα των κυττάρων της κυτταρικής σειράς Caco-2 (Kalantari A. et al., 2017).



### 5.1.2 Πρόσληψη των νανοφορέων

Έχει ήδη αποδειχθεί ότι οι διαφορετικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων, όπως το μέγεθος, το σχήμα, το υλικό και η επιφανειακή επικάλυψη, καθώς και ο τύπος κυττάρου, η αλληλεπίδραση με άλλα κύτταρα και το κυτταρικό περιβάλλον, επηρεάζουν τη πρόσληψη τους (Kuhn D. A. et al., 2014).

Τα περισσότερα νανοσωματίδια προσλαμβάνονται άμεσα από τα δενδριτικά κύτταρα, τα μονοκύτταρα αίματος και τα μακροφάγα που ζουν στο ήπαρ, στο σπλήνα και τους λεμφαδένες. Τα κύτταρα αυτά είναι υπεύθυνα για τον καθαρισμό, την επεξεργασία και την αποικοδόμηση ξένων υλικών από την κυκλοφορία (Walkey C. D., et al., 2012). Διάφορες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί και αποδεικνύουν πως τα διάφορα νανοσωματίδια προσλαμβάνονται τα δενδριτικά κύτταρα. Συγκεκριμένα σύμφωνα με τους Margaroni et al, τα νανοσωματίδια PLGA προσλαμβάνονταν αποτελεσματικά από τα δενδριτικά κύτταρα με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Margaroni M. et al., 2016). Παρόμοια αποτελέσματα είχε και η έρευνα των Fernández et. al, καθώς φάνηκε πως τα νανοσωματίδια χρυσού προσλαμβάνονται από τα δενδριτικά κύτταρα με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Fernández T. B. et al., 2015).

Γενικά, η πρόσληψη των νανοσωματιδίων από τα δενδριτικά κύτταρα είναι αρκετά σημαντική, καθώς αποτελούν τα πιο αποτελεσματικά κύτταρα παρουσίασης αντιγόνου, που είναι ικανά να ξεκινήσουν και να ενισχύσουν προσαρμοστικές ανοσολογικές αποκρίσεις (Bandyopadhyay A. et al., 2011).

Στη παρούσα διπλωματική εργασία, δείξαμε ότι τα νανοσωματίδια SNEDDS, μεγέθους  $27.31 \pm 0.70$  nm προσλαμβάνονται τόσο από τα δενδριτικά όσο και από τα μακροφάγα ήδη από τις 4 ώρες και το ποσοστό των κυττάρων που τα προσλαμβάνει δε διαφοροποιείται στις 12 ώρες για την ίδια συγκέντρωση (100 µg/ml, 50 µg/ml και 25 µg/ml). Στην περίπτωση των δενδριτικών κυττάρων, παρατηρείται μείωση της ποσότητας των SNEDDs που προσλαμβάνουν τα κύτταρα στις 12 ώρες, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα κύτταρα ξεκίνησαν να τα καταβολίζουν.

Τα παραπάνω αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με τα ευρήματα του Mahmood και των συνεργατών του, όπου μελέτησαν την αποτελεσματικότητα πρόσληψης των SNEDDS, από κύτταρα Caco-2, ποιοτικά με συνεστιακή μικροσκοπία. Συγκεκριμένα εντοπίστηκαν

νανοσωματίδια SNEDDS στην περιφέρεια των πυρήνων των κυττάρων σε αυξανόμενη ένταση καθώς ο χρόνος επώασης με αυτά αυξάνονταν (Mahmood A. et al., 2016).

### 5.1.3. Επίδραση των νανοφορέων SNEDDS στην ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων

Τα δενδριτικά κύτταρα (DC) είναι κύρια επαγγελματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, που προέρχονται από το μυελό των οστών και ωριμάζουν στα περιφερειακά λεμφικά όργανα. Η ωρίμανση των DC προκαλείται από την πρόσληψη παθογόνου και χαρακτηρίζεται από μορφολογικές αλλαγές, την έκφραση συνδιεγερτικών μορίων και την απελευθέρωση κυτταροκινών. Λόγω του κεντρικού ρόλου τους στην προσαρμοστική ανοσία, τις τελευταίες δεκαετίες, τα DC έχουν μελετηθεί εκτενώς προς τον στόχο της ανάπτυξης εμβολίων (Jia J. et al., 2018).

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, μελετήσαμε την ικανότητα των νανοσωματιδίων SNEDDS να προκαλούν ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, η πρόσληψη από τα δενδριτικά κύτταρα κενών νανοσωματιδίων PLGA δεν προκάλεσε αλλαγές στην ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων ποντικού (Hamdy S. et al., 2007, Ma W. et al., 2011). Επίσης, ορισμένες άλλες μελέτες έδειξαν επίσης έλλειψη ωρίμανσης δενδριτικών κυττάρων μετά την πρόσληψη σε ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα, νανοσωματιδίων χρυσού (Brandenberger C. et al., 2010, Arosio D. et al., 2014). Σχετικά με τα νανοσωματίδια SNEDDS, δείξαμε πως δεν επάγουν την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων. Ως εκ τούτου, αποτελεσματική κυτταρική πρόσληψη των νανοσωματιδίων, δεν οδηγούν απαραίτητα στην επαγωγή ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων. Για τη μελέτη, ωστόσο της αποτελεσματικότητας των SNEDDS ως φορέων αντιγόνου είναι σκόπιμο να μελετηθεί και η επίδραση στην ωρίμανση SNEDDS που φέρουν ενσωματωμένα τα υπό μελέτη πεπτίδια.

### 5.2. Δράση νανοφορέων SNEDDS *in vivo*

Τα παραπάνω δεδομένα καταδεικνύουν την ικανότητα των SNEDDS να χρησιμοποιηθούν ως φορείς αντιγόνου, καθώς προσλαμβάνονται *in vitro* από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα

και δεν είναι τοξικά για τα μακροφάγα σε συγκεντρώσεις  $\leq 100$   $\mu\text{g/ml}$ . Έχοντας υπόψη αυτά τα δεδομένα κρίθηκε ότι θα ήταν ενδιαφέρουσα η μελέτη των νανοφορέων SNEDDS *in vivo*.

### 5.2.1. Οργανική κατανομή και κυτταρική πρόσληψη νανοφορέων SNEDDS

Μια σημαντική παράμετρος της μελέτης νανοσωματιδίων, που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν ως φορείς φαρμάκων ή εμβολίων, είναι η εντόπιση τους νανοφορέων στους διάφορους ιστούς. Η κατανομή των νανοφορέων εξαρτάται από παράγοντες όπως η οδός χορήγησης, αλλά και από χαρακτηριστικά των ίδιων των νανοσωματιδίων, όπως το μέγεθος και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά.

Στο πλαίσιο της παρούσας δπλωματικής εργασίας, έγινε υποδόρια και ενδομυϊκή χορήγηση των νανοφορέων SNEDDS σε ποντικούς της φυλής BALB/c. Όπως διαπιστώθηκε, ήδη μετά από 30 λεπτά της χορήγησης, τα νανοσωματίδια εντοπίστηκαν στα λεμφικά όργανα, σπλήνα και λεμφαδένες, με τρόπο εξαρτώμενο από τη δόση. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε μεγαλύτερη πρόσληψη, όταν χορηγήθηκε συγκέντρωση νανοσωματιδίων 10mg. Παράλληλα φάνηκε, πως η ποιο αποτελεσματική οδός χορήγησης ήταν η ενδομυϊκή, καθώς παρατηρήθηκε ότι μεγαλύτερο ποσοστό κυττάρων προσλαμβάνει τα SNEDDS, τόσο στο σπλήνα όσο και στους λεμφαδένες.

Παρόμοια μελέτη, έχει δείξει πως τα νανοσωματίδια SNEDDS, μετά τη χορήγηση τους από το στόμα, μπορούν να απορροφηθούν από το γαστρεντερικό επιθήλιο και έπειτα να φθάσουν στο γαστρεντερικό βλεννογόνο όπου και απορροφώνται (de Lima L. L. et al., 2018). Παράλληλα άλλες μελέτες, που έχουν ασχοληθεί με διαφορετικό τύπο νανοσωματιδίων, τα PLGA, έχουν αποδείξει πως τα νανοσωματίδια αυτά, μετά από ενδοφλέβια χορήγηση εντοπίζονται σε διάφορους ιστούς, όπως στο αίμα, το ήπαρ και τον σπλήνα, στους πνεύμονες, τους μυς, τα οστά, ενώ ανιχνεύονται και στα ούρα (Panagi Z. et al., 2001).

### 5.3 Μελέτη αντιγονικότητας πεπτιδίων του παρασίτου *Leishmania*

Ένα εμβόλιο κατά του παρασίτου *Leishmania* είναι αναγκαίο, διότι σε αντίθεση με το πλασμώδιο και άλλα παράσιτα, το παράσιτο *Leishmania* σπάνια αλλάζει το αντιγονικό του

φορτίο και οι μολύνσεις από *Leishmania* προκαλούν δια βίου ανοσία με εκτεταμένη διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ διαφορετικών ειδών *Leishmania*. Επομένως, ένα μόνο εμβόλιο μπορεί να είναι δυνητικά αποτελεσματικό έναντι πολλών μορφών του παρασίτου (Khalil E. A. G., 2018).

Μέχρι σήμερα, διάφορα εμβόλια έχουν αξιολογηθεί έναντι του VL κυρίως σε μοντέλα ποντικών και / ή σκύλων (Ribeiro P. A. F. et al., 2019). Μεταξύ αυτών των διαφορετικών προσεγγίσεων εμβολίων, τα εμβόλια με βάση ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες έχουν αρκετά σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως σταθερότητα, χαμηλό κόστος και τυποποιημένη παραγωγή και της αποδεδειγμένης ανοσογονικότητάς τους (Garde E. et al., 2018).

Πρόσφατες μελέτες, έδειξαν ότι η ανοσοποίηση με ανασυνδυασμένες γνωστές και υποθετικές πρωτεΐνες *Leishmania*, προστάτευε τους ποντικούς έναντι μόλυνσης από *L. infantum* (Martins V. T. et al., 2013, Lage D. P. et al., 2015). Συγκεκριμένα στα πλαίσια της ερευνητικής μελέτης των Martinset al, ποντικοί BALB/c εμβολιάστηκαν υποδορίως με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη LiHyr1, με ανοσοενισχυτικό ή μόνο με PBS. Τα δεδομένα της μελέτης αυτής, έδειξαν ότι η πρωτεΐνη LiHyr1, είναι αντιγονική στο CVL, και επίσης πρόσφερε προστασία σε ποντίκια BALB/c έναντι του *L. infantum*. Η προστασία συσχετίστηκε με την απόκριση CD4<sup>+</sup> T κυττάρων που χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα IFN- $\gamma$ , IL-12 και GM-CSF και χαμηλά επίπεδα IL-4 και IL-10. Παρόμοια αποτελέσματα είχε και η έρευνα των Lageet al., οι οποίοι χρησιμοποίησαν την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη ChimeraT, την οποία κατασκεύασαν χρησιμοποιώντας επιλεγμένους επιτόπους CD4 + και CD8 + T κυττάρων από τις αλληλουχίες αμινοξέων των πρωτεϊνών PHB, EIF5a, LiHyr1 και LiHyr2. Τα ποντίκια BALB/c ανοσοποιήθηκαν με ChimeraT μαζί με ανοσοενισχυτικό σαπωνίνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η διέγερση με χρήση του ChimeraT προκάλεσε υψηλές λεμφοπλασματοκυτταρικές αποκρίσεις καθώς επίσης προκάλεσε παραγωγή σημαντικά υψηλότερων επιπέδων ομόλογης πρωτεΐνης IgG2a (Lage D. P. et al., 2020).

Εμείς, στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, εξετάσαμε την αντιγονικότητα 3 πεπτιδίων από πρωτεΐνες του παρασίτου, που μετά από *in silico* προσέγγιση, επιλέχθηκαν ώστε να αναγνωρίζονται από MHC I και MHC II μόρια του ποντικού. Για το σκοπό αυτό, ανοσοποιήσαμε ποντικούς BALB/c (ενδομυϊκά) 2 φορές, με ενδιάμεσο διάστημα 15 ημερών, με μείγμα των πεπτιδίων σε συνδυασμό με το ανοσοενισχυτικό Addavax.

Η χρήση των ανοσοενισχυτικών, συμβάλει στην αύξηση του μεγέθους της προσαρμοστικής απόκρισης σε ένα εμβόλιο καθώς και στη καθοδήγηση του τύπου της προσαρμοστικής

απόκρισης για την παραγωγή των πιο αποτελεσματικών μορφών ανοσίας για κάθε συγκεκριμένο παθογόνο (Coffman R. L. et al., 2010). Τα τελευταία χρόνια, νέα ανοσοενισχυτικά που βασίζονται σε γαλάκτωμα σκουαλενίου ανοίγουν τη δυνατότητα ανάπτυξης νέων εμβολίων (O'Hagan D. T. et al., 2013). Συγκεκριμένα οι Kim et al., δείξαν ότι τα ανοσοενισχυτικά εμβολίου με βάση το γαλάκτωμα σκουαλενίου προκαλούν ενεργοποίηση CD8<sup>+</sup> T κυττάρων και αποκρίσεις αντισωμάτων (Kim E. H. et al., 2020). Στη κατηγορία αυτή, ανήκει το ανοσοενισχυτικό Addavax, του οποίου η χρήση μπορεί να ενισχύσει την προστασία σε ορισμένα εμβόλια (Goff P. H. et al., 2013). Αυτός ο τύπος ανοσοενισχυτικού έχει χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση τόσο των αποκρίσεων Th1 όσο και Th2 (de Matos Guedes H. et al., 2007). Οι Agallou et al., σε πρόσφατη μελέτη τους έδειξαν ότι ποντίκια που εμβολιάστηκαν με LiChimera ανέπτυξαν αντιγόνο-ειδικές κυτταρικές και χυμικές ανοσοαποκρίσεις, οι οποίες ενισχύθηκαν σημαντικά όταν δόθηκε LiChimera μαζί με το εμπορικό ανάλογο γαλακτώματος ελαίου σε νερό, Addavax. Το κύριο αποτέλεσμα αυτού του γαλακτώματος ήταν η αποτελεσματική στρατολόγηση APCs στο σημείο της ένεσης ακολουθούμενη από τη μετανάστευσή τους στους λεμφαδένες για παρουσίαση αντιγόνων στα CD4 + T κύτταρα (Agallou M. et al., 2020).

### 5.3.1 Μελέτη χυμικών αποκρίσεων στους εμβολιασμένους ποντικούς

Ο στόχος των περισσότερων εμβολίων είναι η παραγωγή αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του παθογόνου μικροοργανισμού. Τα αντισώματα αυτά αναγνωρίζουν ειδικά ορισμένα αντιγόνα του παθογόνου και τα εξουδετερώνουν, προστατεύοντας τον οργανισμό που έχει προσβληθεί (Finco O. & Rappuoli R., 2014).

Στη παρούσα διπλωματική εργασία, η χυμική απόκριση αξιολογήθηκε σε ορούς, με τη μέθοδο Elisa, από ανοσοποιημένα ποντίκια της φυλής BALB/c, 15 ημέρες μετά την ενδομυϊκή χορήγηση μείγματος των 3 πεπτιδίων ή του κάθε πεπτιδίου ξεχωριστά, σε συνδυασμό με το ανοσοενισχυτικό Addavax.

Τα αποτελέσματα έδειξαν, πως μόνο το πεπτιδίο 2 είναι ικανό να προκαλέσει ανοσολογική απόκριση, καθώς μόνο κατά τη χορήγηση αυτού ή του μείγματος παρατηρήθηκε παραγωγή ολικών αντισωμάτων IgG.

Σε συμφωνία με τα παραπάνω δεδομένα είναι και τα αποτελέσματα μιας μελέτης, στην αποδείχθηκε ότι η ανοσοποίηση με ChimeraT και με μεμονωμένες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες προκάλεσαν κατά κύριο λόγο αντι-Leishmania IgG2a αντισώματα, τα οποία συσχετίστηκαν επίσης με ανοσοαπόκριση τύπου Th1 (Lage D. P. et al., 2020).

### 5.3.2 Μελέτη κυτταρομεσολαβητικών αποκρίσεων στους εμβολιασμένους ποντικούς

Ένα επιτυχημένο εμβόλιο πρέπει να ενεργοποιεί την επικοινωνία μεταξύ αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και T λεμφοκυττάρων. Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, η μελέτη του λεμφοκυτταρικού πολλαπλασιασμού πραγματοποιήθηκε σε σπληνοκύτταρα ποντικών που διεγέρθηκαν με μείγμα των 3 πεπτιδίων ή με το κάθε πεπτίδιο ξεχωριστά. Τα αποτελέσματα έδειξαν, ότι το μείγμα πεπτιδίων και το πεπτίδιο 2, ήταν εκείνα που προκάλεσαν ισχυρό πολλαπλασιασμό των σπληνικών κυττάρων κατά την επανα-διέγερση *in vitro*. Επομένως, μόνο το πεπτίδιο 2 είναι ικανό να προκαλέσει λεμφοκυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Παρόμοιο αποτέλεσμα, είχε και η μελέτη των Lage et al, όπου μετά τη διέγερση με χρήση του ChimeraT, προκλήθηκαν υψηλές λεμφοπολλαπλασιαστικές αποκρίσεις. Η ChimeraT, είναι μία ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, που προέκυψε από το συνδυασμό συγκεκριμένων επιτόπων T κυττάρων από πρωτεΐνες PHB, EIF5a, LiHyr1 και LiHyr2 (Lage D. P. et al., 2020). Παράλληλα και σε άλλη μελέτη που ανοσοποίησε ποντικούς BALB/c με PLGA-sLiAg, εμφανίστηκαν υψηλά επίπεδα λεμφοκυτταρικού πολλαπλασιασμού σε απόκριση στο sLiAg (*L. infantum* antigen), ενώ ο εμβολιασμός με PLGA-sLiAg-MPLA είχε ως αποτέλεσμα ακόμη υψηλότερες λεμφοϋπερπλαστικές αποκρίσεις (Margaroni M. et al., 2017).

Τέλος, οι Joshi et al, χρησιμοποιώντας ανοσογόνα πεπτίδια από τις αλληλουχίες έξι πιθανών διεγερτικών πρωτεϊνών Th1 (LdAld, LdEno, LdTPI, LdPDI, Ldelf2 και Ldp45), έδειξαν πως στη περίπτωση των χάμστερ, πέντε πεπτιδίων προκάλεσαν σημαντικό πολλαπλασιασμό κυττάρων, ενώ σε ανθρώπινα PBMCs, δέκα πεπτίδια προκάλεσαν σημαντική λεμφοπολλαπλασιαστική απόκριση (Joshi S. et al., 2019).

#### 5.4 Συμπεράσματα

Με βάση τα αποτελέσματα που λήφθηκαν στην παρούσα μελέτη, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι τα SNEDDs σε συγκεντρώσεις  $\leq 100$   $\mu\text{g/ml}$  δεν είναι τοξικά για τα μακροφάγα της κυτταρικής σειράς J774A.1. Επίσης συμπεραίνουμε πως τα νανοσωματίδια SNEDDS προσλαμβάνονται τόσο από τα δενδριτικά όσο και από τα μακροφάγα ήδη από τις 4 ώρες και το ποσοστό των κυττάρων που τα προσλαμβάνει δε διαφοροποιείται στις 12 ώρες για την ίδια συγκέντρωση (100  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  και 25  $\mu\text{g/ml}$ ). Ωστόσο αν και προσλαμβάνονται από τα δενδριτικά κύτταρα, δεν επάγουν την ωρίμανση τους. Από τα πειράματα *in vivo*, που πραγματοποιήθηκαν, φάνηκε πως τα SNEDDS προσλαμβάνονται από τα λεμφικά όργανα, σπλήνα και λεμφαδένες, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση.

Τέλος, από το πείραμα της ανοσοποίησης, τα αποτελέσματα έδειξαν πως το πεπτίδιο 2, της πρωτεΐνης Rieskeiron-sulfurmitochondrial precursor του παρασίτου *Leishmania*, είναι ικανό να προκαλέσει τόσο χυμική όσο και κυτταρική ανοσολογική απόκριση.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Agallou, Maria, Maritsa Margaroni, Stathis D. Kotsakis, and Evdokia Karagouni**, 'A Canine-Directed Chimeric Multi-Epitope Vaccine Induced Protective Immune Responses in BALB/c Mice Infected with *Leishmania Infantum*', *Vaccines*, 8.3 (2020), 350 <<https://doi.org/10.3390/vaccines8030350>>
2. **Ahmad, Suhana, AnesAteqahZamry, Hern-Tze Tina Tan, KahKeng Wong, JitKang Lim, and Rohimah Mohamud**, 'Targeting Dendritic Cells through Gold Nanoparticles: A Review on the Cellular Uptake and Subsequent Immunological Properties', *Molecular Immunology*, 91 (2017), 123–33 <<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.09.001>>
3. **Akbari, Maryam, Ahmad Oryan, and GholamrezaHatam**, 'Application of Nanotechnology in Treatment of Leishmaniasis: A Review', *Acta Tropica*, 172 (2017), 86–90 <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.04.029>>
4. **Alkilany, Alaaldin M., and Catherine J. Murphy**, 'Toxicity and Cellular Uptake of Gold Nanoparticles: What We Have Learned so Far?', *Journal of Nanoparticle Research*, 12.7 (2010), 2313–33 <<https://doi.org/10.1007/s11051-010-9911-8>>
5. **Am, Villar, NaverosBc, Campmany Ac, Trenchs Ma, RocabertCb, and BellowalH**, 'Design and Optimization of Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems (SNEDDS) for Enhanced Dissolution of Gemfibrozil.', *International Journal of Pharmaceutics*, 431.1–2 (2012), 161–75 <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.04.001>>
6. **Anjuère, F., P. Martín, I. Ferrero, M. L. Fraga, G. M. del Hoyo, N. Wright, and others**, 'Definition of Dendritic Cell Subpopulations Present in the Spleen, Peyer's Patches, Lymph Nodes, and Skin of the Mouse', *Blood*, 93.2 (1999), 590–98
7. **Ardavín, Carlos**, 'Origin, Precursors and Differentiation of Mouse Dendritic Cells', *Nature Reviews Immunology*, 3.7 (2003), 582–91 <<https://doi.org/10.1038/nri1127>>
8. **Arosio, Daniela, Fabrizio Chiodo, José J. Reina, Marcello Marelli, Soledad Penadés, Yvette van Kooyk, and others**, 'Effective Targeting of DC-SIGN by  $\alpha$ -Fucosylamide Functionalized Gold Nanoparticles', *Bioconjugate Chemistry*, 25.12 (2014), 2244–51 <<https://doi.org/10.1021/bc500467u>>
9. **Asselin-Paturel, Carine, Andre Boonstra, Marc Dalod, Isabelle Durand, Nadia Yessaad, Colette Dezutter-Dambuyant, and others**, 'Mouse Type I IFN-Producing Cells Are Immature APCs with Plasmacytoid Morphology', *Nature Immunology*, 2.12 (2001), 1144–50 <<https://doi.org/10.1038/ni736>>
10. **Avila-García, Miroslava, Javier Mancilla, and Enrique Segura-Cervantes and Norma Galindo-Sevilla**, 'Transmission to Humans', *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*, 2014 <<https://doi.org/10.5772/57271>>
11. **Babensee, Julia E., and Abhijit Paranjpe**, 'Differential Levels of Dendritic Cell Maturation on Different Biomaterials Used in Combination Products', *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 74.4 (2005), 503–10 <<https://doi.org/10.1002/jbm.a.30429>>
12. **Baloch, Jeand, Muhammad Farhan Sohail, Hafiz Shaib Sarwar, Maria Hassan Kiani, Gul Majid Khan, Sarwat Jahan, and others**, 'Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) for Improved Oral Bioavailability of Chlorpromazine: *In Vitro* and *In Vivo* Evaluation', *Medicina*, 55.5 (2019) <<https://doi.org/10.3390/medicina55050210>>



13. **Banchereau, J., and R. M. Steinman**, 'Dendritic Cells and the Control of Immunity', *Nature*, 392.6673 (1998), 245–52 <<https://doi.org/10.1038/32588>>
14. **Bandyopadhyay, Arunima, Rebecca L. Fine, Stacey Demento, Linda K. Bockenstedt, and Tarek M. Fahmy**, 'The Impact of Nanoparticle Ligand Density on Dendritic-Cell Targeted Vaccines', *Biomaterials*, 32.11 (2011), 3094–3105 <<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.12.054>>
15. **Bañuls, Anne-Laure, Mallorie Hide, and Franck Prugnolle**, 'Leishmania and the Leishmaniasis: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans', *Advances in Parasitology*, 64 (2007), 1–109 <[https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(06\)64001-3](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(06)64001-3)>
16. **Beattie L1, Kaye PM**, 'Leishmania-Host Interactions: What Has Imaging Taught Us? - Abstract - Europe PMC', 2011 <<https://europepmc.org/article/med/21819514>> [accessed 30 March 2020]
17. **Besteiro, Sébastien, Roderick A. M. Williams, Graham H. Coombs, and Jeremy C. Mottram**, 'Protein Turnover and Differentiation in Leishmania', *International Journal for Parasitology*, 37.10 (2007), 1063–75 <<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.03.008>>
18. **Bhargava, Prachi, and Rajni Singh**, 'Developments in Diagnosis and Antileishmanial Drugs', *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2012 (2012), 626838 <<https://doi.org/10.1155/2012/626838>>
19. **Bi, Kaiming, Yuyang Chen, Songnian Zhao, Yan Kuang, and Chih-Hang John Wu**, 'Current Visceral Leishmaniasis Research: A Research Review to Inspire Future Study', *BioMed Research International* (Hindawi, 2018), e9872095 <<https://doi.org/10.1155/2018/9872095>>
20. **Bilgic-Temel, Asli, Dedee F. Murrell, and SonerUzun**, 'Cutaneous Leishmaniasis: A Neglected Disfiguring Disease for Women', *International Journal of Women's Dermatology*, 5.3 (2019), 158–65 <<https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2019.01.002>>
21. **Biosciences, Taconic**, 'BALB/c' <<https://www.taconic.com/mouse-model/balbc>> [accessed 23 July 2020]
22. **Blum, Johannes, Pierre Buffet, Leo Visser, Gundel Harms, Mark S. Bailey, Eric Caumes, and others**, 'LeishMan Recommendations for Treatment of Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis in Travelers, 2014', *Journal of Travel Medicine*, 21.2 (2014), 116–29 <<https://doi.org/10.1111/jtm.12089>>
23. **Borgognoni, Camila Figueiredo, JooHyoung Kim, ValtencirZucolotto, Harald Fuchs, and Kristina Riehemann**, 'Human Macrophage Responses to Met al-Oxide Nanoparticles: A Review', *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46.sup2 (2018), 694–703 <<https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1468767>>
24. **Bourdoiseau, G., C. Bonnefont, E. Hoareau, C. Boehringer, T. Stolle, and L. Chabanne**, 'Specific IgG1 and IgG2 Antibody and Lymphocyte Subset Levels in Naturally Leishmania Infantum-Infected Treated and Untreated Dogs', *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 59.1 (1997), 21–30 <[https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(97\)00072-X](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(97)00072-X)>
25. **Brandenberger, C., B. Rothen-Rutishauser, C. Mühlfeld, O. Schmid, G. A. Ferron, K. L. Maier, and others**, 'Effects and Uptake of Gold Nanoparticles Deposited at the Air–Liquid Interface of a Human Epithelial Airway Model', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 242.1 (2010), 56–65 <<https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.09.014>>
26. **de Carvalho, Ricardo Fontoura, Ieler Ferreira Ribeiro, Ana Luisa Miranda-Vilela, José de Souza Filho, OlímpiaPaschoal Martins, Débora de Oliveira Cintra e Silva, and others**, 'Leishmanicidal Activity of Amphotericin B Encapsulated in PLGA–DMSA Nanoparticles to Treat Cutaneous Leishmaniasis in C57BL/6 Mice', *Experimental Parasitology*, 135.2 (2013), 217–22 <<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.07.008>>

27. **Chakravarty, Jaya, and Shyam Sundar**, 'Current and Emerging Medications for the Treatment of Leishmaniasis', *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 20.10 (2019), 1251–65 <<https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1609940>>
28. **Cherniakov, Irina, Abraham Domb, and Amnon Hoffman**, 'Self-Nano-Emulsifying Drug Delivery Systems: An Update of the Biopharmaceutical Aspects', *Expert Opinion on Drug Delivery*, 12 (2015) <<https://doi.org/10.1517/17425247.2015.999038>>
29. **Clem, Angela S.**, 'Fundamentals of Vaccine Immunology', *Journal of Global Infectious Diseases*, 3.1 (2011), 73–78 <<https://doi.org/10.4103/0974-777X.77299>>
30. **Coffman, Robert L., Alan Sher, and Robert A. Seder**, 'Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work', *Immunity*, 33.4 (2010), 492–503 <<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.002>>
31. **Coomes, Stephanie M., Victoria S. Pelly, and Mark S. Wilson**, 'Plasticity within the Aβ<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Cell Lineage: When, How and What For?', *Open Biology*, 3.1 (2013), 120157 <<https://doi.org/10.1098/rsob.120157>>
32. **Cox, F. E. G.**, 'History of Human Parasitology', *Clinical Microbiology Reviews*, 15.4 (2002), 595–612 <<https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.595-612.2002>>
33. **Cruz, Teresa, Rogério Gaspar, Ana Donato, and Celeste Lopes**, 'Interaction Between Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles and Peritoneal Macrophages: MTT Metabolism, NET Reduction, and NO Production', *Pharmaceutical Research*, 14.1 (1997), 73–79 <<https://doi.org/10.1023/A:1012059501947>>
34. **Cui, Weiping, Hanqing Zhao, Chen Wang, Yao Chen, Cong Luo, Shenwu Zhang, and others**, 'Co-Encapsulation of Docetaxel and Cyclosporin A into SNEDDS to Promote Oral Cancer Chemotherapy', *Drug Delivery*, 26.1 (2019), 542–50 <<https://doi.org/10.1080/10717544.2019.1616237>>
35. **Cunningham, Anna C.**, 'Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by Leishmania', *Experimental and Molecular Pathology*, 72.2 (2002), 132–41 <<https://doi.org/10.1006/exmp.2002.2418>>
36. **Danhier, Fabienne, Eduardo Ansorena, Joana M. Silva, Régis Coco, Aude Le Breton, and VéroniquePréat**, 'PLGA-Based Nanoparticles: An Overview of Biomedical Applications', *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 161.2 (2012), 505–22 <<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043>>
37. **Dantas-Torres, Filipe**, 'Canine Vector-Borne Diseases in Brazil', *Parasites & Vectors*, 1.1 (2008), 25 <<https://doi.org/10.1186/1756-3305-1-25>>
38. **Date, Abhijit A., Neha Desai, Rahul Dixit, and Mangal Nagarsenker**, 'Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems: Formulation Insights, Applications and Advances', *Nanomedicine (London, England)*, 5.10 (2010), 1595–1616 <<https://doi.org/10.2217/nnm.10.126>>
39. **Daulatabad, Deepashree, Archana Singal, Amit Dhawan, Deepika Pandhi, and Sonal Sharma**, 'Mucocutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania Donovanii Infection in an Indian Man', *International Journal of Dermatology*, 54.6 (2015), 680–84 <<https://doi.org/10.1111/ijd.12748>>
40. **De Brito, Rory Cristiane Fortes, JamilleMirelle de Oliveira Cardoso, Levi Eduardo Soares Reis, Fernando Augusto Siqueira Mathias, Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar-Soares, Andréa Teixeira-Carvalho, and others**, 'Synthetic Peptides Elicit Strong Cellular Immunity in Visceral Leishmaniasis Natural Reservoir and Contribute to Long-Lasting Polyfunctional T-Cells in BALB/c Mice', *Vaccines*, 7.4 (2019), 162 <<https://doi.org/10.3390/vaccines7040162>>
41. **Devani, Manisha, Marianne Ashford, and Duncan Q. M. Craig**, 'The Emulsification and Solubilisation Properties of Polyglycolysed Oils in Self-Emulsifying Formulations', *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56.3 (2004), 307–16 <<https://doi.org/10.1211/0022357022872>>

42. **Dong Liu and Jude E. Uzonna\***, 'The Early Interaction of Leishmania with Macrophages and Dendritic Cells and Its Influence on the Host Immune Response', 2012 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3417671/>> [accessed 30 March 2020]
43. **Duarte, Mariana Costa, Daniela Pagliara Lage, VívianTamietti Martins, Miguel Angel Chávez-Fumagalli, Bruno Mendes Roatt, Daniel Menezes-Souza, and others**, 'Recent Updates and Perspectives on Approaches for the Development of Vaccines against Visceral Leishmaniasis', *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 49.4 (2016), 398–407 <<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0120-2016>>
44. **Dye, Christopher**, 'After 2015: Infectious Diseases in a New Era of Health and Development', *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369.1645 (2014), 20130426 <<https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0426>>
45. **Elsheikha, Hany**, 'Canine Leishmaniosis: Part 2 – Keeping Sandflies at Bay', *Vet Times*, 2016 <<https://www.vettimes.co.uk/article/canine-leishmaniosis-part-2-keeping-sandflies-at-bay/>> [accessed 1 September 2020]
46. **Elsheikha, Hany**, 'Leishmaniosis in Dogs and Cats', *The Veterinary Nurse*, 7.5 (2016), 260–67 <<https://doi.org/10.12968/vetn.2016.7.5.260>>
47. **Engvall, Eva, and Peter Perlmann**, 'Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Quantitative Assay of Immunoglobulin G', *Immunochemistry*, 8.9 (1971), 871–74 <[https://doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90454-X](https://doi.org/10.1016/0019-2791(71)90454-X)>
48. **Fan, Chaoyang, Jung-Cheng Hsiang, and Robert M. Dickson**, 'Optical Modulation and Selective Recovery of Cy5 Fluorescence', *Chemphyschem*, 13.4 (2012), 1023–29 <<https://doi.org/10.1002/cphc.201100671>>
49. **Feng, Qiyi, Yanping Liu, Jian Huang, Ke Chen, Jinxing Huang, and Kai Xiao**, 'Uptake, Distribution, Clearance, and Toxicity of Iron Oxide Nanoparticles with Different Sizes and Coatings', *Scientific Reports*, 8.1 (2018), 1–13 <<https://doi.org/10.1038/s41598-018-19628-z>>
50. **Finco, Oretta, and RinoRappuoli**, 'Designing Vaccines for the Twenty-First Century Society', *Frontiers in Immunology*, 5 (2014), 12 <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00012>>
51. **Fischer, Stefan, Edith Uetz-von Allmen, Ying Waeckerle-Men, Marcus Groettrup, Hans P. Merkle, and Bruno Gander**, 'The Preservation of Phenotype and Functionality of Dendritic Cells upon Phagocytosis of Polyelectrolyte-Coated PLGA Microparticles', *Biomaterials*, 28.6 (2007), 994–1004 <<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.10.034>>
52. **Forgiarini, A., J. Esquena, C. González, and C. Solans**, 'Formation of Nano-Emulsions by Low-Energy Emulsification Methods at Constant Temperature', *Langmuir*, 17.7 (2001), 2076–83 <<https://doi.org/10.1021/la001362n>>
53. **Freshney, R. Ian**, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 3rd edition (New York: Wiley-Liss, 1994)
54. **Fricker, Gert, TorstenKromp, Armin Wendel, Alfred Blume, Jürgen Zirkel, Herbert Rebmann, and others**, 'Phospholipids and Lipid-Based Formulations in Oral Drug Delivery', *Pharmaceutical Research*, 27.8 (2010), 1469–86 <<https://doi.org/10.1007/s11095-010-0130-x>>
55. **Fromen, Catherine A., Tojan B. Rahhal, Gregory R. Robbins, Marc P. Kai, Tammy W. Shen, J. Christopher Luft, and others**, 'Nanoparticle Surface Charge Impacts Distribution, Uptake and Lymph Node Trafficking by Pulmonary Antigen-Presenting Cells', *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 12.3 (2016), 677–87 <<https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.002>>
56. **Garde, Esther, Laura Ramírez, Laura Corvo, José C. Solana, M. Elena Martín, Víctor M. González, and others**, 'Analysis of the Antigenic and Prophylactic Properties of the Leishmania Translation

- Initiation Factors EIF2 and EIF2B in Natural and Experimental Leishmaniasis', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8 (2018), 112 <<https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00112>>
57. **Ghosh, Monidipa, and Santu Bandyopadhyay**, 'Interaction of Leishmania Parasites with Dendritic Cells and Its Functional Consequences', *Immunobiology*, 209.1 (2004), 173–77 <<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2004.02.007>>
58. **Givan, Alice Longobardi**, *Flow Cytometry: First Principles*
59. **Goff, Peter H., Dirk Eggink, Christopher W. Seibert, Rong Hai, Luis Martínez-Gil, Florian Krammer, and others**, 'Adjuvants and Immunization Strategies to Induce Influenza Virus Hemagglutinin Stalk Antibodies', *PLoS ONE*, 8.11 (2013) <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079194>>
60. **Goya, G. F., I. Marcos-Campos, R. Fernández-Pacheco, B. Sáez, J. Godino, L. Asín, and others**, 'Dendritic Cell Uptake of Iron-Based Magnetic Nanoparticles', *Cell Biology International*, 32.8 (2008), 1001–5 <<https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2008.04.001>>
61. **Gregory, Anthony E., Richard Titball, and Diane Williamson**, 'Vaccine Delivery Using Nanoparticles', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3 (2013) <<https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00013>>
62. **Gupta, Gaurav, Steve Oghumu, and Abhay R. Satoskar**, 'Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis', *Advances in Applied Microbiology*, 82 (2013), 155–84 <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407679-2.00005-3>>
63. **Gupta, Shweta, Sandip Chavhan, and Krutika K. Sawant**, 'Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System for Adefovir Dipivoxil: Design, Characterization, *in Vitro* and Ex Vivo Evaluation', *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 392.1 (2011), 145–55 <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.09.048>>
64. **Gutiérrez, Víctor, Amedea B. Seabra, Rosa M. Reguera, Jayant Khandare, and Marcelo Calderón**, 'New Approaches from Nanomedicine for Treating Leishmaniasis', *Chemical Society Reviews*, 45.1 (2016), 152–68 <<https://doi.org/10.1039/C5CS00674K>>
65. **Gutiérrez-Martínez, Enric, Remi Planès, Giorgio Anselmi, Matthew Reynolds, Shinelle Menezes, Aimé Cézaire Adiko, and others**, 'Cross-Presentation of Cell-Associated Antigens by MHC Class I in Dendritic Cell Subsets', *Frontiers in Immunology*, 6 (2015) <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00363>>
66. **Guy, Bruno, and Nicolas Burdin**, 'New Adjuvants for Parenteral and Mucosal Vaccines', *Thérapie*, 60.3 (2005), 235–41 <<https://doi.org/10.2515/therapie:2005030>>
67. **Hamdy, Samar, Azita Haddadi, Vishwa Somayaji, David Ruan, and John Samuel**, 'Pharmaceutical Analysis of Synthetic Lipid A-Based Vaccine Adjuvants in Poly (D,L-Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanoparticle Formulations', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44.4 (2007), 914–23 <<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.03.010>>
68. **Handman, Emanuela**, 'Cell Biology of Leishmania', in *Advances in Parasitology*, ed. by J. R. Baker, R. Muller, and D. Rollinson (Academic Press, 1999), XLIV, 1–39 <[https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60229-8](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60229-8)>
69. **Hassan, Shabir, Gyan Prakash, Aycabal Ozturk, Saghi Saghadzadeh, Mohammad Farhan Sohail, Jungmok Seo, and others**, 'Evolution and Clinical Translation of Drug Delivery Nanomaterials', *Nano Today*, 15 (2017), 91–106 <<https://doi.org/10.1016/j.nantod.2017.06.008>>
70. **Heath, William R., Gabrielle T. Belz, Georg M. N. Behrens, Christopher M. Smith, Simon P. Forehan, Ian A. Parish, and others**, 'Cross-Presentation, Dendritic Cell Subsets, and the Generation of

- Immunity to Cellular Antigens', *Immunological Reviews*, 199.1 (2004), 9–26 <<https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00142.x>>
71. **Heinzel, F. P., D. S. Schoenhaut, R. M. Rerko, L. E. Rosser, and M. K. Gately**, 'Recombinant Interleukin 12 Cures Mice Infected with *Leishmania Major*', *The Journal of Experimental Medicine*, 177.5 (1993), 1505–9 <<https://doi.org/10.1084/jem.177.5.1505>>
72. **Helft, Julie, Jan Böttcher, Probir Chakravarty, Santiago Zelenay, JattaHuotari, Barbara U. Schraml, and others**, 'GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells', *Immunity*, 42.6 (2015), 1197–1211 <<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.05.018>>
73. **Herwaldt, Barbara L.**, 'Leishmaniasis', *The Lancet*, 354.9185 (1999), 1191–99 <[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)10178-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)10178-2)>
74. **Hoebe, Kasper, Edith Janssen, and Bruce Beutler**, 'The Interface between Innate and Adaptive Immunity', *Nature Immunology*, 5.10 (2004), 971–74 <<https://doi.org/10.1038/ni1004-971>>
75. **Hu, Guorong, Mengfei Guo, Juanjuan Xu, Feng Wu, Jinshuo Fan, Qi Huang, and others**, 'Nanoparticles Targeting Macrophages as Potential Clinical Therapeutic Agents Against Cancer and Inflammation', *Frontiers in Immunology*, 10 (2019) <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01998>>
76. **Hulspas, Ruud, Maurice R. G. O'Gorman, Brent L. Wood, Jan W. Gratama, and D. Robert Sutherland**, 'Considerations for the Control of Background Fluorescence in Clinical Flow Cytometry', *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 76B.6 (2009), 355–64 <<https://doi.org/10.1002/cyto.b.20485>>
77. **Hussain, Afzal, Abdus Samad, and Sandeep Kumar Singh and Sarwar Beg**, 'Self-Emulsifying Systems for Oral Bioavailability Enhancement', *Recent Patents on Nanomedicine (Discontinued)*, 2015, 71–77 <<https://www.eurekaselect.com/132261/article>> [accessed 31 August 2020]
78. **Idrees, Muhammad**, 'ROLE OF NANOTECHNOLOGY IN MEDICAL SCIENCES: A REVIEW', 5.1 (2015), 11
79. **Jawed, Junaid Jibrán, Sayantan Banerjee, Syamdas Bandyopadhyay, Shabina Parveen, Bidisha Paul Chowdhury, Prasanta Saini, and others**, 'Immunomodulatory Effect of Arabinosylated Lipoarabinomannan Restrict the Progression of Visceral Leishmaniasis through NOD2 Inflammatory Pathway: Functional Regulation of T Cell Subsets', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106 (2018), 724–32 <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.167>>
80. **Jawed, Junaid Jibrán, Sayanika Dutta, and Subrata Majumdar**, 'Functional Aspects of T Cell Diversity in Visceral Leishmaniasis', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 117 (2019), 109098 <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109098>>
81. **Jia, Jianbo, Yi Zhang, Yan Xin, Cuijuan Jiang, Bing Yan, and ShumeiZhai**, 'Interactions Between Nanoparticles and Dendritic Cells: From the Perspective of Cancer Immunotherapy', *Frontiers in Oncology*, 8 (2018) <<https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00404>>
82. **Jia, Yan-Peng, Bu-Yun Ma, Xia-Wei Wei, and Zhi-Yong Qian**, 'The *in Vitro* and *in Vivo* Toxicity of Gold Nanoparticles', *Chinese Chemical Letters*, 28.4 (2017), 691–702 <<https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2017.01.021>>
83. **João, Cristina, Brenda M. Ogle, and Susan Geyer**, 'Immunoglobulin Promotes the Diversity and the Function of T Cells', *European Journal of Immunology*, 36.7 (2006), 1718–28 <<https://doi.org/10.1002/eji.200635908>>
84. **Joshi, Sumit, Narendra Kumar Yadav, Keerti Rawat, Vikash Kumar, Rafat Ali, Amogh Anant Sahasrabudde, and others**, 'Immunogenicity and Protective Efficacy of T-Cell Epitopes Derived From Potential Th1 Stimulatory Proteins of *Leishmania (Leishmania) Donovanii*', *Frontiers in Immunology*, 10 (2019) <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00288>>

85. **Jy, Hong, Kim Jk, Song Yk, Park Js, and Kim Ck**, 'A New Self-Emulsifying Formulation of Itraconazole with Improved Dissolution and Oral Absorption.', *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 110.2 (2005), 332–38 <<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.10.002>>
86. **Kalantari, Azin, DóraKósa, DánielNemes, ZoltánUjhelyi, PálmaFehér, MiklósVecsernyés, and others**, 'Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems Containing PlantagoLanceolata—An Assessment of Their Antioxidant and Antiinflammatory Effects', *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 22.10 (2017) <<https://doi.org/10.3390/molecules22101773>>
87. **Kaliński, P., C. M. Hilkens, E. A. Wierenga, and M. L. Kapsenberg**, 'T-Cell Priming by Type-1 and Type-2 Polarized Dendritic Cells: The Concept of a Third Signal', *Immunology Today*, 20.12 (1999), 561–67 <[https://doi.org/10.1016/s0167-5699\(99\)01547-9](https://doi.org/10.1016/s0167-5699(99)01547-9)>
88. **Karamanidou, Theodora, Konstantina Karidi, Vassilis Bourganis, Katerina Kontonikola, Olga Kammona, and Costas Kiparissides**, 'Effective Incorporation of Insulin in Mucus Permeating Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems', *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur PharmazeutischeVerfahrenstechnike.V*, 97.Pt A (2015), 223–29 <<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.04.013>>
89. **Karki, Gaurab**, 'Vaccine: Characteristics and Types of Vaccine', *Online Biology Notes*, 2019 <<https://www.onlinebiologynotes.com/vaccine-characteristics-and-types-of-vaccine/>> [accessed 29 August 2020]
90. **Ke, Wen-Ting, Shyr-Yi Lin, Hsiu-O. Ho, and Ming-ThauSheu**, 'Physical Characterizations of Microemulsion Systems Using Tocopheryl Polyethylene Glycol 1000 Succinate (TPGS) as a Surfactant for the Oral Delivery of Protein Drugs', *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 102.2 (2005), 489–507 <<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.10.030>>
91. **Kedzierski, L., Y. Zhu, and E. Handman**, 'Leishmania Vaccines: Progress and Problems', *Parasitology*, 133 Suppl (2006), S87-112 <<https://doi.org/10.1017/S0031182006001831>>
92. **Kedzierski, Lukasz, AnurathaSakthianandeswaren, Joan M. Curtis, Philip C. Andrews, Peter C. Junk, and Katherine Kedzierska**, 'Leishmaniasis: Current Treatment and Prospects for New Drugs and Vaccines', *Current Medicinal Chemistry*, 16.5 (2009), 599–614 <<https://doi.org/10.2174/092986709787458489>>
93. **Khalil, EltahirAwadGasim**, 'Vaccines for Visceral Leishmaniasis: Hopes and Hurdles', *Leishmaniasis as Re-Emerging Diseases*, 2018 <<https://doi.org/10.5772/intechopen.75184>>
94. **Khan, Momin, Akhtar Nadhman, Walayat Shah, Imran Khan, and MasoomYasinzai**, 'Formulation and Characterisation of a Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System of Amphotericin B for the Treatment of Leishmaniasis', *IET Nanobiotechnology*, 13.5 (2019), 477–83 <<https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2018.5281>>
95. **Kim, Eui Ho, Matthew C Woodruff, LilitGrigoryan, Barbara Maier, Song Hee Lee, Pratushya Mandal, and others**, 'Squalene Emulsion-Based Vaccine Adjuvants Stimulate CD8 T Cell, but Not Antibody Responses, through a RIPK3-Dependent Pathway', ed. by Tadatsugu Taniguchi, John W Schoggins, Andrew Oberst, and Ross Kedl, *ELife*, 9 (2020), e52687<<https://doi.org/10.7554/eLife.52687>>
96. **Kima, P. E., L. Soong, C. Chicharro, N. H. Ruddle, and D. McMahon-Pratt**, 'Leishmania-Infected Macrophages Sequester Endogenously Synthesized Parasite Antigens from Presentation to CD4+ T Cells', *European Journal of Immunology*, 26.12 (1996), 3163–69 <<https://doi.org/10.1002/eji.1830261249>>

97. **Kishimoto, Takashi Kei, and Roberto A. Maldonado**, ‘Nanoparticles for the Induction of Antigen-Specific Immunological Tolerance’, *Frontiers in Immunology*, 9 (2018), 230 <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00230>>
98. **Kiyani, Mubin Mustafa, Muhammad Farhan Sohail, Gul Shahnaz, Hamza Rehman, Muhammad Furqan Akhtar, Irum Nawaz, and others**, ‘Evaluation of Turmeric Nanoparticles as Anti-Gout Agent: Modernization of a Traditional Drug’, *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 55.1 (2019) <<https://doi.org/10.3390/medicina55010010>>
99. **Klatt, Stephan, Larry Simpson, Dmitri A. Maslov, and ZoltánKonthur**, ‘Leishmania Tarentolae: Taxonomic Classification and Its Application as a Promising Biotechnological Expression Host’, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13.7 (2019), e0007424<<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007424>>
100. **Kong, Bokyoung, Ji Hyun Seog, Lauren M Graham, and Sang Bok Lee**, ‘Experimental Considerations on the Cytotoxicity of Nanoparticles’, *Nanomedicine (London, England)*, 6.5 (2011), 929–41 <<https://doi.org/10.2217/nnm.11.77>>
101. **Kuhn, Dagmar A., Dimitri Vanhecke, Benjamin Michen, Fabian Blank, Peter Gehr, Alke Petri-Fink, and others**, ‘Different Endocytotic Uptake Mechanisms for Nanoparticles in Epithelial Cells and Macrophages’, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 5 (2014), 1625–36 <<https://doi.org/10.3762/bjnano.5.174>>
102. **Kuhn, Dagmar A., Dimitri Vanhecke, Benjamin Michen, Fabian Blank, Peter Gehr, Alke Petri-Fink, and others**, ‘Different Endocytotic Uptake Mechanisms for Nanoparticles in Epithelial Cells and Macrophages’, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 5.1 (2014), 1625–36 <<https://doi.org/10.3762/bjnano.5.174>>
103. **Kumara, Rishikesh, C. Ganesh, Krishna B. Pandeya, Pradeep Dasa, Ganesh Chandra Sahoo, VnrDasa, and others**, ‘PLGA-PEG Encapsulated Sitamaquine Nanoparticles Drug Delivery System against Leishmania Donovanii’, 2014 <<https://www.semanticscholar.org/paper/PLGA-PEG-Encapsulated-sitamaquine-nanoparticles-Kumara-Ganesh/244859be6377be43ba3be113383b0481773685fe>> [accessed 28 March 2020]
104. **Lage, D. P., V. T. Martins, M. C. Duarte, E. Garde, M. A. Chávez-Fumagalli, D. Menezes-Souza, and others**, ‘Prophylactic Properties of a Leishmania-Specific Hypothetical Protein in a Murine Model of Visceral Leishmaniasis’, *Parasite Immunology*, 37.12 (2015), 646–56 <<https://doi.org/10.1111/pim.12287>>
105. **Lage, Daniela P., Patrícia A. F. Ribeiro, Daniel S. Dias, Débora V. C. Mendonça, Fernanda F. Ramos, Lívia M. Carvalho, and others**, ‘A Candidate Vaccine for Human Visceral Leishmaniasis Based on a Specific T Cell Epitope-Containing Chimeric Protein Protects Mice against Leishmania Infantum Infection’, *Npj Vaccines*, 5.1 (2020), 1–13 <<https://doi.org/10.1038/s41541-020-00224-0>>
106. **Le Gros, G., S. Z. Ben-Sasson, R. Seder, F. D. Finkelman, and W. E. Paul**, ‘Generation of Interleukin 4 (IL-4)-Producing Cells *in Vivo* and *in Vitro*: IL-2 and IL-4 Are Required for *in Vitro* Generation of IL-4-Producing Cells’, *The Journal of Experimental Medicine*, 172.3 (1990), 921–29 <<https://doi.org/10.1084/jem.172.3.921>>
107. **León, Beatriz, María López-Bravo, and Carlos Ardavín**, ‘Monocyte-Derived Dendritic Cells Formed at the Infection Site Control the Induction of Protective T Helper 1 Responses against Leishmania’, *Immunity*, 26.4 (2007), 519–31 <<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.01.017>>
108. **Leta, Samson, Thi Ha Thanh Dao, Frehiwot Mesele, and Gezahegn Alemayehu**, ‘Visceral Leishmaniasis in Ethiopia: An Evolving Disease’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8.9 (2014), e3131<<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003131>>

109. **Liechtenstein, Therese, Ines Dufait, Christopher Bricogne, Alessio Lanna, Joeri Pen, KarineBreckpot, and others**, 'PD-L1/PD-1 Co-Stimulation, a Brake for T Cell Activation and a T Cell Differentiation Signal', *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, S12 (2012) <<https://doi.org/10.4172/2155-9899.S12-006>>
110. **de Lima, Luiza lanny, Karen Rapp Py-Daniel, Maria Adelaide Guimarães, Luís Alexandre Muehlmann, Ana Carolina Mafud, Yvonne PrimeranoMascarenhas, and others**, 'Self-Nanoemulsifying Drug-Delivery Systems Improve Oral Absorption and Antischistosomal Activity of Epiisopiloturine', *Nanomedicine*, 13.7 (2018), 689–702 <<https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0308>>
111. **Lison, Dominique, Leen C. J. Thomassen, Virginie Rabolli, Laetitia Gonzalez, Dorota Napierska, Jin Won Seo, and others**, 'Nominal and Effective Dosimetry of Silica Nanoparticles in Cytotoxicity Assays', *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 104.1 (2008), 155–62 <<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn072>>
112. **Liu, Dong, and Jude E. Uzonna**, 'The Early Interaction of Leishmania with Macrophages and Dendritic Cells and Its Influence on the Host Immune Response', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2 (2012) <<https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00083>>
113. **López-Carvajal, Liliana, Jaiberth Antonio Cardona-Arias, María Isabel Zapata-Cardona, Vanesa Sánchez-Giraldo, and Iván Darío Vélez**, 'Efficacy of Cryotherapy for the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis: Meta-Analyses of Clinical Trials', *BMC Infectious Diseases*, 16.1 (2016), 360 <<https://doi.org/10.1186/s12879-016-1663-3>>
114. **Luckheeram, Rishi Vishal, Rui Zhou, Asha Devi Verma, and Bing Xia**, 'CD4+T Cells: Differentiation and Functions', *Clinical and Developmental Immunology*, 2012 (2012) <<https://doi.org/10.1155/2012/925135>>
115. **Luo, Yang, Chaoming Wang, Yong Qiao, Mainul Hossain, Liyuan Ma, and Ming Su**, 'In Vitro Cytotoxicity of Surface Modified Bismuth Nanoparticles', *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 23.10 (2012), 2563–73 <<https://doi.org/10.1007/s10856-012-4716-1>>
116. **Lutsiak, M. E. Christine, Deborah R. Robinson, Conrad Coester, Glen S. Kwon, and John Samuel**, 'Analysis of Poly(D,L-Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanosphere Uptake by Human Dendritic Cells and Macrophages in Vitro', *Pharmaceutical Research*, 19.10 (2002), 1480–87 <<https://doi.org/10.1023/a:1020452531828>>
117. **Lutz, M. B., N. A. Kukutsch, M. Menges, S. Rössner, and G. Schuler**, 'Culture of Bone Marrow Cells in GM-CSF plus High Doses of Lipopolysaccharide Generates Exclusively Immature Dendritic Cells Which Induce Alloantigen-Specific CD4 T Cell Anergy in Vitro', *European Journal of Immunology*, 30.4 (2000), 1048–52 <[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(200004\)30:4<1048::AID-IMMU1048>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(200004)30:4<1048::AID-IMMU1048>3.0.CO;2-W)>
118. **Lutz, M. B., N. Kukutsch, A. L. Ogilvie, S. Rössner, F. Koch, N. Romani, and others**, 'An Advanced Culture Method for Generating Large Quantities of Highly Pure Dendritic Cells from Mouse Bone Marrow', *Journal of Immunological Methods*, 223.1 (1999), 77–92 <[https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(98\)00204-x](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(98)00204-x)>
119. **Ma, Wenxue, Trevor Smith, Vladimir Bogin, Yu Zhang, Cengiz Ozkan, MihriOzkan, and others**, 'Enhanced Presentation of MHC Class Ia, Ib and Class II-Restricted Peptides Encapsulated in Biodegradable Nanoparticles: A Promising Strategy for Tumor Immunotherapy', *Journal of Translational Medicine*, 9 (2011), 34 <<https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-34>>
120. **Mahmood, Arshad, Felix Prüfert, Nuri Ari Efiana, Muhammad Imtiaz Ashraf, Martin Hermann, Shah Hussain, and others**, 'Cell-Penetrating Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems (SNEDDS) for



- Oral Gene Delivery', *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13.11 (2016), 1503–12 <<https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1213236>>
121. **Mans, Dennis RA, Alida D Kent, Ricardo VPF Hu, and Henk DFH Schallig**, 'Epidemiological, Biological and Clinical Aspects of Leishmaniasis with Special Emphasis on Busi Yasi in Suriname', *Journal of Clinical & Experimental Dermatology Research*, 08.02 (2017) <<https://doi.org/10.4172/2155-9554.1000388>>
122. **Margaroni, Maritsa, Maria Agallou, Evita Athanasiou, Olga Kammona, Costas Kiparissides, Catherine Gaitanaki, and others**, 'Vaccination with Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles Loaded with Soluble Leishmania Antigens and Modified with a TNF $\alpha$ -Mimicking Peptide or Monophosphoryl Lipid A Confers Protection against Experimental Visceral Leishmaniasis', *International Journal of Nanomedicine*, 12 (2017), 6169–84 <<https://doi.org/10.2147/IJN.S141069>>
123. **Margaroni, Maritsa, Maria Agallou, Katerina Kontonikola, Konstantina Karidi, Olga Kammona, Costas Kiparissides, and others**, 'PLGA Nanoparticles Modified with a TNF $\alpha$  Mimicking Peptide, Soluble Leishmania Antigens and MPLA Induce T Cell Priming *in Vitro* via Dendritic Cell Functional Differentiation', *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 105 (2016), 18–31 <<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.05.018>>
124. **Maria Podinovskaia, Albert Descoteaux**, 'Leishmania and the Macrophage: A Multifaceted Interaction', 2015 <[https://www.researchgate.net/publication/271139988\\_Leishmania\\_and\\_the\\_macrophage\\_A\\_multifaceted\\_interaction](https://www.researchgate.net/publication/271139988_Leishmania_and_the_macrophage_A_multifaceted_interaction)> [accessed 30 March 2020]
125. **Marovich, M. A., M. A. McDowell, E. K. Thomas, and T. B. Nutman**, 'IL-12p70 Production by Leishmania Major-Harboring Human Dendritic Cells Is a CD40/CD40 Ligand-Dependent Process', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 164.11 (2000), 5858–65 <<https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.11.5858>>
126. **Martínez-López, María, Manuel Soto, Salvador Iborra, and David Sancho**, 'Leishmania Hijacks Myeloid Cells for Immune Escape', *Frontiers in Microbiology*, 9 (2018) <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00883>>
127. **Martins, Vivian T., Miguel A. Chávez-Fumagalli, Lourena E. Costa, Adriana M. C. Canavaci, Adriana M. C. C. Martins, Paula S. Lage, and others**, 'Antigenicity and Protective Efficacy of a Leishmania Amastigote-Specific Protein, Member of the Super-Oxygenase Family, against Visceral Leishmaniasis', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7.3 (2013), e2148 <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002148>>
128. **de Matos Guedes, Herbert Leonel, Monique Pacheco Duarte Carneiro, Daniel Cláudio de Oliveira Gomes, Bartira Rossi-Bergmann, and Salvatore Giovanni De-Simone**, 'Oligopeptidase B from Leishmania Amazonensis: Molecular Cloning, Gene Expression Analysis and Molecular Model', *Parasitology Research*, 101.4 (2007), 865–75 <<https://doi.org/10.1007/s00436-007-0630-8>>
129. **McClements, David Julian, and Hang Xiao**, 'Is Nano Safe in Foods? Establishing the Factors Impacting the Gastrointestinal Fate and Toxicity of Organic and Inorganic Food-Grade Nanoparticles', *Npj Science of Food*, 1.1 (2017), 6 <<https://doi.org/10.1038/s41538-017-0005-1>>
130. **van Meerloo, Johan, Gertjan J. L. Kaspers, and Jacqueline Cloos**, 'Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay', in *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, ed. by Ian A. Cree, Methods in Molecular Biology (Totowa, NJ: Humana Press, 2011), pp. 237–45 <[https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20)>
131. **Mikhailkevich, Natallia, Brian Becknell, Michael A. Caligiuri, Michael D. Bates, Richard Harvey, and Wei-ping Zheng**, 'Responsiveness of Naive CD4 T Cells to Polarizing Cytokine Determines the

- Ratio of Th1 and Th2 Cell Differentiation', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 176.3 (2006), 1553–60 <<https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.3.1553>>
132. **Mondal, Dinesh, Shinjiro Hamano, Md Golam Hasnain, and Abhay R. Satoskar**, 'Challenges for Management of Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis and Future Directions', *Research and Reports in Tropical Medicine* (Dove Press, 2014), 105–11 <<https://doi.org/10.2147/RRTM.S35707>>
133. **Moon, James J., Heikyung Suh, Mark E. Polhemus, Christian F. Ockenhouse, Anjali Yadava, and Darrell J. Irvine**, 'Antigen-Displaying Lipid-Enveloped PLGA Nanoparticles as Delivery Agents for a Plasmodium Vivax Malaria Vaccine', *PloS One*, 7.2 (2012), e31472 <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031472>>
134. **Mou, Dongsheng, Huabing Chen, Danrong Du, Chengwen Mao, Jiangling Wan, Huibi Xu, and others**, 'Hydrogel-Thickened Nanoemulsion System for Topical Delivery of Lipophilic Drugs', *International Journal of Pharmaceutics*, 353.1–2 (2008), 270–76 <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.11.051>>
135. **Mullen, A. C., F. A. High, A. S. Hutchins, H. W. Lee, A. V. Villarino, D. M. Livingston, and others**, 'Role of T-Bet in Commitment of TH1 Cells before IL-12-Dependent Selection', *Science (New York, N.Y.)*, 292.5523 (2001), 1907–10 <<https://doi.org/10.1126/science.1059835>>
136. **Mutiso, Joshua M., John C. Macharia, and Michael M. Gicheru**, 'A Review of Adjuvants for Leishmania Vaccine Candidates', *Journal of Biomedical Research*, 24.1 (2010), 16–25 <[https://doi.org/10.1016/S1674-8301\(10\)60004-8](https://doi.org/10.1016/S1674-8301(10)60004-8)>
137. Muzaffar, Faizi, U K Singh, and Lalit Chauhan, 'REVIEW ON MICROEMULSION AS FUTURISTIC DRUG DELIVERY', 5.3, 15
138. **Naqvi, Saba, Mohammad Samim, MZAbdin, Farhan Jalees Ahmed, AN Maitra, CK Prashant, and others**, 'Concentration-Dependent Toxicity of Iron Oxide Nanoparticles Mediated by Increased Oxidative Stress', *International Journal of Nanomedicine*, 5 (2010), 983–89 <<https://doi.org/10.2147/IJN.S13244>>
139. **Nasti, Alessandro, Noha M. Zaki, Piero de Leonardis, SuwipaUngphaiboon, ProramateSansongsak, Maria Grazia Rimoli, and others**, 'Chitosan/TPP and Chitosan/TPP-Hyaluronic Acid Nanoparticles: Systematic Optimisation of the Preparative Process and Preliminary Biological Evaluation', *Pharmaceutical Research*, 26.8 (2009), 1918–30 <<https://doi.org/10.1007/s11095-009-9908-0>>
140. **Nazzal, S., I. I. Smalyukh, O. D. Lavrentovich, and Mansoor A. Khan**, 'Preparation and *in Vitro* Characterization of a Eutectic Based Semisolid Self-Nanoemulsified Drug Delivery System (SNEDDS) of Ubiquinone: Mechanism and Progress of Emulsion Formation', *International Journal of Pharmaceutics*, 235.1–2 (2002), 247–65 <[https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(02\)00003-0](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(02)00003-0)>
141. **Newman, Kimberley D., Praveen Elamanchili, Glen S. Kwon, and John Samuel**, 'Uptake of Poly(D,L-Lactic-Co-Glycolic Acid) Microspheres by Antigen-Presenting Cells *in Vivo*', *Journal of Biomedical Materials Research*, 60.3 (2002), 480–86 <<https://doi.org/10.1002/jbm.10019>>
142. **Nicolete, Roberto, Daiane F. dos Santos, and Lúcia H. Faccioli**, 'The Uptake of PLGA Micro or Nanoparticles by Macrophages Provokes Distinct *in Vitro* Inflammatory Response', *International Immunopharmacology*, The role of Toll-like receptors in diseases, 11.10 (2011), 1557–63 <<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.05.014>>
143. **Nielsen, H. B., and B. K. Pedersen**, 'Lymphocyte Proliferation in Response to Exercise', *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 75.5 (1997), 375–79 <<https://doi.org/10.1007/s004210050175>>

144. **Nikalje, Anna Pratima**, 'Nanotechnology and Its Applications in Medicine', *Medicinal Chemistry*, 5.2 (2015) <<https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000247>>
145. **Nikolova, M., R. Slavchov, and G. Nikolova**, 'Nanotechnology in Medicine', in *Drug Discovery and Evaluation: Methods in Clinical Pharmacology*, ed. by Franz J. Hock and Michael R. Gralinski (Cham: Springer International Publishing, 2018), pp. 1–14 <[https://doi.org/10.1007/978-3-319-56637-5\\_45-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-56637-5_45-1)>
146. **O'Hagan, Derek T., Gary S. Ott, Gary Van Nest, RinoRappuoli, and Giuseppe Del Giudice**, 'The History of MF59<sup>®</sup> Adjuvant: A Phoenix That Arose from the Ashes', *Expert Review of Vaccines*, 12.1 (2013), 13–30 <<https://doi.org/10.1586/erv.12.140>>
147. **Oryan, A.**, 'Plant-Derived Compounds in Treatment of Leishmaniasis', *Iranian Journal of Veterinary Research*, 16.1 (2015), 1–19
148. **Panagi, Z., A. Beletsi, G. Evangelatos, E. Livaniou, D. S. Ithakissios, and K. Avgoustakis**, 'Effect of Dose on the Biodistribution and Pharmacokinetics of PLGA and PLGA-MPEG Nanoparticles', *International Journal of Pharmaceutics*, 221.1–2 (2001), 143–52 <[https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(01\)00676-7](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(01)00676-7)>
149. **Patel, Ashok R., and Pradeep R. Vavia**, 'Preparation and *in Vivo* Evaluation of SMEDDS (Self-Microemulsifying Drug Delivery System) Containing Fenofibrate', *The AAPS Journal*, 9.3 (2007), E344–52 <<https://doi.org/10.1208/aapsj0903041>>
150. **Pati, Rashmirekha, Maxim Shevtsov, and AvinashSonawane**, 'Nanoparticle Vaccines Against Infectious Diseases', *Frontiers in Immunology*, 9 (2018) <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02224>>
151. **Perez, Jose E., NoufAlsharif, Aldo I. Martínez-Banderas, Basmah Othman, JasmeenMerzaban, Timothy Ravasi, and others**, 'Review of *In Vitro* Toxicity of Nanoparticles and Nanorods—Part 2', *Cytotoxicity*, 2018 <<https://doi.org/10.5772/intechopen.78616>>
152. **Podinovskaia, Maria, and Albert Descoteaux**, 'Leishmania and the Macrophage: A Multifaceted Interaction', *Future Microbiology*, 10.1 (2015), 111–29 <<https://doi.org/10.2217/fmb.14.103>>
153. **Porter, Christopher J. H., Colin W. Pouton, Jean F. Cuine, and William N. Charman**, 'Enhancing Intestinal Drug Solubilisation Using Lipid-Based Delivery Systems', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60.6 (2008), 673–91 <<https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.10.014>>
154. **Purcell, Anthony W., James McCluskey, and Jamie Rossjohn**, 'More than One Reason to Rethink the Use of Peptides in Vaccine Design', *Nature Reviews Drug Discovery*, 6.5 (2007), 404–14 <<https://doi.org/10.1038/nrd2224>>
155. **Raman, Vanitha S., Malcolm S. Duthie, Christopher B. Fox, Greg Matlashewski, and Steven G. Reed**, 'Adjuvants for Leishmania Vaccines: From Models to Clinical Application', *Frontiers in Immunology*, 3 (2012) <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00144>>
156. **Ramot, Yuval, and Abraham Zlotogorski**, 'Multilesional Cutaneous Leishmaniasis', *CMAJ*, 188.14 (2016), 1034–1034 <<https://doi.org/10.1503/cmaj.151115>>
157. **Ready, P. D.**, 'Leishmaniasis Emergence in Europe', *Eurosurveillance*, 15.10 (2010), 19505 <<https://doi.org/10.2807/ese.15.10.19505-en>>
158. **Rehman, Fiza Ur, Kifayat Ullah Shah, Shefaat Ullah Shah, Ikram Ullah Khan, Gul Majid Khan, and Amjad Khan**, 'From Nanoemulsions to Self-Nanoemulsions, with Recent Advances in Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems (SNEDDS)', *Expert Opinion on Drug Delivery*, 14.11 (2017), 1325–40 <<https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1218462>>
159. **Reithinger, Richard, Jean-Claude Dujardin, HechmiLouzir, Claude Pirmez, Bruce Alexander, and Simon Brooker**, 'Cutaneous Leishmaniasis', *The Lancet. Infectious Diseases*, 7.9 (2007), 581–96 <[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70209-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70209-8)>

160. **Ribeiro, Patrícia A. F., Daniel S. Dias, Daniela P. Lage, Lourena E. Costa, Beatriz C. S. Salles, Bethina T. Steiner, and others**, 'A Conserved Leishmania Hypothetical Protein Evaluated for the Serodiagnosis of Canine and Human Visceral and Tegumentary Leishmaniasis, as Well as a Serological Marker for the Posttreatment Patient Follow-Up', *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 92.3 (2018), 196–203 <<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.05.026>>
161. **Ribeiro, Patrícia A. F., Daniel S. Dias, Daniela P. Lage, Vívian T. Martins, Lourena E. Costa, Thaís T. O. Santos, and others**, 'Immunogenicity and Protective Efficacy of a New Leishmania Hypothetical Protein Applied as a DNA Vaccine or in a Recombinant Form against Leishmania Infantum Infection', *Molecular Immunology*, 106 (2019), 108–18 <<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.12.025>>
162. **Riese, Peggy, Kai Schulze, Thomas Ebensen, Blair Prochnow, and Carlos A. Guzmán**, 'Vaccine Adjuvants: Key Tools for Innovative Vaccine Design', *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13.20 (2013), 2562–80 <<https://doi.org/10.2174/15680266113136660183>>
163. **Rock, Kenneth L., Eric Reits, and Jacques Neefjes**, 'Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules', *Trends in Immunology*, 37.11 (2016), 724–37 <<https://doi.org/10.1016/j.it.2016.08.010>>
164. **Rogers, Matthew Edward, Karina Corware, Ingrid Müller, and Paul Andrew Bates**, 'Leishmania Infantum Proteophosphoglycans Regurgitated by the Bite of Its Natural Sand Fly Vector, Lutzomyia Longipalpis, Promote Parasite Establishment in Mouse Skin and Skin-Distant Tissues', *Microbes and Infection*, 12.11 (2010), 875–79 <<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.05.014>>
165. **Rogers ME1, Corware K, Müller I, Bates PA.**, 'Leishmania Infantum Proteophosphoglycans Regurgitated by the Bite of Its Natural Sand Fly Vector, Lutzomyia Longipalpis, Promote Parasite Establish... - PubMed - NCBI', 2010 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20561596>> [accessed 30 March 2020]
166. **Saleem, Kiran, Zainab Khursheed, Christophe Hano, Iram Anjum, and Sumaira Anjum**, 'Applications of Nanomaterials in Leishmaniasis: A Focus on Recent Advances and Challenges', *Nanomaterials*, 9.12 (2019) <<https://doi.org/10.3390/nano9121749>>
167. **Sanna, Vanna, Elisabetta Gavini, Massimo Cossu, Giovanna Rassu, and Paolo Giunchedi**, 'Solid Lipid Nanoparticles (SLN) as Carriers for the Topical Delivery of Econazole Nitrate: In-Vitro Characterization, Ex-Vivo and in-Vivo Studies', *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59.8 (2007), 1057–64 <<https://doi.org/10.1211/jpp.59.8.0002>>
168. **Schuchat, Anne**, 'Human Vaccines and Their Importance to Public Health', *Procedia in Vaccinology*, International Workshop on Alternative Methods to Reduce, Refine, and Replace the Use of Animals in Vaccine Potency and Safety Testing: State of the Science and Future Directions, 5 (2011), 120–26 <<https://doi.org/10.1016/j.provac.2011.10.008>>
169. **Shinryuu, A**'96-Well Microtiter Plate Used in an MTT Assay. Each Column Was Incubated with Different Amounts of Culture Cells, Increasing from 500 Cells in Column 2 (Left) to 100.000 Cells in Column 11 (Right), for 72 Hours. After a Short Incubation with MTT, the Purple Formazan Product Was Extracted Using Dimethyl Sulfoxide. As Can Be Seen, Higher Amounts of Cells Result in Higher Formazan Production and Thus a Stronger Purple Colour., 2010, Own work <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MTT\\_Plate.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MTT_Plate.jpg)> [accessed 1 June 2020]
170. **Shokrzadeh, Mohammad, and Mona Modanloo**, 'An Overview of the Most Common Methods for Assessing Cell Viability', 2017 <<https://doi.org/10.24896/JRMDS.V5I2.278>>
171. **Shortman, Ken, and Yong-Jun Liu**, 'Mouse and Human Dendritic Cell Subtypes', *Nature Reviews Immunology*, 2.3 (2002), 151–61 <<https://doi.org/10.1038/nri746>>

172. **Siegrist, Claire-Anne**, '2 - Vaccine Immunology', in *Vaccines (Sixth Edition)*, ed. by Stanley A. Plotkin, Walter A. Orenstein, and Paul A. Offit (London: W.B. Saunders, 2013), pp. 14–32 <<https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0090-5.00004-5>>
173. **da Silva, R., and D. L. Sacks**, 'Metacyclogenesis Is a Major Determinant of Leishmania Promastigote Virulence and Attenuation', *Infection and Immunity*, 55.11 (1987), 2802–6
174. **Singh, R. K., H. P. Pandey, and S. Sundar**, 'Visceral Leishmaniasis (Kala-Azar): Challenges Ahead', *The Indian Journal of Medical Research*, 123.3 (2006), 331–44
175. **Singh, Raman Preet, and Poduri Ramarao**, 'Cellular Uptake, Intracellular Trafficking and Cytotoxicity of Silver Nanoparticles', *Toxicology Letters*, 213.2 (2012), 249–59 <<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.07.009>>
176. **Singh, Sandeep Kumar, Priya Ranjan Prasad Verma, and BalkishenRazdan**, 'Development and Characterization of a Lovastatin-Loaded Self-Microemulsifying Drug Delivery System', *Pharmaceutical Development and Technology*, 15.5 (2010), 469–83 <<https://doi.org/10.3109/10837450903286537>>
177. **Skoberne, Mojca, Anne-Sophie Beignon, and Nina Bhardwaj**, 'Danger Signals: A Time and Space Continuum', *Trends in Molecular Medicine*, 10.6 (2004), 251–57 <<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.04.001>>
178. **Soong, Lynn**, 'Modulation of Dendritic Cell Function by Leishmania Parasites', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180.7 (2008), 4355–60 <<https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4355>>
179. **Srivastava, Saumya, Prem Shankar, Jyotsna Mishra, and Sarman Singh**, 'Possibilities and Challenges for Developing a Successful Vaccine for Leishmaniasis', *Parasites & Vectors*, 9.1 (2016), 277 <<https://doi.org/10.1186/s13071-016-1553-y>>
180. **von Stebut, E., Y. Belkaid, T. Jakob, D. L. Sacks, and M. C. Udey**, 'Uptake of Leishmania Major Amastigotes Results in Activation and Interleukin 12 Release from Murine Skin-Derived Dendritic Cells: Implications for the Initiation of Anti-Leishmania Immunity', *The Journal of Experimental Medicine*, 188.8 (1998), 1547–52 <<https://doi.org/10.1084/jem.188.8.1547>>
181. **Steinman, Ralph M., and Jacques Banchereau**, 'Taking Dendritic Cells into Medicine', *Nature*, 449.7161 (2007), 419–26 <<https://doi.org/10.1038/nature06175>>
182. **Sunter, Jack, and Keith Gull**, 'Shape, Form, Function and Leishmania Pathogenicity: From Textbook Descriptions to Biological Understanding', *Open Biology*, 7.9 (2017) <<https://doi.org/10.1098/rsob.170165>>
183. **Sypek, J. P., C. L. Chung, S. E. Mayor, J. M. Subramanyam, S. J. Goldman, D. S. Sieburth, and others**, 'Resolution of Cutaneous Leishmaniasis: Interleukin 12 Initiates a Protective T Helper Type 1 Immune Response', *The Journal of Experimental Medicine*, 177.6 (1993), 1797–1802 <<https://doi.org/10.1084/jem.177.6.1797>>
184. **Szabo, S. J., S. T. Kim, G. L. Costa, X. Zhang, C. G. Fathman, and L. H. Glimcher**, 'A Novel Transcription Factor, T-Bet, Directs Th1 Lineage Commitment', *Cell*, 100.6 (2000), 655–69 <[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80702-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80702-3)>
185. **T, Liechtenstein, Dufait I, Bricogne C, Lanna A, Pen J, Breckpot K, and others**, 'PD-L1/PD-1 Co-Stimulation, a Brake for T Cell Activation and a T Cell Differentiation Signal.', *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, S12 (2012) <<https://doi.org/10.4172/2155-9899.s12-006>>
186. **Td, Fernández, Pearson Jr, Leal Mp, Torres Mj, Blanca M, Mayorga C, and others**, 'Intracellular Accumulation and Immunological Properties of Fluorescent Gold Nanoclusters in Human Dendritic Cells.', *Biomaterials*, 43 (2014), 1–12 <<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.11.045>>

187. **Ternynck, T., and S. Avrameas**, *Immunoenzymatic Techniques* (Amsterdam ; New York: Elsevier Science Ltd, 1990)
188. **Thoo, Lester, Mochamad Z Fahmi, Ihsan N Zulkipli, Natasha Keasberry, and Adi Idris**, 'Interaction and Cellular Uptake of Surface-Modified Carbon Dot Nanoparticles by J774.1 Macrophages', *Central-European Journal of Immunology*, 42.3 (2017), 324–30 <<https://doi.org/10.5114/ceji.2017.70978>>
189. **Tibúrcio, Rafael, Sara Nunes, Ivanéia Nunes, Mariana Rosa Ampuero, IcaroBonyek Silva, Reinan Lima, and others**, 'Molecular Aspects of Dendritic Cell Activation in Leishmaniasis: An Immunobiological View', *Frontiers in Immunology*, 10 (2019) <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00227>>
190. **Tomić, Sergej, Jelena Đokić, SašaVasilijić, Nina Ogrinc, Rebeka Rudolf, PrimožPelicon, and others**, 'Size-Dependent Effects of Gold Nanoparticles Uptake on Maturation and Antitumor Functions of Human Dendritic Cells *In Vitro*', *PLOS ONE*, 9.5 (2014), e96584<<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096584>>
191. **Tonigold, Manuel, and Volker Mailänder**, 'Endocytosis and Intracellular Processing of Nanoparticles in Dendritic Cells: Routes to Effective Immunonanomedicines', *Nanomedicine*, 11.20 (2016), 2625–30 <<https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0195>>
192. **Torres-Guerrero, Edoardo, Marco Romano Quintanilla-Cedillo, Julieta Ruiz-Esmenjaud, and Roberto Arenas**, 'Leishmaniasis: A Review', *F1000Research*, 6 (2017) <<https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>>
193. **Tran, Thuy, Xi Xi, Thomas Rades, and Anette Müllertz**, 'Formulation and Characterization of Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems Containing Monoacyl Phosphatidylcholine', *International Journal of Pharmaceutics*, 502.1–2 (2016), 151–60 <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.02.026>>
194. **Tz, Chang, Stadmiller Ss, Staskevicius E, and Champion Ja**, 'Effects of Ovalbumin Protein Nanoparticle Vaccine Size and Coating on Dendritic Cell Processing.', *Biomaterials Science*, 5.2 (2017), 223–33 <<https://doi.org/10.1039/c6bm00500d>>
195. **Van Assche, Tim, MaartjeDeschacht, Raquel A. Inocêncio da Luz, Louis Maes, and Paul Cos**, 'Leishmania-Macrophage Interactions: Insights into the Redox Biology', *Free Radical Biology & Medicine*, 51.2 (2011), 337–51 <<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.011>>
196. **Vaughan, Joshua C., Graham T. Dempsey, Eileen Sun, and Xiaowei Zhuang**, 'Phosphine-Quenching of Cyanine Dyes as a Versatile Tool for Fluorescence Microscopy', *Journal of the American Chemical Society*, 135.4 (2013), 1197–1200 <<https://doi.org/10.1021/ja3105279>>
197. **Vetter, Volker, GülhanDenizer, Leonard R. Friedland, Jyothsna Krishnan, and Marla Shapiro**, 'Understanding Modern-Day Vaccines: What You Need to Know', *Annals of Medicine*, 50.2 (2018), 110–20 <<https://doi.org/10.1080/07853890.2017.1407035>>
198. **Villar, Ana Maria Sierra, Beatriz ClaresNaveros, Ana Cristina CalpenaCampmany, Monserrat ArózteguiTrenchs, Coloma BarbéRocabert, and LydaHalbautBellowa**, 'Design and Optimization of Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems (SNEDDS) for Enhanced Dissolution of Gemfibrozil', *International Journal of Pharmaceutics*, 431.1–2 (2012), 161–75 <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.04.001>>
199. **Walkey, Carl D., Jonathan B. Olsen, Hongbo Guo, Andrew Emili, and Warren C. W. Chan**, 'Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake', *Journal of the American Chemical Society*, 134.4 (2012), 2139–47 <<https://doi.org/10.1021/ja2084338>>

200. **Walther, Stefanie, Tamara V. Rusitzka, Ulrike S. Diesterbeck, and Claus-Peter Czerny**, 'Equine Immunoglobulins and Organization of Immunoglobulin Genes', *Developmental and Comparative Immunology*, 53.2 (2015), 303–19 <<https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.07.017>>
201. **Wang, Zhiyuan, Jin Sun, Yongjun Wang, Xiaohong Liu, Yanhua Liu, Qiang Fu, and others**, 'Solid Self-Emulsifying Nitrendipine Pellets: Preparation and *in Vitro/in Vivo* Evaluation', *International Journal of Pharmaceutics*, 383.1–2 (2010), 1–6 <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.08.014>>
202. **Weissleder, Ralph, Matthias Nahrendorf, and Mikael J. Pittet**, 'Imaging Macrophages with Nanoparticles', *Nature Materials*, 13.2 (2014), 125–38 <<https://doi.org/10.1038/nmat3780>>
203. **Wilson-Welder, Jennifer H., Maria P. Torres, Matt J. Kipper, Surya K. Mallapragada, Michael J. Wannemuehler, and Balaji Narasimhan**, 'Vaccine Adjuvants: Current Challenges and Future Approaches', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98.4 (2009), 1278–1316 <<https://doi.org/10.1002/jps.21523>>
204. **Yang, Ying, Christopher Marshall-Breton, Martin E. Leser, Alexander A. Sher, and David Julian McClements**, 'Fabrication of Ultrafine Edible Emulsions: Comparison of High-Energy and Low-Energy Homogenization Methods', *Food Hydrocolloids*, 29.2 (2012), 398–406 <<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.04.009>>
205. **Yoshida, Mutsumi, Jessica Mata, and Julia E. Babensee**, 'Effect of Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Contact on Maturation of Murine Bone Marrow-Derived Dendritic Cells', *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 80.1 (2007), 7–12 <<https://doi.org/10.1002/jbm.a.30832>>
206. **Yue, Hua, Wei Wei, Zhanguo Yue, Piping Lv, Lianyan Wang, Guanghui Ma, and others**, 'Particle Size Affects the Cellular Response in Macrophages', *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41.5 (2010), 650–57 <<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.09.006>>
207. **Zhang, Jinjie, Qiang Peng, Sanjun Shi, Qiang Zhang, Xun Sun, Tao Gong, and others**, 'Preparation, Characterization, and *in Vivo* Evaluation of a Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) Loaded with Morin-Phospholipid Complex', *International Journal of Nanomedicine*, 6 (2011), 3405–14 <<https://doi.org/10.2147/IJN.S25824>>
208. **Zheng, W., and R. A. Flavell**, 'The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells', *Cell*, 89.4 (1997), 587–96 <[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80240-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80240-8)>
209. **Zupančič, Ožbej, Alexandra Partenhauser, Hung Thanh Lam, Julia Rohrer, and Andreas Bernkop-Schnürch**, 'Development and *in Vitro* Characterisation of an Oral Self-Emulsifying Delivery System for Daptomycin', *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 81 (2016), 129–36 <<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.10.005>>
210. **Αθανασίου, Ευανθία-Βαρβάρα**, 'Έλεγχος απόδοσης συστημάτων μεταφοράς αντιγόνων: κυτταρική στόχευση και λειτουργική διαφοροποίηση' (unpublished Διδακτορική Διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ). Σχολή Πολυτεχνική. Τμήμα Χημικών Μηχανικών. Τομέας Ανάλυσης Σχεδιασμού και Ρύθμισης των Χημικών Διεργασιών και Εγκαταστάσεων, 2015) <<http://hdl.handle.net/10442/hedi/36987>> [accessed 20 November 2019]
211. **Βογιατζάκη, Δρ Χρυσάνθη**, 'ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΗΣ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ - Ppt Κατέβασμα', 2020 <<https://slideplayer.gr/slide/15735981/>> [accessed 1 June 2020]

«Δηλώνω ρητά ότι το κείμενο το κείμενα της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας, δεν αποτελεί προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον».