

تهیه و ارزیابی ویژگی‌های نانوذرات پلی‌لاکتیک-کو-گلیکولیک اسید حامل عصاره سلول توموری و Poly-IC و بررسی اثرات خد توموری آن در مدل موشی سرطان پستان

ساناز شیخزاده^۱, نوروز دلیر^{۲*}, رحیم حب نقی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۵/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۲۰

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: ایمونوتراپی سرطان علیرغم مزایای فراوان آن، همچنان با چالش‌های متعددی مواجه است. نانوذرات، سیستم‌های تحويل دارویی هستند که احتمالاً بتوانند بر این چالش‌ها غلبه کنند. هدف از پژوهش حاضر، تولید واکسن نانوذرات حاوی عصاره سلول توموری و Poly-IC با خصوصیات مطلوب و بررسی اثرات نانوذرات حاصل در درمان سرطان پستان در مدل موشی می‌باشد.

مواد و روش کار: نانوذرات با استفاده از روش امولسیون دوگانه-تبخیرحلال و پلی‌وینیل‌الکل به عنوان سورفاکtant تهیه شدند. اثرات وزن مولکولی و درصد هیدروولیز سورفاکtant، بر روی اندازه ذرات، شاخص پراکنده‌گی، کارایی انکپسولاسیون و درصد سورفاکtant باقیمانده مورد بررسی قرار گرفت. به منظور القاء تومور پستان در موش‌ها از رده سلولی 4T1 استفاده شد. جهت ارزیابی اثربخشی واکسن، میزان رشد تومور، فعالیت تکثیری سلول‌های طحالی به روش MTT و پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری (DTH) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از پلی‌وینیل‌الکل با وزن مولکولی ۱۳–۲۳ کیلو دالتون و درصد هیدروولیز ۸۷–۸۹ درصد باعث تولید نانوذرات با ویژگی‌های مطلوب می‌شود. اگرچه تزریق نانوذرات حاوی عصاره سلول توموری با یا بدون Poly-IC به موش‌های مبتلا به تومور باعث کاهش معنی‌دار رشد تومور، افزایش میزان تکثیر لنفوسيت‌های طحالی و افزایش پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری در این دو گروه شد. اما این تغییرات در گروه دریافت‌کننده نانوذرات حاوی عصاره سلول توموری با Poly-IC بیشتر بود.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج حاصل نشان داد که انکپسولاسیون همزمان عصاره سلول توموری و Poly-IC در یک نانوذره، با توجه به اثرات IC-Poly بر روی بلوغ و عملکرد سلول‌های دندریتیک، باعث تقویت پاسخ‌های ایمنی ضدتوموری شده و می‌تواند به عنوان یک راهکار درمانی مؤثر در درمان سرطان پستان مطرح شود.

کلیدواژه‌ها: نانوذرات، پلی‌وینیل‌الکل، ایمونوتراپی، سرطان پستان، عصاره سلول توموری، Poly-IC

مجله پژوهشی ارومیه، دوره بیست و نهم، شماره هشتم، ص ۵۶۹-۵۸۴، آبان ۱۳۹۷

آدرس مکاتبه: ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروبیولوژی، تلفن: ۰۴۴۳۲۷۷۹۵۵۲

Email: n.delirezh@urmia.ac.ir

مقدمه

سرطان پستان، علت اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در زنان می‌باشد. به طوری که سالیانه، بیش از ۵۰۰۰ زن در سراسر جهان در اثر ابتلا به این بیماری از دنیا می‌روند (۱). روش‌های معمول درمان سرطان از جمله شیمی‌درمانی، نه تنها سلول‌های توموری، بلکه همه سلول‌های در حال تقسیم و تکثیر سریع را بدون هیچ‌گونه تمایزی هدف قرار می‌دهند و درنتیجه بیماران سرطانی اغلب از

^۱ دانشجوی دکتری ایمنی شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

^۲ دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

^۳ دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

اختصاصی آنتی‌زن، که واسطه‌های مهم ضد توموری هستند، می‌شود.^(۹)

PRR (Toll Like Receptor) سنسورهای اولیه سیستم ایمنی ذاتی در شناسایی پاتوزن‌های میکروبی عمل می‌کنند. فعال شدن TLR ها منجر به تحریک بلوغ و فعال شدن سلول‌های دندریتیک با افزایش بیان مولکول‌های کمک محرك CD40- CD86- MHC CD40- CD86 و عرضه بسیار مؤثرتر آنتی‌زن می‌شود^(۱۰). انکپسولاسیون لیگاندهای TLR در نانوذرات، امکان استفاده از دوزهای بسیار کم لیگاند، محدود شدن فعال کردن غیراختصاصی سیستم ایمنی، کاهش سمیت ناشی از مصرف سیستمیک این ترکیبات و از طرف دیگر افزایش جذب توسط سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌زن را منجر می‌شود^(۱۱، ۱۲). مطالعات اخیر نشان داده که انکپسولاسیون همزمان آنتی‌زن توموری و ادجوانی در یک نانوذره باعث ایجاد اثرات سینرژیستیک در تقویت ایمنی با هدف قرار دادن هر دو آنتی‌زن و ادجوانیت به داخل اجزای اندوزومال سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌زن می‌شود^(۱۳).

استفاده از پروتئین‌ها از جمله عصاره سلول توموری به عنوان عوامل درمانی، به دلیل وزن مولکولی بالا، حساسیت آن‌ها به شرایط محیطی و تخریب در طول آماده‌سازی، ذخیره‌سازی و انتشار چالش برانگیز است^(۱۵). که همین ویژگی‌ها، باعث کاهش حق انتخاب روش کپسوله کردن پروتئین‌ها شده است. روش امولسیون دوگانه-تبخیر حلال از معمول ترین روش‌ها برای تهیه نانوذرات حاوی پروتئین می‌باشد^(۱۶). از طرفی در میان پلیمرهای مختلفی که برای ساخت نانوذرات طراحی شده‌اند، پلی‌لactیک-کو-گلیکولیک اسید (PLGA)^(۱) به دلیل خواص جذاب آن، از جمله زیست تخریب پذیری و زیست سازگاری، حفاظت دارو از تخریب توسط آنزیم‌های پروتولیتیک، امکان رهایش مداوم و پایدار و از همه مهم‌تر دارا بودن تاییدیه سازمان غذا و دارو^۲ و اداره پزشکی اروپا^۳ در سیستم‌های تحویل دارو برای استفاده تزریقی، توجه قابل ملاحظه‌ای را به خود جلب کرده است^(۱۷).

با توجه به مطالعات صورت گرفته، تولید ذرات با اندازه مطلوب و توزیع اندازه یکنواخت یک پارامتر بسیار مهم برای فرمولاسیون

به تحقیق در زمینه واکسن‌های سلطانی مختلف از جمله آنتی‌زن‌های خالص‌سازی شده، پیتیدهای سنتزی با توالی مشخص، ویروس‌های نوترکیب کدکننده آنتی‌زن‌های توموری، استخراج RNA مشتق از سلول‌های توموری و همچنین استفاده از سلول‌های کل توموری پرداخته‌اند^(۴، ۳). سلول‌های کل توموری درواقع تمام آنتی‌زن‌های اختصاصی (Tumor Specific Antigen) و آنتی‌زن‌های همراه تومور (Tumor Associated Antigen) شناخته‌شده و ناشناخته را برای عرضه همزمان به هر دو نوع سلول‌های T CD4+ و T CD8+ بیان می‌کنند و باعث گسترش مخزنی از کلون‌های سلول‌های T اختصاصی آنتی‌زن‌های توموری برای فعال شدن می‌شوند و درنتیجه احتمال فرار ایمنی توسط تومور را کاهش می‌دهند^(۴، ۵). یکی از روش‌های استفاده از کل آنتی‌زن‌های همراه توموری، تهیه عصاره سلول‌های توموری می‌باشد. واکسیناسیون با عصاره سلول توموری نیاز به شناسایی و تخلیص آنتی‌زن‌های توموری منفرد، قبل از شروع درمان را رفع کرده و باعث کاهش زمان بین تشخیص تومور و درمان می‌شود.

سلول‌های دندریتیک به عنوان آغازگر و تنظیم‌کننده قوی پاسخ‌های ایمنی اختصاصی و خاطره‌ای ضد آنتی‌زن‌های توموری فعالیت می‌کنند. با توجه به نقش مهم این سلول‌ها، توجه خاصی به استفاده از آن‌ها در ایمونوتراپی تومور معطوف شده است^(۶). یکی از استراتژی‌هایی که به فراوانی موردمطالعه قرار گرفته است، جداسازی پیش‌سازهای سلول‌های دندریتیک و سپس تمایز آن‌ها به سلول‌های دندریتیک پالس شده با آنتی‌زن‌های توموری در محیط آزمایشگاه و تزریق مجدد به بدن بیمار است^(۷). اما از محدودیت‌های این روش، سختی و پرهزینه بودن مراحل کشت سلول‌های دندریتیک اتو لوگ می‌باشد. یک روش جایگزین، که کمتر موربدرسی قرار گرفته است و مستقل از مراحل کشت سلولی در محیط خارج از بدن است، استفاده از نانو و میکرونذرات زیست سازگار به عنوان حامل آنتی‌زن‌های توموری، جهت عرضه مستقیم به سلول‌های دندریتیک در داخل بدن می‌باشد^(۸). این روش در عین حال راهکاری برای غلبه بر نواقص استفاده از عصاره سلول توموری به صورت محلول نیز می‌باشد. در حقیقت قرار دادن عصاره توموری درون نانوذرات پلیمری زیست تخریب پذیر نه تنها باعث افزایش ایمنی زایی فرم انکپسوله شده در مقایسه با فرم محلول، به دلیل حضور طولانی مدت مواد آنتی‌زنیک می‌شود، بلکه باعث افزایش جذب و عرضه متقاطع عصاره توموری توسط سلول‌های دندریتیک می‌زبان شده و درنتیجه باعث القاء قوی سلول‌های TCD8+ می‌شوند.

¹ Poly(lactic-co-glycolic acid)

² Food and Drug Administration

³ European Medicine Agency

(Phosphate Buffered Saline) از شرکت Gibco (آلمان) خردباری شد. PLGA، انواع پلیوبنیلالکل مورد استفاده، (Bovine Serum Albumin) BSA دیکلرومتان، MTT (3-Polyinosinic-Polycytidylic acid (Poly-IC) و (4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه شد.

کشت و تکثیر رده سلولی سرطان پستان موشی 4T1:
رده سلولی سرطان پستان موشی (4T1) از بانک سلولی انسنتیوتپاستور تهران خردباری شد. بعد از دفریز کردن سلول‌ها در محیط کشت 1640 RPMI حاوی ۱۰٪ FBS و ۱۰۰ IU/mL پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/mL استرپتومایسین تحت شرایط استاندارد کشت در انکوباتور محتوى ۵ درصد دی اکسید کربن، ۹۵ درصد رطوبت و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.

تهیه عصاره سلول‌های توموری:

سلول‌های رده سلولی 4T1 بعد از کشت و جداسازی توسط Trypsin/EDTA، با PBS شستشو شده و بهمنظور به حداکثر رساندن رهایش آنتی‌زن‌های پروتئینی از سلول‌ها و درنتیجه افزایش غلاظت عصاره مورد استفاده برای انکپسولاسیون، در PBS سرد حل شدند. برای رفع نیاز به مهارکننده‌های پروتئاز اضافی (سیتوتوکسیک)، محلول‌های سلولی قبل و در طول پروسه تهیه عصاره بر روی بخ نگهداری شدند. بهمنظور تهیه عصاره، سلول‌های توموری تحت ۴ مرتبه انجماد در نیتروژن مایع و ذوب مجدد در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد بطور متناوب قرار گرفتند و سپس با دستگاه سونیکاتور به مدت ۱۵ ثانیه بهمنظور شکستن غشای سلولی سونیک شدند. در تمام موارد، مرگ و لیز شدن سلول‌ها توسط رنگ آمیزی با تریپان بلو و لام هموسیتومتر تایید شد. پس از حذف ذرات بزرگ توسط سانتریفیوز (g، ۲۰۰۰، ۱۳۰۰۰) به مدت ۶۰ دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سرعت ۸۰ میکرون استریل شد و تا زمان استفاده در دمای منفی ۲ درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. محتوا پروتئینی عصاره تهیه شده با روش برده‌فورد با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر و جذب در ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و غلاظت پروتئین با مقایسه جذب منحنی کالیبراسیون استاندارد از سرم آلبومین گاوی تعیین شد (۲۲).

سنتر نانوذرات PLGA:

نانوذرات PLGA با استفاده از روش امولسیون دوگانه-تبخیر حلال، آب/روغن/آب (W1/O/W2) روش سایز و همکاران

واکسن‌های تزریقی است. چرا که اندازه ذرات می‌تواند بطور مستقیم بر روی ثبات فیزیکی، جذب سلولی، انتشار بیولوژیکی نانوذرات و انتشار دارو از نانوذرات در داخل بدن تأثیر بگذارد (۱۶). روش‌های مختلفی برای کاهش سایز و یکنواختی نانوذرات تولیدی موردنرسی قرار گرفته است که یکی ازین روش‌ها استفاده از سورفاکتانت پلیوبنیلالکل می‌باشد. پلیوبنیلالکل^۴ (PVA) یک پلیمر مصنوعی محلول در آب است که بطور گستره‌ای برای ساخت نانوذرات پلیمری ازجمله PLGA مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۹). اثربخشی نانوذرات PLGA در جهت تحويل واکسن به سلول‌های دندربیتیک در مطالعات مختلفی نشان داده شده است (۲۰، ۱۳). اما اکثر این مطالعات به بررسی برونشیون (in vitro) پاسخ سلول‌های T ضد توموری پرداخته‌اند و مطالعات بسیار اندکی در زمینه استفاده از نانوذرات PLGA به عنوان حامل واکسن در شرایط درون تن (in vivo) به چشم می‌خورد. از طرف دیگر در اکثر این مطالعات به بررسی اثرات آنتی‌زن‌های توموری منفرد پرداخته شده است و در کمتر مطالعه‌ای از عصاره سلول توموری استفاده شده است (۲۱). همچنین انکپسولاسیون همزمان ادجوانات‌های محرك ایمنی به همراه آنتی‌زن‌های توموری در داخل یک نانوذره موضوعی است که به تازگی موردتوجه قرار گرفته است. به همین دلیل، در این پژوهش، به بررسی اثرات درمانی انکپسولاسیون همزمان عصاره سلول توموری 4T1 و ادجوانات Poly-IC درون نانوذرات PLGA بر روی مدل موشی سرطان پستان پرداخته شد که تاکنون موردنرسی قرار نگرفته است. بدین منظور اثر چهار نوع پلیوبنیلالکل با درجات مختلف هیدرولیز و وزن مولکولی بر روی آماده‌سازی نانوذرات و خصوصیات فیزیکی آن‌ها، جهت دست یافتن به بهترین پاسخها ازجمله اندازه ذرات کوچک با شخص پرآنگی یکنواخت و درعین حال بازده کپسولاسیون مناسب موردنرسی قرار گرفت. سپس با القاء تومور پستان در موش‌های BALB/c و اطمینان از ایجاد تومور قابل لمس، اقدام به درمان موش‌های مبتلا با عصاره سلول توموری و Poly IC به صورت محلول و فرم کپسوله شده در نانوذرات PLGA گردید و اثرات آن بر روی رشد تومور، میزان تکثیر لنفوسيت‌های طحالی و پاسخ ازدياد حساسیت تأخیری مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش کار

مواد:

FBS (Fetal Bovine Serum)، RPMI، PBS، Trypsin/EDTA، پنی‌سیلین، استرپتومایسین،

⁴ poly(vinyl alcohol)

ستجش پروتئین کوماسی بلو (بردفورد) مقدار پروتئین موجود در آن‌ها تعیین شد. کارایی انکپسولاسیون با استفاده از فرمول زیر به دست آمد (۲۲).

$$\text{کارایی} = \frac{\text{مقدار پروتئین انکپسوله شده}}{\text{مقدار پروتئین استفاده شده در تهیه نانوذرات انکپسولاسیون}} \times 100$$

تعیین درصد پلی‌وینیل الکل باقیمانده:

درصد پلی‌وینیل الکل باقیمانده در سطح نانوذرات با استفاده از روش رنگ سنجی که بر پایه تشکیل یک کمپلکس رنگی پایدار بین گروه هیدروکسیل پلی‌وینیل الکل و یک مولکول ید در حضور اسید بوریک می‌باشد، تعیین شد. بطور خلاصه، ۲ میلی‌گرم نمونه نانوذرات لیوفیلیزه شده از هر گروه در ۲ میلی‌لیتر محلول سدیم هیدروکسید ۰/۵ مولار به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد حل و هیدرولیز شدند. سپس هر نمونه با ۹۰۰ میکرومتر محلول هیدروکلریک اسید ۱ نرمال، خنثی شده و حجم محلول با آب مقطر به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. برای هر نمونه، ۳ میلی‌لیتر از محلول ۰/۶۵ مولار اسید بوریک، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول ید / پتاسیم یدید ۰/۰۵ مولار / ۰/۱۵ مولار) و ۱/۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. در نهایت، پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون، جذب نمونه‌ها در ۶۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-vis اندازه‌گیری شد و درصد پلی‌وینیل الکل باقیمانده با مقایسه جذب منحنی کالیبراسیون استاندارد محلول پلی‌وینیل الکل تحت شرایط مشابه محاسبه شد (۲۴).

حیوانات آزمایشگاهی مورد مطالعه:

این مطالعه از نوع مداخله‌ای تجربی بود که به صورت موردنی/شاهدی انجام شد. جامعه مورد مطالعه، شامل موش‌های ماده خالص ۲۰-۲۵ BALB/c با محدوده سنی ۶ تا ۸ هفتۀ با متوسط وزن ۵۵±۲ g بود که از انیستیتو پاستور ایران خریداری شده و پیش از شروع آزمایشات، جهت سازگاری موش‌ها با شرایط محیط، حداقل به مدت دو هفته در قفس‌های حیوان‌خانه پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه در محدوده دمایی ۲۲±۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۵±۵ درصد و برنامه نوری ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. شرایط نگهداری و نیز نحوه به دستگیری و کار کردن با موش‌ها براساس توصیه‌های قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی و معاهده هلسینکی انجام شد. کلیه مراحل این تحقیق در کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه ارومیه موردن تأیید قرار گرفت.

القای تومور پستان در موش c-BALB

این بخش از مطالعه به صورت تجربی-پژوهشی صورت گرفت. از رده سلولی سرطان پستان موشی 4T1 جهت القای تومور استفاده

با کمی تغییرات تولید شد. حاصل امولسیفیکاسیون یک محلول آلی پلیمری و یک محلول آبی، تشکیل قطرات کوچکی از پلیمر است که پس از خشک شدن به نانوذرات جامد تبدیل می‌شوند.

عصاره پروتئینی و IC به عنوان فاز آبی اول به محلول PLGA در دی‌کلرومتان (فاز آلی) اضافه شد. سپس توسط دستگاه اولتراسوند سونیکه شد تا امولسیون اولیه آب و روغن به دست آید. امولسیون به دست آمده به فاز آبی دوم که شامل محلول پلی‌وینیل الکل ۴ درصد است اضافه شد و مجدداً سونیکه شد. امولسیون ثانویه حاصل به محلول پلی‌وینیل الکل ۳/۰ درصد اضافه شد و به وسیله همزن مغناطیسی به مدت ۳ ساعت به منظور تبخیر دی‌کلرومتان همزده شد. محلول حاصل به منظور رسوب نانوذرات با سرعت ۰/۲۰۰۰۰ به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس نانوذرات حاصل، سه بار متوالی با آب دیونیزه شستشو شدند. پس از آخرین شستشو، نانوذرات به یک لوله منتقل و در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد منجمد شدند. نمونه‌های فریز شده به دستگاه فریزدرایر منتقل شده و بعد از خشک شدن نانوذرات، در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند (۲۳).

تعیین اندازه و شاخص پراکندگی ذرات:

اندازه و شاخص پراکندگی ذرات ساخته شده به روش تفرق نور پویا (Dynamic Light Scattering) (DLS) (Malvern instruments, Ltd) Zetasizer تمامی اندازه‌گیری‌ها در دمای اتاق و سه بار تکرار (n=3) انجام و نتایج به صورت mean±SD گزارش شد. اندازه‌گیری حرکت براونی ذرات در این روش، با استفاده از تابش پرتوهای نور مرئی از یک منبع نور از جنس نئون هلیوم با طول موج ۶۳۳ نانومتر و تجزیه و تحلیل نوسانات شدت نور متفرق شده در اثر برخورد پرتوهای نور با ذرات به دست آمد.

تعیین کارایی انکپسولاسیون:

مقدار پروتئین کپسوله شده در نانوذرات بر اساس میزان پروتئین استخراج شده از یک حجم ثابت نانوذرات محاسبه شد. ۵ میلی‌گرم از نانوذرات تهیه شده، در ۱ میلی‌لیتر محلول سدیم هیدروکسید ۱۰۰ میلی‌مولا، حاوی ۰/۰۵ مولار (W/v) مداوم نانوذرات دودسیل سولفات حل شد. نمونه‌ها به منظور تخریب کامل نانوذرات به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و تحت تحرک مداوم در یک انکوباتور متحرک قرار گرفتند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۰/۱۶۰۰۰ g به منظور رسوب ذرات احتمالی موجود در آن‌ها سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رویی جدا و با استفاده از روش

موشهایی بودند که عصاره سلول توموری پستان و Poly-IC به صورت محلول دریافت نمودند. گروه B شامل موشهایی بودند که واکسن نانوذرات PLGA حاوی عصاره سلول توموری پستان را دریافت نمودند. گروه C شامل موشهایی بودند که واکسن نانوذرات PLGA حاوی عصاره سلول توموری پستان و Poly-IC را دریافت نمودند. گروه D (گروه کنترل توموری) موش‌های این گروه تحت هیچ‌گونه تیماری قرار نگرفتند و فرآیند درمانی را هم‌زمان با سایر گروه‌ها فقط با دریافت PBS طی نمودند.

اندازه‌گیری حجم نهایی تومور در موشهای توموری:

بدین منظور حجم تومور، در دو جهت قطر بزرگ و کوچک اندازه‌گیری گردید و این عمل بصورت یک روز در میان تا انتهای کار با استفاده از کولیسیونی ورنیه صورت گرفت و سپس حجم تومور با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{قطر بزرگتر} = D \quad \text{قطر کوچکتر} = d \quad \text{Tumor volumes (mm}^3\text{)} = 0.5 \times d^2 \times D$$

تشکیل کریستال‌های فورمازون بتفش نامحلول انجام می‌گیرد. کریستال‌های فورمازونی که تشکیل می‌شوند قابل حل شدن هستند و جذب محلول رنگی حاصل می‌تواند با استفاده از الایزانگار به طور کمی بررسی شود.

بدین منظور پس از تهیه کشت سلول طحالی و به دنبال شمارش سلول‌ها، سوسپانسیونی حاوی 1×10^6 cell/ml تهیه شد و ۱۰۰ µl از آن در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ته تخت ریخته شد. برای هر نمونه سه تکرار در حضور $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ انتی‌زن اختصاصی تومور و سه تکرار در حضور $1 \text{ mg}/\text{ml}$ میتوژن فیتوهم‌ماگلوتینین به عنوان کنترل مثبت نظر گرفته شد. به عنوان کنترل منفی نیز در سه چاهک از محیط RPMI خالی استفاده شد. بعد از ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO₂ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به هر چاهک ۱ ml محلول MTT در $5 \text{ mg}/\text{ml}$ (PBS) افزوده شده و دوباره انکوباسیون به مدت ۴ ساعت ادامه یافت. در این مدت احیاء ماده MTT توسط سلول‌های زنده و در حال تکثیر سبب تشکیل کریستال‌های فورمازون گردید که با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به حالت محلول درآمد. سپس شدت رنگ در طول موج ۵۷۰ nm توسط الایزانگار تعیین و جذب سلول‌های تحریک شده به تحریک نشده به عنوان اندیکس تحریکی محاسبه گردید (۲۵).

بررسی میزان التهاب ناشی از (Delayed Type DTH) Hypersensitivity

ابتدا ۲۰ میکرولیتر آنتی‌زن توموری (تهیه شده از رده سلولی) در کف پای چپ و ۲۰ میکرولیتر PBS را در کف پای راست موشها تزریق نموده و سپس قطر التهاب ناحیه تزریق بعد از ۷۲ ساعت با

گردید. رده سلولی تومور پستان موش (4T1)، یک رده سلولی با قابلیت تهاجمی زیاد می‌باشد که از تومور خود بخودی ایجاد شده در موش BALB/c مشتق شده است و به عنوان یک مدل حیوانی مناسب برای سرطان پستان انسان در نظر گرفته می‌شود. بدین منظور 10^5 سلول توموری زنده محلول در $50 \mu\text{l}$ بافر PBS به صورت زیرجلدی در ناحیه پهلوی راست موش‌ها تزریق شد. موش‌ها روزانه از نظر وجود تومور قابل لمس معاینه شدند. ۱۴ روز پس از القاء تومور، به منظور ارزیابی اثربخشی واکسن تولیدی، اقدام به تجویز رژیم‌های درمانی در موش‌های مبتلا گردید. بدین منظور ۳۲ سر موش ماده بعد از القای تومور به صورت تصادفی در ۴ گروه ۸ تایی با شرایط سنی و وزنی یکسان و به ترتیب زیر تقسیم شدند و تحت دو بار تزریق زیرجلدی با فاصله دو هفتگی یکبار، در ناحیه مخالف رشد تومور یعنی پهلوی چپ قرار گرفتند. گروه A شامل

حجم نهایی تومور نیز با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\frac{\text{حجم تومور در روز پایان دوره درمانی}}{\text{حجم تومور در روز شروع درمان}} \times 100 = \text{حجم نهایی تومور}$$

تهیه کشت سلولی طحال:

۲۱ روز پس از آغاز درمان، طحال موش‌های مورد مطالعه پس از برداشت در شرایط استریل، در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ حاوی ۱۰ درصد FBS توسط پیستون سرنگ له شد. پس از برداشت کپسول طحال و بافت‌های اضافی، مایع باقیمانده از سل استرینر ۷۰ میکرومتر عبور داده شد تا جمعیت یک دست از سلول‌ها به دست آید. به منظور حذف گلbul‌های قرمز پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت 200 g ، ۵ میلی‌لیتر بافر لیزکنند گلbul‌های قرمز، بر روی رسوب سلولی به دست آمده افزوده شد. پس از ۵ دقیقه ضمن افزودن ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت بار دیگر به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت 200 g سانتریفیوژ گردید. سپس رسوب سلولی در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد به حالت سوسپانسیون درآورده شد.

بررسی میزان تکثیر سلول‌های ایمنی در تحریک با آنتی

MTT به روش

میزان تکثیر لنفوцит‌های طحالی توسط روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون MTT یک روش رنگ‌سنجی است که براساس احیا و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم با فرمول شیمیایی ۳-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-4-(4,5-dimethylthiazol-2yl)bromide) و سیله آنزیم سوکسینات دهیدروژنات و

تولید نانوذرات PLGA حاوی عصاره سلول توموری با استفاده از چهار نوع پلی وینیل الکل تجاری متفاوت از نظر وزن مولکولی و درصد هیدرولیز، شامل پلی وینیل الکل (A) با میانگین وزن مولکولی ۱۳-۲۳ کیلو دالتون و درصد هیدرولیز ۸۷-۸۹ درصد، پلی وینیل الکل (B) با میانگین وزن مولکولی ۳۱-۵۰ کیلو دالتون و درصد هیدرولیز ۳۱-۵۰ درصد، پلی وینیل الکل (C) با میانگین وزن مولکولی ۴۷-۸۹ درصد، پلی وینیل الکل (D) با میانگین وزن مولکولی ۹۸-۹۹ درصد و پلی وینیل الکل (D) با میانگین وزن مولکولی ۸۵-۱۲۴ کیلو دالتون و درصد هیدرولیز PVA (B)، PVA (A) و (C) درصد که به ترتیب تحت عنوان (A)، (B) و (D) مشخص شدند، مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در نمودار ۱ نشان داده شده است با افزایش وزن مولکولی و درصد هیدرولیز پلی وینیل الکل، مقدار امولسیفایر باقیمانده روی سطح نانوذرات بطور معنی داری افزایش یافت ($p<0.05$). به طوری که درصد پلی وینیل الکل باقیمانده در کمترین وزن مولکولی و درصد هیدرولیز (A) PVA از ۳۷/۵ درصد به ۱۱/۴ درصد در بیشترین وزن مولکولی و درصد هیدرولیز PVA(D) رسید.

استفاده از کولیس ورنیه اندازه گیری و میزان DTH با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

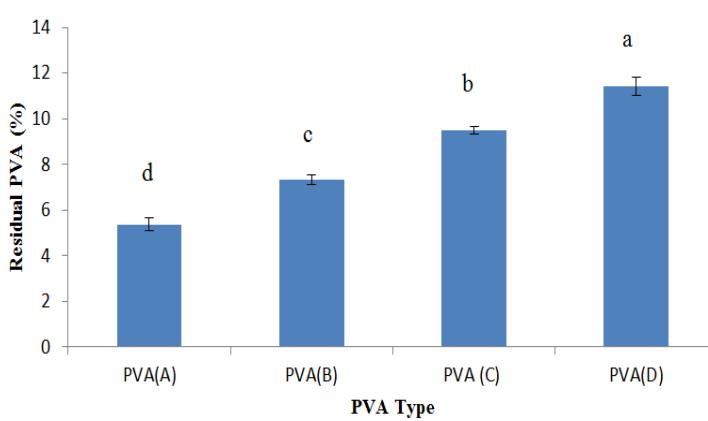
$$\text{DTH} = \frac{\text{قطر پای راست} - \text{قطر پای چپ}}{\text{قطر پای راست}}$$

آنالیز آماری:

جهت تجزیه و تحلیل داده ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA، نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ و آزمون Tukey استفاده گردید. تمامی داده ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش و حد معنی دار بودن $p<0.05$ در نظر گرفته شد. تمامی تست ها سه بار تکرار شدند.

یافته ها

اثرات وزن مولکولی و درصد هیدرولیز پلی وینیل الکل:



نمودار (۱): تأثیر انواع پلی وینیل الکل بر روی درصد پلی وینیل الکل باقیمانده بر سطح نانوذرات، حروف کوچک متفاوت نشان دهنده معنی داری در سطح $p<0.05$ می باشد.

وینیل الکل است ($p<0.001$). برای نمونه های PVA (A) و PVA (B)، (C) و PVA (D) اندازه ذرات به ترتیب ۲۹۱ ± ۲۹۱ ، ۱۶۵ ± ۱۶۵ و ۶۸۳ ± ۶۸۳ نانومتر بود. همانطور که مشاهده می شود کوچکترین اندازه ذرات با استفاده از پلی وینیل الکل با کمترین وزن مولکولی و درصد هیدرولیز (A)) PVA به دست آمد. شاخص پراکندگی، یک بیانیه واحد برای بررسی توزیع اندازه ذرات است و پارامتری بین عدد ۰ تا ۱ است و نشان دهنده میزان هموژن یا هتروژن بودن ذرات ساخته شده است. هر چه این شاخص

جدول ۱ اثرات وزن مولکولی و درصد هیدرولیز پلی وینیل الکل را به عنوان سورفاکتانت بر اندازه ذرات، شاخص پراکندگی و کارایی انکپسولاسیون نانوذرات تولید شده را نشان می دهد. همانطور که مشاهده می شود، علیرغم روش تھبیه یکسان، نانوذرات با توجه به نوع پلی وینیل الکل مورد استفاده، ویژگی های متفاوتی را نشان دادند. DLS اندازه ذرات و شاخص پراکندگی با استفاده از دستگاه تعیین شد. نتایج حاصل از آنالیز داده ها نشان داد که اندازه ذرات به دست آمده تحت تأثیر مستقیم وزن مولکولی و درصد هیدرولیز پلی

معنی داری وجود نداشت ($p < 0.05$). در حالت کلی، پلی وینیل الکل های با وزن مولکولی و درصد هیدرولیز پایین تر باعث تولید ذرات کوچک تر، شاخص پراکندگی همگن تر، ولی کارابی انکپسولاسیون کمتری نسبت به نانوذرات تهیه شده توسط پلی وینیل الکل های با وزن مولکولی و درصد هیدرولیز بالاتر شدند که البته این کاهش کارابی انکپسولاسیون از نظر آماری چندان معنی دار نبود. به همین دلیل (A)، با وزن مولکولی ۱۳-۲۳ کیلو دالتون و درصد هیدرولیز ۸۷-۸۹ درصد به عنوان بهترین نوع پلی وینیل الکل جهت ادامه آزمایشات انتخاب شد.

به عدد صفر نزدیکتر باشد، ذرات سنتری همگن تر می باشند. هنگامی که از (A) PVA برای تهیه نانوذرات استفاده شد، سیستم دارای ذرات همگن بیشتری در مقایسه با سایر پلی وینیل الکل های مورد استفاده بود و شاخص پراکندگی ذرات حدود ۰/۰۶ به دست آمد. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می شود وزن مولکولی و درصد هیدرولیز پلی وینیل الکل بر روی کارابی انکپسولاسیون نانوذرات تولیدی نیز تأثیر داشت و با افزایش وزن مولکولی و درصد هیدرولیز، کارابی انکپسولاسیون نانوذرات نیز افزایش یافت ($p < 0.05$). البته بین دو نمونه (A) PVA و (B) PVA اختلاف

جدول (۱): نتایج حاصل از تأثیر نوع پلی وینیل الکل بر روی خصوصیات نانوذرات

نوع پلی وینیل الکل	قطر متوسط ذرات (nm)	شاخص پراکندگی (%)	کارابی انکپسولاسیون
PVA(A)	^d ۳/۶۰ ± ۱۶۵/۶۰	^d D۰/۰۰۵ ± ۰/۰۶	^{cB} ۲/۰۶ ± ۸۲/۸۶
PVA(B)	^{cC} ۴/۴۱ ± ۲۹۱/۱۳	^{cC} ۰/۰۲ ± ۰/۱۵	^{cB} ۰/۷۵ ± ۸۵/۹۰
PVA(C)	^{bB} ۱۰/۶۸ ± ۴۰۲/۳۳	^{bB} ۰/۰۱ ± ۰/۲۴	^{bAB} ۱/۵۶ ± ۹۰/۷۳
PVA(D)	^{aA} ۴/۶۹ ± ۶۸۳/۴۶	^{aA} ۰/۰۱ ± ۰/۳۳	^{aA} ۱/۷۹ ± ۹۶/۱۳

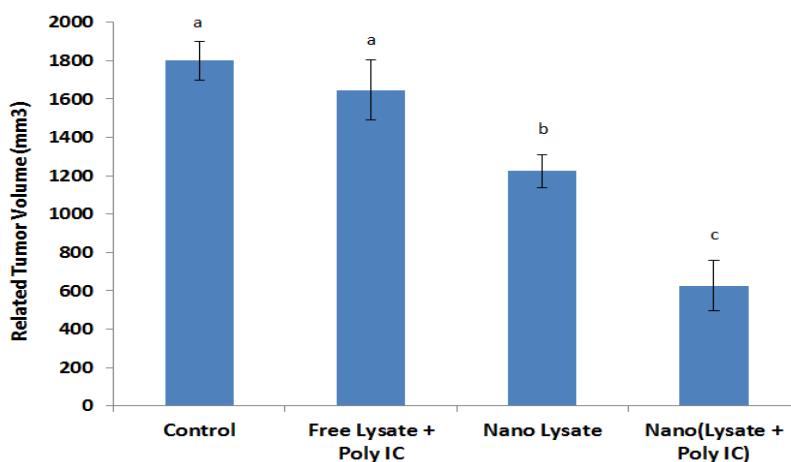
حرروف کوچک متفاوت نشان دهنده معنی داری در سطح $p < 0.05$ می باشد.

حرروف بزرگ متفاوت نشان دهنده معنی داری در سطح $p < 0.001$ می باشد.

نظر آماری معنی دار نبود. اما در گروه های دریافت کننده نانوذرات حاوی عصاره با یا بدون Poly IC از نظر آماری با گروه کنترل معنی دار بود ($p < 0.05$) که این کاهش در گروه دریافت کننده نانوذرات حاوی عصاره توموری به همراه Poly IC نسبت به سه گروه دیگر بیشتر بود (نمودار ۲).

نتایج تأثیر واکسن بر حجم تومور:

مقایسه تغییرات رشد تومور در بین گروه های مختلف، حاکی از کاهش روند رشد تومور در گروه های درمانی نسبت به گروه کنترل می باشد. البته این کاهش در گروه موش های ایمن شده با عصاره سلول توموری و Poly IC به فرم محلول نسبت به گروه کنترل از

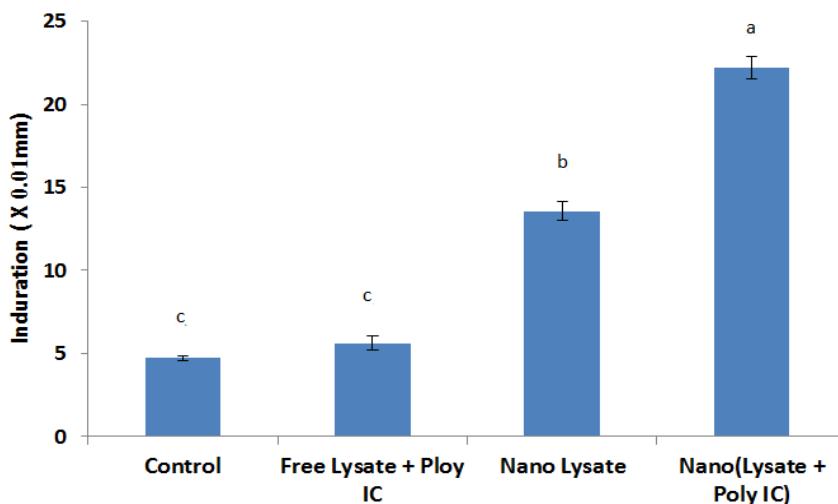


نمودار (۲): مقایسه حجم نهایی تومور در گروه های مختلف

حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح $p<0.05$ می‌باشد.

بررسی میزان التهاب ناشی از DTH:

واکنش مثبت آزمون پوستی، نشان‌دهنده وجود جمعیت حساسی از سلول‌های Th1 می‌باشد. طبق نتایج بدست آمده، التهاب و تورم در گروه‌های دریافت کننده نانوذرات بیشتر از دو گروه کنترل و گروه دریافت کننده عصاره و Poly IC به فرم محلول بود ($p<0.05$). اما بیشترین میزان افزایش، در گروهی بدست آمد که نانوذرات حاوی عصاره سلول توموری به همراه Poly IC را دریافت کرده بودند (نمودار ۳).



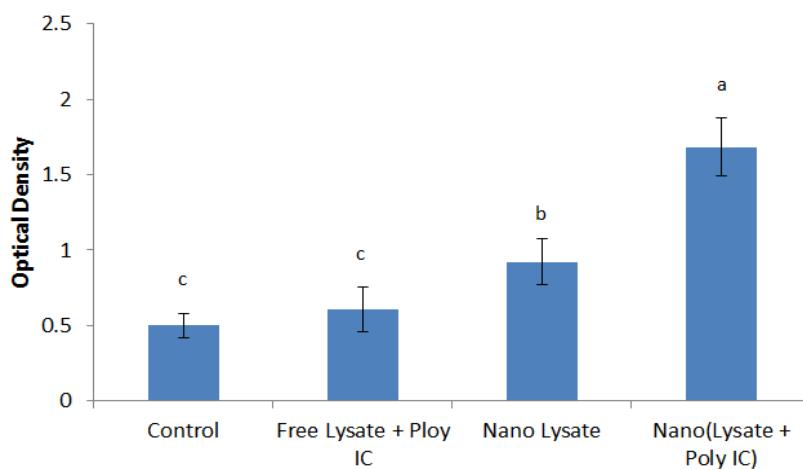
نمودار (۳): مقایسه پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری حاصل از تزریق آنتی ژن توموری پس از ۷۲ ساعت

حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح $p<0.05$ می‌باشد.

دریافت کننده عصاره و Poly IC به صورت محلول و گروه کنترل توموری بود ($p<0.05$). البته این افزایش در گروه دریافت کننده نانوذرات حاوی عصاره سلول توموری به همراه Poly IC بسیار بیشتر از سایر گروه‌ها بود.

بررسی میزان تکثیر لنفوسيت‌های طحالی به روش MTT:

نتایج آزمون MTT حاکی از افزایش معنی‌دار پاسخ تکثیری لنفوسيت‌های طحالی در گروه‌های درمانی دریافت کننده نانوذرات حاوی عصاره سلول توموری با یا بدون Poly IC، نسبت به گروه‌های



نمودار (۴): مقایسه تکثیر لنفوسيت‌های طحالی در تحریک با آنتی ژن توموری پس از ۷۲ ساعت

بحث و نتیجه‌گیری

ایمونوتراپی سرطان علیرغم مزایای فراوان آن، همچنان با چالش‌های متعددی مانند اینمی‌زابی ضعیف واکسن‌های سرطانی، سرکوب اینمی در ناحیه تومور یا تحمل ایمونولوژیک مواجه است. نانوذرات با خصوصیات فیزیکی و بیوشیمیایی تعریف شده، سیستم‌های تحويل دارویی متنوعی هستند که ممکن است بتواند بر این چالش‌های پیش روی ایمونوتراپی و واکسن‌های سرطانی غلبه کنند. یکی از مهمترین عوامل مؤثر بر تعامل نانوذرات با سلول‌های دندریتیک و همچنین توزیع بیولوژیکی آن‌ها در بدن، اندازه ذرات می‌باشد. به طوری که نانوذرات دارای سایز بین ۲۰-۳۰۰ نانومتر به طور مؤثری به روش اندوسیتوز یا پینوسیتوز توسط سلول‌های دندریتیک جذب می‌شوند و باعث تسهیل القای پاسخ‌های اینمی سلولی می‌شوند در حالی که میکروذرات دارای سایز بین ۵-۰/۵ میکرومتر از طریق مسیر فاگوسیتوز یا ماکروپینوسیتوز جذب شده و بیشتر باعث القای پاسخ‌های پاسخ‌های اینمی همورال می‌شوند (۲۶). سیلوا و همکاران در پژوهشی به مقایسه نانوذرت PLGA با سایز ۳۰۰ نانومتر و میکروذرات دارای سایز ۲۰ میکرومتر در شرایط آزمایشگاهی و درون تن پرداختند و به این نتیجه رسیدند که نانوذرات نسبت به میکروذرات، براحتی توسط سلول‌های دندریتیک جذب شده و باعث افزایش پاسخ سلول‌های CD8+ می‌شوند (۲۷).

نکته قابل توجه این است که اندازه ذرات به شدت وابسته به پارامترهای فرآیند تهیه نانوذرات، از جمله نوع و غلظت سورفتانت مورد استفاده می‌باشد (۲۸). به همین دلیل، در قسمت اول این پژوهش با ارزیابی انواع پلی‌وینیل‌الکل استفاده شده در طی روند تهیه نانوذرات، سیستم تحويل ذراتی انتخاب شد که دارای سایز مناسب برای جذب آسان توسط سلول‌های دندریتیک و در عین حال کارایی انکپسولاسیون مناسب بود تا در ادامه آزمایشات مورد استفاده قرار گیرد. مشکلی که در تهیه نانوذرات به روش امولسیون دوگانه-تبخیر حلال وجود دارد، این است که در طول فرآیند تبخیر حلال، با کاهش تدریجی حجم محلول، ویسکوزیته محلول افزایش می‌یابد که این افزایش ویسکوزیته و کشش بین سطحی موجود در امولسیون بر تعادل قطرات تأثیر گذاشته و منجر به تجمع قطرات در طی مراحل اولیه حذف حلال می‌شود. پلی‌وینیل‌الکل به عنوان یک تثبیت کننده استریک، باعث کاهش این کشش بین سطحی شده و با ایجاد یک لایه محافظ نازک در اطراف قطرات منجر به کاهش تجمع ذرات و تولید یک امولسیون پایدار می‌شود (۲۹). اما نکته قابل توجه در مورد پلی‌وینیل‌الکل این است که حتی بعد از چندین بار شستشو، باز هم بر روی سطح نانوذرات، باقیمانده و حذف کامل آن بسیار

حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح $p < 0.05$ می‌باشد.

مشکل است. علت این امر را میتوان به این موضوع نسبت داد که بخش هیدرووفوب پلی‌وینیل‌الکل در طی روند تهیه، به سطح نانوذرات اتصال می‌یابد. اتصال پلی‌وینیل‌الکل به سطح نانوذرات در مطالعات دیگر نیز با استفاده از روش طیف سنجی فوتوالکترون اشعه ایکس به اثبات رسیده است (۳۰). اهمیت این موضوع به این دلیل است که این پلی‌وینیل‌الکل باقیمانده، روی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نانوذرات تولیدی از جمله سایز، شاخص پراکندگی و نیز جذب سلولی نانوذرات در داخل بدن اثر می‌گذارد (۳۱). نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که افزایش درصد هیدروولیز پلی‌وینیل‌الکل، باعث افزایش قطره متوسط نانوذرات می‌شود. علت این امر را می‌توان به این موضوع نسبت داد که پلی‌وینیل‌الکل‌های با درصد هیدروولیز بالا ((PVA(C) و PVA(D)، دارای تعداد گروه‌های هیدروکسیل بیشتری هستند که می‌توانند پیوندهای هیدروژنی درون یا بین مولکولی بیشتری ایجاد کنند. برهمکنش‌های بین مولکولی قوی ایجاد شده از طریق پیوندهای هیدروژنی موجب افزایش ویسکوزیته فاز آبی می‌شود که منجر به افزایش اندازه ذرات می‌شود (۳۲). همچنین افزایش اندازه ذرات با افزایش وزن مولکولی پلی‌وینیل‌الکل نیز می‌تواند در ارتباط با تشکیل لایه‌های متراکم پلی‌وینیل‌الکل در اطراف سطح نانوذرات و درنتیجه افزایش قطره هیدرودینامیکی نانوذرات باشد (۳۳). با افزایش وزن مولکولی و درصد هیدروولیز پلی‌وینیل‌الکل، مقدار امولسیفار باقیمانده روی سطح نانوذرات نیز افزایش یافت. این نتایج در توافق با نتایج سایر پژوهشگران بود (۳۴، ۳۵). موراکامی و همکاران نیز گزارش کردند که استفاده از پلی‌وینیل‌الکل با درصد هیدروولیز و وزن مولکولی پایین، مانع از ژلاتینه شدن موضعی پلی‌وینیل‌الکل در سطح ذرات امولسیون شده و درنتیجه تجمع نانوذرات را به میزان قابل توجهی محدود می‌کند (۳۶). همچنین این محققین مشاهده کردند که پلی‌وینیل‌الکل با درصد هیدروولیز بالا (بیشتر از ۸۸درصد) منجر به پراکندگی ناپایدار ذرات، حل شدن مجدد ضعیف و درنتیجه درصد پایین تولید نانوذرات می‌شود (۳۶). افزایش درصد هیدروولیز و وزن مولکولی پلی‌وینیل‌الکل موجب افزایش کارایی انکپسولاسیون شد. سایر محققین نیز نتایج مشابه‌ای را گزارش نمودند (۳۵، ۳۷). دلایلی که می‌توان برای این امر عنوان کرد شامل ۱- افزایش درصد هیدروولیز پلی‌وینیل‌الکل منجر به افزایش ویسکوزیته فاز آبی می‌شود و ازین‌رو منجر به تشکیل نانوذرات با اندازه‌های بزرگ می‌شود و هر چه ذرات بزرگ‌تر می‌شوند، توانایی دربرگرفتن مقدار بیشتری از عصاره را دارند و درنتیجه کارایی انکپسولاسیون افزایش می‌یابد. ۲- گروه‌های هیدروکسیل پلی‌وینیل‌الکل جذب شده بر روی سطح نانوذرات ممکن است یک فیلم ضخیم بر روی سطح نانوذرات

سیستم‌های تحویل آنتیزن مبتنی بر نانوذرات، توانایی تحویل همزمان آنتیزن و مولکول‌های محرك اینمنی از جمله آگونیست‌های TLR به سلول‌های عرضه‌کننده آنتیزن می‌باشد. تحویل همزمان لیگاند‌های مختلف TLR و آنتیزن درون نانوذرات PLGA در مطالعات مختلف در شرایط آزمایشگاهی و بر روی مدل‌های حیوانی و موارد انسانی مورد بررسی قرار گرفته است و بلوغ سلول‌های دندربیتیک و افزایش پاسخ‌های CTL اختصاصی آنتیزن با موفقیت اثبات شده است (۴۴). البته در هیچ‌کدام از این مطالعات، اثرات انکپسوله کردن همزمان عصاره سلول توموری پستان (4T1) و Poly-IC در نانوذرات PLGA در مدل موشی سرطان پستان مورد مطالعه قرار نگرفته است. مولر و همکاران در سال ۲۰۱۲، عصاره توموری سرطان پروستات و ادجوانات CpG را به صورت همزمان درون نانوذرات PLGA انکپسوله نمودند و پاسخ‌های طولانی‌مدت CTL را پس از تزریق زیرجلدی در یک مدل موشی سرطان پروستات مشاهده نمودند (۴۵). سیلوا و همکاران در سال ۲۰۱۵ آنتیزن توموری اووالبومین را به همراه Poly-IC درون نانوذرات C57BL/6 PLGA کپسوله کرده و به صورت زیرجلدی به موش‌های 6 تزریق کرده و مشاهده نمودند که نانوذرات حاصل باعث افزایش تولید سلول‌های CD8+ اختصاصی اووالبومین شد (۴۶). ویسکه و همکاران در سال ۲۰۰۹ میکروذرات PLGA حاوی BSA را توسط Poly IC پوشش داده و مشاهده کردند که این میکروذرات باعث افزایش بیان مولکولهای CD80، CD86 و CD83 بر سطح سلول‌های دندربیتیک در شرایط آزمایشگاهی شد (۴۷). حمدي و همکاران در سال ۲۰۰۷ گزارش کردند که تحویل اووالبومین و MPLA به سلول‌های دندربیتیک به صورت انکپسوله در نانوذرات، منجر به افزایش چشمگیر پاسخ‌های تکثیری T CD8+ در شرایط برون تن (بالای ۳۰۰۰ برابر) و افزایش ۱۳ برابری گسترش کلونال سلول‌های T CD4+ در شرایط درون تن می‌شود (۴۸). در مطالعه حاضر پاسخ‌های ضد توموری نانوذرات حاوی عصاره به همراه Poly-IC، بسیار بیشتر از گروه دریافت کننده نانوذرات حاوی عصاره تنها و نیز گروه دریافت کننده عصاره Poly-IC به فرم محلول بود. علت این امر را می‌توان به این موضوع نسبت داد که تزریق همزمان آنتیزن و ادجوانات به صورت محلول می‌تواند موجب انتقال آنتیزن به بعضی از سلول‌های دندربیتیک و انتقال ادجوانات به گروهی دیگر از سلول‌های دندربیتیک شود. انتقال آنتیزن در غیاب ادجوانات موجب القاء تولرانس یا تحمل ایمونولوژیک شده و درنتیجه پاسخ‌های اینمنی قوی ضد توموری را مهار می‌کند (۴۹). کپسوله کردن هر دو آنتیزن و ادجوانات به صورت مشترک در یک ذره تحویل همزمان این دو جزء، را به یک سلول دندربیتیک امکان پذیر

را از طریق برهمنش‌های قوی درون یا بین مولکولی تشکیل دهد. این فیلم ضخیم احتمالاً انتشار عصاره را به فاز آبی به تاخیر می‌اندازد، درنتیجه باعث کاهش از دست رفتن عصاره می‌شود. ۳- افزایش ویسکوزیتی، میزان انتشار دارو را به فاز آبی کاهش داده و درنتیجه باعث افزایش کارایی انکپسولاسیون می‌شود (۳۷).

از نظر بالینی، خط مقدم درمان سرطان پستان، برداشت تومورهای اولیه پستان به کمک جراحی است. این یعنی عصاره‌های توموری فراوانی را می‌توان در طی دوره مراقبت استاندارد به دست آورده و سپس داخل پلیمر PLGA انکپسوله کرده و به عنوان بخشی از درمان ایمونوتراپی استفاده نمود که به عنوان یک واکسن شخصی در برابر عود مجدد تومور قابل استفاده می‌باشد. درواقع انکپسولاسیون پروتئین‌ها درون ماتریکس پلیمری PLGA آن‌ها را از هضم توسط آنزیمهای پروتئولیتیک و تجزیه هیدرولیزی محافظت نموده و مانع تخریب خارج سلولی قبل از فاگوسیتوز توسط سلول‌های عرضه‌کننده آنتیزن می‌شود. بعد از فاگوسیتوز نانوذرات توسط سلول‌های دندربیتیک، نانوذرات PLGA باعث افزایش فرایند فاگوژومال شده که باعث تقویت عرضه متقاطع آنتیزن‌های توموری به سلول‌های T CD8+ دست نخورده می‌شود (۱۱).

مطالعات مختلفی به بررسی انکپسولاسیون پروتئین‌ها و آنتیزن‌های منفرد در نانوذرات PLGA پرداخته‌اند (۳۸، ۳۹)، اما مطالعات اندکی در زمینه استفاده از کل آنتیزن‌های توموری صورت گرفته است (۴۰). هانولن و همکاران نشان دادند که دندربیتیک سل مشتق از افراد سالم داوطلب پالس شده با ذرات PLGA حاوی عصاره توموری حاصل از رده سلولی سرطان تخدمان، منجر به تحریک تولید چشمگیر سیتوکین‌های Th1 در کشت همزمان با سلول‌های CD8+ خودی در مقایسه با دندربیتیک سل‌های پالس شده با عصاره سلول توموری محلول می‌شود (۴۱). پراساد و همکاران PLGA عصاره حاصل از رده سلولی B16 ملانوما را در نانوذرات انکپسوله نمودند و نتایج حاصل از تأثیر آن‌ها بر روی سلول‌های دندربیتیک در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که استفاده از عصاره توموری انکپسوله شده باعث تحریک بیشتر تولید سیتوکین‌های محرك اینمنی از جمله IFN- γ و کاهش تولید سیتوکین‌های مهارکننده اینمنی از جمله IL-10 نسبت به استفاده از عصاره سلول توموری به صورت محلول می‌شود (۴۲).

Polyinosinic-polycytidylic acid Poly (I: C) سنتتیک RNA دو رشته‌ای و آگونیست TLR3 است که باعث افزایش پایداری بلوغ در سلول‌های دندربیتیک، افزایش عرضه متقاطع آنتیزن توسط سلول دندربیتیک به سلول‌های TCD8+ و درنتیجه افزایش پاسخ‌های اولیه و خاطره‌ای برای القا پاسخ‌های اینمنی سلولی می‌شود (۴۳، ۴۴). یکی از مهم‌ترین مزایای

DTH برای ارزیابی تأثیر واکسن‌های سرطانی بسیار مفید می‌باشد زیرا به بررسی مستقیم وضعیت خاطره اینمی سلولی در بدن بیمار می‌پردازد. مجموعه‌ی لنفوسیت‌های حساس شده‌ای که موجب افزایش حساسیت تأثیری می‌شوند، چنانچه مجددًا با آنتیژن مربوطه مواجه شوند، سایتوکاین‌هایی را ترشح می‌کنند که سبب یک واکنش التهابی موضعی به نام DTH می‌شود. از مشخصه‌های این واکنش، نفوذ فراوان سلول‌های التهابی غیر اختصاصی به خصوص ماکروفاژها می‌باشد (۴۹). این واکنش‌ها به صورت تورم و سفتی پوستی ظاهر می‌شوند. هر چه میزان پاسخ‌دهی سلول‌های T کمکی افزایش یابد، پاسخ‌های شدیدتر تورم در کف پای موش‌های حساس شده ایجاد می‌کند. در مطالعه حاضر بالاترین سطح DTH مربوط به موش‌های گروه دریافت کننده نانوذرات حاوی هر دو عصاره و Poly-IC بود. یزدی و همکاران در مطالعه‌ای بر روی موش‌های مبتلا به سرطان پستان گزارش کردند که نانوذرات سلنیوم به همراه آنتیژن‌های DTH توموری حاصل از رده 4T1 باعث تولید سطح بالاتری از پاسخ نسبت به گروه دریافت کننده نانوذرات سلنیوم تنها می‌شود (۵۰).

بطور خلاصه در پژوهش حاضر، عصاره سلول توموری به عنوان منبع غنی از آنتیژن‌های توموری و Poly-IC به عنوان ادجوانی محرك سیستم اینمی، درون نانوذرات زیست تخریب پذیر PLGA با موفقیت انکپسوله شدند. با توجه به نتایج این پژوهش و مطالعات سایر محققین که ذکر شد، مشخص شد که خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات تولیدی، تحت تأثیر وزن مولکولی و درصد هیدرولیز پلی‌وینیل‌الکل مورد استفاده و متعاقباً پلی‌وینیل‌الکل باقیمانده بر سطح نانوذرات می‌باشد. به همین دلیل انتخاب صحیح نوع پلی‌وینیل‌الکل، یک فاکتور کلیدی در طراحی موفقیت آمیز ساخت نانوذرات PLGA می‌باشد. استفاده از پلی‌وینیل‌الکل با وزن مولکولی ۱۳-۲۳ کیلو دالتون و درصد هیدرولیز ۸۷-۸۹ درصد باعث تولید نانوذرات با ویژگی‌های مطلوب شد که برای استفاده در سیستم تحويل واکسن ایده‌آل بود. اندازه، شاخص پراکنندگی و بازده کپسولاسیون نانوذرات تهیه شده به ترتیب برابر با $165/60 \pm 3/60$ نانومتر، 0.05 ± 0.06 و 0.06 ± 0.08 درصد بود. همچنین با القاء تومور پستان در موشهای BALB/c، به بررسی اثرات ضد توموری نانوذرات تولیدی پرداخته شد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که هر دو واکسن مبتنی بر نانوذرات PLGA حاوی عصاره سلول توموری تنها و نیز همراه با Poly-IC باعث کاهش معنی‌دار رشد تومور، افزایش میزان فعالیت تکثیری لنفوسیت‌های طحالی (نشان‌دهنده پاسخ اینمی سلولی ضد تومور) و همچنین افزایش پاسخ ازدیاد حساسیت تأثیری (نشان‌دهنده پاسخ سلول‌های Th1 ضد تومور) در موش‌های مبتلا به تومور پستان، نسبت به گروه کنترل و گروه دریافت کننده عصاره و Poly-IC به فرم محلول شدند.

می‌سازد و این فرایند موجب القاء قوی سلول‌های TCD8+ اختصاصی می‌شود.

یکی از راههای درمان سرطان، افزایش پاسخ تکثیری سلول‌های اینمی بهویژه لنفوسیت‌ها بر علیه تومور می‌باشد. لنفوسیت‌های حساس شده در برخورد با آنتی‌ژن مربوطه تکثیر شده و اثرات خود را اعمال می‌کنند. تکثیر لنفوسیت‌ها از نشانه‌های اولیه فعال شدن آن‌ها توسط آنتی‌ژن می‌باشد. این تکثیر، توسط تست رایج MTT بررسی شد و مشاهده شد که میزان تکثیر سلول‌های اینمی در طحال موهشهای دریافت کننده نانوذرات، بهویژه گروه دریافت کننده نانوذرات حاوی هر دو عصاره و Poly-IC افزایش معنی‌داری داشت که می‌تواند نشان‌دهنده مؤثر بودن این نانوذرات در تحریک پاسخ‌های اینمی ضد تومور باشد. سالوادور و همکاران نیز طی تحقیقی که در سال ۲۰۱۱ انجام دادند اعلام کردند که تزریق میکروذرات PLGA حاوی BSA و Poly IC به صورت همزمان، باعث افزایش میزان تکثیر سلول‌های اینمی در طحال موهشهای دریافت کننده واکسن گردید که این نتایج در توافق با نتایج حاصل از آنالیز تست MTT بود (۴۶).

تغییرات اندازه اولیه تومور از نشانه‌های بالینی و خامت با وضعیت درمان تومور به شمار می‌رود. نتایج مربوط به حجم نهائی تومور که نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار سرعت رشد تومور در موش‌های دریافت کننده نانوذرات می‌باشد، میتواند تأثیری بر فعل شدن و کارآمدی سیستم اینمی در مقابله با تومور و جلوگیری از رشد آن درنتیجه‌ی تزریق نانوذرات باشد. هر چند که نانوذرات حاوی عصاره بدون Poly-IC توانست تا حدودی جلوی رشد تصاعدي تومور را بگیرد. اما این کاهش در گروه دریافت کننده نانوذرات حاوی عصاره و Poly-IC بسیار چشمگیر بود. گروس و همکاران در سال ۲۰۱۵ عصاره سلول تومور پستان را درون نانوذرات PLGA کپسوله کردند و کاهش قابل توجه در حجم تومور موش‌های تحت تزریق زیر جلدی را گزارش نمودند (۴۷). بورمن و همکاران در سال ۲۰۱۷ داروی دوکستاکسل را درون نانوذرات PLGA لود کرده و به موش‌های مبتلا به سرطان پستان مقاوم به تاکسل تزریق کردد و مشاهده کردند که نانوذرات حاصل باعث کاهش چشمگیر رشد تومور و افزایش زندمانی در موش‌های مبتلا به سرطان پستان مقاوم به تاکسل شد (۴۸).

نتایج تست DTH نشانه دیگری از تأثیر واکسن مبتنی بر نانوذرات بر تقویت پاسخ اینمی سلولی وابسته به لنفوسیت‌های Th1 بود. واکنش ازدیاد حساسیت تأثیری (DTH) یک ارزیابی درون‌تنی (in vivo) از عملکرد اینمی سلولی است و به طور مستقیم نشان‌دهنده عملکرد سلول‌های Th1 که درواقع یکی از پاسخ‌های اینمی مورد نیاز در شرایط ابتلا به سرطان می‌باشد، است. تست

پستان مطرح شود. در نهایت، میتوان تأثیر انکپسولاشیون همزمان با اگونیست‌های TLR با سایر آنتی‌ژن‌ها، در یک نانوذره بر روی پاسخ‌های ایمنی و یا استفاده از نانوذرات PLGA در درمان سایر سرطان‌ها و یا بیماری‌های خودایمن را برای انجام سایر محققین پیشنهاد داد.

References:

- 1- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2011; 61: 69-90.
- 2- Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. Science 2013; 342: 1432-1433.
- 3- Finn OJ. Cancer vaccines: Between the idea and the reality. Nat Rev Immunol 2003; 3: 630-641.
- 4- Sheikhi A, Jafarzadeh A, Kokhaei P, Farsangi M. Whole Tumor Cell Vaccine Adjuvants: Comparing IL-12 to IL-2 and IL-15. Iran J Immunol 2016; 13(3): 148-166.
- 5- Topalian SL, Weiner GJ, Pardoll DM. Cancer immunotherapy comes of age. J Clin Oncol: Off J Am Soc Clin Oncol 2011; 29(36): 4828-36.
- 6- Figdor CG, Devries JJ, Lesterhuis WJ, Melief CJ. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. Nat Med 2004; 10(5): 475-80.
- 7- Sehgal K, Dhodapkar MK, Dhodapkar MV. Targeting human dendritic cells in situ to improve vaccines. Immunol Lett 2014; 162: 59-67.
- 8- Joshi VB, Geary SM, Gross BP, Wongrakpanich A, Norian LA, Salem AK. Tumor lysate-loaded biodegradable microparticles as cancer vaccines. Expert Rev Vaccines 2014; 13(1): 9-15.
- 9- Rice-Ficht AC, Arenas-Gamboa AM, Kahl-Medonagh MM, Ficht TA. Polymeric particles in vaccine delivery. Curr Opin Microbiol 2010; 13(1): 106-112.
- 10- Wang W, Singh M. Selection of Adjuvants for Enhanced Vaccine Potency. World J Vaccine 2011; 1: 40.
- 11- Hamdy S, Haddadi A, Hung RW, Lavasanifar A. Targeting dendritic cells with nano-particulate PLGA cancer vaccine formulations. Adv Drug Deliv Rev 2011; 63: 943-955.
- 12- Ilynskii PO, Roy CJ, Oneil CP, Browning EA, Pittet LA, Altreuter DH et al. Adjuvant-carrying synthetic vaccine particles augment the immune response to encapsulated antigen and exhibit strong local immune activation without inducing systemic cytokine release. Vaccine 2014; 32: 2882-95.
- 13- Hamdy S, Elamanchili P, Alshamasan A, Molavi O, Satou T, Samuel J. Enhanced antigen-specific primary CD4+ and CD8+ responses by codelivery of ovalbumin and toll-like receptor ligand monophosphoryl lipid A in poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles. J Biomed Mater Res A 2007; 81: 652-662.
- 14- Elamanchili P, Lutsiak CM, Hamdy S, Diwan M, Samuel J. "Pathogen-mimicking" nanoparticles for vaccine delivery to dendritic cells. J Immunother 2007; 30: 378-95.
- 15- Hermeling S, Crommelin DJA, Schellekens H, Jiskoot W. Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins. Pharm Res 2004; 21: 897-903.
- 16- Sinha VR, Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery. J Control Release 2003; 90: 261-280.
- 17- Danhier F, Ansorena E, Silva MJ, Coco R, Breton LA, Preat V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. J Control Release 2012; 161(2): 505-22.
- 18- He C, Hu Y, Yin L, Tang C, Yin C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake

اما این تغییرات در گروه دریافت کننده نانوذرات حاوی عصاره به همراه Poly-IC به طور قابل توجهی بیشتر بود. نتایج حاصل نشان داد که استفاده از واکسن تولیدی مبتنی بر نانوذرات حاوی عصاره سلول توموری و Poly-IC باعث تقویت پاسخ‌های ایمنی ضدتوموری شده و می‌تواند به عنوان یک راهکار درمانی مؤثر در درمان سرطان

- and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials* 2010; 31: 3657–3666.
- 19- Yang YY, Chung TS, Ng NP. Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/ evaporation method. *Biomaterials* 2001; 22: 231–241.
- 20- Hamdy S, Molavi O, Ma Z, Haddadi A, Alshamsan A, Gobti Z et al. Co-delivery of cancer-associated antigen and Toll-like receptor 4 ligand in PLGA nanoparticles induces potent CD8⁺ T cell-mediated anti-tumor immunity. *Vaccine* 2008; 26: 5046–5057.
- 21- Delirezh N, Moazzeni SM, Shokri F, Shokrgozar MA, Atri M et al. Autologous dendritic cells loaded with apoptotic tumor cells induce T cell-mediated immune responses against breast cancer in vitro. *Cell Immunol* 2009; 257: 23–31.
- 22- Prasad S, Cody V, Saucier-Sawyer KJ, Fadel RT, Edelson LR, Birchall AM et al. Optimization of Stability, Encapsulation, Release, and Cross-Priming of Tumor Antigen-Containing PLGA Nanoparticles. *Pharm Res* 2012; 29(9): 2565–2577.
- 23- Sainz V, Peres C, Ciman T, Rodrigues C, Viana SA, Afonso AC et al. Optimization of protein loaded PLGA nanoparticles manufacturing parameters following a quality-by-design approach. *RSC Adv* 2016; 6(106): 104502–104512.
- 24- Joshi PD, Lan-Chun-Fung LY, Pritchard WJ. Determination of poly (vinyl alcohol) via its complex with boric acid and iodine. *Anal Chim Acta* 1979; 104: 153–160.
- 25- Ang YH, Subramani T, Yeap KS, Omar RA, Ho YW, Abdullah PM. Immunomodulatory effects of *Potentilla indica* and *Dendrophthoe pentandra* on mice splenocytes and thymocytes. *Exp Ther Med* 2014; 7: 1733–1737.
- 26- Oyewumi MO, Kumar A, Cui Z. Nano-microparticles as immune adjuvants: correlating particle sizes and the resultant immune responses. *Expert Rev Vaccines* 2010; 9: 1095–107.
- 27- Silva AL, Rosalia RA, Varypataki E, Sibuea S, Ossendorp F, Jiskoot W. Poly-(lactic-co-glycolic-acid)-based particulate vaccines: Particle uptake by dendritic cells is a key parameter for immune activation. *Vaccine* 2015; 33(7): 847–54.
- 28- Mohammadi-Samani S, Taghipour B. PLGA micro and nanoparticles in delivery of peptides and proteins; problems and approaches. *Pharm Dev Technol* 2015; 20(4): 385–393.
- 29- Feczko T, Toth J, Gyenis J. Comparison of the preparation of PLGA–BSA nano- and microparticles by PVA, poloxamer and PVP. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 2008; 39(1–3): 188–195.
- 30- Shakesheff MK, Evora C, Soriano II, Langer R. the adsorption of poly(vinyl alcohol) to biodegradable microparticles: studied by x-ray photoelectron spectroscopy (XPS). *J Colloid Interface Sci* 1997; 185: 538–547.
- 31- Sahoo KS, Panyam J, Prabha S, Labhasetwar V. Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *J Control Rel* 2002; 82: 105–114.
- 32- Li H, Zhang W, Xu W, Zhang X. Hydrogen bonding governs the elastic properties of poly(vinyl alcohol) in water, singlemolecule force spectroscopic studies of PVA by AFM. *Macromolecules* 2000; 33: 465–469.
- 33- Konan YN, Cerny R, Favet J, Berton M, Gurny R, Allemann E. Preparation and characterization of sterile sub-200 nm meso-tetra(4-hydroxylphenyl)porphyrin-loaded nanoparticles for photodynamic therapy. *Eur J Pharm Biopharm* 2003; 55: 115–124.
- 34- Şengel-Türk CT, Hasçicek C, Dogan AL, Esenagli G, Guc D, Gönül N. Preparation and in vitro evaluation of meloxicam-loaded PLGA

- nanoparticles on HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Drug Dev Ind Pharm* 2012; 38(9): 1107–1116.
- 35- Azizi M, Farahmandgavi F, Joghataei M, Zandi M, Imani M, Bakhtiary M et al. Fabrication of protein-loaded PLGA nanoparticles: effect of selected formulation variables on particle size and release profile. *J Polym Res* 2013; 20: 110.
- 36- Murakami H, Kawashima Y, Niwa T, Hino T, Takeuchi H, Kobayashi M. Influence of the degrees of hydrolyzation and polymerization of PVA on the preparation and properties of PLGA nanoparticles. *Int J Pharm* 1997; 149: 43–49.
- 37- Songa X, Zhaob Y, Wu W, Bi Y, Cai Z, Chena Q et al. PLGA nanoparticles simultaneously loaded with vincristine sulfate and verapamil hydrochloride: Systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. *Int J Pharm* 2008; 350: 320–329.
- 38- Lee YR, Lee YH, Im SA, Kim K, Lee CK. Formulation and Characterization of Antigen-loaded PLGA Nanoparticles for Efficient Cross-priming of the Antigen. *Immune Netw* 2011; 11: 163–168;
- 39- Sales-Junior P, Guzman F, Vargas M, Sossai S, Gonzalez C, Patarroyo J. Use of biodegradable PLGA microspheres as a slow release delivery system for the Boophilus microplus synthetic vaccine SBm7462. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 107: 281–90.
- 40- Prasad S, Cody V, Saucier-Sawyer JK, Saltzman WM, Sasaki CT, Edelson RL et al. Polymer nanoparticles containing tumor lysates as antigen delivery vehicles for dendritic cell-based antitumor immunotherapy. *Nanomed: Nanotechnol Biol Med* 2011; 7(1): 1–10.
- 41- Hanlon DJ, Aldo PB, Devine L, Alvero AB, Engberg AK, Edelson R et al. Enhanced stimulation of anti-ovarian cancer CD8(+) T cells by dendritic cells loaded with nanoparticle encapsulated tumor antigen. *Am J Reprod Immunol* 2011; 65(6): 597–609.
- 42- Wischke C, Zimmermann J, Wessinger B, Schendler A, Borchert HH, Peters JH et al. Poly(I: C) coated PLGA microparticles induce dendritic cell maturation. *Int J Pharm* 2009; 365: 61–68.
- 43- Hafner AM, Cortesey B, Merkle HP. Particulate formulations for the delivery of poly (I: C) as vaccine adjuvant. *Adv Drug Deliv Rev* 2013; 65: 1386–99.
- 44- Schlosser E, Mueller M, Fischer S, Basta S, Busch DH, Gander B, Groettrup M. TLR ligands and antigen need to be coencapsulated into the same biodegradable microsphere for the generation of potent cytotoxic T lymphocyte responses. *Vaccine* 2008; 26: 1626–37.
- 45- Mueller M, Reichardt W, Koerner J, Groettrup M. Coencapsulation of tumor lysate and CpG-ODN in PLGA-microspheres enables successful immunotherapy of prostate carcinoma in TRAMP mice. *J Control Release* 2012; 162: 159–166.
- 46- SalvadorA, Igartua M, Hernndez RM, Pedraz JL. Combination of immune stimulating adjuvants with poly(lactide-co-glycolide) microspheres enhances the immune response of vaccines. *Vaccine* 2012; 30: 589–596.
- 47- Gross B, Wongrakpanich A, Francis M, Salem A, Norian LA. Therapeutic microparticle-based tumor lysate vaccine reduces spontaneous metastases in murine breast cancer. *AAPS J* 2014; 16: 1194–1203.
- 48- Bowerman CJ, Byrne JD, Chu KS, Schorzman AN, Keeler AW, Sherwood CA. Docetaxel-Loaded PLGA Nanoparticles Improve Efficacy in Taxane-Resistant Triple-Negative Breast Cancer. *Nano Lett* 2017 January 11; 17(1): 242–248.
- 49- Disis ML, Schiffman K, Gooley TA, McNeel DG, Rinn K, Knutson KL. Delayed-type hypersensitivity response is a predictor of peripheral blood T-cell immunity after HER-2neu

- peptide immunization. Clin Cancer Res 2000; 6: 1347-50.
- 50- Yazdi MH, Mahdavi M, Faghfuri E, Faramarzi MA, Sepehrizadeh Z, Hassan ZM et al. Th1 Immune Response Induction by Biogenic Selenium Nanoparticles in Mice with Breast Cancer: Preliminary Vaccine Model. Iran J Biotech 2015; 13(2): e1056.

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF TUMOR CELL LYSATE AND POLY-IC LOADED POLY (LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID) NANOPARTICLES AND EVALUATION OF THEIR ANTI-TUMOR EFFECTS IN MOUSE MODEL OF BREAST CANCER

Sanaz Sheikhzadeh¹, Nowruz Delirezh^{2}, Rahim Hobbenaghi³*

Received: 09 May, 2018; Accepted: 13 Aug, 2018

Abstract

Background & Aims: Cancer immunotherapy, despite its many benefits, faces major challenges. Nanoparticles are drug delivery systems that may address these challenges. The goal of this study was to produce the tumor cell lysate and Poly-IC loaded nanoparticles with desirable properties and evaluation of their therapeutic effects in mouse model of breast cancer.

Materials & Methods: Nanoparticles were prepared by the double emulsion solvent-evaporation method, using poly (vinyl alcohol) (PVA) as a surfactant. Effects of molecular weight variation and the degree of hydrolyzation of PVA were investigated for the particle size, polydispersity index, encapsulation efficiency and the residual surfactant percentage of nanoparticles. 4T1 Cell line was used to induce the breast tumor in mice. To evaluate the effectiveness of the vaccine, tumor growth rate, proliferation of splenic cells by MTT assay and Delayed Type Hypersensitivity (DTH) reaction were evaluated.

Results: These results showed that the use of polyvinyl alcohol with a molecular weight of 13-23 kDa and 87-89% hydrolysis, produced nanoparticles with desirable properties. Although injection of nanoparticles containing tumor cell lysate with or without poly-IC to mice, caused a significant decrease in tumor growth, increased splenic lymphocyte proliferation, and delayed type hypersensitivity response in these two groups. But these changes, in the group that received nanoparticles containing the tumor cell lysate with Poly-IC were more significant than other groups.

Conclusion: The results showed that the co-encapsulation of tumor cell lysate and poly-IC in one nanoparticle, due to the effects of Poly-IC on the maturation and activation of dendritic cells, enhance anti-tumor immune responses and can be considered as an effective therapeutic strategy for the treatment of breast cancer.

Keywords: Nanoparticles, Poly (vinyl alcohol) , Immunotherapy, Breast cancer, Tumor cell lysate, Poly-IC

Address: Microbiology Department, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Tel: +984432779552

Email: n.delirezh@urmia.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2018; 29(8): 584 ISSN: 1027-3727

¹ PhD Candidate, Microbiology Department, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

² Associate Professor, Microbiology Department, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
(Corresponding Author)

³ Associate Professor, Pathobiology Department, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran