

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

ساناز شیخزاده^۱، نوروژ دلیرزاده^{۲*}، رحیم حب نقی^۳

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

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: ایمونوتراپی سرطان علیرغم مزایای فراوان آن، همچنان با چالش‌های متعددی مواجه است. نانوذرات، سیستم‌های تحویل 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 به‌عنوان سورفاکتانت تهیه شدند. اثرات وزن مولکولی و درصد هیدرولیز سورفاکتانت، بر روی اندازه ذرات، شاخص پراکندگی، کارایی انکپسولاسیون و درصد سورفاکتانت باقیمانده مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور القاء تومور پستان در موش‌ها از رده سلولی 4T1 استفاده شد. جهت ارزیابی اثربخشی واکسن، میزان رشد تومور، فعالیت تکثیر 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 ۲۳-۱۳ کیلو دالتون و درصد هیدرولیز ۸۹-۸۷ 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 لنفوسیت‌های 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 Poly-IC بر روی بلوغ و عملکرد سلول‌های دندریتیک، باعث تقویت پاسخ‌های ایمنی ضد توموری شده و می‌تواند به‌عنوان یک راهکار درمانی مؤثر در درمان سرطان پستان مطرح شود.

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

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

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

Email: n.delirez@urmia.ac.ir

مقدمه

عوارض جانبی مخرب و کیفیت بسیار پایین زندگی رنج می‌برند. با توجه به این مشکلات، امروزه تمرکز عمده بر روی ایمونوتراپی به‌عنوان یک روش جدید و کارآمد برای مبارزه با سرطان می‌باشد. چراکه ایمونوتراپی، باعث القا پاسخ‌های ایمنی اختصاصی و خاطره‌ای ضد تومور با حداقل عوارض جانبی می‌شود (۲). واکسیناسیون از جمله موضوعاتی است که در زمینه ایمونوتراپی سرطان بسیار مورد توجه قرار گرفته است. چندین کارآزمایی بالینی و پیش بالینی

سرطان پستان، علت اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در زنان می‌باشد. به طوری که سالانه، بیش از ۵۰۲۰۰۰ 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 در نتیجه 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 آنتی‌ژن، که واسطه‌های مهم ضد توموری هستند، می‌شود (۹).

TLR (Toll Like Receptor) ها عضو خانواده PRR

(Pattern Recognition Receptor)ها هستند که به‌عنوان سنسورهای اولیه سیستم ایمنی ذاتی در شناسایی پاتوژن‌های میکروبی عمل می‌کنند. فعال شدن TLR ها منجر به تحریک بلوغ و فعال شدن سلول‌های دندریتیک با افزایش بیان مولکول‌های کمک محرک CD86-CD80-CD40 و MHC و عرضه بسیار مؤثرتر آنتی‌ژن 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 آنتی‌ژن را منجر می‌شود (۱۲، ۱۱). مطالعات اخیر نشان داده که انکپسولاسیون هم‌زمان آنتی‌ژن توموری و ادجوانت در یک نانوذره باعث ایجاد اثرات سینرژیستیک در تقویت ایمنی با هدف قرار دادن هر دو آنتی‌ژن و ادجوانت به داخل اجزای اندوزومال سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن می‌شود (۱۲). عرضه آنتی‌ژن توموری و لیگاند TLR توسط نانوذرات به سلول‌های دندریتیک باعث افزایش پاسخ سلول‌های T تا ۳۰۰۰-۱۰۰۰ برابر در شرایط آزمایشگاه (In vitro) و ۲۰-۱۰ برابر در داخل بدن (In vivo) در مقایسه با فرم محلول آن می‌شود (۱۴، ۱۳).

استفاده از پروتئین‌ها از جمله عصاره سلول توموری به‌عنوان 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-تبخیرحلال از معمول‌ترین روش‌ها برای تهیه نانوذرات حاوی پروتئین می‌باشد (۱۶). از طرفی در میان پلیمرهای مختلفی که برای ساخت نانوذرات طراحی شده‌اند، پلی‌لاکتیک-کو-گلیکولیک اسید (PLGA) به دلیل خواص جذاب آن، از جمله زیست تخریب پذیری و زیست سازگاری، حفاظت دارو از تخریب توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک، 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 سرطانی مختلف از جمله آنتی‌ژن‌های خالص‌سازی شده، پپتیدهای سنتزی با توالی مشخص، ویروس‌های نو ترکیب کدکننده آنتی‌ژن‌های توموری، استخراج RNA مشتق از سلول‌های توموری و هم‌چنین استفاده از سلول‌های کل توموری پرداخته‌اند (۳، ۴). سلول‌های کل توموری در واقع تمام آنتی‌ژن‌های اختصاصی (Tumor Specific Antigen) و آنتی‌ژن‌های 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 آنتی‌ژن‌های توموری برای فعال شدن می‌شوند و در نتیجه احتمال فرار ایمنی توسط تومور را کاهش می‌دهند (۴، ۵). یکی از روش‌های استفاده از کل آنتی‌ژن‌های همراه توموری، تهیه عصاره سلول‌های توموری می‌باشد. واکسیناسیون با عصاره سلول توموری نیاز به شناسایی و تخلیص آنتی‌ژن‌های توموری منفرد، قبل از شروع درمان را رفع کرده و باعث کاهش زمان بین تشخیص تومور و درمان می‌شود.

سلول‌های دندریتیک به‌عنوان آغازگر و تنظیم‌کننده قوی پاسخ‌های ایمنی اختصاصی و خاطره‌ای ضد آنتی‌ژن‌های 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 مورد مطالعه قرار گرفته است، جداسازی پیش‌سازهای سلول‌های دندریتیک و سپس تمایز آن‌ها به سلول‌های دندریتیک پالس شده با آنتی‌ژن‌های 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 اتولوگ می‌باشد. یک روش جایگزین، که کم‌تر مورد بررسی قرار گرفته است و مستقل از مراحل کشت سلولی در محیط خارج از بدن است، استفاده از نانو و میکروذرات زیست سازگار به‌عنوان حامل آنتی‌ژن‌های 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 به‌صورت محلول نیز می‌باشد. در حقیقت قرار دادن عصاره‌ی توموری درون نانوذرات پلیمری زیست‌تخریب‌پذیر نه تنها باعث افزایش ایمنی‌زایی فرم انکپسوله شده در مقایسه با فرم محلول، به دلیل حضور طولانی مدت مواد آنتی‌ژنیک می‌شود، بلکه باعث افزایش جذب و عرضه متقاطع عصاره‌ی توموری توسط سلول‌های دندریتیک میزبان شده و در نتیجه باعث القاء قوی سلول‌های TCD8+

³ European Medicine Agency

¹ Poly(lactic-co-glycolic acid)

² Food and Drug Administration

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 (۱۸، ۱۶). روش‌های مختلفی برای کاهش سایز و یکنواختی نانوذرات تولیدی مورد بررسی قرار گرفته است که یکی از این روش‌ها استفاده از سورفاکتانت پلی‌وینیل‌الکل می‌باشد. پلی‌وینیل‌الکل^۴ (PVA) یک پلیمر مصنوعی محلول در آب است که بطور گسترده‌ای برای ساخت نانوذرات پلیمری از جمله PLGA مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۹).

کشت و تکثیر رده سلولی سرطان پستان موشی 4T1:

اربخشی نانوذرات PLGA در جهت تحویل واکسن به سلول‌های دندریتیک در مطالعات مختلفی نشان داده شده است (۱۳، ۲۰). اما اکثر این مطالعات به بررسی برون‌تنی (in vitro) پاسخ سلول‌های T ضد توموری پرداخته‌اند و مطالعات بسیار اندکی در زمینه استفاده از نانوذرات PLGA به‌عنوان حامل واکسن در شرایط درون‌تن (in vivo) به چشم می‌خورد. از طرف دیگر در اکثر این مطالعات به بررسی اثرات آنتی‌ژن‌های توموری منفرد پرداخته شده است و در کم‌تر مطالعاتی از عصاره سلول توموری استفاده شده است (۲۱).

تهیه عصاره سلول‌های توموری:

هم‌چنین انکیپسولاسیون هم‌زمان ادجوانت‌های محرک ایمنی به همراه آنتی‌ژن‌های توموری در داخل یک نانوذره موضوعی است که به تازگی مورد توجه قرار گرفته است. به همین دلیل، در این پژوهش، به بررسی اثرات درمانی انکیپسولاسیون هم‌زمان عصاره سلول توموری 4T1 و ادجوانت Poly-IC درون نانوذرات PLGA بر روی مدل موشی سرطان پستان پرداخته شد که تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است. بدین منظور اثر چهار نوع پلی‌وینیل‌الکل با درجات مختلف هیدرولیز و وزن مولکولی بر روی آماده‌سازی نانوذرات و خصوصیات فیزیکی آن‌ها، جهت دست یافتن به بهترین پاسخ‌ها از جمله اندازه ذرات کوچک با شاخص پراکندگی یکنواخت و درعین‌حال بازده کپسولاسیون مناسب مورد بررسی 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 به‌صورت محلول و فرم کپسوله شده در نانوذرات PLGA گردید و اثرات آن بر روی روند رشد تومور، میزان تکثیر لنفوسیت‌های طحالی و پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش کار

مواد:

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

سلول‌های رده سلولی 4T1 بعد از کشت و جداسازی توسط Trypsin/EDTA، با PBS شستشو شده و به‌منظور به حداکثر رساندن رهایش آنتی‌ژن‌های پروتئینی از سلول‌ها و در نتیجه افزایش غلظت عصاره مورد استفاده برای انکیپسولاسیون، در PBS سرد حل شدند. برای رفع نیاز به مهارکننده‌های پروتئاز اضافی (سیتوتوکسیک)، محلول‌های سلولی قبل و در طول پروسه تهیه عصاره بر روی یخ نگهداری شدند. به‌منظور تهیه عصاره، سلول‌های توموری تحت ۴ مرتبه انجام داد 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 سونیکه 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 سانتریفیوژ (g ۲۰۰۰، ۱۰ دقیقه)، نمونه مجدداً با سرعت ۱۳۰۰۰g، به مدت ۶۰ دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌منظور رسوب غشای سلول‌ها سانتریفیوژ شد و مایع رویی با فیلتر ۰/۲ میکرون استریل شد و تا زمان استفاده در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. محتوای پروتئینی عصاره تهیه شده با روش بردفورد با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و جذب در ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و غلظت پروتئین با مقایسه جذب منحنی کالیبراسیون استاندارد از سرم آلبومین گاوی تعیین شد (۲۲).

سنتز نانوذرات PLGA:

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

⁴ poly(vinyl alcohol)

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 Poly-IC به‌عنوان 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 به‌دست آمده به فاز آبی دوم که شامل محلول پلی‌وینیل‌الکل ۴ درصد است اضافه شد و مجدداً سونیکه شد. امولسیون ثانویه حاصل به محلول پلی‌وینیل‌الکل ۰/۳ درصد اضافه شد و به وسیله همزن مغناطیسی به مدت ۳ ساعت به‌منظور تبخیر دی‌کلرومتان همزده شد. محلول حاصل به‌منظور رسوب نانوذرات با سرعت ۲۰۰۰۰ g 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).

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

تعیین درصد پلی‌وینیل‌الکل باقیمانده:

درصد پلی‌وینیل‌الکل باقیمانده در سطح نانوذرات با استفاده از روش رنگ سنجی که بر پایه تشکیل یک کمپلکس رنگی پایدار بین گروه هیدروکسیل پلی‌وینیل‌الکل 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 میکرولیتر 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 / ۰/۱۵ / 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 اسپکتروفتومتر UV-vis اندازه‌گیری شد و درصد پلی‌وینیل‌الکل باقیمانده با مقایسه جذب منحنی کالیبراسیون استاندارد محلول پلی‌وینیل‌الکل تحت شرایط مشابه محاسبه شد (۲۴).

حیوانات آزمایشگاهی مورد مطالعه:

این مطالعه از نوع مداخله‌ای تجربی بود که به‌صورت موردی/شاهدی انجام شد. جامعه مورد مطالعه، شامل موش‌های ماده خالص نژاد BALB/c با محدوده سنی ۶ تا ۸ هفته با متوسط وزن ۲۵-۲۰ گرم 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 ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵±۵۵ درصد و برنامه نوری ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. شرایط نگهداری و نیز نحوه به‌دستگیری 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 مورد تأیید قرار گرفت.

القای تومور پستان در موش BALB/c:

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

تعیین اندازه و شاخص پراکندگی ذرات:

اندازه و شاخص پراکندگی ذرات ساخته شده به روش تفرق پویا (DLS (Dynamic Light Scattering)، با استفاده از دستگاه Zetasizer (Malvern instruments, Ltd) اندازه‌گیری شد. تمامی اندازه‌گیری‌ها در دمای اتاق و سه بار تکرار (n=3) انجام و نتایج به‌صورت mean ± SD گزارش شد. اندازه‌گیری حرکت براونی ذرات در این روش، با استفاده از تابش پرتوهای نور مرئی از یک منبع نور از جنس نفون 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 میلی‌مولار، حاوی (w/v) ۰/۰۵ درصد سدیم دودسیل سولفات حل شد. نمونه‌ها به‌منظور 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 ۱۶۰۰۰ g به‌منظور 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 را 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.

اندازه گیری حجم نهایی تومور در موشهای توموری:

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

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

تشکیل کریستالهای فورمازون بنفش نامحلول انجام می گیرد. کریستالهای فورمازونی که تشکیل می شوند قابل حل شدن هستند و جذب محلول رنگی حاصل می تواند با استفاده از الیزانگار 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 $100 \mu\text{l}$ از آن در هر یک از چاهکهای پلیت ۹۶ خانه‌ای ته تخت ریخته شد. برای هر نمونه سه تکرار در حضور $20 \mu\text{g/ml}$ از آنتی ژن اختصاصی تومور و سه تکرار در حضور $50 \mu\text{L}$ (1 mg/ml) میتوزن فیتوهماکلوآنتیجین 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 CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به هر چاهک $20 \mu\text{l}$ محلول MTT (5mg/ml در 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 $100 \mu\text{l}$ میکرولیتر DMSO به حالت محلول درآمد. سپس شدت رنگ در طول موج 570 nm توسط الیزانگار تعیین و جذب سلولهای تحریک شده به تحریک نشده بعنوان اندیکس تحریکی محاسبه گردید (۲۵).

بررسی میزان التهاب ناشی از (Delayed Type DTH) Hypersensitivity

ابتدا $20 \mu\text{l}$ میکرولیتر آنتی ژن توموری (تهیه شده از رده سلولی) در کف پای چپ و $20 \mu\text{l}$ 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 مهاجمی زیاد می باشد 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 می شود. بدین منظور 10^5 سلول توموری زنده محلول در $50 \mu\text{L}$ بافر PBS به صورت زیرجلدی در ناحیه پهلوئی 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 هفته یکبار، در ناحیه مخالف رشد تومور یعنی پهلوئی چپ قرار گرفتند. گروه A شامل

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

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

تهیه کشت سلولی طحال:

۲۱ روز پس از آغاز درمان، طحال موشهای مورد مطالعه پس از برداشت در شرایط استریل، در ۵ میلی لیتر محیط کشت RPMI 1640 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 گلبولهای قرمز پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت 200 g ، ۵ میلی لیتر بافر لیزکننده گلبولهای قرمز، بر روی رسوب سلولی به دست آمده افزوده شد. پس از ۵ دقیقه ضمن افزودن ۱۰ میلی لیتر محیط کشت بار دیگر به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت 200 g سانتریفیوژ گردید. سپس رسوب سلولی در محیط کشت RPMI حاوی FBS ۱۰ درصد به حالت سوسپانسیون درآورده شد.

بررسی میزان تکثیر سلولهای ایمنی در تحریک با آنتی

ژن توموری به روش MTT

میزان تکثیر لنفوسیتهای 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-dimethylthiazol2yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و

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

$$DTH: \text{میزان التهاب ناشی} = \frac{\text{قطر پای راست} - \text{قطر پای چپ}}{\text{قطر پای راست}}$$

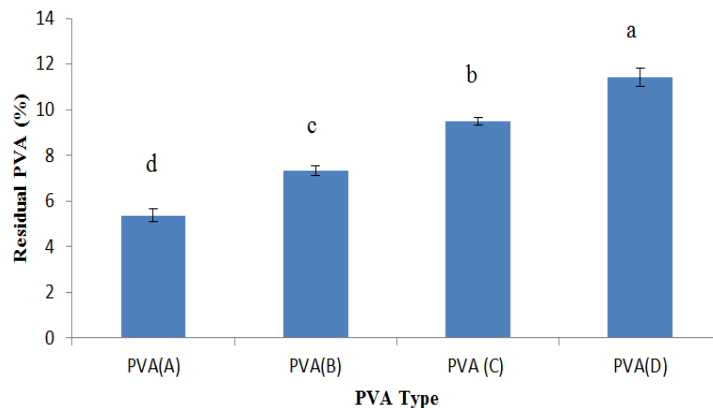
آنالیز آماری:

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA، نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴) و آزمون Tukey استفاده گردید. تمامی داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش و حد معنی‌دار بودن $p < 0/05$ در نظر گرفته شد. تمامی تست‌ها سه بار تکرار شدند.

یافته‌ها

اثرات وزن مولکولی و درصد هیدرولیز پلی وینیل الکل:

تولید نانوذرات PLGA حاوی عصاره سلول توموری با استفاده از چهار نوع پلی‌وینیل‌الکل تجاری متفاوت از نظر وزن مولکولی و درصد هیدرولیز، شامل پلی‌وینیل‌الکل (A) با میانگین وزن مولکولی ۱۳-۲۳ کیلو دالتون و درصد هیدرولیز ۸۷-۸۹ درصد، پلی‌وینیل‌الکل (B) با میانگین وزن مولکولی ۳۱-۵۰ کیلو دالتون و درصد هیدرولیز ۸۷-۸۹ درصد، پلی‌وینیل‌الکل (C) با میانگین وزن مولکولی ۳۱-۵۰ کیلو دالتون و درصد هیدرولیز ۹۸-۹۹ درصد و پلی‌وینیل‌الکل (D) با میانگین وزن مولکولی ۸۵-۱۲۴ کیلو دالتون و درصد هیدرولیز ۹۹ درصد که به ترتیب تحت عناوین PVA (A)، PVA (B)، PVA (C) و PVA (D) مشخص شدند، مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در نمودار ۱ نشان داده شده است با افزایش وزن مولکولی و درصد هیدرولیز پلی‌وینیل‌الکل، مقدار امولسیفایر باقیمانده روی سطح نانوذرات بطور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0/05$). به طوری که درصد پلی وینیل الکل باقیمانده در کم‌ترین وزن مولکولی و درصد هیدرولیز PVA (A) از ۵/۳۷ درصد به ۱۱/۴۱ درصد در بیشترین وزن مولکولی و درصد هیدرولیز PVA(D) رسید.



نمودار (۱): تأثیر انواع پلی وینیل الکل بر روی درصد پلی وینیل الکل باقیمانده بر سطح نانوذرات، حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح $p < 0/05$ می باشد.

وینیل الکل است ($p < 0.001$). برای نمونه‌های PVA (A)، PVA (B)، PVA (C) و PVA (D) اندازه ذرات به ترتیب ۱۶۵، ۲۹۱، ۴۰۲ و ۶۸۳ نانومتر بود. همانطور که مشاهده می‌شود کوچکترین اندازه ذرات با استفاده از پلی وینیل الکل با کم‌ترین وزن مولکولی و درصد هیدرولیز PVA (A) به دست آمد.

شاخص پراکندگی، یک بیانیه واحد برای بررسی توزیع اندازه ذرات است و پارامتری بین عدد ۰ تا ۱ است و نشان‌دهنده میزان هموزن 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 می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود، علیرغم روش تهیه یکسان، نانوذرات با توجه به نوع پلی وینیل الکل مورد استفاده، ویژگی‌های متفاوتی را نشان دادند. اندازه ذرات و شاخص پراکندگی با استفاده از دستگاه DLS تعیین شد. نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها 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 الکل‌های با وزن مولکولی و درصد هیدرولیز پایین‌تر باعث تولید ذرات کوچک‌تر، شاخص پراکندگی همگن‌تر، ولی کارایی انکپسولاسیون کم‌تری نسبت به نانوذرات تهیه شده توسط پلی وینیل الکل‌های با وزن مولکولی و درصد هیدرولیز بالاتر شدند که البته این کاهش کارایی انکپسولاسیون از نظر آماری چندان معنی‌دار نبود. به همین دلیل PVA (A)، با وزن مولکولی ۲۳-۱۳ کیلو دالتون و درصد هیدرولیز ۸۹-۸۷ درصد به‌عنوان بهترین نوع پلی وینیل الکل جهت ادامه آزمایشات انتخاب شد.

به عدد صفر نزدیک‌تر باشد، ذرات سنتزی همگن‌تر می‌باشند. هنگامی که از PVA (A) برای تهیه نانوذرات استفاده شد، سیستم دارای ذرات همگن بیشتری در مقایسه با سایر پلی وینیل الکل‌های مورد استفاده بود و شاخص پراکندگی ذرات حدود ۰/۰۶ به دست آمد. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود وزن مولکولی و درصد هیدرولیز پلی وینیل الکل بر روی کارایی انکپسولاسیون نانوذرات تولیدی نیز تأثیر داشت و با افزایش وزن مولکولی و درصد هیدرولیز، کارایی انکپسولاسیون نانوذرات نیز افزایش یافت ($p < 0.05$). البته بین دو نمونه PVA (A) و PVA (B) 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	کارایی انکپسولاسیون (%)
PVA(A)	$165/60 \pm 3/60$	$0/06 \pm 0/05$	$82/86 \pm 2/06$
PVA(B)	$291/13 \pm 4/41$	$0/15 \pm 0/02$	$85/90 \pm 0/75$
PVA(C)	$402/33 \pm 10/68$	$0/24 \pm 0/01$	$90/73 \pm 1/56$
PVA(D)	$683/46 \pm 4/69$	$0/33 \pm 0/01$	$96/13 \pm 1/79$

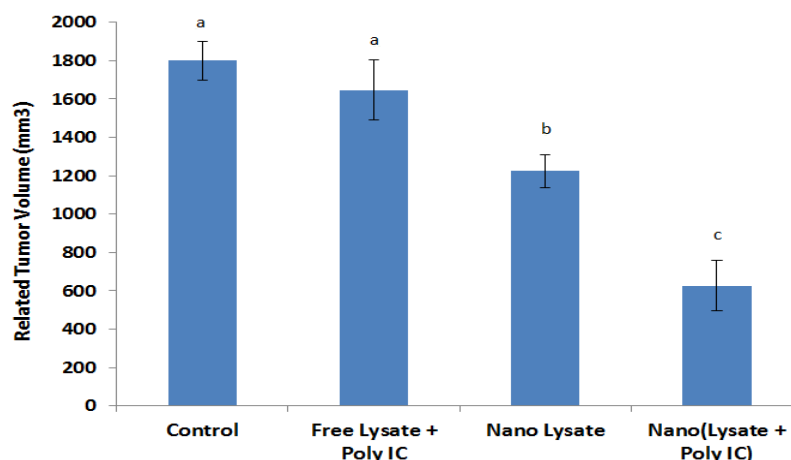
حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده معنی داری در سطح $p < 0/05$ می باشد.

حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده معنی داری در سطح $p < 0/001$ می باشد.

نتایج تأثیر واکسن بر حجم تومور:

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

نظر آماری معنی‌دار نبود. اما در گروه‌های دریافت کننده نانوذرات حاوی عصاره با یا بدون Poly IC از نظر آماری با گروه کنترل معنی‌دار 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).

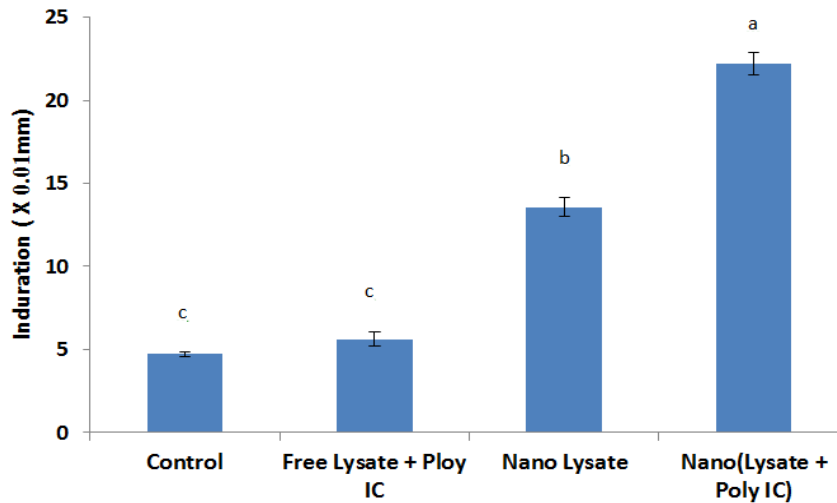


نمودار (۲): مقایسه حجم نهایی تومور در گروه‌های مختلف

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 دریافت‌کننده نانوذرات بیشتر از دو گروه کنترل و گروه دریافت‌کننده 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).



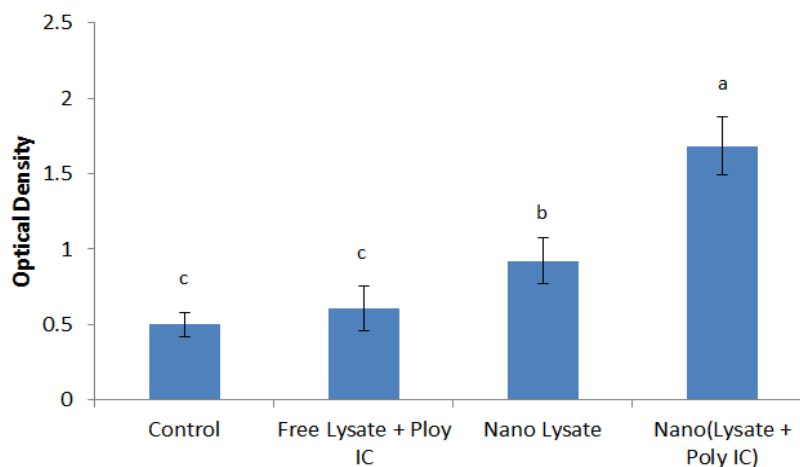
نمودار (۳): مقایسه پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری حاصل از تزریق آنتی ژن توموری پس از ۷۲ ساعت حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح $p < 0/05$ می‌باشد.

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

بررسی میزان تکثیر لنفوسیت‌های طحالی به روش

MTT:

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



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

حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح $p < 0/05$ می باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

ایمونوترپی سرطان علیرغم مزایای فراوان آن، همچنان با چالش‌های متعددی مانند ایمنی‌زایی ضعیف واکسن‌های سرطانی، سرکوب ایمنی در ناحیه تومور یا تحمل ایمونولوژیک مواجه است. نانوذرات با خصوصیات فیزیکی و بیوشیمیایی تعریف شده، سیستم‌های تحویل دارویی متنوعی هستند که ممکن است بتوانند بر این چالش‌های پیش روی ایمونوترپی 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 ایمنی سلولی می‌شوند در حالی که میکروذرات دارای سایز بین ۵-۵۰ میکرومتر از طریق مسیر فاگوسیتوز یا ماکروپینوسیتوز جذب شده و بیشتر باعث القای پاسخ‌های ایمنی 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 درون‌تن 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 سورفکتانت مورد استفاده می‌باشد (۲۸). به همین دلیل، در قسمت اول این پژوهش با ارزیابی انواع پلی‌وینیل‌الکل استفاده شده در طی روند تهیه نانوذرات، سیستم تحویل ذراتی انتخاب شد که دارای سایز مناسب برای جذب آسان توسط سلول‌های دندریتیک و درعین 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

مشکل است. علت این امر را میتوان به این موضوع نسبت داد که بخش هیدروفوب 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 هیدرولیز پلی‌وینیل‌الکل، باعث افزایش قطر متوسط نانوذرات می‌شود. علت این امر را می‌توان به این موضوع نسبت داد که پلی‌وینیل‌الکل‌های با درصد هیدرولیز 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 ویسکوزیته‌ی 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 در نتیجه افزایش قطر هیدرودینامیکی نانوذرات باشد (۳۳). با افزایش وزن مولکولی و درصد هیدرولیز پلی‌وینیل‌الکل، مقدار امولسیفایر باقیمانده روی سطح نانوذرات نیز افزایش یافت. این نتایج در توافق با نتایج سایر پژوهشگران بود (۳۴، ۳۵). موراکی و همکاران نیز گزارش کردند که استفاده از پلی‌وینیل‌الکل با درصد هیدرولیز و وزن مولکولی پایین، مانع از ژلاتینه شدن موضعی پلی‌وینیل‌الکل در سطح ذرات امولسیون شده و در نتیجه تجمع نانوذرات را به میزان قابل توجهی محدود می‌کند (۳۶). همچنین این محققین مشاهده کردند که پلی‌وینیل‌الکل با درصد هیدرولیز بالا (بیشتر از ۸۸ درصد) منجر به پراکندگی ناپایدار ذرات، حل شدن مجدد ضعیف و در نتیجه درصد پایین تولید نانوذرات می‌شود (۳۶). افزایش درصد هیدرولیز 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 هیدرولیز پلی‌وینیل‌الکل منجر به افزایش ویسکوزیته فاز آبی می‌شود و از این رو منجر به تشکیل نانوذرات با اندازه‌های بزرگ می‌شود و هر چه ذرات بزرگ‌تر می‌شوند، توانایی دربرگرفتن مقدار بیشتری از عصاره را دارند و در نتیجه کارایی انکپسولاسیون افزایش می‌یابد. ۲- گروه‌های هیدروکسیل پلی‌وینیل‌الکل جذب شده بر روی سطح نانوذرات ممکن است یک فیلم ضخیم بر روی سطح نانوذرات

را از طریق برهم‌کنش‌های قوی درون یا بین مولکولی تشکیل دهند. این فیلم ضخیم احتمالاً انتشار عصاره را به فاز آبی به تاخیر می‌اندازد، در نتیجه باعث کاهش از دست رفتن عصاره می‌شود. ۳- افزایش ویسکوزیته، میزان انتشار دارو را به فاز آبی کاهش داده و در نتیجه 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. در واقع 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 آنتی‌ژن می‌شود. بعد از فاگوسیتوز نانوذرات توسط سلول‌های دندریتیک، نانوذرات PLGA باعث افزایش فرایند فاگوزومال شده که باعث تقویت عرضه متقاطع آنتی‌ژن‌های توموری به سلول‌های T CD8+ دست نخورده می‌شود (۱۱).

مطالعات مختلفی به بررسی انکپسولاسیون پروتئین‌ها و آنتی‌ژن‌های منفرد در نانوذرات PLGA پرداخته‌اند (۳۸، ۳۹)، اما مطالعات اندکی در زمینه استفاده از کل آنتی‌ژن‌های توموری صورت گرفته است (۴۰). هانولن و همکاران نشان دادند که دندریتیک سل مشتق از افراد سالم داوطلب پالس شده با ذرات PLGA حاوی عصاره توموری حاصل از رده سلولی سرطان تخمدان، منجر به تحریک تولید چشمگیر سیتوکین‌های Th1 در کشت هم‌زمان با سلول‌های T CD8+ خودی در مقایسه با دندریتیک سل‌های پالس شده با عصاره سلول توموری محلول می‌شود (۴۱). پراساد و همکاران عصاره حاصل از رده سلولی B16 ملانوما را در نانوذرات PLGA انکپسوله نمودند و نتایج حاصل از تأثیر آن‌ها بر روی سلول‌های دندریتیک در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که استفاده از عصاره توموری انکپسوله شده باعث تحریک بیشتر تولید سیتوکین‌های محرک ایمنی از جمله IFN- γ و کاهش تولید سیتوکین‌های مهارکننده ایمنی از جمله IL-10 نسبت به استفاده از عصاره سلول توموری به صورت محلول می‌شود (۲۲).

Poly (I: C) Polyinosinic-polycytidylic acid آنالوگ

سنتتیک RNA دو رشته‌ای و آگونیست TLR3 است که باعث افزایش پایداری بلوغ در سلول‌های دندریتیک، افزایش عرضه متقاطع آنتی‌ژن توسط سلول دندریتیک به سلول‌های TCD8+ و در نتیجه افزایش پاسخ‌های اولیه و خاطره‌ای TCD8+ برای القا پاسخ‌های ایمنی سلولی می‌شود (۴۳، ۴۲). یکی از مهم‌ترین مزایای

سیستم‌های تحویل آنتی‌ژن مبتنی بر نانوذرات، توانایی تحویل هم‌زمان آنتی‌ژن و مولکول‌های محرک ایمنی از جمله آگونیست‌های TLR به سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن می‌باشد. تحویل هم‌زمان لیگاندهای مختلف TLR و آنتی‌ژن 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 دندریتیک و افزایش پاسخ‌های CTL اختصاصی آنتی‌ژن 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 ادجوانت CpG را به صورت هم‌زمان درون نانوذرات PLGA انکپسوله نمودند و پاسخ‌های طولانی مدت CTL را پس از تزریق زیرجلدی در یک مدل موشی سرطان پروستات مشاهده نمودند (۴۵). سیلوا و همکاران در سال ۲۰۱۵ آنتی‌ژن توموری اووآلبومین را به همراه Poly-IC درون نانوذرات PLGA کپسوله کرده و به صورت زیرجلدی به موش‌های C57BL/6 تزریق کرده و مشاهده نمودند که نانوذرات حاصل باعث افزایش تولید سلول‌های T CD8+ اختصاصی اووآلبومین شد (۲۷). 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 دندریتیک در شرایط آزمایشگاهی شد (۴۲). حمدی و همکاران در سال ۲۰۰۷ گزارش کردند که تحویل اووآلبومین و MPLA به سلول‌های دندریتیک 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 (۱۳). در مطالعه حاضر پاسخ‌های ضد توموری نانوذرات حاوی عصاره به همراه Poly-IC، بسیار بیشتر از گروه دریافت‌کننده نانوذرات حاوی عصاره تنها و نیز گروه دریافت‌کننده عصاره و Poly-IC به فرم محلول بود. علت این امر را می‌توان به این موضوع نسبت داد که تزریق هم‌زمان آنتی‌ژن و ادجوانت به صورت محلول می‌تواند موجب انتقال آنتی‌ژن به بعضی از سلول‌های دندریتیک و انتقال ادجوانت به گروهی دیگر از سلول‌های دندریتیک شود. انتقال آنتی‌ژن در غیاب ادجوانت موجب القاء تولرانس یا تحمل ایمنولوژیک شده و در نتیجه پاسخ‌های ایمنی قوی ضد توموری را مهار می‌کند (۴۴). کپسوله کردن هر دو آنتی‌ژن و ادجوانت به صورت مشترک در یک ذره، تحویل هم‌زمان این دو جزء را به یک سلول دندریتیک امکان‌پذیر

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

یکی از راه‌های درمان سرطان، افزایش پاسخ تکثیری سلول‌های ایمنی به‌ویژه لنفوسیت‌ها بر علیه تومور می‌باشد. لنفوسیت‌های حساس شده در برخورد با آنتی ژن 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 ایمنی در طحال موش‌های 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 ایمنی 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 و MPLA به‌صورت هم‌زمان، باعث افزایش میزان تکثیر سلول‌های ایمنی در طحال موش‌های 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 وخامت یا وضعیت درمان تومور به شمار می‌رود. نتایج مربوط به حجم نهایی تومور که نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار سرعت رشد تومور در موش‌های دریافت کننده نانوذرات می‌باشد، می‌تواند تائیدی بر فعال شدن و کارآمدی سیستم ایمنی در مقابله با تومور و جلوگیری از رشد آن در نتیجه‌ی تزریق نانوذرات باشد. هر چند که نانوذرات حاوی عصاره بدون Poly-IC توانست تا حدودی جلوی رشد تصاعدی 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 کردند و مشاهده کردند که نانوذرات حاصل باعث کاهش چشمگیر رشد تومور و افزایش زنده‌مانی 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 ایمنی سلولی وابسته به لنفوسیت‌های Th1 بود. واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری (DTH) یک ارزیابی درون‌تنی (in vivo) از عملکرد ایمنی سلولی است و به‌طور مستقیم نشان‌دهنده عملکرد سلول‌های Th1 که در واقع یکی از پاسخ‌های ایمنی مورد نیاز در شرایط ابتلا به سرطان می‌باشد، است. تست

DTH برای ارزیابی تأثیر واکسن‌های سرطانی بسیار مفید می‌باشد زیرا به بررسی مستقیم وضعیت خاخره ایمنی سلولی در بدن بیمار می‌پردازد. مجموعه‌ی لنفوسیت‌های حساس شده‌ای که موجب ازدیاد حساسیت تأخیری می‌شوند، چنانچه مجدداً 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 به‌صورت 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 توموری حاصل از رده 4T1 باعث تولید سطح بالاتری از پاسخ DTH نسبت به گروه دریافت کننده نانوذرات سلنیوم تنها می‌شود (۵۰).

بطور خلاصه در پژوهش حاضر، عصاره سلول توموری به‌عنوان منبع غنی از آنتی‌ژن‌های توموری و Poly-IC به‌عنوان ادجوانت محرک سیستم ایمنی، 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 فیزیکیوشیمیایی 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 ۲۳-۱۳ کیلو دالتون و درصد هیدرولیز ۸۷-۸۹ درصد باعث تولید نانوذرات با ویژگی‌های مطلوب شد که برای استفاده در سیستم تحویل واکسن ایده‌آل بود. اندازه، شاخص پراکندگی و بازده کپسولاسیون نانوذرات تهیه شده به ترتیب برابر با $2/60 \pm 165/60$ نانومتر، $0/05 \pm 0/06$ و $2/06 \pm 82/86$ 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 ایمنی سلولی ضد تومور) و همچنین افزایش پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری (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

پستان مطرح شود. در نهایت، میتوان تأثیر انکپسولاسیون هم‌زمان سایر آگونیست‌های 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.

اما این تغییرات در گروه دریافت‌کننده نانوذرات حاوی عصاره به همراه Poly-IC به‌طور قابل‌توجهی 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 به‌عنوان یک راهکار درمانی مؤثر در درمان سرطان

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 IJ, 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-McDonagh 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

- 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, single-molecule 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-hydroxyphenyl)porphyrin-loaded nanoparticles for photodynamic therapy. *Eur J Pharm Biopharm* 2003; 55: 115–124.
- 34- Şengel-Türk CT, Haşçıçek C, Dogan AL, Esendagli G, Güc 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, Farahmandghavi 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, Corthesy 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, Hernandez 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