



Comparison of Humoral and Cell-Mediated Immune Response to Tetanustoxin Coated PLGA in Mice

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Vasegh R.¹ MSc,
Ebtekar M.*¹ PhD,
Shafiee Ardestani M.² PhD
Gholamzad M.¹ PhD

How to cite this article

Alizadeh S, Ebtekar M, Shafiee Gholamzad M. Comparison of Humoral and Cell-Mediated Immune Response to Tetanustoxin Coated PLGA in Mice. Pathobiology Research. 2019;22(1):7-19.

¹Immunology Department, Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Radiopharmacy Department, Pharmacy Faculty, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran.

Phone: +98 (21) 82883846

Fax: -

ebtekarm@modares.ac.ir

Article History

Received: March 18, 2018

Accepted: June 12, 2018

ePublished: March 11, 2019

ABSTRACT

Aims New vaccines based on recombinant and DNA proteins are safer than traditional vaccines, but unfortunately, they have lower immunogenicity. Therefore, there is a need for the development of safe and strong adjuvants that can increase the immune response of the vaccine. Glycolic acid lactic polyester (PLGA), a copolymer ester, consists of acidic and polyglycolic lactic acid. Its hydrolysis leads to the production of lactic acid and glycolic acid monomers. The aim of this study was to compare humoral and cell mediated immune response to tetanustoxin coated PLGA in mice.

Materials & Methods In this experimental study, PLGA nanoparticles were produced by water/oil (W/O) method. Tetanus toxin were covalently attached to nanoparticles by EDC. After coated nanoparticles characterization, they were injected into different groups of mice. The Freund's complete adjuvant and Alum were used as control. After a single injection, the immunostimulation of humoral immuneresponse was investigated by ELISA and cellular immunresponse was analyzed by spleen cell proliferation assay. One-way analysis of variance was used.

Findings PLGA nanoparticles had a strong adjuvant effect, and when used with antigens, could produce cellular and humoral immune response far more powerful than alum adjuvant and equal than Freund's adjuvant.

Conclusion Glycolic acid lactic polyester, in the form of conjugation with an antigen, can be used to increase the immune response, especially in the cellular immune arm, relative to the antigenic solution. Although PLGA adjuvant seems not so successful to the humoral immune stimulus against alum adjuvant, but in comparison to the full adjuvant of Freund's, it can be a significant competitor with single injection.

Keywords Nanoparticles ; PLGA ; Tetanus Toxin; Immune response; Adjuvant

CITATION LINKS

[1] Vaccine adjuvants ... [2] Dose sparing of CpG ... [3] Absorbable pins of self-reinforced ... [4] Biomedical application ... [5] A comparison of anionic ... [6] Preparation of biodegradable ... [7] Preparation and characterization ... [8] Preliminary biological ... [9] Investigations on the toxicological ... [10] Immunogenic and allergenic ... [11] Immunostimulating effect ... [12] Nanoparticles and the immune ... [13] Pathogen recognition ... [14] Particle size and ... [15] Biodegradable particles ... [16] Amphiphilic poly ... [17] The uptake of PLGA ... [18] Size dependency of PLGA ... [19] Determining the size ... [20] Shape induced inhibition ... [21] Gold nanoparticles ... [22] Endocytosis and intracellular ... [23] Combined atomic force ... [24] Surface charge of nanoparticles ... [25] Enhancing the receptor ... [26] Nanocarriers' entry into the ... [27] Improved immune ... [28] Enhanced cellular uptake ... [29] Vaccine adjuvants: A priority ... [30] The inhibitory role ... [31] Immunostimulation mechanism ... [32] Microneedle-mediated transcutaneous ... [33] Intranasal delivery of cationic ... [34] Comparison of humoral ... [35] Effect of surface properties ... [36] Lung inflammation and ... [37] Carbon nanotubes show ... [38] Effect of ultrasmall ... [39] Biologically and chemically ... [40] Effect of blending Calcium ... [41] Reduced inflammatory responses ... [42] Reduction of inflammatory ... [43] Biodegradable nanoparticle ... [44] Tetanus toxoid loaded ... [45] Type 1 and 2 immunity ... [46] Size-dependent immunogenicity ... [47] Size dependent immune ... [48] Preclinical studies to understand ... [49] Adjuvant activity and toxicity ... [50] A new family of carriers ... [51] Immunogenic properties ... [52] Systemic immune responses ... [53] Vaccination against foot ... [54] An experimental divalent ... [55] Formulation, characterization ... [56] Formulation of functionalized ... [57] Micro- and nanoparticle-based ... [58] Biodegradable nanoparticle ... [59] Immunity in response to particulate ... [60] Analysis of the role of vaccine ... [61] Gamma-irradiation effects ...

مقایسه پاسخ ایمنی سلولی و ایمنی همورال علیه نانوذرات PLGA پوشانده‌شده با توکسین تتانی در موش

روح‌الله واثق * MSc

گروه ایمنی‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

معصومه ابتکار PhD

گروه ایمنی‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

مهدی شفیعی‌اردستانی PhD

گروه رادیوفارماسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

مهرداد غلام‌زاد PhD

گروه ایمنی‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

اهداف: واکنش‌های جدید بر پایه پروتئین‌های نوترکیب و DNA نسبت به واکنش‌های سنتی ایمن‌تر هستند، اما متاسفانه ایمنوژنیسیته پایینی دارند، بنابراین به توسعه ادجوانتی ایمن و قوی نیاز است. لاکتیک‌گلیکولیک‌اسید (PLGA)، کو-پلی‌مری استری متشکل از لاکتیک‌اسید و پلی‌گلیکولیک‌اسید. هیدرولیز آن منجر به تولید مونومرهای لاکتیک‌اسید و گلیکولیک‌اسید می‌شود. هدف پژوهش حاضر مقایسه پاسخ ایمنی سلولی و همورال علیه نانوذرات PLGA پوشانده‌شده با توکسین تتانی (PLGA-Tet) در موش بود.

مواد و روش‌ها: در پژوهش تجربی حاضر نانوذرات PLGA با روش آب/روغن تولید و اتیل‌دی‌متیل‌آمینوپروپیل‌کاربودی‌ایمید (EDC) توکسین تتانی به روش کووالان به آن متصل شد. پس از تعیین خصوصیات نانوذرات پوشانده‌شده با توکسین تتانی، آنها به گروه‌های مختلف موشی تزریق شدند. در گروه‌های کنترل از ادجوانت کامل فروند و آلود استفاده شد. پس از یک‌بار تزریق، ایمنی همورال موش‌ها به روش الیزا و ایمنی سلولی با پاسخ تکثیر لئوسیت‌های طحال مورد بررسی قرار گرفت. برای تحلیل داده‌ها آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه به کار رفت.

یافته‌ها: نانوذرات PLGA خاصیت ادجوانتی قوی داشتند و یک‌بار تزریق آن به‌همراه آنتی‌ژن، پاسخ ایمنی سلولی و ایمنی همورال به‌مراتب قوی‌تر از ادجوانت آلود و کمتر از ادجوانت فروند ایجاد کرد.

نتیجه‌گیری: پلی‌لاکتیک-کو-گلیکولیک‌اسید به شکل کوئژوگاسیون با آنتی‌ژن، با یک‌دوز تزریق می‌تواند پاسخ ایمنی را به‌ویژه در بازوی ایمنی سلولی نسبت به حالت محلول آنتی‌ژن افزایش دهد. همچنین ادجوانت PLGA اگرچه در برابر ادجوانت آلود در تحریک ایمنی همورال چندان موفق به نظر نمی‌رسد، اما در مقایسه با ادجوانت کامل فروند می‌تواند با یک‌دوز تزریق، رقیبی قابل توجه برای آن باشد.

کلیدواژه‌ها: نانوذرات، PLGA، توکسین تتانی، پاسخ ایمنی، ادجوانت

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۳/۲۲

* نویسنده مسئول: ebtokarm@modares.ac.ir

مقدمه

پلیمرهایی که امروزه در دنیای زیست‌شناسی به کار می‌روند و تحت عنوان زیست‌تخریب‌پذیر توصیف می‌شوند در کاربری‌های مختلف بیولوژیکی از قبیل ناقل‌های دارویی و بخیه بررسی شده‌اند که دلایل آن به زیست‌سازگاری، ماهیت غیرسمی و ویژگی‌های زیست‌تخریب‌پذیری آنها مربوط می‌شود. پلیمرهایی که برای استفاده در این کاربری‌ها از قبیل واکنش انتخاب می‌شوند باید دارای برخی ویژگی‌ها مانند زیست‌تخریب‌پذیری، ایمنی (سازگاری با بافت، بدون واکنش ثانویه و زاید)، سازگاری با آنتی‌ژن،

نفوذپذیری، با ثبات در شرایط درون‌تنی، تهیه آسان، تنها عامل تعیین فرمولاسیون واکنش و در نهایت ارزانی باشند.

واکنش‌های جدید بر پایه پروتئین‌های نوترکیب و DNA نسبت به واکنش‌های سنتی ایمن‌تر هستند، اما متاسفانه ایمنوژنیسیته (توانایی القای پاسخ ایمنی همورال و سلولی) پایینی دارند. بنابراین به توسعه ادجوانتی ایمن و قوی نیاز مبرمی وجود دارد که می‌تواند پاسخ ایمنی واکنش را افزایش دهد.

پلیمرهای نانوسفر عموماً ذراتی مستحکم، کروی یا نسبتاً کروی، زیست‌تخریب‌پذیر و زیست‌سازگار هستند که اندازه‌ای در محدوده یک تا ۱۰۰۰ نانومتر دارند. پلیمرهای نانوسفری می‌توانند به اشکال مختلفی نقش ادجوانتی خود را ایفا کنند. یکی از این نقش‌ها به‌عنوان رساننده آنتی‌ژن و عرضه آن به سلول‌های پردازنده آنتی‌ژن (APC) است که در این حالت آنتی‌ژن‌ها به شکل غیرکووالان در نانوسفرها بارگذاری و محصور می‌شوند و در نهایت به شکل هدفمند در جایگاه مورد نظر آنتی‌ژن را آزاد می‌کنند. برخی از این ترکیبات که به‌عنوان رساننده کنترل‌شده ترکیبات عمل می‌کنند، در دهه گذشته به شکل قابل توجهی افزایش یافته‌اند^[1]. یکی از طبقه‌بندی‌های موجود در تقسیم پلیمرها براساس منشأ آنها است و موارد زیر را شامل می‌شود:

۱) پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر سنتتیک که شامل ترکیبات نسبتاً آب‌گریز از قبیل پلی‌استر (شامل پلی‌لاکتیک-کو-گلیکولیک‌اسید؛ PLGA)، پلی‌انیدرید و غیره می‌شوند.

۲) پلیمرهایی که به‌طور طبیعی وجود دارند و شامل ترکیبات آلی قندی پیچیده از قبیل هیالورونان، کتیوزان، دکستران، نشاسته و ترکیبات غیرآلی از قبیل هیدروکسی‌آپاتیت و غیره هستند.

پلی‌استر لاکتیک گلیکولیک‌اسید، کو-پلیمری استری، خطی، آلیفاتیک و آمورف است که از دو هیدروکسیل‌اسید شامل پلی (D و L) لاکتیک‌اسید (PLA) و پلی‌گلیکولیک‌اسید (PGA) تشکیل شده است. بنابراین معمولاً نوع PLGA به‌واسطه نسبت مونومرهای آن مشخص می‌شود (به‌طور مثال PLGA50:50). کو-پلیمر

PLGA به‌واسطه هیدرولیز پیوند استری از طریق تماس و حضور در آب به شکل bulk erosion تخریب می‌شود، به‌گونه‌ای که مونومرهای لاکتیک‌اسید و گلیکولیک‌اسید تولید می‌شوند^[2]. این

دو مونومر تحت شرایط نرمال فیزیولوژیک، محصولات جانبی مسیرهای مختلف متابولیک در بدن هستند، بنابراین PLGA را جزء پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر طبقه‌بندی می‌کنند. همان‌طور که ذکر شد ترکیبات زیست‌تخریب‌پذیر، منشأ طبیعی یا سنتتیک دارند

و در شرایط درون‌تنی به شکل آنزیمی یا غیرآنزیمی یا هر دو، تخریب شده و محصولات زیست‌سازگار و غیرسمی و ایمن تولید می‌کنند که به‌واسطه مسیرهای متابولیک نرمال حذف می‌شوند.

بنابراین، از آنجایی که بدن انسان به‌طور موثر با این مونومرها سروکار دارد، این ترکیبات از طریق چرخه تری‌کربوکسیلیک‌اسید (TCA) متابولیزه می‌شوند، از همین رو PLGA به‌عنوان پلیمری منحصر به فرد توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده، برای استفاده در دستگاه‌های درمانی به‌عنوان بخیه‌های قابل جذب، صفحات استخوانی در ترمیم استخوان و رسانش هدفمند دارو مورد تایید قرار گرفته است (شکل ۱)^[3, 4].

همان‌طور که گفته شد PLGA در محیط‌های آبی به‌واسطه هیدرولیز پیوندهای استری، به شکل Bulk erosion تخریب زیستی می‌شود. حضور گروه جانبی متیل در پلی‌لاکتیک‌اسید هیدروفوبی آن را نسبت به پلی‌گلیکولیک‌اسید افزایش می‌دهد.

آماده‌سازی نانوسفرهای PLGA، روش امولسیون یگانه یا امولسیون دوگانه/تبخیر حلال است. فرآیند امولسیون یگانه شامل امولسیفیکاسیون روغن در آب (O/W) است که برای انکپسوله کردن داروهای نامحلول در آب از قبیل استروئیدها، یک روش ایده‌آل محسوب می‌شود. در حالی که امولسیون دوگانه فرآیندی شامل متد آب در روغن در آب (W/O/W) بوده و برای انکپسوله کردن ترکیبات محلول در آب از قبیل پپتید، پروتئین و واکسن بسیار مناسب است [6,7].

در مطالعات مختلف نقش رسانش آنتی‌ژن و ارایه آن توسط میکرو/نانوسفرهای PLGA به‌طور فراوان بررسی شده است، اما نقش ایمونومدولاتوری (تعدیل‌کننده پاسخ ایمنی) این پلیمر مشخص نیست.

پژوهش حاضر با هدف مقایسه پاسخ ایمنی سلولی و همورال علیه نانوذرات PLGA پوشانده‌شده با توکسین تتانی (PLGA-TET) در موش انجام شد.

مواد و روش‌ها

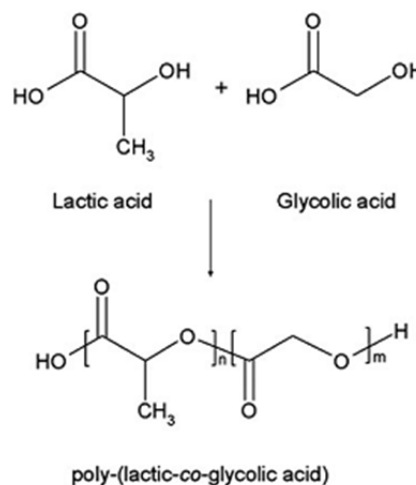
در پژوهش تجربی حاضر PLGA با نسبت لاکتیک‌اسید به گلایکولیک‌اسید ۵۰:۵۰ و وزن مولکولی ۳۰۰۰۰-۶۰۰۰۰ (سیگما آلد ریچ؛ ایالات متحده) به کار رفت. توکسین تتانی (موسسه رازی؛ ایران)، آنتی‌بادی (HyTest؛ فنلاند) و سایر مواد شامل نمک‌ها و محلول‌ها (تهیه‌شده از شرکت‌های تامین‌کننده داخلی) نیز استفاده شدند.

تهیه نانوذره PLGA: ۱۰۰ میلی‌گرم PLGA در ۲ میلی‌لیتر کلروفرم حل و با استفاده از سونیکاتور به مدت ۱۰ دقیقه یکنواخت (هموژنیزه) شد تا نانوذرات شکل گیرند. روی همزن به میزان ۵ میلی‌لیتر دی‌متیل سولفوکساید (DMSO)، پس از گذشت ۵ دقیقه ۵۰ میلی‌گرم اتیل‌دی‌متیل آمینوپروپیل‌کاربودی‌ایمید (EDAC) یا EDC، سپس ۷/۸ میلی‌گرم سولفوان-هیدروکسی سولفوکسینامید (S-NHS) و پس از گذشت ۵ دقیقه دیگر ۲۰ میلی‌گرم توکسین تتانی به محلول فوق اضافه شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه ۳۰/۳ گرم کلسیم کلراید (CaCl₂) به محلول ذکر شده افزوده شد. هم‌زدن محلول به مدت یک هفته ادامه پیدا کرد و در روز سوم نیز ۱/۱ گرم CaCl₂ به آن اضافه و پس از گذشت یک هفته محلول حاصل به مدت یک ساعت در سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و رسوب آن جمع‌آوری شد. عمل شست‌وشو سه بار با بافر فسفات‌سالین (PBS) صورت گرفت. رسوب باقی‌مانده در ویال‌های کوچک لئوفیلیزه شد.

تعیین خصوصیات نانوذرات تولیدشده: میانگین اندازه نانوذرات PLGA پوشانده‌شده با توکسین تتانی توسط روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) محاسبه و مورفولوژی سطحی نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) بررسی شد. همچنین برای ارزیابی اتصال توکسین تتانی به نانوذرات PLGA روش میکروسکوپ نوری اتمی (AFM) و طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته‌ای پروتون (H-NMR) به کار رفت.

تزریق نانوذرات: در پژوهش حاضر موش‌ها به پنج گروه مجزا تقسیم شدند که در هر گروه ۶ سر موش قرار داشت. میزان دوز نهایی تزریق یک میلی‌گرم بر کیلوگرم بود که معادل ۲۰ میکروگرم در ۱۰۰ میکرولیتر است. تزریقات در یک مرحله به شکل زیرجلدی انجام شدند. ۲۸ روز پس از تزریق به بررسی پاسخ ایمنی سلولی به روش‌های ازدیاد حساسیت تاخیری (DTH) و برمودئوکسی یوریدین (BrdU) و

بنابراین PLGA با میزان PLA بالا، هیدروفیلی کمتری دارد، آب کمتری جذب می‌کند و در نتیجه به‌کندی تخریب می‌شود.



شکل ۱) ساختار پلی‌لاکتیک‌گلایکولیک‌اسید: n = تعداد واحدهای لاکتیک‌اسید، m = تعداد واحدهای گلایکولیک‌اسید

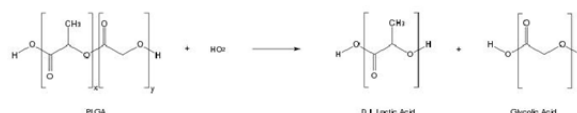
سرعت تجزیه می‌تواند تحت تاثیر پارامترهای مختلفی از جمله موارد زیر باشد:

۱) وزن مولکولی: وزن مولکولی PLGAهای موجود از ۱۰ تا ۱۰۰ کیلودالتون بوده و با افزایش وزن مولکولی نرخ تجزیه از چند هفته تا چند ماه گزارش شده است.

۲) نسبت گلاکولیک‌اسید به لاکتیک‌اسید: افزایش محتوای لاکتیک‌اسید منجر به کاهش هیدروفیلی آن می‌شود و آب کمتری را جذب می‌کند که به دنبال آن تجزیه آهسته‌تری را خواهد داشت؛ همان‌طور که ذکر شد حضور گروه جانبی متیل در PLA آن را نسبت به PGA هیدروفوب‌تر می‌کند. استثنائی در این رابطه وجود دارد به‌طور مثال کو-پلی‌مر ۵۰:۵۰ سریع‌ترین نرخ تجزیه را نشان می‌دهد.

۳) شیمی فضایی: ترکیب ایزومرهای D و L-لاکتیک‌اسید در تولید PLGA متداول است. از آنجایی که نفوذ آب در ناحیه D و L بیشتر است، روند تجزیه PLGA سرعت پیدا می‌کند.

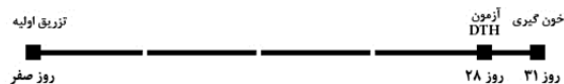
۴) گروه‌های عملکردی انتهایی: پلیمرهایی با استرهای پایان‌پوش (برخلاف کریوکسیلیک‌اسید آزاد) نیمه‌عمر تجزیه‌ای طولانی‌تری را نشان می‌دهند. علاوه بر این، شکل ذرات که دسترسی به آب را تحت تاثیر قرار می‌دهد، می‌تواند بر رفتار تجزیه‌ای PLGA نیز تاثیرگذار باشد. همچنین محیط اسیدی اطراف نیز به علت فعل‌وانفعالات شیمیایی، تجزیه PLGA را تسریع می‌کند (شکل ۲) [5].



شکل ۲) هیدرولیز پلی‌لاکتیک‌گلایکولیک‌اسید

نانوسفرهای PLGA رساننده آنتی‌ژن، می‌توانند با ویژگی‌های فیزیکی متفاوت (سایز، پراکندگی سایز، مورفولوژی و پتانسیل زتا) به واسطه کنترل پارامترهای خاص سنتز شوند که این نانوسفرها در روش‌های تولیدی به کار می‌روند. متداول‌ترین روش تهیه و

بررسی پاسخ ایمنی هومورال با اندازه‌گیری تیتر آنتی‌بادی به روش الایزا پرداخته شد (شکل ۳؛ جدول ۱).



شکل ۳) پروتکل تزریق

جدول ۱) گروه‌های آزمایشی (۶ سر موش در هر گروه)

گروه	واکسن تزریقی	تست یا کنترل
۱	PLGA-Tet	تست
۵	CFA-Tet	کنترل
۸	Tet	کنترل
۱۱	واکسن دوگانه دیفتری تتانی	کنترل
۱۲	PLGA	کنترل

PLGA: پلی‌لاکتیک - کو - گلیکولیک اسید; PLGA-Tet: نانوذرات PLGA پوشانده شده با توکسین تتانی، CFA: ادجوانت فروند کامل

آزمون ازدیاد حساسیت تاخیری: ۲۸ روز پس از ایمونیزاسیون موش‌ها با گروه‌های مختلف نانوذرات PLGA پوشانده شده با توکسین تتانی، توکسوئیدهای تتانی به شکل استریل با دوز ۱۰ میکروگرم در ۵۰ میکرولیتر به شکل کف پایی تزریق شدند. پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از تزریق، وضعیت کف پای موش بررسی شد.

پس از گذشت ۷۲ ساعت از تزریق، تورم موضعی ناحیه تزریقی کف پا با کولیس اندازه‌گیری شد و طبق فرمول زیر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت:

$$DTH = \frac{\text{ضخامت پای تزریق نشده} - \text{ضخامت پای تزریق شده}}{\text{ضخامت پای تزریق نشده}} \times 100$$

بررسی پاسخ‌های تکثیری لنفوسیت‌ها با آزمون BrdU:

۵۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی ۲۰۰ هزار سلول سوسپانسیون شده به چاهک‌های پلیت اضافه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر آنتی‌ژن (توکسوئید) رقیق شده با محیط کشت به میزان ۱۰ میکروگرم (غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به چاهک‌ها افزوده شد. ۵۰ میکرولیتر فیتوهم‌گلوتینین به تعدادی از چاهک‌ها به عنوان کنترل مثبت، به تعدادی از چاهک‌های دیگر پروتئین آلبومین به عنوان کنترل منفی و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت به یک چاهک فاقد سلول به عنوان بلانک اضافه شدند. حجم نهایی همه چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر بود. در نهایت به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C و در حضور ۵٪ دی‌اکسیدکربن انکوباسیون صورت گرفت. سپس ۱۰ میکرولیتر BrdU با رقت ۱ به ۱۰۰ به چاهک‌های کشت سلولی افزوده شد و انکوباسیون آن به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C و ۵٪ دی‌اکسیدکربن صورت گرفت. پس از گذشت این زمان پلیت‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند و به مدت یک ساعت در فور با دمای ۶۰°C قرار گرفتند. ۲۰۰ میکرولیتر محلول فیکساتور FixDenat به چاهک‌های پلیت اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند، سپس محلول فیکساتور خارج و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی کوئزوگه اختصاصی ضد برومودی‌اکسی‌یوریدین (BrdU) تحت عنوان آنتی-برومودی‌اکسی‌یوریدین-پراکسیداز (Anti-BrdU-POD) اضافه و به مدت ۲ ساعت مجدداً در دمای اتاق انکوبه شدند. شست‌وشوی تمامی چاهک‌ها سه مرتبه با محلول حاوی بافر فسفات‌سالین صورت گرفت.

۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترای تترامتیل‌بنزدین (TMB) به

چاهک‌ها افزوده و به مدت یک ساعت در محیط تاریک در دمای اتاق قرار داده شدند. به منظور توقف واکنش ۲۵ میکرولیتر اسیدسولفوریک یک مولار (H₂SO₄) به چاهک‌ها اضافه شد. مقدار جذب نوری نمونه‌ها با الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر و طول موج مرجع ۶۹۰ نانومتر خوانده شد و شاخص تحریک با فرمول زیر مورد بررسی قرار گرفت:

$$\text{مقدار جذب نوری سلول‌های تحریک شده} = \frac{\text{مقدار جذب نوری سلول‌های تحریک نشده}}{\text{شاخص تحریک (SI)}}$$

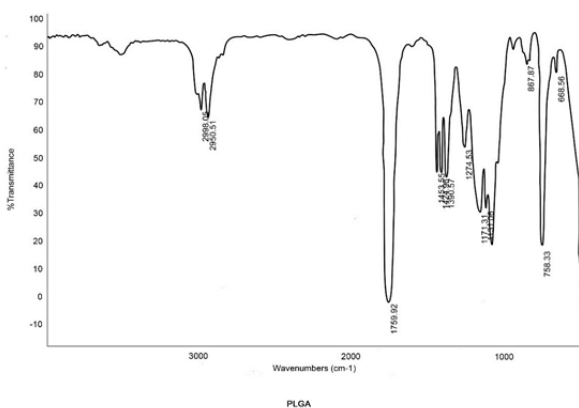
اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های تولیدی با آزمون الایزا: آنتی‌ژن‌های مورد نظر در بافر کربنات‌بی‌کربنات به میزان ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رقیق شدند و با استفاده از سمپلر مولتی‌کانال، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنتی‌ژن به چاهک‌های هر پلیت اضافه و ۲۴ ساعت در یخچال انکوبه شدند. شست‌وشوی کلیه چاهک‌ها پنج بار با بافر صورت گرفت. ۳۰۰ میکرولیتر بافر بلاکینگ به تمامی چاهک‌ها اضافه شد و انکوباسیون به مدت یک ساعت در دمای ۳۷°C صورت گرفت. پس از پنج بار شست‌وشو، ۱۰۰ میکرولیتر سرم موش و سرم‌های کنترل به چاهک‌های مربوطه اضافه شد. انکوباسیون پلیت‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷°C صورت پذیرفت.

۱۰۰ میکرولیتر آنزیم کوئزوگه شده با پراکسیداز ترب کوهی (HRP؛ نسبت ۱:۱۰۰۰ رقیق شده) به چاهک‌ها اضافه شد و انکوباسیون آنها به مدت یک ساعت در دمای ۳۷°C صورت گرفت. پس از سه مرتبه شست‌وشوی چاهک‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا-کروموژن به همه چاهک‌ها افزوده شد.

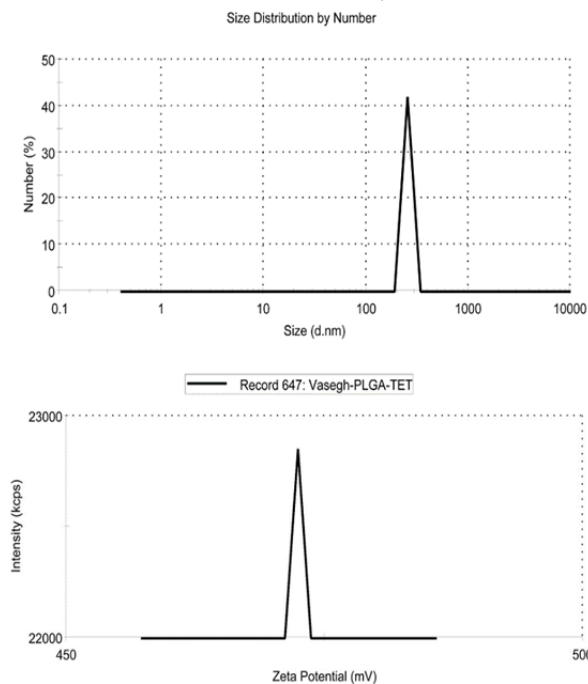
پس از نیم ساعت انکوباسیون در دمای اتاق و در محل تاریک، به کلیه حفرات ۱۰۰ میکرولیتر محلول اسیدسولفوریک اضافه و جذب نوری همه آنها در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. تمام سنجش‌ها و آزمایش‌های پژوهش حاضر به شکل دوتایی صورت گرفت و میانگین آنها به دست آمد. آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و نرم‌افزار نیز به کار رفتند.

یافته‌ها

پیک‌های ۳۳۰۰ تا ۳۵۰۰ نشان‌دهنده وجود آمین (NH₂)، پیک ۳۲۰۰ نشان‌دهنده وجود NH پیوند آمیدی (آمین آمیدی)، پیک‌های ۱۶۰۰ به معنی وجود CO پیوند آمیدی (کربونیل آمیدی)، پیک‌های ۱۷۰۰ نشان‌دهنده گروه کربونیل اسیدی (CO) و وجود پیک‌های ۲۹۰۰ به معنی حضور زنجیره کربنی آلیفاتیک بود (نمودارهای ۱ و ۲؛ جدول ۲).



نمودار ۱) طیف FT-IR نانوذره PLGA؛ پیک ۱۷۵۹ بر سانتی‌متر نشان‌دهنده وجود گروه عاملی کربونیل اسید بود.

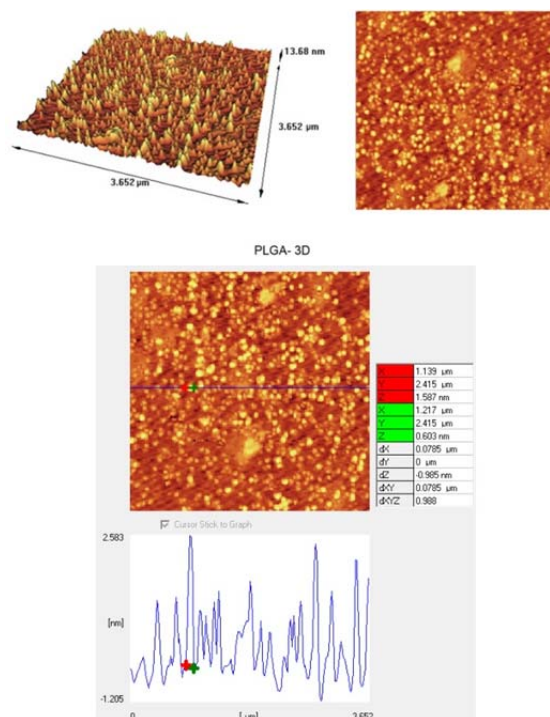


نمودار (۴) منحنی سایز و بار محصولات کونژوگاسیون، PLGA-TET (A)

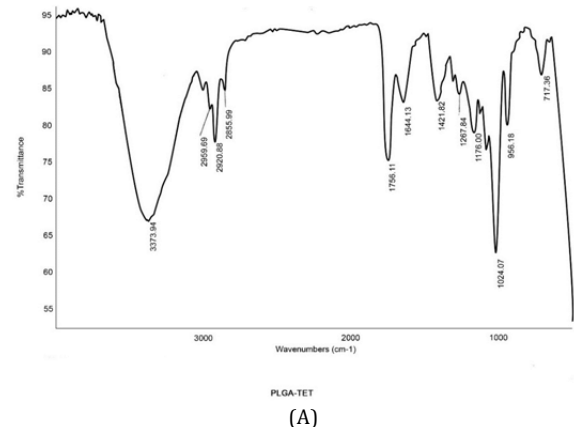
جدول (۱) سایز و بار نانوذرات قبل و بعد از کونژوگاسیون

اندازه (نانومتر)	بار (میلی ولت)	نمونه
۷۰	-۲۴۹	PLGA
۲۸۰	۴۷۱	PLGA-TET

میکروسکوپ نیروی اتمی از نظر مورفولوژی و اندازه ذرات نتایج آزمون‌های دیگر را تایید کرد (نمودار ۳). سایز PLGA در حدود ۷۰ نانومتر و سایز کونژوگه PLGA-TET در حدود ۳۰۰ نانومتر به دست آمد (شکل ۴).



شکل (۴) تصویر بالا: تصاویر سه‌بعدی میکروسکوپی AFM؛ تصویر پایین: آنالیز خطی ذرات PLGA و کونژوگه PLGA-TET، dX سایز ذرات را نشان می‌دهد.

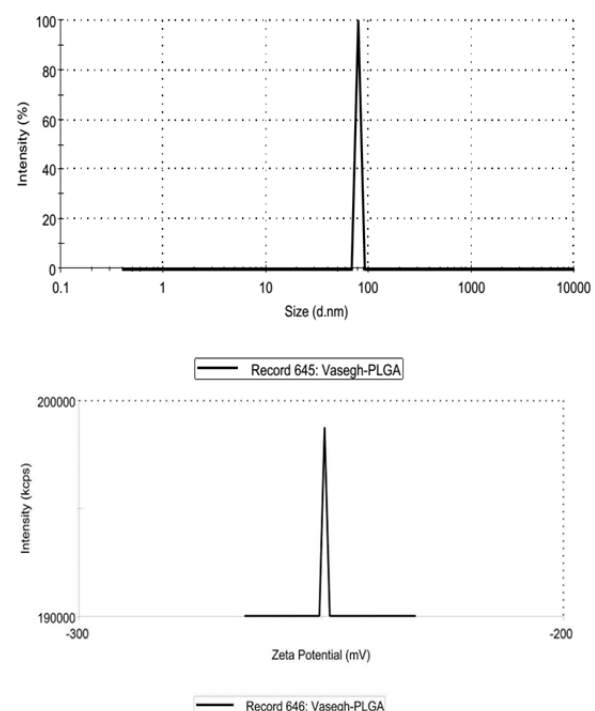


نمودار (۲) طیف FT-IR محصولات کونژوگاسیون PLGA-TET (A)؛ وجود پیک‌های ۱۶۰۰ بر سانتی‌متر نشان‌دهنده گروه کربونیل آمیدی است، ۳۳۰۰ تا ۳۵۰۰ بر سانتی‌متر نشان‌دهنده گروه آمین است، پیک‌های ۳۲۰۰ بر سانتی‌متر نشان‌دهنده وجود گروه آمین آمیدی است.

جدول (۲) طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوری (FT-IR) گروه‌های عاملی مختلف

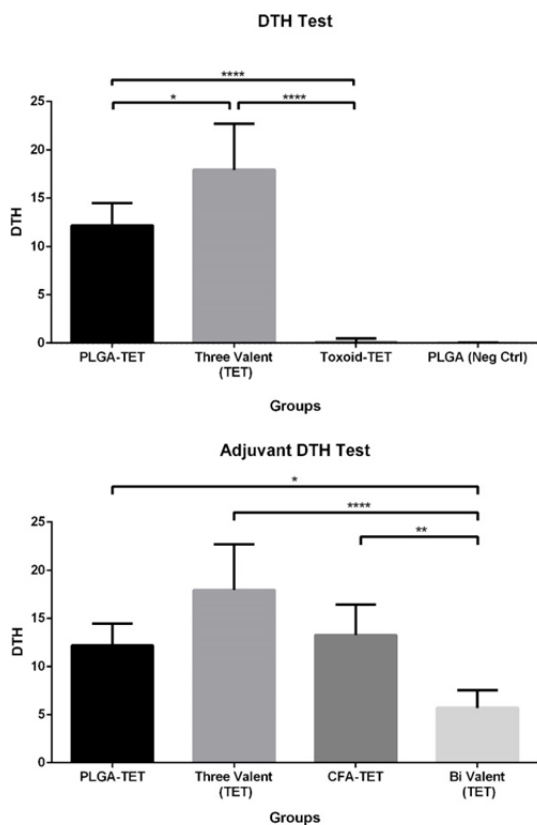
گروه عاملی	طول موج (بر سانتی‌متر)
کربونیل اسیدی	۱۷۰۰
زنجیره کربنی آلیفاتیک	۲۹۰۰
کربونیل آمیدی	۱۶۰۰
آمین	۳۵۰۰-۳۳۰۰
آمین آمیدی	۳۲۰۰

پس از اضافه شدن پپتید به PLGA علاوه بر بزرگ شدن ذرات، بار PLGA نیز از منفی به مثبت تغییر کرد، سایز ذرات در حدود ۷۰ نانومتر و پتانسیل زتا در حدود ۲۴۹- میلی‌ولت بود، سایز و بار ذرات بعد از کونژوگاسیون افزایش داشت (نمودارهای ۳ و ۴؛ جدول ۳).

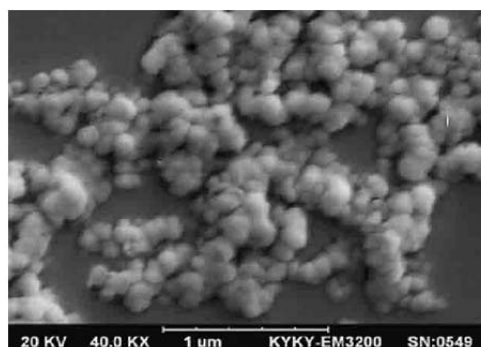


نمودار (۳) منحنی سایز و بار نانوذرات PLGA؛ بالا: سایز نانوذرات (نانومتر)، پایین: بار نانوذرات (میلی‌ولت)

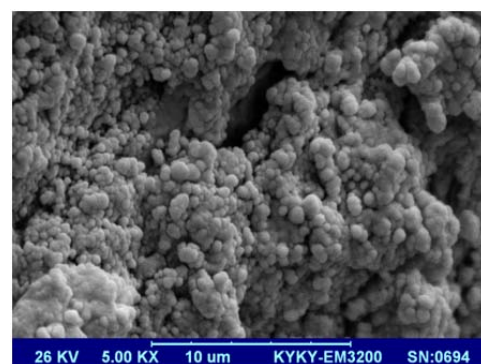
شکل ۷) مقایسه الکتروفرورز محلول رویی و اکنش قبل و بعد از کوئژوگاسیون؛ تصویر الکتروفرورز محلول مخلوط اولیه آغاز واکنش کوئژوگاسیون و محلول سوپراناتانت بعد از کوئژوگاسیون نشان داده شده است، با سنجش محلول سوپراناتانت به روش برادفورد، مقادیر جذب نوری آن برابر با مقدار جذب نوری محلول برادفورد خوانده و با توجه به فرمول راندمان کوئژوگاسیون، مقدار راندمان بیش از ۹۰٪ تخمین زده شد.



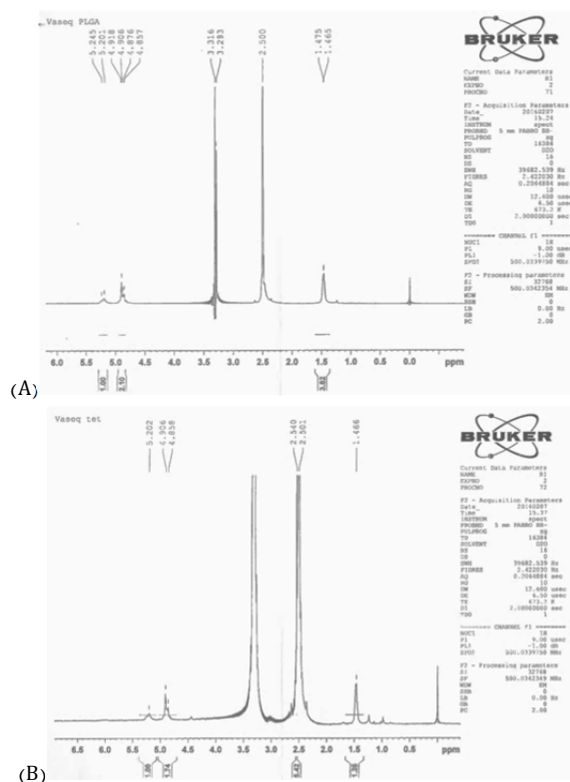
نمودار ۶) نمودار آزمون DTH گروه تتانی



شکل ۵) نتایج میکروسکوپ الکترونی روشی PLGA



شکل 6) نتایج میکروسکوپ الکترونی (رویشی) PLGA-TET



نمودار ۵) نتایج طیف‌سنجی PLGA-TET؛ PLGA (B) H-NMR (A)؛ افزایش پهنای پیک‌های ۲/۵ppm و ۳/۳ حاکی از وجود گروه‌های عاملی آمین و پیوند آمیدی و تابید کوئژوگاسیون است.

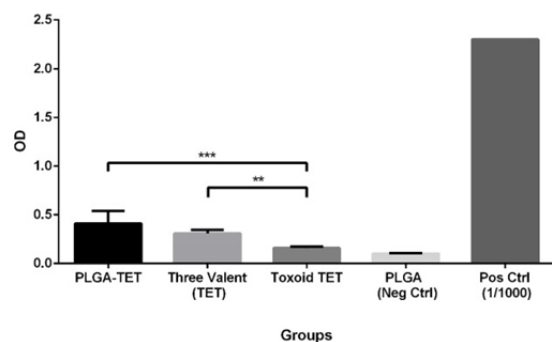
نتوانست به‌طور معنی‌داری در ایجاد پاسخ ایمنی سلولی از ادجوانت کامل فروند و در پاسخ ایمنی همورال از ادجوانت آلودم پیشی بگیرد، هرچند در آزمون DTH تتانی، واکنش توام سه‌گانه در مقایسه با ادجوانت کامل فروند قدری پیشی گرفت، اما این تفاوت معنی‌دار نبود ($p > 0.05$).

جدول ۶) نتایج آزمون الایزا گروه تتانی

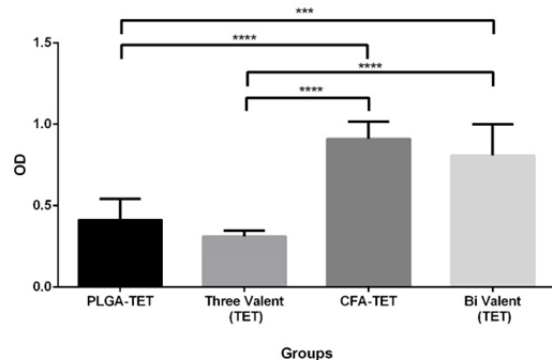
گروه	میانگین آماری
PLGA-TET	0.41 ± 0.13
CFA-TET	0.91 ± 0.11
Three Valent(TET)	0.31 ± 0.04
Bi Valent(TET)	0.81 ± 0.19
Toxoid TET	0.16 ± 0.15
PLGA	0.10 ± 0.001
کنترل مثبت (1:1000)	2.30 ± 0.001

PLGA-TET: نانوذرات PLGA پوشانده‌شده با توکسین تتانی؛ CFA-TET: ادجوانت فروند کامل، Three Valent (TET): واکنش توام سه‌گانه، Bi Valent (TET): واکنش توام دوگانه، Toxoid TET: توکسوئید تتانی، PLGA: پلی‌لاکتیک-کو-گلیکولیک‌اسید

PLGA ELISA Test



Adjuvant ELISA Test



نمودار ۸) نتایج آزمون الایزا گروه تتانی

بحث

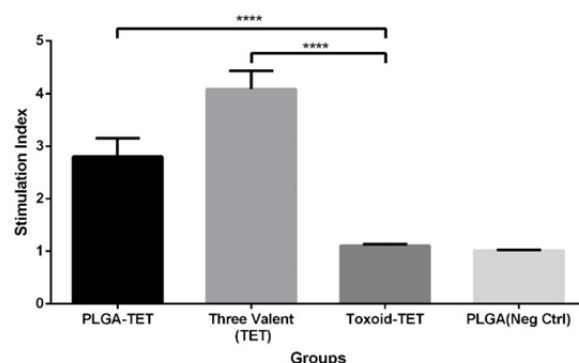
پژوهش حاضر با هدف مقایسه پاسخ ایمنی سلولی و همورال علیه نانوذرات PLGA پوشانده‌شده با توکسین تتانی در موش انجام شد. با توجه به مشکلات و نقایصی که در واکنش‌ها وجود دارد، و با توجه به شرایط ایده‌آل و سیر طراحی منطقی واکنش‌ها، نیاز به تغییر، اصلاح و بهبود روش‌شناسی به‌منظور برانگیختن، افزایش و بهبود عملکرد سیستم ایمنی علیه این عفونت‌ها و مقابله با آنها ضروری است. یکی از اصلی‌ترین راه‌هایی که می‌توان به اهداف ایده‌آل واکنش دست یافت و بر مشکلات واکنش‌های موجود فائق

جدول ۴) مقادیر به‌دست‌آمده در آزمون DTH گروه تتانی

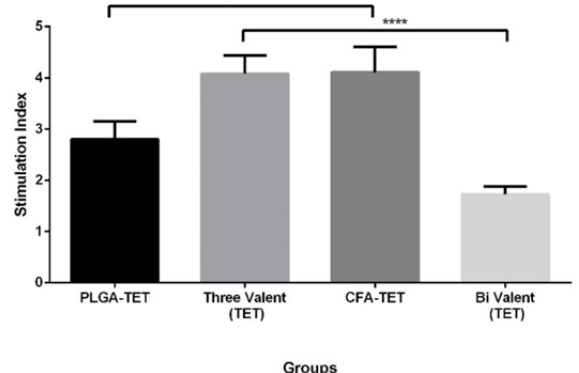
گروه	میانگین آماری
PLGA-Tet	$12/17 \pm 2/31$
CFA-Tet	$13/26 \pm 3/16$
Three Valent(Tet)	$17/93 \pm 4/74$
Bi Valent(Tet)	$5/70 \pm 1/84$
Toxoid Tet	$0/08 \pm 0/38$
PLGA	$0/01 \pm 0/02$

PLGA-Tet: نانوذرات PLGA پوشانده‌شده با توکسین تتانی؛ CFA-Tet: ادجوانت فروند کامل تتانی، Three Valent (Tet): واکنش توام سه‌گانه، Bi Valent (Tet): واکنش توام دوگانه، Toxoid Tet: توکسوئید تتانی، PLGA: پلی‌لاکتیک-کو-گلیکولیک‌اسید

PLGA BrdU



Adjuvant BrdUTest



نمودار ۷) نتایج آزمون BrdU گروه تتانی

جدول ۵) نتایج آزمون BrdU گروه تتانی

گروه	میانگین آماری
PLGA-Tet	$2/79 \pm 0/35$
CFA-Tet	$4/10 \pm 0/49$
Three Valent(Tet)	$3/23 \pm 0/29$
Bi Valent(Tet)	$1/72 \pm 0/14$
Toxoid Tet	$1/10 \pm 0/03$
PLGA	$1/00 \pm 0/01$

PLGA-Tet: نانوذرات PLGA پوشانده‌شده با توکسین تتانی؛ CFA-Tet: ادجوانت فروند کامل، Three Valent (Tet): واکنش توام سه‌گانه، Bi Valent (Tet): واکنش توام دوگانه، Toxoid Tet: توکسوئید تتانی، PLGA: پلی‌لاکتیک-کو-گلیکولیک‌اسید

سنجش آنتی‌بادی‌های تولیدی با آزمون الایزا: نتایج آزمون تکثیر لنفوسیت‌های ایزوله‌شده از غدد لنفاوی در جدول ۶ و نمودار ۸ مشخص شده است.

ترکیب PLGA با اینکه نسبت به حالت عادی توکسوئید و توکسین‌ها موثر واقع شد، اما در مقایسه با سایر ادجوانت‌ها

شد، ادجوانت‌ها هستند که لازم است مورد بررسی و ارزشیابی قرار گیرند.

امروزه تلاش‌ها و مطالعات زیادی در حوزه ادجوانت‌ها برای تحقق شرایط منطقی یک واکسن، به شکل گسترده در حال انجام است. یکی از آنها مطالعه در حوزه نانوادجوانت‌ها است. در عصر جدید واکسن‌های ساب‌یونیت متشکل از آنتی‌ژن‌های پروتئینی، پپتیدی، پلی‌ساکاریدی و DNA، به ادجوانت‌های قوی (که ایمونوژنیسیته را افزایش می‌دهند) نیاز بیشتری دارند، زیرا می‌توان تحت تاثیر طراحی هدفمند ادجوانت‌ها، پکیج و بسته‌بندی آنتی‌ژن، ارایه و نحوه ارایه آن، سیستم ایمنی را بهبود بخشید و مشکلات یادشده را اصلاح و برطرف کرد.

نانوادجوانت‌های ذره‌ای، ذراتی پلیمریک و یکی از اهداف پژوهشی دنیای واکسن هستند. پلیمرها می‌توانند آنتی‌ژن را به فرم‌های مختلف نانوذره، ماتریس یا میسل تحویل دهند و مزایای متعددی نسبت به ادجوانت‌های سنتی دارند؛ این مزایا شامل آزادسازی دوام‌دار آنتی‌ژن برای دوره زمانی خاص و در نتیجه حذف برنامه واکسیناسیون منطبق بر تزریق یادآور (استراتژی تقویت اولیه؛ Prim-Boost)، تعامل و فعال‌سازی PRRها و آغاز پاسخ ایمنی ذاتی، طراحی متناسب با ادغام ترکیبات ایمونومدولاتور (تعدیل‌کننده پاسخ ایمنی)، انعطاف در ساخت و سنتز آنها به اشکال انکپسوله، کوئزوگاسیون سطحی و جذب فیزیکی از مزایای مختلف این مکانیزم نسبت به سایر ادجوانت‌ها است [8]. رید و همکاران ادجوانت‌ها را از لحاظ عملکردی به سه دسته کلی شامل رساننده آنتی‌ژن، ایمونومدولاتور و ترکیب اثر هر دو تقسیم کرده‌اند.

در حوزه رسانش آنتی‌ژن توسط پلیمر PLGA بررسی‌های فراوانی صورت گرفته است. پلیمر PLGA به‌طور وسیع در حوزه واکسن بررسی شده است. از آنجایی که نانوسفرهای PLGA می‌توانند رهایش دوام‌دار محتویات خود را در یک محدوده زمانی معین به شکل ضربانی ارایه کنند، در مطالعات گذشته تمرکز اصلی روی استفاده از این نانوسفرها به‌عنوان جایگزین دوزهای چندگانه تقویتی ایمنی برای القای ایمنی محافظتی بود. به‌عنوان سیستم رسانش کنترل‌شده، پلیمر PLGA به‌طور بالقوه می‌تواند با رهایش ادجوانت‌ها یا آنتی‌ژن‌ها در محل مورد نظر با سرعت معین و مدت‌زمان مشخص به‌طور موثر پاسخ ایمنی را طی یک دوره از زمان تنظیم کند. به‌عنوان ناقل در رسانش هدفمند، پلیمر PLGA به‌عنوان یک کمک موثر در هدایت آنتی‌ژن به APC به‌واسطه تردد موثر آنها از طریق بافت لنفوئیدی موضعی برای برداشت توسط سلول‌های دندریتیک (DC) گزارش شده است [9، 10]. اندازه کوچک‌تر به نانوذرات اجازه می‌دهد تا روی موانع فیزیکی و فیزیولوژیکی اندام‌های خاص مانور دهند [11]. نانوذرات PLGA با اندازه‌های متفاوت اما در محدوده تعریف‌شده، به‌جای اینکه فقط در ایمنی‌زایی موضعی به شکل مولکول‌های پلیمری بزرگ مفید باشند، از لحاظ نظری می‌توانند به شکل سیستمیک تزریق شوند تا مدولاتورهای خاص پاسخ ایمنی از قبیل سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژ را در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی هدف قرار دهند [9، 12]. تحریک پاسخ ایمنی به‌واسطه این نانوذرات با اندازه‌گیری اینترلوکین ۲ (IL2) و اینترفرون گاما (IFN γ) افزایش‌یافته در هموژنات طحال مشخص شده است [12].

ویژگی پلی‌مرهای سنتتیک و زیست‌تخریب‌پذیر از قبیل ایمن‌بودن و زیست‌سازگاری، آنها را نامزدهای قابل توجهی برای واکسیناسیون دوام‌دار تبدیل کرده است. مطالعات مختلف به‌منظور دستیابی به شیوه‌های بالینی مرتبط، به‌ویژه در رسانش واکسن‌های ساب‌یونیت

با استفاده از نانو/ میکروذرات تهیه‌شده از پلی‌مرهای زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر برای القای هم پاسخ ایمنی هومورال و هم سلولی، استفاده از این پلی‌مرها را مورد هدف قرار داده‌اند [13]. بنابراین از آنجا که رسانش آنتی‌ژن PLGA در بررسی‌های مختلف نشان داده است، در پژوهش حاضر سعی شد اثرات ایمونومدولاتوری آن بررسی و با نتایج پژوهش‌های رسانش آنتی‌ژن مقایسه شود.

تهیه نانوذره PLGA: در تهیه نانوذرات PLGA از روش‌ها و منابع مقالات مشابه استفاده شد [14-16]، با این تفاوت که در پژوهش حاضر با استفاده از سونیکاتور اولتراسونیک اندازه ذرات تا جایی که ممکن بود یکنواخت و کوچک شدند.

مکانیزم کوئزوگاسیون: مکانیزم‌های متفاوت و زیادی در رابطه با کوئزوگاسیون مطرح شده که اساس تفاوت مکانیزم‌های مختلف در اتصال‌دهنده عرضی ترکیبات هدف است. بنابراین گروه‌های فعال و گروه‌های عاملی ترکیبات هدف، تعیین‌کننده نوع مکانیزم هستند. اتصال‌دهنده در پژوهش حاضر از اتصال‌دهنده‌های Zero-length بود. آنها کوچک‌ترین اتصال‌دهنده‌ها در بیوکونژوگاسیون هستند و ترکیبات هدف را به شکل مستقیم (بدون هر نوع ترکیب واسط) به هم متصل می‌کنند، از این رو این‌گونه نام‌گذاری و استفاده شده‌اند. اتصال‌دهنده‌های عرضی این روش نیز خود به دسته‌های مختلف تقسیم می‌شوند که اساس آن ساخت انواع مختلف پیوندها است. اتصال‌دهنده‌ها با توجه به ساختارها و گروه‌های عاملی ترکیبات هدف انتخاب می‌شوند. بسته به سیستم معرف مختلف به‌کاررفته انواع مختلف پیوندها از قبیل پیوند آمیدی، فسفرآمیدات و پیوند آمینی دومین و سومین را می‌توان ایجاد کرد. در پژوهش حاضر PLGA گروه عاملی شاخص کربوکسیلیک‌اسید و ترکیبات آنتی‌ژنی پپتیدی گروه عاملی آمین (NH_3^+) داشت، بنابراین بهترین راه کوئزوگاسیون این دو ترکیب، ایجاد پیوند آمیدی است.

روشی که در پژوهش حاضر استفاده شد، کاربرد سیستم معرف کاربودی‌ایمیدی است که تشکیل پیوندهای آمیدی بین کربوکسیلات و آمین را واسطه‌گری می‌کند. این سیستم از جمله روش‌های موثر و رایج اتصال‌دهنده Zero-length در اتصال بیومولکول‌ها و پلیمرها است. از آنجا که در پژوهش حاضر از PLGA به‌عنوان ترکیب نامحلول و پپتیدها به‌عنوان ترکیبات محلول استفاده شد، نوع واکنش، کاربودی‌ایمید نامحلول در آب است.

از جمله ترکیبات کاربودی‌ایمیدی که در پژوهش حاضر برای کوئزوگاسیون و ایجاد باند کووالان استفاده شد اتیل‌دی‌متیل‌آمینوپروپیل‌کاربودی‌ایمید (EDAC یا EDC) و سولفون-هیدروکسی‌سولفوکسینامید (S-NHS) بودند که در تشکیل پیوند آمیدی نقش دارند و در شکل ۸ نشان داده شده‌اند.

ترکیب EDC با اتصال به گروه کربوکسیلات نشان داد که با اتصال به این گروه و فعال‌کردن آن شرایط اتصال گروه آمین و تشکیل باند آمیدی را فراهم می‌کند، اما با این وجود، علاوه بر اینکه سرعت واکنش EDC با گروه آمین کند است که می‌تواند در فاز آبی نیز هیدرولیز شود، با اضافه‌کردن ترکیب S-NHS، افزایش سرعت، حلالیت و ثبات ترکیب حد واسط را خواهیم داشت که می‌تواند در نهایت با گروه آمین ترکیب هدف واکنش دهد. با توجه به دیگر پژوهش‌ها یکی از ضروریات مهمی که در این پژوهش مد نظر قرار گرفت، آب‌گیری از واکنش بود، زیرا علاوه بر محلول پروتئینی، تشکیل پیوند نیز همراه با ایجاد آب خواهد بود. نکته مهم دیگر نیز مدت‌زمان تماس گروه‌های عاملی با فعال‌کننده‌ها بود که حداکثر ۵ دقیقه در نظر گرفته شد. نمایی از واکنش این دو ترکیب در شکل

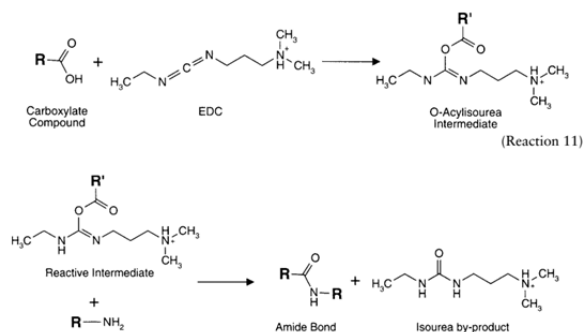
طیف‌سنجی FT-IR قرار گرفتند.

طبق نتایج پژوهش حاضر در طیف‌سنجی H-NMR نیز وضعیت مشابه است. افزایش شدت سیگنال‌های هیدروژنی در ناحیه ۲/۵ppm و ۳/۳ مشاهده شد.

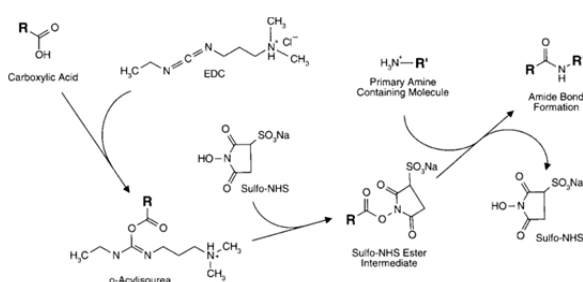
بعد از بررسی‌های تایید کونژوگاسیون، به بررسی ساختار مورفولوژیک و مقایسه آنها در حالات قبل و بعد از کونژوگاسیون توسط دستگاه‌های SEM و AFM پرداخته شد که نتایج هر دو تست تاییدکننده یکدیگر بودند. به نظر می‌رسد آماده‌سازی نانوذرات برای انجام کونژوگاسیون، تاثیر مهمی در تعیین شکل ذرات دارد. نتایج میکروسکوپی از نظر مورفولوژی و سایز حایز اهمیت هستند. فرم ذرات به‌دست‌آمده به شکل کروی بود. در رابطه با اندازه ذرات نیز نتایج این بررسی، نتایج آزمون DLS را تایید کرد. نانوذرات بعد از کونژوگاسیون افزایش قابل توجهی را در اندازه نشان دادند که می‌تواند دلیلی بر تایید کونژوگاسیون باشد. این نتایج با سایر پژوهش‌های مشابه همخوانی دارد [14, 15, 17, 19].

طبق پژوهش‌های مختلف، بررسی مورفولوژیک ذرات از لحاظ بیولوژیک می‌تواند اثرات قابل توجهی را به دنبال داشته باشد. مورفولوژی ذرات از عوامل مهم در برداشت سلولی یاد شده است، زیرا شکل ظاهری ذرات می‌تواند در روند و سرعت اندوسیتوز ذرات تاثیرگذار باشد. در اکثر مطالعات مقایسه‌ای، ذرات کروی‌شکل، اندوسیتوز مناسب‌تر و موثرتری را نسبت به اشکال دیگر ذرات دارند. در مطالعه چیتراونی و همکاران ذرات کروی برداشت موثرتری نسبت به ذرات میله‌ای شکل نشان دادند [19]. ذرات شبه‌کرم نیز فاگوسیتوز ناچیزی را نسبت به حالت کروی داشتند [20]. در مطالعه نیکورا و همکاران ذرات بیضوی PLGA نسبت به ذرات کروی آن سرعت اندوسیتوز کندتری نشان دادند [21]. شکل ذرات می‌تواند کیفیت و نوع پاسخ ایمنی را نیز جهت‌دهی کند. در مطالعه نیکورا و همکاران، نانوذرات کروی طلا با اندازه ۴۰ نانومتر به شکل موثرتری پاسخ آنتی‌بادی را نسبت به اشکال مکعبی یا کشیده با سایز ۲۰ نانومتر تحریک کردند [21]. در مطالعه کومار بیان شده است که ذرات کروی ۱۹۳ نانومتری پاسخ ایمنی Th1 را جهت‌دهی کرد، در حالی که ذرات کشیده با سایز ۱۵۳۰ نانومتری پاسخ‌های ایمنی قوی‌تر Th2 را القا می‌کند [22].

انجام کونژوگاسیون، روی سایز و بار ذرات تاثیرگذار است و بررسی این پارامترها از شاخصه‌های تایید کونژوگاسیون است. طبق پژوهش حاضر از پلیمر PLGA بعد از نانسفریزه‌شدن، ذراتی با بار منفی (آنیون) با معادل بار حدود ۲۴۳ میلی‌ولت تولید شد. براساس پژوهش‌های دیگر PLGA در حالت عادی و طبیعی پس از نانسفریزه‌شدن، پتانسیل زتای منفی دارد که با نتایج این پژوهش همسو است [16, 18]. پتانسیل منفی ذرات از عوامل تاثیرگذار بر ماندگاری بالای سیستمیک، همراه با کاهش بسیار زیاد برداشت سلولی در اندام‌های لنفاوی است [23, 24]. در ادامه انجام واکنش نیز با انجام کونژوگاسیون علاوه بر اندازه ذرات، به بار ذرات نیز افزوده شد، به‌گونه‌ای که ذرات از حالت آنیونیک به کاتیونیک درآمدند یا شدت بار آنیونیک آنها کاسته شد. در عموم بررسی‌های صورت‌گرفته، بعد از انجام کونژوگاسیون، اندازه ذرات به شکل قابل توجه افزایش یافته است [15, 18, 25]. اما در ارتباط با پتانسیل زتای ذرات، پژوهش‌های مختلف نتایج مختلفی را نشان داده‌اند. در مطالعه جیانگ و همکاران بعد از کونژوگاسیون بار ذرات افزایش یافت [25]، اما در پژوهش‌های دیگر کاهش بار یا عدم تغییر بار نیز مشاهده شده است [14, 18]. به نظر می‌رسد عوامل موثر در این مساله به نوع و درصد حلال‌ها، نوع ترکیب کونژوگه‌شده و مقدار آن



شکل ۸) نمایی از واکنش سیستم معرف کاربودی‌ایمیدی EDC با گروه کربوکسیل اسیدی و تشکیل ترکیب حد واسط و در نهایت تشکیل باند کووالان با گروه هدف



شکل ۹) نمایی از واکنش EDC و S-NHS

در پژوهش حاضر، EDC و S-NHS با اتصال به گروه عاملی کربوکسیلات PLGA، این ترکیب را آماده واکنش با گروه آمین ترکیبات پروتئینی و پپتیدی کرد. از آنجایی که آب می‌تواند در شکل‌گیری واکنش اختلال ایجاد کند، با استفاده از ترکیبات آب‌گیر باید آن را حذف کرد و مدت‌زمان فعال‌سازی گروه‌های عاملی PLGA را کاهش داد. در اکثر پژوهش‌ها کونژوگاسیون PLGA به‌علت دارابودن گروه عاملی کربوکسیل از سیستم کاربودی‌ایمید برای ایجاد باند کووالان استفاده شده است [14-16].

بعد از پروسه کونژوگاسیون، اصلی‌ترین راه تایید کونژوگاسیون، طیف‌سنجی ترکیبات حاصل و مقایسه آن با طیف قبل از کونژوگاسیون است، زیرا طبق پژوهش‌ها طیف‌سنجی هر ترکیب، اثر انگشت آن ترکیب و اختصاصی آن است. از همین رو، انجام تست‌های FT-IR و H-NMR از جمله تست‌های روتین بعد از واکنش هستند. از آنجایی که ترکیبات هدف کونژوگاسیون شامل پپتید و پلی‌استر و پیوند تشکیلی نیز آمیدی بود، چند گروه زیر حایز اهمیت است:

در PLGA، وجود کربن کربونیل، اتر، متیل و زنجیره کربنی آلیفاتیک می‌تواند نشان‌دهنده ساختار PLGA که طیف FT-IR آن به‌ترتیب شامل ۱۷۰۰، ۱۴۰۰، ۱۱۰۰ و ۲۹۰۰ سانتی‌متر معکوس بود، باشد. بعد از کونژوگاسیون علاوه بر طیف‌های یادشده گروه کربن آمیدی، آمین آمیدی و گروه آمین نیز باید حضور داشته باشند که طیف این گروه‌ها نیز به‌ترتیب شامل ۱۶۰۰، ۳۲۰۰، ۳۳۰۰-۳۵۰۰ سانتی‌متر معکوس بود و در طیف در PLGA اولیه مشاهده نشد. این مقادیر در نتایج پژوهش حاضر کاملاً مشهود بود. در بررسی‌های دیگر در کونژوگاسیون PLGA نیز همین نتایج به دست آمده است [14, 15, 17, 18]. شایان ذکر است که محصولات کونژوگاسیون به شکل کاملاً لیوفلیزه‌شده و فاقد آب، مورد

بستگی دارد [25، 14]. اگرچه در پژوهش حاضر چنین اثری مشاهده نشد، اما در برخی پژوهش‌ها اشاره شده که اندازه ذرات با سنجش زتاسایز در قیاس با بررسی میکروسکوپی اندکی بیشتر است که علت آن را احتمالاً ناشی از پراشندگی خلل و فرج ذرات با حلال عنوان کرده‌اند [26]. اهمیت سایز و بار در پژوهش‌های مختلف این گونه است که اندازه و توزیع نانوذرات در تعیین اینترکشن این ذرات با غشای سلولی و جابه‌جایی آنها در عرض سدهای فیزیولوژیک مهم است. به شکل کلی، نانوذرات سایز قابل قیاسی نسبت به پاتوژن‌ها دارند که به آسانی می‌توانند شناسایی، برداشت و در نهایت موجب تحریک سیستم ایمنی شوند، هرچند نمی‌توان به‌طور دقیق در این باره اظهار نظر کرد اما دندرتیک‌سل‌ها به شکل ترجیحی ذرات بین ۲۰ تا ۲۰۰ نانومتر را اندوسیتوز، در حالی که ماکروفاژها به‌طور ترجیحی ذرات بین ۵/۰ تا ۵ میکرومتر را فاگوسیتوز می‌کنند [27].

پژوهش‌های مختلف [28، 29] تفاوت‌های زیادی در اندازه بهینه نانوذرات نشان می‌دهند. به نظر می‌رسد که این تفاوت‌ها در تفاوت ذاتی در خواص مواد ریشه دارند، به‌گونه‌ای که هر ماده یک اندازه بهینه برای القای پاسخ ایمنی قوی دارد.

در رابطه با PLGA نیز وضعیت به همین گونه است. در پژوهشی فاگوسیتوز ماکروفاژ ذرات نانوی PLGA نسبت به ذرات میکروبی آن بیشتر صورت گرفته است [30]. در مطالعه‌ای دیگر مشخص شد که اندازه ذرات حدود ۲۱۵ نانومتر به شکل معنی‌داری نسبت به اندازه‌های ۶۰۰ و ۱۰۰۰ نانومتری اینترنالیزه می‌شود [31]. در مطالعه‌ای دیگر روی مدل سلولی Caco-2، مشخص شد که ذرات ۱۰۰ نانومتری PLGA برداشت بیشتری نسبت به ذرات یک‌میکرونی دارند. اندازه ذرات از این بابت حایز اهمیت است که می‌تواند سلول‌های ایمنی را در راستای تولید سایتوکاین‌های مختلف تحریک و جهت‌دهی کند [32، 33]. نانوذرات بر پایه PLGA با سایز ۵۰۰ نانومتر و کوچک‌تر از آن پاسخ سایتوکاین سلولی را القا می‌کنند [34، 35]. در مطالعه دیگر، تجویز خوراکی و استنشاقی ذرات ۱۰۰ و ۵۰۰ نانومتری PLGA موجب القای معنی‌دار تیترا بالایی از آنتی‌بادی نسبت به اندازه‌های بزرگ‌تر آن شد [36]. در تحقیقی دیگر خاصیت التهاب‌زایی ذرات میکروبی PLGA نسبت به ذرات نانوی آن مشخص شده است [30]. در پژوهشی دیگر تفاوتی در ذرات نانو و میکروبی PLGA در راستای ایجاد پاسخ ایمنی وجود نداشت [37].

طبق نتایج سایر پژوهش‌ها نانوبیدها با سایز ۴۰ تا ۵۰ نانومتر علاوه بر اینکه به‌طور موثرتری نسبت به سایزهای بزرگ‌تر به درون دندرتیک‌سل‌ها اینترنالیزه می‌شوند، می‌توانند پاسخ‌های ایمنی سلولی TCD8⁺ را نیز القا کنند، در حالی که ذرات بزرگ‌تر آن پاسخ ایمنی هومورال TCD4⁺ را القا می‌کنند [38، 39]. در پژوهشی دیگر مشخص شد که ذرات ۱۰۰۰ نانومتری PLGA نسبت به ذرات ۵۰۰ و ۲۰۰ نانومتری تیترا سرمی بالاتری از ایمونوگلوبولین G (IgG) را دارند. همچنین روت تزریق بر کمیت پاسخ ایمنی، بدون تاثیر نبود [40].

پتانسیل زتای ذرات نیز به همین گونه است؛ ذرات کاتیونیک به‌طور مشخص به گروه‌های بار منفی سطح سلول متصل شده و از همین رو در مقایسه با ذرات با بار منفی و خنثی سرعت بیشتری در اینترنالیزاسیون سلولی دارند [41]. در برداشت سلولی نانوذرات بار سطحی در اجتماع آنها، اتصال یا واکنش با سلول‌ها با بار الکتریکی مخالف اهمیت دارد. پژوهشی دیگر نیز برداشت سلولی ذرات با بار مثبت را نسبت به ذرات با بار منفی بهتر ارزیابی کرده است [42]. به نظر می‌رسد که pH محیط نیز روی میزان برداشت سلولی تاثیرگذار

باشد. در مطالعه‌ای نانوذرات PLGA که در شرایط اسیدی بار مثبت بیشتری دارند، بیشترین برداشت سلولی را نیز نشان دادند [2]. مطالعات مختلفی به اثر بار سطحی در القای پاسخ التهابی پرداخته‌اند [43، 44]. به‌طور کلی، القای پاسخ التهابی توسط ذرات کاتیونیک (بار مثبت) نسبت به ذرات آنیونیک (منفی) و ذرات خنثی احتمال بیشتری دارد. طبق نتایج یک مطالعه، ذرات آنیونیک دندریمر قادر به تحریک لکوسیت‌ها برای ترشح سایتوکاین‌ها نیستند [5]. در حالی که ذرات کاتیونیک لیپوزوم توانستند ترشح سایتوکاین‌ها از قبیل فاکتور نکروزکننده تومور (TNF)، IL12 و IFN γ را القا کنند [45]. تجویز سیستمیک نانولیپوزوم کاتیونیک دیگر به‌تنهایی یا به شکل ترکیبی با DNA باکتری، با اینکه منجر به ترشح سایتوکاین خاصی نمی‌شود، اما بیان مارکرهای سطحی سلول‌های دندرتیک مانند CD80 و CD86 را افزایش می‌دهد که در القای التهاب نقش موثری دارد [46]. در مورد PLGA نیز پژوهش‌ها این موضوع را تایید می‌کنند. در پژوهش کومار و همکاران مشخص شده است که PLGA با بار مثبت پاسخ ایمنی قوی‌تری را نسبت به شارژ منفی آن به‌ویژه در ایمنی موکوسی با روت تزریقی ترانس‌کوتانئوس القا می‌کند [47]. در پژوهشی ذرات کاتیونیک PLGA حاوی DNA ویروس بیماری پا و دهان، به شکل موثری پاسخ ایمنی سلولی و هومورال را تحریک کرد [48]. طی مطالعه‌ای مشخص شده است که استفاده از ذرات کاتیونیک PLGA به‌عنوان واکسن هپاتیت در تحریک پاسخ‌های سلولی همراه با پاسخ ایمنی هومورال موثر است [49].

از جمله چالش‌های جدی پیش روی پژوهش حاضر، حلالیت و سوسپانسیون‌پذیری بسیار پایین و اگرگاسیون بالای (با توجه به عکس‌های AFM و SEM) ذرات در محیط‌های آبی نسبت به حلال‌های آلی بود و با بررسی دیگر پژوهش‌ها مساله همچنان بدون پاسخ ماند. ابتکار پژوهش حاضر با توجه به مشاوره‌های مختلف، استفاده از حلال DMSO و بت‌سونیکاسیون موثر واقع شد، اما مجدداً با اضافه‌شدن محلول آبی (بافر فسفات‌سالین)، ذرات حالت اگرگاسیون به خود می‌گرفتند. در این مرحله نیز با اضافه‌کردن توبین ۲۰ به‌عنوان سورفاکتانت، به سوسپانسیون DMSO از اگرگاسیون مجدد ذرات در صورت اضافه‌شدن محلول آبی جلوگیری شد. با توجه به استانداردهای تزریق، DMSO به رقت ۵٪ تهیه و مورد استفاده قرار گرفت [50، 5].

چون یکی از اهداف پژوهش حاضر تحریک هر دو پاسخ ایمنی سلولی و هومورال بود، روت زیرپوستی (SC) انتخاب شد. همچنین با توجه به ویژگی بافتی این ناحیه به‌دلیل وجود چربی و جریان خون اندک موجود در این ناحیه در کنار رگ‌های لنفاوی، جذب ترکیبات به‌کندی صورت می‌گیرد و می‌تواند به شکل موثر هر دو بازوی سیستم ایمنی را تحت تاثیر خود قرار دهد [51]. در بسیاری از پژوهش‌ها به‌منظور تلیقح نانوذرات نیز از همین روت تزریقی استفاده شده است [52، 53].

طبق نتایج پژوهش حاضر، پاسخ ایمنی علیه کوئزوگاسیون PLGA-آنتی‌ژن به شکل معنی‌داری ($P < 0.05$) چه در بازوی ایمنی هومورال و چه در بازوی ایمنی سلولی نسبت به حالت محلول آنتی‌ژن افزایش نشان داد.

در پژوهشی امکان‌پذیری واکسن‌های تک‌دوز هپاتیت B بر پایه PLGA بررسی شد. طبق یافته‌های این پژوهش آنتی‌ژن‌های سطحی ویروس هپاتیت (HBsAg) که درون PLGA بارگذاری

و متداول‌تر تحریک می‌کند که با نتایج پژوهش حاضر تا حدودی مطابقت داشت [49].

در پژوهشی تجویز تک‌دوز ذرات PLGA حاوی HBSAg افزایش معنی‌داری را در تولید آنتی‌بادی تا روز ۹۰ام بعد از تجویز نشان داد، در حالی که با تلقیح آنتی‌ژن جذب‌شده توسط آلوم به شکل تک‌دوز، تا ۹۰ روز بعد از تزریق، سطح آنتی‌بادی اختصاصی قابل اندازه‌گیری نیست. در یک بررسی دیگر تلقیح زیرپوستی آنتی‌ژن به‌کاررفته با ادجوانت PLGA تیتر سرمی بالاتری از IgG را نسبت به حالات کنترل آنتی‌ژن آزاد و آنتی‌ژن امولسیون‌شده با ادجوانت کامل فروند از خود نشان داد [53].

در پژوهش /یگارتو/ و همکاران پس از تلقیح زیرپوستی تک‌دوز آنتی‌ژن همراه ادجوانت فروند و PLGA تفاوت معنی‌داری در پاسخ آنتی‌بادی IgG مشاهده نشد [61]. در مطالعه گوتیه‌رو و همکاران نیز مشخص شد که نانوذرات آنتی‌ژنیک PLGA با یک‌بار تزریق زیرپوستی می‌توانند پاسخ آنتی‌بادی IgG2a را تحریک کنند، در حالی که در ادجوانت آلوم به‌علت عدم تحریک سلول Th1 امکان‌پذیر نیست، همچنین تیتر سرمی IgG تحریک‌شده ناشی از CFA و PLGA تفاوت معنی‌داری نداشت [40]. به‌طور کلی براساس پژوهش حاضر، نانوذرات PLGA ضمن بی‌ضرری برای بدن، می‌تواند گزینه خوبی در تشدید پاسخ ایمنی سلولی و همورال علیه آنتی‌ژن ایفا نماید و می‌توان به‌عنوان یک ادجوانت از آن استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

پلی‌لاکتیک-کو-گلیکولیک‌اسید به شکل کونژوگاسیون با آنتی‌ژن، با یک‌دوز تزریق می‌تواند پاسخ ایمنی را به‌ویژه در بازوی ایمنی سلولی نسبت به حالت محلول آنتی‌ژن افزایش دهد. همچنین ادجوانت PLGA اگرچه در برابر ادجوانت آلوم در تحریک ایمنی همورال چندان موفق به نظر نمی‌رسد، اما در مقایسه با ادجوانت کامل فروند می‌تواند با یک‌دوز تزریق رقیبی قابل توجه برای آن باشد.

تشکر و قدردانی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشد.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشد.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشد.

سهم نویسندگان: روح‌الله وائق (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۲۵٪)؛ معصومه ابتکار (نویسنده دوم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۲۵٪)؛ مهدی شفیع‌اردستانی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۲۵٪)؛ مهرداد غلام‌زاد (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۲۵٪)

منابع مالی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشد.

منابع

- controlled release adjuvancity. Saudi Pharm J. 2011;19(4):197-206.
- Diwan M, Elamanchili P, Cao M, Samuel J. Dose sparing of CpG Oligodeoxynucleotide vaccine adjuvants by nanoparticle delivery. Curr Drug Deliv. 2004;1(4):405-12.
- Pihlajamäki H, Böstman O, Hirvensalo E, Törmälä P, Rokkanen P. Absorbable pins of self-reinforced poly-L-lactic acid for fixation of fractures and osteotomies. J Bone Joint Surg Br. 1992;74(6):853-7.

شده‌اند، می‌توانند موجب افزایش خودکار پاسخ ایمنی شده و PLGA به‌عنوان یک نامزد نویدبخش در رهایش کنترل‌شده آنتی‌ژن مطرح شود [54].

اخیراً در یک پژوهش با استفاده از روتاویروس سویه SA11 انکپسوله‌شده با PLGA و استفاده از آلومین سرمی به‌عنوان تثبیت‌کننده در طول فرآیند امولسیفیکاسیون، مشخص شد که تک‌دوز ایمونیزاسیون دهانی با ۲۰ میکروگرم آنتی‌ژن، تیتر ارتقایافته‌ای از آنتی‌بادی‌های IgA و IgG در مقایسه با حالت محلول آنتی‌ژن القا می‌کند [55].

طی پژوهشی مشخص شده است که رسانش ذره‌ای آلومین تخم مرغ و ۷-آسیل‌لیپید A توسط PLGA به دندرتیک‌سل، منجر به افزایش پاسخ ایمنی سلولی T سل‌ها می‌شود [56].

در رابطه با مکانیزم‌های عملکردی ادجوانت‌های نانوذره‌ای، اگرچه مکانیزم‌ها به شکل دقیق مشخص نیست، اما فرضیه‌های زیادی تاکنون مطرح شده است. افزایش برداشت نانوذرات یا تحریک سلول‌های APC یکی از این فرضیات است [8, 32, 57]. مطالعات نشان داده‌اند که PLGA پاسخ ایمنی را به‌ترتیب علیه آنتی‌ژن سرطانی MUC₁ که خاصیت ایمونوژنی اندکی دارد افزایش می‌دهد [58]. اهمیت ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، از قبیل اندازه ذرات به این معنی است که نانوذرات کوچک‌تر می‌توانند از طریق عروق لنفاوی به‌آسانی نسبت به ذرات بزرگ‌تر به غدد لنفاوی جابه‌جا و در دندرتیک‌سل‌های گره لنفاوی تجمع پیدا کنند [32]. فرضیه دیگر اثر دیو است؛ همان‌طور که ذکر شد، نانوذرات می‌توانند به‌عنوان یک منبع برای حفظ و رهاسازی دوام‌دار آنتی‌ژن عمل کنند [32].

کلیه تزریقات به‌صورت زیرپوستی در پشت حیوان انجام شد و جایگاه تزریق در طول دوره مورد بررسی بالینی قرار گرفت. در پژوهش حاضر از آنتی‌ژن‌هایی با حداقل ایمونوژنیسته استفاده شد که دلیل آن بررسی دقیق‌تر اثرات متمایز ادجوانت‌ها بدون هر نوع مداخله‌گر بود.

مکانیزم عمل ادجوانت کامل فروند، شامل آزادسازی کند در جایگاه تزریق به‌خاطر وجود روغن و وجود مایکوباکتریوم کشته‌شده به‌عنوان آگونیست TLR بیان شده که منجر به فعال‌سازی و پرولیفراسیون T سل‌ها شده است [59]. با این حال، روغن پارافین موجود در این ادجوانت تجزیه‌ناپذیر بوده و عامل مشکلات توکسیک دیگر نیز است [60]. ادجوانت کامل فروند می‌تواند التهاب مزمن شدید موضعی ایجاد کند، به‌گونه‌ای که منجر به ایجاد زخم، تخلیه سینوس و گرانولوما شود.

مطالعه روی ادجوانت‌های مختلف و مقایسه آنها، در فراهم‌سازی دستورالعمل متقن علمی در رویه ایمونیزاسیون اهمیت بسزایی دارد. از همین رو یکی از اهداف پژوهش حاضر نیز مقایسه ادجوانت‌های مختلف مهم در تحریک پاسخ ایمنی بود. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که PLGA با اینکه نسبت به حالت عادی توکسوئید و توکسین‌ها موثر واقع شد اما در مقایسه با سایر ادجوانت‌ها نتوانست به‌طور معنی‌داری در ایجاد پاسخ ایمنی سلولی از ادجوانت کامل فروند و در پاسخ ایمنی همورال از ادجوانت آلوم پیشی بگیرد. هر چند در آزمون DTH تتانی، واکسن توام سه‌گانه در مقایسه با ادجوانت کامل فروند قدری پیشی گرفت، اما این تفاوت معنی‌دار نبود. در پژوهشی مشخص شد که ذرات آنتی‌ژن‌رسان کاتیونیک PLGA بارگذاری‌شده با آنتی‌ژن HBSAg به شکل تک‌دوز در مقایسه با واکسن HBSAg جذب آلوم با دو دوز، پاسخ ایمنی سلولی را همراه با ایمنی همورال به شکل موثرتر

- immunological responses in vitro and in vivo. *ACS Nano*. 2013;7(5):3926-38.
- 22- Yoo JW, Doshi N, Mitragotri S. Endocytosis and intracellular distribution of PLGA particles in endothelial cells: Effect of particle Geometry. *Macromol Rapid Commun*. 2010;31(2):142-8.
- 23- Muñoz Javier A, Kreft O, Piera Alberola A, Kirchner C, Zebli B, Susha AS, et al. Combined atomic force microscopy and optical microscopy measurements as a method to investigate particle uptake by cells. *Small*. 2006;2(3):394-400.
- 24- Harush-Frenkel O, Rozentur E, Benita S, Altschuler Y. Surface charge of nanoparticles determines their endocytic and transcytotic pathway in polarized MDCK cells. *Biomacromolecules*. 2008;9(2):435-43.
- 25- Jiang G, Tang Sh, Xuelan C, Ding F. Enhancing the receptor-mediated cell uptake of PLGA nanoparticle for targeted drug delivery by incorporation chitosan onto the particle surface. *J Nanopart Res*. 2014;16(6):2453.
- 26- Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: Relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(17):2873-96.
- 27- Raghuvanshi RS, Katare YK, Lalwani K, Ali MM, Singh O, Panda AK. Improved immune response from biodegradable polymer particles entrapping tetanus toxoid by use of different immunization protocol and adjuvants. *Int J Pharm*. 2002;245(1-2):109-21.
- 28- Samadi Moghaddam M, Heiny M, Shastri VP. Enhanced cellular uptake of nanoparticles by increasing the hydrophobicity of poly(lactic acid) through copolymerization with cell-membrane-lipid components. *Chem Commun*. 2015;51(78):14605-8.
- 29- Harandi AM, Medaglini D, Shattock RJ. Vaccine adjuvants: A priority for vaccine research. *Vaccine*. 2010;28(12):2363-6.
- 30- Tan Y, Li S, Pitt BR, Huang L. The inhibitory role of CpG immunostimulatory motifs in cationic lipid vector-mediated transgene expression in vivo. *Hum Gene Ther*. 1999;10(13):2153-61.
- 31- Cui Z, Han SJ, Vangasseri DP, Huang L. Immunostimulation mechanism of LPD nanoparticle as a vaccine carrier. *Mol Pharm*. 2005;2(1):22-8.
- 32- Kumar A, Wonganan P, Sandoval MA, Li X, Zhu S, Cui Z. Microneedle-mediated transcutaneous immunization with plasmid DNA coated on cationic PLGA nanoparticles. *J Control Release*. 2012;163(2):230-9.
- 33- Wang G, Pan L, Zhang Y, Wang Y, Zhang Z, Lü J, et al. Intranasal delivery of cationic PLGA nano/microparticles-loaded FMDV DNA vaccine encoding IL-6 elicited protective immunity against FMDV challenge. *PLoS One*. 2011;6(11):e27605.
- 34- Saini V, Jain V, Sudheesh MS, Jaganathan KS, Murthy PK, Kohli DV. Comparison of humoral and cell-mediated immune responses to cationic PLGA microspheres containing recombinant hepatitis B antigen. *Int J Pharm*. 2011;408(1-2):50-7.
- 35- Nabeshi H, Yoshikawa T, Arimori A, Yoshida T, Tochigi S, Hirai T, et al. Effect of surface properties of silica nanoparticles on their cytotoxicity and cellular distribution in murine macrophages. *Nanoscale Res Lett*. 2011;6(1):1-6.
- 36- Jacobsen NR, Møller P, Jensen KA, Vogel U, Ladefoged O, Loft S, et al. Lung inflammation and genotoxicity following pulmonary exposure to nanoparticles in ApoE^{-/-} mice. *Part Fibre Toxicol*. 2009;6:2.
- 37- Pulskamp K, Diabaté S, Krug HF. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular
- 4- Jagur-Grodzinski J. Biomedical application of functional polymers. *React Funct Polym*. 1999;39(2):99-138.
- 5- Wendorf J, Chesko J, Kazzaz J, Ugozzoli M, Vajdy M, O'Hagan D, et al. A comparison of anionic nanoparticles and microparticles as vaccine delivery systems. *Hum Vaccin*. 2008;4(1):44-9.
- 6- Arshady R. Preparation of biodegradable microspheres and microcapsules: 2, Polyactides and related polyesters. *J Control Release*. 1991;17(1):1-21.
- 7- Chaisri W, Hennink WE, Okonogi S. Preparation and characterization of cephalexin loaded PLGA microspheres. *Curr Drug Deliv*. 2009;6(1):69-75.
- 8- Roberts JC, Bhalgat MK, Zera RT. Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) Starburst dendrimers. *J Biomed Mater Res*. 1996;30(1):53-65.
- 9- Agashe HB, Dutta T, Garg M, Jain NK. Investigations on the toxicological profile of functionalized fifth-generation poly (propylene imine) dendrimer. *J Pharm Pharmacol*. 2006;58(11):1491-8.
- 10- Andreev SM, Babakhin AA, Petrukhina AO, Romanova VS, Parnes ZN, Petrov RV. Immunogenic and allergenic properties of fullerene conjugates with aminoacids and proteins. *Dokl Biochem*. 2000;370(1-6):4-7.
- 11- Masalova OV, Shepelev AV, Atanadze SN, Parnes ZN, Romanova VS, Vol'pina OM, et al. Immunostimulating effect of water-soluble fullerene derivatives--perspective adjuvants for a new generation of vaccine. *Dokl Akad Nauk*. 1999;369(3):411-3. [Russian]
- 12- Zolnik BS, González-Fernández A, Sadrieh N, Dobrovolskaia MA. Nanoparticles and the immune system. *Endocrinology*. 2010;151(2):458-65.
- 13- Xiang SD, Scholzen A, Minigo G, David C, Apostolopoulos V, Mottram PL, et al. Pathogen recognition and development of particulate vaccines: Does size matter? *Methods*. 2006;40(1):1-9.
- 14- Foged C, Brodin B, Frokjaer S, Sundblad A. Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. *Int J Pharm*. 2005;298(2):315-22.
- 15- Joshi VB, Geary SM, Salem AK. Biodegradable particles as vaccine delivery systems: Size matters. *AAPS J*. 2013;15(1):85-94.
- 16- Kim H, Uto T, Akagi T, Baba M, Akashi M. Amphiphilic poly(amino acid) nanoparticles induce size-dependent dendritic cell maturation. *Adv Funct Mater*. 2010;20(22):3925-31.
- 17- Nicolette R, dos Santos DF, Faccioli LH. The uptake of PLGA micro or nanoparticles by macrophages provokes distinct in vitro inflammatory response. *Int Immunopharmacol*. 2011;11(10):1557-63.
- 18 - Patel NR, Damann K, Leonardi C, Sabliov CM. Size dependency of PLGA-nanoparticle uptake and antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *Nanomedicine*. 2011;6(8):1381-95.
- 19- Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WCW. Determining the size and shape dependence of Gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett*. 2006;6(4):662-8.
- 20- Champion JA, Mitragotri S. Shape induced inhibition of phagocytosis of polymer particles. *Pharm Res*. 2009;26(1):244-9.
- 21- Niikura K, Matsunaga T, Suzuki T, Kobayashi S, Yamaguchi H, Orba Y, et al. Gold nanoparticles as a vaccine platform: Influence of size and shape on

- 49- Cho WS, Dart K, Nowakowska DJ, Zheng X, Donaldson K, Howie SE. Adjuvanticity and toxicity of cobalt oxide nanoparticles as an alternative vaccine adjuvant. *Nanomedicine*. 2012;7(10):1495-505.
- 50- Castignolles N, Morgeaux S, Gontier-Jallet C, Samain D, Betbeder D, Perrin P. A new family of carriers (biovectors) enhances the immunogenicity of Rabies antigens. *Vaccine*. 1996;14(14):1353-60.
- 51- Dykman LA, Sumaroka MV, Staroverov SA, Zaitseva IS, Bogatyrev VA. Immunogenic properties of colloidal Gold. *Biol Bull Russ Acad Sci*. 2004;31(1):75-9.
- 52- Scheerlinck JP, Gloster S, Gamvrellis A, Mottram PL, Plebanski M. Systemic immune responses in sheep, induced by a novel nano-bead adjuvant. *Vaccine*. 2006;24(8):1124-31.
- 53- Greenwood DL, Dynon K, Kalkanidis M, Xiang S, Plebanski M, Scheerlinck JP. Vaccination against foot-and-mouth disease virus using peptides conjugated to nano-beads. *Vaccine*. 2008;26(22):2706-13.
- 54- Peyre M, Sesardic D, Merkle HP, Gander B, Johansen P. An experimental divalent vaccine based on biodegradable microspheres induces protective immunity against Tetanus and Diphtheria. *J Pharm Sci*. 2003;92(5):957-66.
- 55- Nayak B, Panda AK, Ray P, Ray AR. Formulation, characterization and evaluation of rotavirus encapsulated PLA and PLGA particles for oral vaccination. *J Microencapsul*. 2009;26(2):154-65.
- 56- Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Sung J, Luther G, Gu FX, et al. Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials*. 2007;28(5):869-76.
- 57- Bharali DJ, Mousa SA, Thanavala Y. Micro- and nanoparticle-based vaccines for hepatitis B. In: Shurin MR, Smolkin YS, editors. *Immune-mediated diseases: From theory to therapy*. Berlin: Springer Science & Business Media; 2007. pp. 415-21.
- 58- Diwan M, Elamanchili P, Lane H, Gainer A, Samuel J. Biodegradable nanoparticle mediated antigen delivery to human cord blood derived dendritic cells for induction of primary T cell responses. *J Drug Target*. 2003;11(8-10):495-507.
- 59- Storni T, Kündig TM, Senti G, Johansen P. Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57(3):333-55.
- 60- Sun H, Pollock KG, Brewer JM. Analysis of the role of vaccine adjuvants in modulating dendritic cell activation and antigen presentation in vitro. *Vaccine*. 2003;21(9-10):849-55.
- 61- Igartua M, Hernández RM, Rosas JE, Patarroyo ME, Pedraz JL. Gamma-irradiation effects on biopharmaceutical properties of PLGA microspheres loaded with SPf66 synthetic vaccine. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008;69(2):519-26.
- reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicol Lett*. 2007;168(1):58-74.
- 38- Müller K, Skepper JN, Posfai M, Trivedi R, Howarth S, Corot C, et al. Effect of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles (Ferumoxtran-10) on human monocyte-macrophages in vitro. *Biomaterials*. 2007;28(9):1629-42.
- 39- Linhart W, Peters F, Lehmann W, Schwarz K, Schilling AF, Amling M, et al. Biologically and chemically optimized composites of carbonated apatite and polyglycolide as bone substitution materials. *J Biomed Mater Res*. 2001;54(2):162-71.
- 40- Ara M, Watanabe M, Imai Y. Effect of blending Calcium compounds on hydrolytic degradation of poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid). *Biomaterials*. 2002;23(12):2479-83.
- 41- Kim S, Lee Y, Park H, Hong D, Khang G, Lee D. Reduced inflammatory responses to poly(lactic-co-glycolic acid) by the incorporation of hydroxybenzyl alcohol releasing polyoxalate. *Macromol Res*. 2011;19(12):1242-9.
- 42- Lee Y, Kwon J, Khang G, Lee D. Reduction of inflammatory responses and enhancement of extracellular matrix formation by vanillin-incorporated poly(lactic-co-glycolic acid) scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(19-20):1967-78.
- 43- Lutsiak ME, Kwon GS, Samuel J. Biodegradable nanoparticle delivery of a Th2-biased peptide for induction of Th1 immune responses. *J Pharm Pharmacol*. 2006;58(6):739-47.
- 44- Jung T, Kamm W, Breitenbach A, Hungerer KD, Hundt E, Kissel T. Tetanus toxoid loaded nanoparticles from sulfobutylated poly(vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide): Evaluation of antibody response after oral and nasal application in mice. *Pharm Res*. 2001;18(3):352-60.
- 45- Mottram PL, Leong D, Crimeen-Irwin B, Gloster S, Xiang SD, Meanger J, et al. Type 1 and 2 immunity following vaccination is influenced by nanoparticle size: Formulation of a model vaccine for respiratory syncytial virus. *Mol Pharm*. 2007;4(1):73-84.
- 46- Fifis T, Gamvrellis A, Crimeen-Irwin B, Pietersz GA, Li J, Mottram PL, et al. Size-dependent immunogenicity: Therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *J Immunol*. 2004;173(5):3148-54.
- 47- Gutierrez I, Hernández RM, Igartua M, Gascón AR, Pedraz JL. Size dependent immune response after subcutaneous, oral and intranasal administration of BSA loaded nanospheres. *Vaccine*. 2002;21(1-2):67-77.
- 48- Dobrovolskaia MA, Aggarwal P, Hall JB, McNeil SE. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Mol Pharm*. 2008;5(4):487-95.