

## اثر میکروپارتيكل‌های كيتين و كيتوسان بر توليد اينترفرون-گاما و اينترلوکين-۵ در سوسپانسیون سلولی غدد لنفی موش‌های balb/c آلوده به انگل ليشمانيا ماژور

مریم مرادی<sup>۱</sup>، دکتر مصطفی حاجی ملاحسینی<sup>۲\*</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران  
۲. استادیار گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران؛ مرکز تحقیقات فیتوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** در مورد خواص تعدیل ایمنی کیتین و کیتوسان، گزارش‌های متعددی وجود دارد. به منظور امکان‌سنجی استفاده از میکروپارتيكل‌های کیتینی به عنوان ادجوانت در واکنش‌های ضد ليشمانيا، تأثیر میکروپارتيكل‌های کیتین و کیتوسان بر تولید اینترفرون-گاما (IFN- $\gamma$ ) و اینترلوکین-۵ (IL-5) در سوسپانسیون سلولی آلوده به انگل ليشمانيا، مورد مطالعه گرفت.

**مواد و روش‌ها:** موش‌های Balb/c با  $2 \times 10^5$  پروماستیگوت انگل ليشمانيا ماژور در فاز ایستایی، در قاعده‌ی دم و به روش داخل جلدی آلوده شدند و پس از دوهفته، سوسپانسیون سلولی آلوده به ليشمانيا، از غدد لنفی موش‌ها جدا شد. از میکروپارتيكل‌های کیتینی کوچک اندازه (کمتر از ۴۰ میکرون) که با سونیکاسیون و عبور دادن از صافی تهیه و اندازه‌ی آنها با Master sizer بررسی شده بود، برای تحریک سلولی استفاده گردید و در نهایت، غلظت IFN- $\gamma$  و IL-5 به روش الیزا و میزان نیتریک اکساید به روش گریس در سوپرناتانت کشت سلولی اندازه‌گیری شد. قابلیت تحریک تکثیر سلولی توسط میکروپارتيكل‌ها نیز به روش جذب تایمیدین بررسی گردید.

**یافته‌ها:** میکروپارتيكل‌های کیتین و کیتوسان، تکثیر سلولی را موجب شدند، اما هیچ یک قادر به تحریک تولید نیتریک اکساید از سوسپانسیون سلولی آلوده به انگل ليشمانيا نبودند. افزایش نسبت میزان IFN- $\gamma$ /IL-5 در تحریک با میکروپارتيكل‌های کیتین، مشاهده گردید.

**نتیجه‌گیری:** میکروپارتيكل‌های کیتین قادر به تحریک تولید IFN- $\gamma$  در سوسپانسیون سلولی آلوده به ليشمانيا بوده و توان تحریک تکثیر سلول‌هایی در سوسپانسیون غدد لنفی را دارند. به نظر می‌رسد بتوان از میکروپارتيكل‌های کیتینی به عنوان یک ایمونوادجوانت در واکنش‌های ضد ليشمانيا بهره گرفت.

### واژگان کلیدی: کیتین، کیتوسان، ليشمانيا ماژور، ادجوانت

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Moradi M, Haji Molla Hoseini M. Effect of chitin and chitosan microparticles on interferon- $\gamma$  and interleukine-5 production by leishmania infected lymph nodes cell suspensions of the Balb/c mice. *Pejouhandeh* 2015;20(5):240-248.

### مقدمه

طی نزدیک به یک قرن، توسعه‌ی ادجوانت‌هایی که قابلیت مصارف انسانی داشته باشند، پیشرفت چندانی نداشته و پس از گذشت قریب به ۹۰ سال، همچنان آلودگی شناخته شده‌ترین ادجوانتی است که جهت مصارف انسانی مورد تأیید مؤسسه‌ی غذا و داروی آمریکا (FDA) قرار گرفته است. البته ادجوانت‌های دیگری هم وجود دارند که برای واکنش‌های انسانی مورد تأیید قرار گرفته‌اند، ولی تعداد آنها انگشت شمار است (۱). ابداع واکنش‌های جدید، همچنان که نیازمند شناخت آنتی‌ژن‌های حفاظتی است، به توسعه‌ی ادجوانت‌ها نیز وابسته می‌باشد. موضوعی که حداقل در کشور ما، کمتر

تولید واکنش مؤثر با هزینه‌ی پایین، یکی از اولویت‌های سازمان بهداشت جهانی است. علاوه بر آنتی‌ژن حفاظتی که جزو اصلی واکنش است، ادجوانت‌ها همواره یکی از اجزای جدایی‌ناپذیر در فرمولاسیون واکنش محسوب می‌شوند. در

\*نویسنده مسؤول مکاتبات: دکتر مصطفی حاجی ملاحسینی؛ استادیار گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران؛ مرکز تحقیقات فیتوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران؛ تلفن و نمابر: ۲۲۴۳۹۹۷۰ (۰۲۱)؛ پست الکترونیکی:

m.mollahoseini@sbm.ac.ir

با یکدیگر مقایسه نماییم. نتیجه‌ی آن تحقیق نشان داد که میکروپارتیکل‌های کیتین و نه کیتوسان، توان تحریک سوسپانسیون سلول‌های غدد لنفی موش آلوده به لیشمانیا را دارند، به گونه‌ای که سوسپانسیون سلولی آلوده به انگل لیشمانیا در پاسخ به تحریک کیتین، بیش از ۲۰ برابر نسبت به کیتوسان، تولید TNF- $\alpha$  و IL-10 را به دنبال دارد (۱۱). در ادامه‌ی این تحقیقات، به منظور امکان‌سنجی استفاده از میکروپارتیکل‌های کیتینی به عنوان ادجوانت در واکسیناسیون ضد لیشمانیا، در این مطالعه تأثیر میکروپارتیکل‌های کیتین و کیتوسان بر تحریک سوسپانسیون سلولی آلوده به انگل لیشمانیا، در جهت تولید IFN- $\gamma$ ، IL-5، نیتریک اکساید و توان القای تکثیر سلولی، مورد مطالعه گرفت.

### مواد و روش‌ها

به منظور دستیابی به ذراتی با میانگین اندازه‌ی کمتر از ۴۰ میکرون، تهیه‌ی میکروپارتیکل‌ها همچون مطالعات قبلی انجام شد (۱۱، ۷، ۶). به اختصار، سوسپانسیون پودرهای کیتین و کیتوسان از صافی‌های با اندازه‌ی ۴۰، ۷۰ و ۱۰۰ میکرون (Cell Strainer BD Falcon, Mexico) عبور داده شد و سوسپانسیون زیر فیلتر ۴۰ میکرون با استفاده از فریز درایر (Christ Alpha 1-2 LD, UK) خشک شد. پودر حاصل، وزن گردید و از آن سوسپانسیون تهیه شد. سپس، سوسپانسیون حاصل در شرایط قدرت ۲۵ درصد با استفاده از سیستم UP200H سونیکه شد و اندازه‌ی ذرات به روش بهره‌گیری از لیزر (Malvern Master Sizer. Malvern ) (Instruments. Ltd. Worcestershaier, UK) بررسی گردید. بدین ترتیب، مشابه نتایج مطالعه‌ی پیشین (۱۱) میکروپارتیکل‌های با اندازه‌ی مناسب جهت تحریک سوسپانسیون سلولی غدد لنفاوی، آماده شد.

از پروماستیگوت‌های انگل (سویه‌ی ایرانی MRHO/IR/75/ER) که در مرحله‌ی ایستایی قرار داشتند، سوسپانسیون انگلی به تعداد  $2 \times 10^5$  در ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات برای تزریق به هر موش آزمایشگاهی، تهیه شد. در قاعده‌ی دم ۱۵ موش Balb/c ماده با سن ۵ تا ۷ هفته، تعداد  $2 \times 10^5$  پروماستیگوت انگل به صورت داخل جلدی تزریق شد. سپس موش‌ها به ۳ گروه (یک گروه کنترل و دو گروه تیمار) تقسیم شدند. گروه‌های تحت تیمار، تا دو هفته به صورت دو روز در میان با تزریق زیر جلدی  $100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  میکروپارتیکل در قاعده‌ی دم، تیمار شدند و گروه کنترل، ۱۰۰ میکرولیتر محلول PBS دریافت کرد.

مورد توجه قرار گرفته و چه بسا با تغییر فرمولاسیون واکسن و تغییر ادجوانت بتوان واکسیناسیون موفقیت‌آمیزی علیه پاتوژن‌هایی مانند لیشمانیا که واکسیناسیون ضد آن تاکنون مؤثر نبوده است، ارایه کرد.

کیتین پس از سلولز، فراوان‌ترین بیوپلیمر موجود در طبیعت با فرمول  $\beta$ -1-4-poly-N-acetyl D glucosamine می‌باشد. کیتین و مشتقات آن به دلیل دارا بودن خواص بیولوژیکی مفید مانند سازگاری زیستی (Biocompatibility)، قابلیت تجزیه‌ی زیستی (Biodegradability)، خواص التیامی در زخم، خاصیت ضدتوموری، ضد باکتریایی، ضد ویروسی و ضد قارچی، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (۲). میکروپارتیکل‌های کیتینی متناسب با اندازه‌شان (۳) دارای اثرات تعدیل ایمنی (ایمونومدولاتوری) بوده و با تأثیر بر ایمنی ذاتی و اکتسابی، سبب افزایش فعالیت سلول‌ها، ترشح سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها می‌شوند (۲). با توجه به عدم وجود کیتین و مشتقات آن در ساختار بدن انسان، حضور آنها برای سیستم ایمنی، یک فعال‌کننده‌ی سیستم ایمنی محسوب می‌شود. در سطح سلول‌های ایمنی گیرنده‌هایی چون TLR-2، Detectin-1 و مانوز، مسؤول شناسایی کیتین می‌باشند (۴).

میکروپارتیکل‌های کیتین به واسطه‌ی توانمندی در تعدیل پاسخ‌های ایمنی، به ادجوانت‌های چند وجهی (Multifaceted) معروف شده‌اند (۵). نتایج تحقیقات پیشین ما نشان می‌دهد که میکروپارتیکل‌های کیتین در شرایط *in vitro* باعث تحریک تولید TNF- $\alpha$  از ماکروفاژهای آلوده به لیشمانیا ماژور می‌شوند و همچنین در شرایط *in vivo* در موش آلوده به لیشمانیا ماژور، با فعال نمودن محور IFN- $\gamma$ -IL-10، یک پاسخ TH1 کنترل شده ایجاد می‌کنند (۷، ۶). گزارش‌های موجود نشان می‌دهند در بین مشتقات مختلف کیتین، مشتقات دآستیل‌ی آن (کیتوسان)، پاسخ‌های ایمنی را بهتر تحریک می‌کند (۹، ۸). برخی مطالعات دیگر نیز به پتانسیل متفاوت کیتین و کیتوسان بر القای پاسخ‌های ایمنی اشاره دارند؛ مانند مطالعه‌ای که بر نقش کیتوسان و نه کیتین در فعال کردن اینفلامازوم از راه فاگوسیتوز پرداخته است (۱۰). در مطالعه‌ی دیگر بر آن شدیم که تأثیر میکروپارتیکل‌های کیتوسان را که خاصیت ادجوانتی دارند (C-3646, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) در مقایسه با میکروپارتیکل‌های کیتین (C-7170, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) در توانایی تحریک سوسپانسیون سلولی غدد لنفاوی موش‌های آلوده به لیشمانیا،

استاندارد، غلظت‌ها محاسبه گردید.

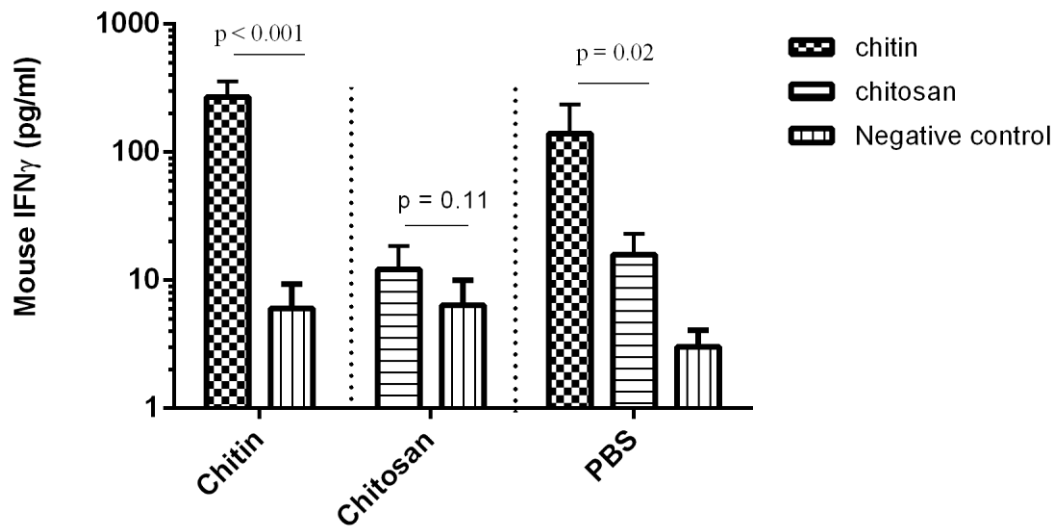
به هر حفره از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای کشت سلول (NUNC)، ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون  $1 \times 10^6$  سلول در میکرولیتر اضافه شد. سلول‌ها با میکروپارتیکل‌ها (غلظت  $100 \mu\text{g/ml}$ ) و یا میتوزن Con A (غلظت  $10 \mu\text{g/ml}$ )، تحریک و به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شدند. در ۱۸ ساعت پایانی، تایمیدین نشاندار (Amersham) به میزان ۲۰ میکرولیتر و غلظت  $0.5$  میکروکوری به هر خانه اضافه شد. سپس به کمک دستگاه cell harvester (Titertek)، سلول‌ها روی کاغذ فایبرگلاس منتقل شدند. پس از خشک شدن، فیلترها در محلول سنتیلاسیون شامل  $0.25$  گرم  $\text{POPOP}$  ( $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$ ) (Sigma)،  $6$  گرم  $\text{PPO}$  ( $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}$ ) (Sigma)، و  $1$  لیتر تولوئن (Sigma) قرار داده شد. میزان جذب تایمیدین توسط سلول‌های تکثیر یافته و یا به عبارتی (count per minute) CPM آنها توسط دستگاه شمارنده‌ی بتا (Wallav 14410)، محاسبه شد. برای انجام محاسبات آماری از نرم‌افزار Graph Pad Prism version 6.01 استفاده شد. برای تعیین نرمال یا غیرنرمال بودن نمونه از نظر متغیر مورد نظر، به علت کم بودن تعداد نمونه‌ها، آزمون Shapiro-Wilk مبنا قرار گرفت. در صورتی که هر دو گروه و یا گروه‌ها از نظر متغیر مورد نظر، دارای توزیع نرمال بودند، از آزمون آماری t-test و ANOVA و در صورتی که دارای توزیع غیر نرمال بودند یا آن که یکی دارای توزیع نرمال و دیگری دارای توزیع غیر نرمال بود، از آزمونهای ناپارامتری Mann-Whitney و K Independent Samples استفاده گردید.  $P\text{-value} \leq 0.05$  مبنای معنی‌داری آماری در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

در گروه دریافت‌کننده‌ی PBS که سلول‌های آنها در محیط کشت با کیتین تحریک شدند، میانگین غلظت  $\text{IFN-}\gamma$  معادل  $169/57 \pm 38/52$  بود که در مقایسه با تحریک توسط کیتوسان ( $5/82 \pm 19/86$ )، افزایش  $8/5$  برابری را نشان داد ( $P < 0.02$ ). در گروه دریافت‌کننده‌ی میکروپارتیکل‌های کیتین، هنگامی که سلول‌ها در محیط کشت با کیتین تحریک شدند، افزایش قابل توجهی در تولید  $\text{IFN-}\gamma$  در مقایسه با سلول تحریک نشده رخ داد ( $P < 0.01$ )، ولی در گروهی که میکروپارتیکل‌های کیتوسان دریافت کرده و در محیط کشت با کیتوسان تحریک شدند، تفاوت معنی‌داری در تحریک تولید سایتوکاین دیده نشد ( $P = 0.11$ )، نمودار (۱).

در تأیید نتیجه‌ی بررسی  $\text{IFN-}\gamma$  و در تکرار مجدد آزمایش، از سوسپانسیون سلولی غدد لنفی موش‌های سالم و البته تحت تیمار در گروه‌های سه گانه نیز استفاده شده است. موش‌های آزمایشگاهی ۲ هفته بعد از تلقیح انگل، به روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شده و گره‌های لنفاوی اینگوئینال چپ و راست آنها به منظور آزمایش‌های تحریک سلولی خارج شد. پس از یکنواخت کردن، سلول‌ها شستشو داده شد و شمارش سلولی با لام نفوبار انجام گرفت و درصد زنده بودن سلول‌ها با رنگ تریپان بلو مشخص گردید. با توجه به اینکه در پایان دو هفته، زخمی شکل نگرفته بود که نشانگر آلودگی موش‌ها باشد، برای اثبات آلودگی، مانند مطالعه‌ی قبلی (۱۱)، از آزمایش PCR استفاده شد. لازم به ذکر است که پس از چند روز در کشت سلول‌های جدا شده نیز انگل در نمای میکروسکوپی رویت گردید که تأییدی دوباره بر آلودگی موش‌ها بود. به منظور تحریک تولید  $\text{IFN-}\gamma$  و  $\text{IL-5}$  توسط سلول‌های گره‌ی لنفاوی،  $2 \times 10^6$  سلول گره‌ی لنفاوی در  $1$  میلی‌لیتر محیط کامل RPMI، با میکروپارتیکل‌های کیتین و یا کیتوسان (غلظت  $100$  میکروگرم در میلی‌لیتر) به مدت  $72$  ساعت در دمای  $37$  درجه‌ی سانتی‌گراد و  $5\%$   $\text{CO}_2$  تحریک شد. میزان سایتوکاین‌ها در سوپرناتانت سلولی به روش ELISA با استفاده از کیت‌های تجاری (U-cyTech, Utrecht, Netherlands) که حساسیت این کیت‌ها حداقل یک پیکوگرم در میلی‌لیتر بود، مطابق دستورالعمل، اندازه‌گیری شد.

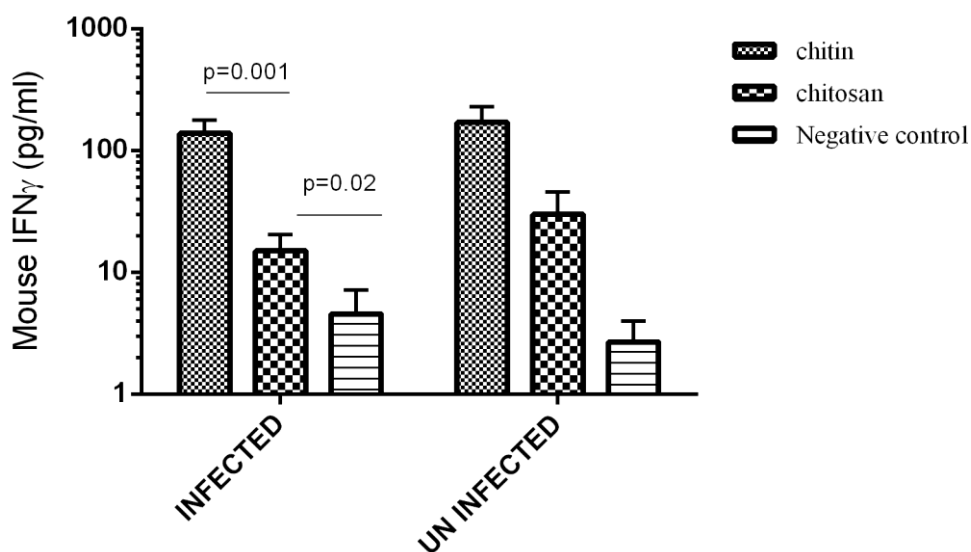
به منظور سنجش میزان نیتریک اکساید در سوپرناتانت کشت سلولی تحریک شده با میکروپارتیکل‌ها، از روش رنگ‌سنجی Griss و دستورالعمل کیت شرکت زیست رویش استفاده شد. به منظور رسم منحنی استاندارد با رقیق‌سازی ضریب دو از غلظت  $100$  میکرومولار نیتريت سدیم، غلظت‌های  $100$  تا صفر میکرومولار آن در پلیت ۹۶ خانه به حجم  $50$  میکرولیتر در دو ستون تهیه شد. به چاهک‌های دیگر،  $50$  میکرولیتر از هر یک از نمونه‌ها اضافه شد. آنگاه  $50$  میکرولیتر محلول اسیدی سولفانیل‌آمید  $1\%$  به تمام چاهک‌ها اعم از استاندارد، بلانک و نمونه‌ها اضافه گردید. پلیت به مدت  $10$  دقیقه در تاریکی و دمای اتاق انکوبه شد. سپس  $50$  میکرولیتر محلول نفتیل-اتیلن‌دی‌آمین‌دی‌هیدروکلراید  $0.1$  درصد به تمام چاهک‌ها افزوده شد. مجدداً پلیت به مدت  $10$  دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی، انکوبه گردید. رنگ ارغوانی حاصل شد که پس از  $10$  دقیقه، جذب نوری آن در طول موج بین  $520$  تا  $550$  نانومتر خوانده شد و با رسم منحنی



نمودار ۱. میزان  $IFN-\gamma$  تولید شده و موجود در سوپرناتانت کشت سلولی غدد لنفی موش آلوده به انگل لیشمانیا در پاسخ اولیه و ثانویه به میکروپارتیکل‌ها. سلول‌های موش‌های آلوده گروه PBS برای اولین بار، در محیط کشت با میکروپارتیکل‌ها مواجهه داشتند در حالی که سلول‌های موش‌های آلوده در گروه‌های کیتین و کیتوسان، در شرایط محیط کشت در وضعیت پاسخ یادآور به میکروپارتیکل‌ها قرار داشتند.

متوسط سایتوکاین تولیدی ( $15 \pm 2/23$ ) مشابه نتایج پیشین، ارایه شده در نمودار ۱ است. نتایج بررسی سایتوکاینی موش‌های سالم دریافت کننده‌ی PBS در تحریک با میکروپارتیکل‌های کیتین و کیتوسان، مشابه سایر نتایج این تحقیق بود، لذا گزارش نشدند.

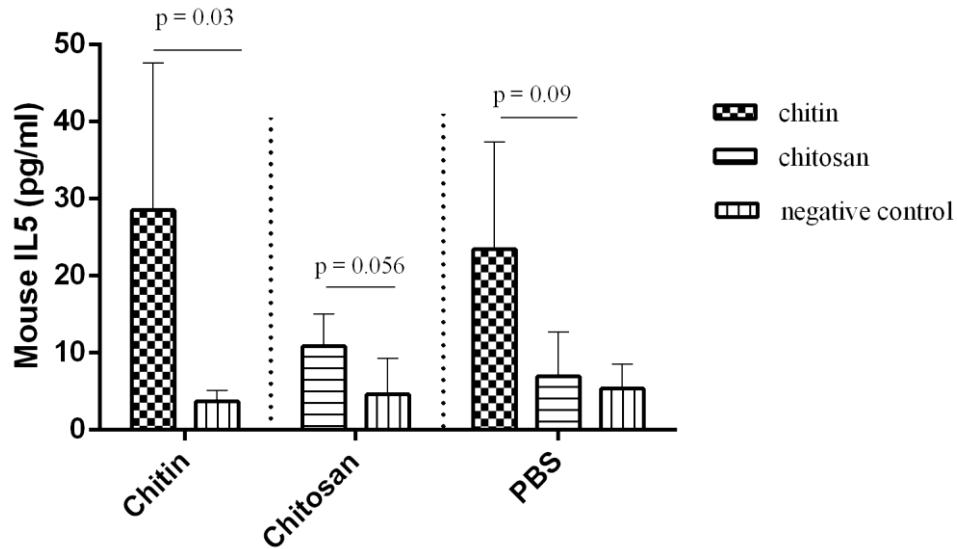
میکروپارتیکل‌های کیتین قادر به تحریک تولید  $IFN-\gamma$  از سوسپانسیون سلولی غدد لنفی موش سالم و آلوده به لیشمانیا می‌باشند. اگرچه تفاوت معنی‌دار ( $P < 0.02$ ) در موش‌های آلوده تیمار شده با کیتوسان در پاسخ به میکروپارتیکل کیتوسان در این مرحله دیده شد (نمودار ۲)، ولی سطح



نمودار ۲. میانگین غلظت  $IFN-\gamma$  در سوپرناتانت کشت سلولی غدد لنفی ۳ گروه موش‌های سالم (Uninfected) و ۳ گروه موش‌های آلوده (Infected) در پاسخ به میکروپارتیکل‌های مربوطه.

محیط کشت در گروه تیمار نشده (PBS) در مقایسه با گروه‌های تحت تیمار که تحریک ثانویه (پاسخ یادآور) را دریافت می‌کردند، تفاوتی نشان نداد (نمودارهای ۱ و ۳). نتایج ارزیابی مجدد IL-5 در تکرار آزمایش با حضور موش‌های سالم، به علت دستیابی به نتایجی مشابه، ارایه نشده است.

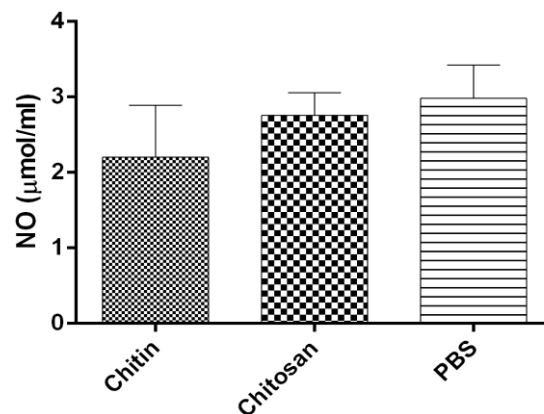
میزان IL-5 در گروه دریافت‌کننده PBS در پاسخ به کیتین،  $23/43 \pm 7/22$  پیکوگرم در میلی‌لیتر بود که نسبت به سایتوکاین تولیدی در پاسخ به کیتوسان ( $4/41 \pm 0/5$ ) افزایشی ۵ برابری نشان داد ولی به لحاظ آماری، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ( $P=0/09$ ). مقادیر سایتوکاین‌های تولیدی متعاقب تحریک اولیه سلول با میکروپارتیکل‌ها در



نمودار ۳. میزان IL-5 تولید شده در سوپرناتانت کشت سلولی غدد لنفی موش‌های آلوده تیمار شده با کیتین و کیتوسان در پاسخ دوباره به میکروپارتیکل‌ها، در کنار نتایج تولید IL-5 مربوط به موش‌های آلوده و دریافت‌کننده PBS.

حفاظتی آنها وابسته به نیتریک اکساید نمی‌باشد. به علت عدم تفاوت در نتایج حاصل از تحریک و عدم تحریک با میکروپارتیکل در شرایط *in vitro* فقط نتایج حاصل از عدم تحریک (Baseline) گروه‌های مختلف ارایه شده است (نمودار ۴).

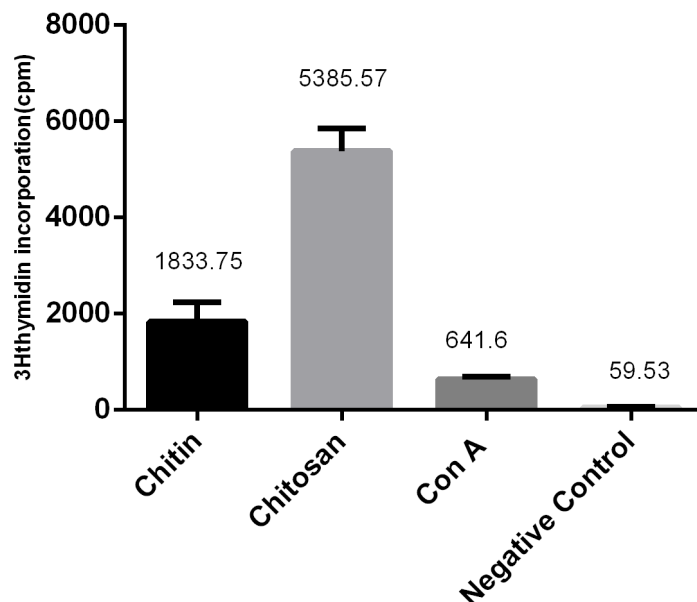
میزان NO در موش‌های آلوده به انگل که تحت تیمار با میکروپارتیکل‌های کیتین و کیتوسان قرار گرفته بودند، نسبت به گروه آلوده غیر تیمار شده، کاهش داشت. البته این تفاوت به لحاظ آماری معنی‌دار نبود ( $P=0/21$ ). میکروپارتیکل‌ها باعث تحریک تولید نیتریک اکساید نمی‌گردند و احتمالاً اثر



نمودار ۴. سطح پایه غلظت NO در سوپرناتانت سوسپانسیون سلولی غدد لنفی ۳ گروه موش‌های آلوده دریافت‌کننده میکروپارتیکل‌های کیتین، کیتوسان و PBS در زمان ۲ هفته پس از تلقیح انگل.

به محرک Con-A به عنوان کنترل مثبت، معادل ۱۱ بود. با در نظر گرفتن شاخص تحریک بیش از ۲/۵ به عنوان نتیجه‌ی مثبت، مشخص می‌شود که میکروپارتیکل‌ها خاصیت میتوژنیک داشته‌اند (نمودار ۵).

متوسط cpm حاصل از محرک کیتین برابر با  $1833.75 \pm 287/5$  و در مورد کیتوسان، معادل  $5385.57 \pm 271/6$  برآورد شد. بر اساس مقایسه‌ی cpm محرک‌ها و مقایسه‌ی آن با cpm کنترل منفی ( $59.53 \pm 6/94$ )، به ترتیب شاخص تحریک برای کیتین ۳۰/۵ و برای کیتوسان ۹۰ و شاخص تحریک در پاسخ



نمودار ۵. تکثیر سلولی با روش جذب تایمیدین نشان‌دار در سوسپانسیون سلولی غدد لنفی موش سالم تحت تأثیر کیتین و کیتوسان.

## بحث

در این تحقیق، پاسخ ایمنی موش‌های آلوده به لیشمانیا به تحریک با میکروپارتیکل‌های کوچک اندازه کیتینی، پس از دو هفته از زمان آلودگی و به عبارت دیگر در فاز حساس شدن پاسخ ایمنی (sensitization phase)، بررسی شد تا خاصیت ایمنوآجوانتی میکروپارتیکل‌ها مورد ارزیابی قرار گیرد. نتایج نشان داد که:

الف) میکروپارتیکل‌های کیتین بر خلاف کیتوسان قادر به القای ترشح سایتوکاین از سوسپانسیون سلولی غدد لنفی موش آلوده و همچنین غیر آلوده می‌باشند.  
ب) میکروپارتیکل‌های کیتین و کیتوسان قادر به القای پاسخ تکثیری در سوسپانسیون سلولی غدد لنفی موش‌های آزمایشگاهی هستند.

مطالعات قبلی ما نشان داد که در شرایط داخل آزمایشگاهی، میکروپارتیکل‌های کیتین سبب تحریک تولید  $TNF-\alpha$  به عنوان سایتوکاین مؤثر ضد لیشمانیا گردیده و بر میزان رشد انگل در ماکروفاژهای آلوده (infection rate) تاثیر می‌گذارند (۶). همچنین در مطالعه‌ی دیگر، سوسپانسیون سلولی غدد لنفی موش‌های آلوده به لیشمانیا که دو هفته تحت درمان با میکروپارتیکل‌های کیتین قرار گرفته

بودند، در پاسخ یادآور به آنتی‌ژن‌های انگل لیشمانیا، افزایش تولید  $TNF-\alpha$ ،  $IFN-\gamma$ ،  $IL-0$  و کاهش تولید  $IL-5$  را نشان دادند. به عبارت دیگر، افزایش پاسخ‌های  $T_H1$  و کاهش پاسخ‌های  $T_H2$  در مدل موش Balb/c آلوده با انگل لیشمانیا ماژور و تحت تیمار دوهفته‌ای با میکروپارتیکل کیتین، مشاهد شد (۷). در تحقیق دیگری با هدف مقایسه‌ی کیتین و کیتوسان نشان دادیم که میکروپارتیکل‌های کیتین و نه کیتوسان، توان تحریک سوسپانسیون سلول‌های غدد لنفی موش آلوده به لیشمانیا را در جهت تولید  $TNF-\alpha$  و  $IL-10$  دارند (۱۱). اینک تولید  $IFN-\gamma$  در پاسخ به تحریک با کیتین، که در این تحقیق حاصل شد می‌تواند تأییدی بر اثر ضدلیشمانیایی این ترکیب باشد. Nagatani در تحقیقی که نتایج آن در سال ۲۰۱۲ منتشر شد، نشان داد که موش‌های مدل بیماری کولیت در پاسخ به درمان توسط میکروپارتیکل‌های کیتین بهبود می‌یابد و مکانیسم این اثر را پاسخ مبتنی بر محور  $IFN-\gamma-IL-10$  عنوان می‌دارد (۱۲). یافته‌ی غیر منتظره‌ی پژوهش حاضر، تولید  $IL-5$  در تحریک با میکروپارتیکل‌های کیتین بود که افزایش آن با الگوی ضدلیشمانیایی میکروپارتیکل‌های کیتین هم‌خوانی ندارد. این پدیده می‌تواند ناشی از ناخالصی کیتین تجاری باشد، چرا که

دآستیل‌های خود، تحت تأثیر هم‌هم لیزوزومی قرار می‌گیرد. در مطالعه‌ی اخیر ما، با روش MTT و نوترال، رد هیچ گونه اثر توکسیک و یا پرولیفراتیو از کیتین و کیتوسان بر لاین سلولی A549 و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون انسان مشاهده نشد (منتشر نشده). در مجموع، مطالعات مختلف با روش‌های گوناگون در زمینه‌ی قابلیت تکثیر کیتین و مشتقات آن، صورت پذیرفته ولی بررسی پاسخ تکثیری این مواد بر سلول‌های غدد لنفی موش BALB/c تاکنون گزارش نشده است. پاسخ تکثیری قوی که در این مطالعه مشاهده شد، نیازمند مطالعات بیشتر و شناسایی سلول هدف پاسخ دهنده به کیتین در غدد لنفی است. یکی از پیشنهادهایی که در ادامه‌ی این تحقیق می‌توان مطرح نمود، مطالعه‌ی پاسخ سلول‌های لمفوئیدی ایمنی ذاتی (Innate Lymphoid Cells) در تحریک با میکروپارتیکل‌های کیتینی است. این احتمال وجود دارد که کیتین با ساختار کربوهیدراتی خود بتواند گیرنده‌های لکتینی این سلول‌ها را تحریک نماید، کما اینکه اثر تحریکی بر NKC گزارش شده است (۲۱). به تازگی نیز محققین اثر تحریکی کیتین بر سلول‌های لمفوئید ایمنی ذاتی از جمله سلول‌های گاما-دلتا و ILC2 را گزارش کرده‌اند (۲۲). لازم به ذکر است که نتایج تحقیق حاضر همچنین نشان داد که پاسخ سایتوکاینی القا شده توسط میکروپارتیکل‌ها، ناشی از یک پاسخ یادآور نمی‌باشد و بنابراین سلول‌های ایمنی ذاتی می‌تواند منشأ سایتوکاین‌های موجود باشد.

خاصیت ضدلیشمانیایی کیتین و مشتق دآستیل‌های آن ممکن است ناشی از تحریک ترشح کیتینازها باشد. تزریق داخل صفاقی مخمر با ساختار کیتینی به موش‌های بزرگ آزمایشگاهی موجب افزایش سطح پلاسمایی کیتینازها گردید (۲۳). همچنین، استفاده از کیتیناز نوترکیب سبب بهبودی موش‌های آلوده به کاندیدیازیس شد (۲۴). در نتیجه، این فرض مطرح می‌شود که شاید تزریق میکروپارتیکل‌های کیتینی از طریق سنتز کیتینازها، پاسخ‌های ایمنی را تعدیل می‌کنند، چرا که کیتینازها خواص شبه سایتوکاینی دارند (۲۵). در ادامه‌ی این تحقیق، مطالعه‌ی در زمینه‌ی تولید کیتینازها تحت تأثیر محرک‌های کیتینی، در حال بررسی است.

در سال ۲۰۰۳، Okawa به مقایسه‌ی اثرات کیتین و کیتوسان در موش‌های آلوده به باکتری سودوموناس آئروژینوزا و موش‌های آلوده به لیستریا منوسایتوتوزن پرداخت. نتایج این مطالعه نشان داد که درصد بقای (survival) موش‌های آلوده

تحقیقات نشان داده است که کیتین اگر که به صورت کامل پروتئین‌زدایی نشده باشد، خاصیت آلرژیک دارد (۱۵-۱۳). البته پراکندگی داده‌های مربوط به این سایتوکاین نیز قضاوت در مورد آن را دشوار می‌نماید. به هر حال ارزیابی دوباره و دقیق‌تر این سایتوکاین ضروری به نظر می‌رسد. نتایج مطالعه‌ی فعلی ما در تطابق با نتایج مطالعات قبلی (۶) نشان داد که میکروپارتیکل‌های کیتینی قادر به القای ترشح نیتریک اکساید نیستند و ظاهراً اثر ضد لیشمانیایی آنها غیر وابسته به نیتریک اکساید می‌باشد. البته مطالعات دیگران هم نشان داده است که ترکیبات کیتینی، القاکننده‌ی نیتریک اکساید نیستند (۱۶) و این ویژگی ترکیبات کیتینی سبب شده است که در بهبود زخم مؤثر عمل کنند (۱۷، ۱۸). از این رو به نظر می‌رسد میکروپارتیکل‌های کیتینی قادرند دو فرایند به ظاهر متضاد یعنی بهبود زخم و مقابله با لیشمانیا را به موازات هم پیش ببرند و علاوه بر کنترل عفونت، در بهبود ضایعات هم مؤثر باشند.

تکثیر سلولی ناشی از تحریک با میکروپارتیکل‌های کیتین که در این تحقیق گزارش شده است، حکایت از این دارد که کیتین و کیتوسان می‌توانند زمینه‌ساز تولید مواد مؤثر بر تقسیم سلولی باشند که این موضوع نیاز به تحقیق بیشتر دارد. البته اثر کیتین و مشتقات آن بر تقسیم و تکثیر فیبروبلاست‌ها و کراتینوسیت‌ها در مطالعات دیگری هم گزارش شده است (۱۹) و نقش این ترکیبات در بهبود زخم بر مبنای همین قابلیت توضیح داده می‌شود. نخستین بار در سال ۱۹۸۴ در یک مطالعه، اثر تحریکی استیل-د-گلوکزآمین بر تحریک سلول‌های تک‌هسته‌ای خون انسان مورد آزمایش قرار گرفت و مشخص شد که این ترکیب اثر سینرژیک با میتوژنی چون PHA دارد (۲۰). در مطالعه‌ی که Nishimura و همکارانش در سال ۱۹۸۵ در دانشگاه Hokkaido انجام دادند و نتایج آن را در مجله Vaccine منتشر نمودند مشخص گردید که مشتقات کیتینی در دوزهای بیشتر از ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، دارای اثر میتوژنیک ضعیف بر سلول‌های جدا شده از طحال موش‌های سالم نژاد BALB/c و C57BL/6 دارند (۲۱). در این تحقیق مشابه تحقیق ما، از روش پرولیفراسیون با استفاده از تایمیدین رادیواکتیو استفاده شده بود. البته لازم به ذکر است که محققین ژاپنی در مطالعه‌ی خود، قابلیت ترکیبات کیتینی در تحریک سلول‌های NK را نیز گزارش نمودند و بهترین تحریک‌کنندگی را مربوط به مشتق دآستیل‌های کیتین با میزان ۷۰٪ دآستیل‌سیون عنوان کردند. همچنین، دریافتند که کیتین بهتر از مشتقات

میکروپارتيکل‌های کیتینی به عنوان ایمونوآدجوانت در تحقیقات پیرامون واکسیناسیون ضد لیشمانیا خواهد بود.

### تشکر و قدردانی

این تحقیق، بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد ایمونولوژی خانم مریم مرادی بود که با حمایت مالی دانشکده پزشکی در قالب طرح پژوهشی شماره ۱۳/۲۷۰ صورت پذیرفت. بدینوسیله، از حمایت‌های معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، صمیمانه سپاسگزاریم. همچنین، از مساعی همکاران در گروه ایمونولوژی دانشگاه شهید بهشتی، به ویژه خانم دکتر نریمان مصفا و آقای دکتر فرشید یگانه، تشکر نموده و از همکاران بخش ایمونولوژی انیستیتو پاستور جناب آقای وحید خاضع و سرکار خانم دکتر هایده دارابی، قدردانی می‌نماییم.

به سودموناتس در گروه تحت تیمار با کیتین ۶۰٪ و کیتوسان ۷۰٪ در مقایسه با گروه کنترل (۲۶٪) می‌باشد. همچنین در موش‌های آلوده به لیستریا منوسیتوژنز به عنوان یک باکتری داخل سلولی، بر اثر تزریق داخل رگی کیتین، ۹۰٪ و تزریق داخل رگی کیتوسان ۷۸٪ بقا را در مقایسه با ۲۲٪ بقای گروه کنترل گزارش نمودند. با تزریق داخل صفاقی کیتین نیز بقای ۵۰٪ در مقایسه با گروه کنترل را گزارش نمودند که به این ترتیب خاصیت ضد باکتریایی هر دو ترکیب را نشان دادند (۲۶). در حال حاضر، مطالعه‌ای در آزمایشگاه ایمونولوژی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به منظور مقایسه‌ی اثرات تیمار با کیتین و کیتوسان در موش‌های آلوده به لیشمانیا بر زمان بروز زخم، وسعت ضایعه، بار انگلی و مرگ و میر در حال انجام است که حصول نتایج مطلوب از آن، زمینه ساز مطالعات آتی در خصوص استفاده از

### REFERENCES

- Mohan T, Verma P, Rao DN. Novel adjuvants and delivery vehicles for vaccines development: A road ahead. *Indian J Med Res* 2013;138(5):779-95.
- Kim SK, Venkatesan J. Chitin and chitosan derivatives: In: Kim SK, editor. *Chitin and chitosan derivatives advances in drug discovery and developments*. London: CRC Press; 2014. p. 3-15.
- Da Silva CA, Chalouni C, Williams A, Hartl D, Lee CG, Elias JA. Chitin is a size-dependent regulator of macrophage TNF and IL-10 production. *J Immunol* 2009;182:3573-82.
- Da Silva CA, Hartl D, Liu W, Lee CG, Elias JA. TLR-2 and IL-17A in chitin-induced macrophage activation and acute inflammation. *J Immunol* 2008;181(6):4279-86.
- Da Silva CA, Pochard P, Lee CG, Elias JA. Chitin particles are multifaceted immune adjuvants. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182(12):1482-91.
- Fatemeh D, Hoseini Mostafa HM, Memarnejadian A, Yeganeh F, Rezaie AM, Khaze V, et al. Immunomodulatory activities of chitin microparticles on *Leishmania major*-infected murine macrophages. *Arch Med Res* 2011;42:571-46.
- Ghotloo S, Hoseini MH, Alimohammadian MH, Khaze V, Memarnejadian A, Rostami A. Immunomodulatory effects of chitin microparticles on *Leishmania major*-infected BALB/c mice. *Parasitol Int* 2015;64(2):219-21.
- Nishimura K, Nishimura S, Nishi N, Saiki I, Tokura S, Azuma I. Immunological activity of chitin and its derivatives. *Vaccine* 1984;2(1):93-9.
- Nishimura S, Nishi N, Tokura S, Nishimura K, Azuma I. Bioactive chitin derivatives. Activation of mouse-peritoneal macrophages by O-(carboxymethyl)chitins. *Carbohydr Res* 1986;146(2):251-8.
- Bueterr C, Lee CK, Rathinam V, Healy GJ, Taron CH. Chitosan but not chitin activates the inflammasome by a mechanism dependent upon phagocytosis. *J Biol Chem* 2011;286(41):35447-55.
- Moradi M, Alimohammadian M, Yeganeh F, Khaze V, Haji Molla Hoseini M. Comparison of immune modulating effects of chitin microparticles with chitosan microparticles on leishmania infected lymph nodes cell suspensions of the mice. *Pejouhesh* 2014; 38(1):19-24. (Full Text in Persian)
- Nagatani K, Wang S, Llado V, Lau CW, Li Z, Mizoguchi A, et al. Chitin microparticles for the control of intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2012;18(9):1698-710.
- Zakzuk J, Benedetti I, Fernández-Caldas E, Caraballo L. The influence of chitin on the immune response to the house dust mite allergen blo t 12. *Int Arch Allergy Immunol* 2014;163(2):119-29.
- Shuhui L, Mok YK, Wong WF. Role of mammalian chitinases in asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2009; 149(4):369-77.
- Vega K, Kalkum M. Chitin, chitinase responses, and invasive fungal infections. *Int J Microbiol* 2012;2012:920459.
- Hwang SM, Chen CY, Chen SS, Chen JC. Chitinous materials inhibit nitric oxide production by activated RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Research Commun* 2000;271(1):229-33.

17. Schäffer MR, Tantry U, Thornton FJ, Barbul A. Inhibition of nitric oxide synthesis in wounds: pharmacology and effect on accumulation of collagen in wounds in mice. *Eur J Surg* 1999;165(3):262–7.
18. Murrell G, Szabo C, Hannafin J, Jang D, Dolan M, Deng XH, *et al.* Modulation of tendon healing by nitric oxide. *Inflamm Res* 1997;46(1):19–27.
19. Howling GI, Dettmar PW, Goddard PA, Hampson FC, Dornish M, Wood EJ. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials* 2001;22(22):2959–66.
20. Komlos L, Ben-Efraim S, Lewis NJ, Hart J, Halbrecht I. Synergistic effect of N-acetyl-D-glucosamine (NAG) on mitogenic, antigenic and allogeneic stimulation of normal human lymphocytes. *Int J Immunopharmacol* 1984;6(6):593–9.
21. Nishimura K, Nishimura Si, Nishi N, Numata F, Tone Y, Tokura S, *et al.* Adjuvant activity of chitin derivatives in mice and guinea-pigs. *Vaccine* 1985;3(5):379–84.
22. Dyken SJV, Mohapatra A, Nussbaum JC, Molofsky AB, Thornton EE, Ziegler SF, *et al.* Chitin activates parallel immune modules that direct distinct inflammatory responses via innate lymphoid type 2 and  $\gamma\delta$  T Cells. *Immunity* 2014;40(3):414–24.
23. Korolenko TA, Zhanaeva SY, Falameeva OV, Kaledin VI, Filyushina EE, Buzueva II, *et al.* Chitotriosidase as a marker of macrophage stimulation. *Bull Exp Biol Med* 2000;130(4):948-50.
24. van Eijk M, van Roomen CP, Renkema GH, Bussink AP, Andrews L, Blommaart EF, *et al.* Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity. *Int Immunol* 2005;17(11):1505–12.
25. Johansen JS. Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibroses and cancer. *Dan Med Bull* 2006;53:172–209.
26. Okawa Y, Kobayashi M, Suzuki S, Suzuki M. Comparative study of protective effects of chitin, chitosan, and N-acetyl chitohexaose against *Pseudomonas aeruginosa* and *Listeria monocytogenes* infections in mice. *Biol Pharm Bull* 2003;26(6):902–4.