Research on Medicine Original Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Vol.43; No.2; 2019

Effect of Intra-Peritoneal Injection of Chitosan Nanoparticle Loaded with Leishmania *major* Excretory-Secretory Antigens on Macrophage Function in Exposure to Parasites in BALB/c Mice

Elham Feizabadi, Ahmad Zavaran Hossieni, Sara Soudi

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

(Received:2018/06/30 Accept: 2019/02/4)

Abstract

Background: *Leishmania major (L.major) is a causative agent of leishmaniasis. The disease has now become a public health problem. Modulation of the immune responses to inhibit the infection or the proliferation of the parasite is an effective way to overcome the leishmaniosis. Leishmania parasite secretory-excretory antigens are responsible for immune system modulation; therefore, they are used in vaccine design and immunotherapy. Nanoparticles have been considered in recent years due to the features that stimulate the immune system. The purpose of the present study was to produce a combination of nanoparticles and secretory-excretory antigens to induce immune responses.*

Materials and methods: *L.major secretory-excretory antigens were isolated from supernatant of parasite culture using ultracentrifugation and protein molecular weight and concentration were determined using SDS-PAGE and Bradford methods. The chitosan nanoparticle were loaded with antigens which confirmed by FTIR. MTT test was performed to determine the cytotoxic effect of nanoparticles on macrophages. Five groups of female BALB/c mice were sensitized with nanoparticles and nanoparticles loaded with the protein on days 0.10 and 21. The macrophages were isolated from the mice and infected with L.major for one hour. After 72 hours of incubation, NO production and inhibition of parasite growth were measured in response to L.major.*

Result: *In the present study, the excretory-secretory antigens of the L.major were in the range of 75-110 kDa, and loaded with chitosan nanoparticle by %76 efficacy. The results showed that the excretory-secretory antigens of the L.major parasites significantly increased the production of nitric oxide in the macrophages and the presence of chitosan induced this increase ($P<0.01$). In addition, the group that received chitosan loaded with the excretory secretory antigens of the L.major showed the least proliferation of the parasites ($P<0.05$).*

Conclusion: *If chitosan nanoparticles loaded with L.major excretory-secretory antigens can increase the activity of macrophage killing function by increasing nitric oxide production; therefore, they can be nominated as candidates for vaccine development and disease improvement.*

Keywords: *Excretory-Secretory Antigens; Chitosan; Leishmania Major; Macrophage*

* *Corresponding: Sara Soudi*
Email: soudi@modares.ac.ir

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور ۴۳، شماره ۲، ۱۳۹۸، صفحات ۹۷ تا ۱۰۴

بررسی اثر تزریق داخل صفاقی نانوذره کیتوزان همراه شده با آنتی‌ژن‌های ترشحی-تراوشی لیشمانیا ماژور برعملکرد ماکروفاژها در مواجهه با انگل در موش‌های BALB/c

الهام فیض‌آبادی، احمد زواران‌حسینی، سارا صعودی

دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمنی‌شناسی

تاریخ دریافت مقاله:۱۳۹۷/۰۴/۹ تاریخ پذیرش مقاله:۱۳۹۷/۱۱/۱۵

چکیده:

سابقه وهدف: لیشمانیا ماژور عامل بیماری لیشمانیوز است. این بیماری در حال حاضر به یک مشکل بهداشت عمومی تبدیل شده است. تعدیل پاسخ‌های سیستم ایمنی به نحوی که بتواند عفونت یا تکثیر انگل را مهار کند، یک راه موثر در غلبه بر لیشمانیوز خواهد بود. آنتی‌ژن‌های ترشحی- تراوشی انگل لیشمانیا، نقش تعدیل کنندگی سیستم ایمنی را بر عهده دارند، از این رو در طراحی واکسن و روش‌های ایمونوتراپی به کار گرفته می‌شوند. به نانوذرات با توجه به ویژگی‌هایی که در تحریک سیستم ایمنی دارند، در سال‌های اخیرمورد توجه قرار گرفته اند. هدف از این تحقیق، تولید ترکیبی از نانوذرات و آنتی‌ژن‌های ترشحی-تراوشی است که بتواند پاسخ ایمنی را القا کند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی که روی ماکروفاژهای صفاقی موش انجام شده است، آنتی‌ژن‌های ترشحی- تراوشی انگل لیشمانیا ماژور از سوپرناتانت کشت انگل با استفاده از اولتراسانتریفوژ جدا شده و محدوده وزن مولکولی پروتئینی و مقدار آن به روش *SDS-PAGE* و برادفورد تعیین شد. سپس این آنتی‌ژن‌ها با نانوذره کیتوزان همراه شدند و صحت آن با *FTIR* تایید شد. برای بررسی خاصیت کشندگی نانوذره بر ماکروفاژها، تست *MTT* انجام شد. پنج گروه موش ماده *BALB/c* در روزهای ۰، ۱۰، ۲۱ به صورت داخل صفاقی با نانوذره و نانوذره همراه با پروتئین حساس شدند. ماکروفاژها در روز ۲۸ از موش‌ها جدا شده و به مدت یک ساعت با انگل مجاور شدند. بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون، میزان تولید *NO* و مهار رشد انگل در پاسخ به لیشمانیا بررسی و با تست آماری *One- WayANOVA* آنالیز شد.

نتایج: در بررسی انجام شده، آنتی‌ژن‌های ترشحی- تراوشی انگل لیشمانیا ماژور در محدوده وزنی *75-110* کیلو دالتون قرار داشتند و با راندمان ۷۶درصد با نانوذرات کیتوزان همراه شدند. نتایج به دست آمده نشان داد که آنتی‌ژن‌های ترشحی- تراوشی انگل لیشمانیا ماژور به تنهایی سبب افزایش معنادار تولید نیتریک اکساید در ماکروفاژها می‌شود و حضور کیتوزان این افزایش را تقویت می کند*(P<0.01)*. همچنین گروهی که آنتی‌ژن‌های ترشحی- تراوشی انگل لیشمانیا ماژور همراه شده با کیتوزان را دریافت کرده‌اند، کم‌ترین میزان تکثیر انگل را نشان دادند*(P<0.05)*.

نتیجه‌گیری: آنتی‌ژن‌های ترشحی-تراوشی لیشمانیا ماژور اگر با نانوذره کیتوزان همراه شوند، می‌توانند از راه افزایش تولید نیتریک اکساید، عملکرد کشندگی ماکروفاژ را افزایش دهند. از این رو می‌توانند به عنوان کاندیدایی برای تولید واکسن و بهبود بیماری مطرح شوند.

واژگان کلیدی: آنتی‌ژن‌های ترشحی- تراوشی، کیتوزان، لیشمانیا ماژور، ماکروفاژ

مقدمه:

لیشمانیوز عفونت حاصل از انگل‌های لیشمانیاست که به سه شکل جلدی، احشایی و مخاطی بروز می‌کند. نزدیک به ۳۵۰میلیون نفر در بیش از ۹۸ کشور در سرتاسر جهان، تحت تاثیر آن قرار دارند. این انگل یک مشکل بزرگ و عمده در بسیاری از کشورها از جمله ایران است. تلاش‌های فراوانی برای درمان این بیماری و حتی تولید واکسن انجام شده که تاکنون موفقیت‌آمیز نبوده و تعداد مبتلایان همچنان رو به افزایش است. براساس آخرین آمار، سالانه ۷۰۰ هزار تا یک میلیون نفر به این انگل مبتلا شده و ۲۰تا۳۰ هزار نفر جان خود را از دست می‌دهند. از این رو باید به دنبال راهی برای کنترل این بیماری بود.

ماکروفاژها میزبان لیشمانیا محسوب می‌شوند. ماکروفاژها می توانند با واسطه متابولیتهای سمی اکسیژن شامل آنیون سوپراکسید (O^{-2})، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و نیتریک اکسید (NO)سبب حذف لیشمانیا شوند. در نتیجه ترکیبی که

نویسنده مسئول: سارا صعودی
پست الکترونیک: *soudi@modares.ac.ir*

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

بتواند ماکروفاژها را در مبارزه با این انگل فعال کند، در درمان یا کنترل این بیماری موثر خواهد بود. در این مطالعه از نانوذره کیتوزان به همراه آنتی‌ژن‌های ترشحی-تراوشی انگل لیشمانیا برای القای بهتر پاسخ ایمنی استفاده شده است[۱].

نانوپارتیکل‌ها یا نانوذرات به ترکیب‌هایی با سایز حدود ۱۰۰۰- ۱ نانومتر گفته می‌شود که امروزه در موارد مختلفی استفاده شده و کاربردهای متفاوتی دارند. مزیت خاص این ذرات برای استفاده گسترده به خصوص در پزشکی، اندازه کوچکشان است که به عبور آن‌ها از سدهای بیولوژیکی کمک شایانی می‌کند. این ترکیب‌ها می‌توانند از طریق تعامل با سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی بدن، روی عملکرد سیستم ایمنی تأثیرگذار باشند[۲].

یکی از انواع مهم این نانوذرات که زیست تخریب پذیر نیز است، کیتوزان است[۳و۴]. کیتوزان در وزن‌های ملکولی مختلف وجود دارد و دارای ویژگی‌های مورد توجهی است که به سبب آن می‌تواند کاربردهای زیادی در صنعت و به ویژه انتقال دارو داشته باشد. ذرات کیتوزان می‌توانند به صورت میکروکپسول، میکروسفر و نانوذرات تولید شوند[۵و۶]. کیتوزان از طریق گروه‌های آمین خود در واکنش‌های شیمیایی مختلف شرکت می‌کند[۷]. در واقع استفاده از نانوذرات به عنوان ادجوانت به خصوص کیتوزان برای ارتقای اثر بخشی واکسن‌ها رونق بسیار یافته که سودمندی نیز دارد.

انگل‌ها و محصولات آن‌ها می‌توانند پاسخ ایمنی میزبان و مکانیسم‌های حذف انگل را سرکوب کنند. یکی از این تولیدات، پروتئین‌های انگل است که عملکردهای متنوعی را انجام می‌دهند. از جمله پروتئین‌های انگل لیشمانیا، پروتئین‌های ترشحی- تراوشی هستند که در تمام مراحل چرخه زندگی آزاد شده و نقش حفاظتی و تعدیل‌کنندگی ایمنی را دارند. در واقع این پروتئین‌ها مانع از تخریب انگل توسط سیستم ایمنی خواهند شد[۸]. پروماستیگوتهای گونه‌های مختلف لیشمانیا، انواع متنوعی از پروتئین‌ها را در مراحل مختلف رشد خود درون بدن پشه خاکی یا ماکروفاژهای انسانی و همچنین در محیط In vitro تولید و آزاد می‌کنند.

دیده شده است که برخی از پروتئین‌های ترشحی-تراوشی در لیشمانیا دونووانی، خاصیت اسید فسفاتازی دارند که هم در تهاجم و هم در مقاومت در برابر مکانیسم‌های ایمنی ماکروفاژها، شرکت دارند. حال آن‌که این پروتئین‌های اسید فسفاتازی در لیشمانیا ماژور دیده نمی‌شوند[۹]. پروتئین‌های ترشحی دیگر نیز در نماتودها شناخته شده است که خاصیت استیل کولین استرازی دارند. بر اساس مطالعه‌هایی که روی اثر پروتئین‌های ترشحی-تراوشی نماتودها در ماکروفاژها و به صورت In vitro انجام شده است، مشخص شد که این پروتئین‌ها بیان TLR، تولید IL-12 و TNF-α را در ماکروفاژها کاهش میدهند[۱۰]. پروتئین‌های ترشحی-تراوشی انگل از هر دو مسیر وابسته به شبکه اندوپلاسمی و غیر وابسته به آن، تولید و ترشح می‌شوند[۱۱].

هدف از این پژوهش، بررسی آثار تنظیم ایمنی نانوذره کیتوزان و تاثیر آن بر القای پاسخ ایمنی علیه پروتئین‌های ترشحی-تراوشی انگل و بهبود فعالیت ضد لیشمانیایی ماکروفاژ است. به این منظور، بعد از کشت انگل و جداسازی آنتی‌ژن‌های ترشحی-تراوشی آن، نانوذره کیتوزان با این آنتی‌ژن‌ها همراه شد. برای تعیین محدوده وزن پروتئین و غلظت آن از تست‌های الکتروفورز و برادفورد استفاده شد. برای تایید تشکیل نانوذره از FTIR استفاده شد. بعد از تیمار موش‌های آزمایش شده با گروه‌های آزمون، ماکروفاژهای آن‌ها استخراج شده و از نظر تولید نیتریک اکساید و قابلیت کشندگی انگل ارزیابی شدند. نتایج به دست آمده، سودمندی استفاده از این نانوذرات را در بهبود عملکرد ماکروفاژهای آلوده به انگل نشان می‌دهد.

مواد و روش‌ها:

۱. کشت انگل لیشمانیا ماژور

انگل لیشمانیا ماژور سویه MRHO IR75 ER از بافت طحال موش‌های آلوده به لیشمانیا ماژور جدا شد. این انگل‌ها در محیط NNN در دمای C26 تکثیر شده سپس به محیط RPMI (GIBCO) با FBS 5% منتقل شدند.

پروماستیگوت‌های فاز ایستا پس از سانتریفیوژ در g3000 به مدت ۱۵ دقیقه شمارش شده و برای آلوده سازی ماکروفاژها در in vitro استفاده شدند.

۲. تهیه آنتی‌ژن‌های ترشحی - تراوشی انگل لیشمانیا ماژور

پروماستیگوت‌های فاز ایستا لیشمانیا ماژور، چهار بار با استفاده از محیط RPMI بدون FBS با سانتریفیوژ در دور g3000 به مدت ۱۵ دقیقه، شسته شدند. . سپس به محیط RPMI بدون FBS انتقال داده شدند تا به چگالی نهایی ۱۰۸سلول در هر میلی‌لیتر محیط برسند. بعد از ۲۴ تا ۷۲ ساعت انکوباسیون، انگل‌ها با دور g3000 در دمای چهار درجه برای ۱۵دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی جمع‌آوری شد. برای حذف انگل‌های باقی مانده، مایع رویی از فیلتر ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد. مایع به دست آمده محصولات ترشحی - تراوشی انگل لیشمانیا ماژور خواهند بود. **۳. اولتراسانتریفیوژ**

برای جداسازی پروتئین‌های ترشحی-تراوشی، انگل محیط کشت جمع‌آوری شده و به لوله‌های اولتراسانتریفیوژ منتقل شدند.(اولتراسانتریفیوژ در دور g100000 و دمای ۴ درجه، به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. رسوب حاصل در ml2 محیط RPMI بدون FBS معلق شد و در دمای ۷۰- نگهداری گردید.

۴. الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید (SDS-PAGE)

این تست برای تایید حضور پروتئینهای مورد نظر در مایع رویی فیلتر شده حاصل از کشت انگل انجام شد. ژل استفاد شده با ضخامت mm1 و ۱۲درصد آکریل آمید در بخش Resolving و ۶درصد در بخش Stacking ساخته شد. نمونهها با غلظت مساوی درون چاهکها ریخته شد. در نتیجه الکتروفورز، پروتئینها براساس وزن مولکولی، از یکدیگر جدا شدند. رنگآمیزی ژل و باندها نیز باکوماسی بلو انجام شد. تمام مواد شیمیایی استفاده شده، مربوط به شرکت Merck آلمان است.

۵. تست برادفورد

برای انجام تست برادفورد، مقدار۲۰ میکرولیتر از محلول پروتئین، درون چاهک یک پلیت الایزا ریخته و به آن ۲۰۰ میکرولیتر معرف برادفورد اضافه شد. رنگ حاصل از واکنش در طول موج۵۴۰ نانومتر قرائت شد و با توجه به نمودار استاندارد، مقدار پروتئین موجود در سوپرناتانت محاسبه شد. در این تست از BSA به عنوان استاندارد استفاده شد. نموداری بر اساس غلظت‌های مختلف BSA و جذب آن در واکنش برادفورد با نرم‌افزار Excel رسم شد. مقدار پروتئین براساس معادله این نمودار تعیین شد.

۶. تهیه نانوذره کیتوزان

کیتوزان مشتق قلیایی و داستیله شده کیتین است که از پوسته خارجی سخت پوستان به دست میآید. کیتوزان برعکس کیتین، در محلول‌های اسیدی حل و پروتونیزه می‌شود[۱۲]. برای تهیه نانوذرات کیتوزان حداقل چهار روش گزارش شده است که در اینجا از روش Ionotropic gelation استفاده شد. [۱۳]. براساس مطالعه‌ها، حلال کیتوزان اسید استیک رقیق شده در آب دیونیزه است که به نسبت دو به یک در اسید استیک حل می‌شود. کیتوزان استفاده شده از شرکت Sigma با وزن مولکولی متوسط و درصد داستیلاسیون ۸۵درصد خریداری شد.

۱- اسید استیک رقیق شده با غلظت ۵۴درصد مولار ساخته شد. به این ترتیب که ابتدا ۲۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه را درون ظرف ریخته و به آن ۳۰۰ میکرولیتر اسید استیک خالص اضافه شد. حجم این محلول با آب دیونیزه به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد[۱۴].

۲- محلول کیتوزان با غلظت mg/ml2 ساخته و با مقدار مشخص برای ساخت میزان مورد نیاز از محلول، درون اسید استیک ریخته شد. محلول روی روتیتور (با دور ۱۰۰۰) به مدت دو تا سه ساعت قرار گرفته تا کیتوزان در اسید استیک حل شد.

۳- سپس هر ml5 از این محلول به صورت قطره قطره به ml2 محلول TPP و آب دیونیزه با غلظت mg/ml1 که روی روتیتور قرار گرفته، اضافه شد.

۴- پس از گذشت یک ساعت از حل شدن این دو، محلول مورد نظر با دور g20000 به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و بعد از دور ریختن مایع رویی،

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

نانوذره مورد نظر به صورت ژل سفید رنگی تهنشین شد.

TPP(سدیم تری پلی فسفات) با گروه‌های آمین کیتوزان وارد واکنش شده و سبب ایجاد اتصال عرضی بین کیتوزان و پروتئین میشود.TPP حل شده در آب دیونیزه، یون‌های OH^- و $P_3O_{10}^{-5}$ را ایجاد می‌کند که همزمان در محلول TPP وجود دارند. در pH اولیه، یونهای OH با یون‌های $P_3O_{10}^{-5}$ برای اتصال به گروه‌های NH_3^+ کیتوزان در رقابتند. یون‌های OH^- به دلیل کوچک‌تر بودن، به راحتی به درون کیتوزان نفوذ کرده و لایه رسوبی ایجاد میکنند، در حالی که با اسیدی کردن pH، تنها یونهای $P_3O_{10}^{-5}$ در محیط وجود دارند. بنابراین کیتوزان به راحتی با TPP پیوند عرضی برقرار کرده و یک لایه ژلی تشکیل می‌شود[۱۵]. برای به دست آوردن بهترین حالت در ترکیب کیتوزان و TPP برای تولید نانوذرهای با اندازه مناسب، نسبتهای مختلفی از این دو با هم ترکیب شده و ذرات حاصل از نظر اندازه با هم مقایسه شدند. دیده شد که وقتی کیتوزان به نسبت پنج به دو به TPP اضافه می‌شد، ذرات تشکیل شده مناسب‌ترین اندازه را برای تزریق داشتند.TPP در آب مقطر حل شده و با نسبت گفته شده به محلول کیتوزان-اسیداستیک اضافه شد.

۵- بررسی مورفولوژی نانوذرات تشکیل شده با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) انجام شد.

۷. بررسی اثر سمیت نانوذره کیتوزان بر ماکروفاژهای صفاقی به روش MTT

از تست MTT برای سنجش سمیت نانوذره برای ماکروفاژها استفاده شد. ماکروفاژها به تعداد ۱۰۵ سلول در چاهکهای پلیت ۹۶ خانه ریخته شدند.پس از ۲۴ ساعت، مقادیر مختلفی از نانوذره کیتوزان و آنتیژن ترشحی- تراوشی انگل لیشمانیا به صورت سه‌تایی به ماکروفاژها اضافه شدند. تست MTT در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد.

به این منظور به هرچاهک، ۱۰۰ میکرولیتر محیط بدون FBS و ۱۰میکرولیتر معرف زرد رنگ MTT اضافه شد. بعد از چهار ساعت انکوباسیون، کریستال‌ها در ۱۰۰ میکرولیتر (DMSOSigma-آلمان) حل و سپس OD آن در ۵۴۰ نانومتر توسط میکروپلیت ریدر(Eppendorf,USA) قرائت شد. برای کنترل منفی از ماکروفاژ به تنهایی استفاده شد. در کنترل مثبت نیز، LPS با غلظت‌های مختلف در سه تکرار به ماکروفاژها اضافه شدند. برای بررسی آلوده نبودن نانوذرات با LPS، تست لیموس (LAL Test) با استفاده از کیت خریداری شده از شرکت Sigma انجام شد. نتایج به دست آمده حاکی از نبود آلودگی به LPS در نانوذرات بود.

برای ساخت غلظتهای مختلفی از نانوذره کیتوزان محلول کیتوزان-اسیداستیک با غلظت 2 mg/ml ساخته شد. این محلول به نسبت پنج به دو به TPP با غلظت 1 mg/ml اضافه شد. بعد از سانتریفیوژ و تشکیل ژل مورد نظر، با استفاده از محیط کشت، ژل به صورت محلول درآمده و با محاسبات میزان کیتوزان موجود در آن اندازه گیری و سپس مقدار مناسبی از محلول به هر چاهک اضافه شد.

۸. همراه کردن آنتی‌ژن‌های ترشحی - تراوشی انگل لیشمانیا ماژور با نانوذره کیتوزان

پروتئین‌های مورد نظر با غلظت‌های مختلف در محلول TPP (1mg/ml)حل شده و به صورت قطره قطره به نسبت دو به پنج با محلول کیتوزان (2mg/ml) ترکیب شدند. بعد از گذشت یک ساعت، محلول مورد نظر سانتریفیوژ شده و ژل حاوی نانوذره همراه با آنتی‌ژن ترشحی - تراوشی حاصل شد.

۹. بررسی اتصال نانوذره کیتوزان به وسیله میکروسکوپ الکترونی SEM

نانوذره کیتوزان در حالت متصل به TPP و متصل به پروتئین با میکروسکوپ الکترونی (SEM(Zeiss EM10C 80KW بررسی شدند.

۱۰. بررسی درصد اتصال نانوذره کیتوزان به پروتئین به‌وسیله اسپکتروفوتومتر

اتصال پروتئین به نانوذره کیتوزان در طول موج ۲۸۰ نانومتر بررسی شد. درصد اتصال پروتئین به نانوذره از معادله زیر محاسبه شد که در این معادله A مربوط به OD کل آنتی‌ژن‌های اضافه شده به محلول نانوذره وB نشان دهنده OD آنتی‌ژن‌های متصل نشده در سوپرناتانت محلول آنتی‌ژن و نانوذره بعد از سانتریفیوژ است.

به این ترتیب که از نانوذرات ساخته شده با غلظت‌های متفاوت کیتوزان، به همراه مقداری آب مقطر در دستگاه اسپکتروفوتومتر، OD گرفته شده و در فرمول زیر قرار می‌گیرد. این مقدار نشان دهنده A در رابطه زیر است. بعد از سانتریفیوژ و ته‌نشین شدن نانوذره، از مایع رویی حاصل نیز OD گرفته شده که نشان‌دهنده B یا همان آنتی‌ژن‌های متصل نشده بعد از سانتریفیوژ است.

$$\%Loading = (A-B/A) \times 100$$

۱۱. حساس کردن موش‌های BALB/c و گروه‌های آزمایش

۲۵ سر موش BALB/c ماده ۸-۶ هفته‌ای از انستیتوپاستور کرج خریداری شدند. سپس در اتاق مخصوص حیوانات آزمایشگاهی در دانشگاه تربیت مدرس که ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و درجه حرارت C21 داشت، با دسترسی آسان به آب و غذا نگه‌داری میشدند. موش‌ها به گروه‌های پنج‌تایی از نظر تزریق به شرح زیر تقسیم شدند:

۱) نانوذره کیتوزان

۲)پروتئین‌های ترشحی - تراوشی انگل لیشمانیا همراه با نانوذره کیتوزان

۳)پروتئین‌های ترشحی - تراوشی انگل لیشمانیا

۴)محیط کشت به عنوان کنترل

۵)پروتئین‌های ترشحی-تراوشی انگل لیشمانیا ماژور همراه با ادجوانت کامل فروند

به موش‌های هر گروه در روزهای ۲۱-۱۰-۰ به صورت داخل صفاقی تزریق انجام شد. در نوبت اول مقدار ۱۵ میکروگرم از آنتی‌ژن، در نوبت دوم مقدار هفت میکروگرم و در نوبت سوم پنج میکروگرم از آنتی‌ژن همراه با نانوذره یا ادجوانت تزریق شدند. در تزریق نانوذره به تنهایی نیز مقداری از آن تزریق شد که در مقدار تزریق کونژوگه وجود داشت. در روز ۲۸ نیز ماکروفاژها جداسازی شدند. ادجوانت فروند خود حاوی BCG است. علاوه بر این، از ادجوانت کامل فروند در ارزیابی ایمنی آنتی‌ژن‌ها در موش بیشتر استفاده می‌شود. این ادجوانت به دلیل افزایش بیان MHC در سطح سلول‌های عرضه‌کننده، شناسایی آنتی‌ژن و پاسخ‌دهی به آن را افزایش می‌دهد[۱۶].

۱۲. جداسازی و کشت ماکروفاژهای صفاقی موش‌های BALB/c

بعد از قطع حیات حیوان به روش اخلاقی آتانازی، محیط کشت سرد بدون FBS به صفاق موش تزریق شد. ماکروفاژها به روش لاواژ صفاقی از موش های BALB/cگروه‌های آزمون و کنترل پس از پایان دوره تیمار با آنتی‌ژن، جداسازی شدند. سلول‌ها با دور g1500 به مدت ÷نج دقیقه سانتریفیوژ شدند ودر پلیت ۱۰ سانتی‌متری به مدتچهار ساعت در انکوباتور C۳۷ قرار گرفتند. پس از پایان انکوباسیون، سلول‌های غیرچسبنده از محیط حذف شدند. سلول‌های چسبنده (ماکروفاژها) به تعداد ۴۰۰ هزار سلول درون چاهک‌های پلیت شش‌خانهای کشت شدند. ۱۳. آلوده سازی ماکروفاژها با لیشمانیا ماژور و سنجش نیتریک اکساید

۲۴ ساعت پس از کشت ماکروفاژها، انگل لیشمانیا ماژور به نسبت۱۰ به یک به ماکروفاژها اضافه شد. سوپرناتانت ماکروفاژها پس از ۷۲ ساعت برای سنجش ترشح نیتریک اکساید جمعآوری شد. میزان نیتریک اکساید به روش گریس اندازهگیری و رنگ صورتی حاصل از واکنش نیتریت با معرف گریس، در طول موج ۵۴۰ نانومتر با الایزا ریدر خوانده شد. جذب‌ها براساس منحنی استانداردی که از افزودن معرف گریس به مقادیر مختلف نیتریت سدیم (از دو میکرومول تا ۲۰۰ میکرومول) به دست آمده بود محاسبه شدند. میانگین تولید نیتریت در هر نمونه در نتایج گزارش شد.

۱۴. شمارش انگل‌های آزاد شده از ماکروفاژ

ماکروفاژهای گروه‌های کنترل و آزمون با پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور به نسبت تقریبی یک به ۱۰ در37C و ۵درصد CO^2 به مدت یک ساعت انکوبه شدند. در این مدت ماکروفاژها عمل بلع انگل را انجام دادند. بعد از اتمام زمان

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

انکوباسیون، پلیت با محیط کشت شست‌وشو داده شده تا انگلهای آزاد موجود در محیط حذف شوند. ماکروفاژهای آلوده به انگل به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. سپس ماکروفاژها با محلول ۰،۰۵ درصد SDS در محیط کشت RPMI لیز شدند تا اماستیگوت‌ها به محیط کشت آزاد شوند. محلول رویی جمع‌آوری شد و با محیط کشت واجد ۱۰ درصد FBS در حجم یک میلی‌لیتر به مدت سه روزدر دمای ۲۶ درجه قرار گرفت تا آماستیگوت‌ها به پروماستیگوت تبدیل شوند. ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه زیر میکروسکوپ معکوس قرار گرفته و پروماستیگوت‌ها توسط لام نئوبار شمارش شدند. این آزمایش برای تعیین اثر تیمارهای انجام شده بر توانایی کشندگی ماکروفاژ انجام شد [۱۷–۱۸].

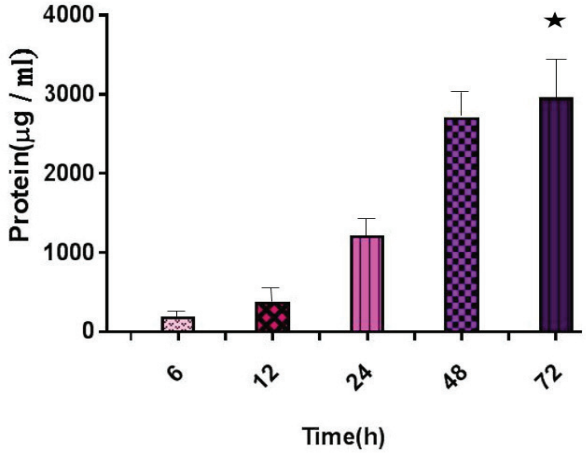
۱۵. آنالیز آماری

تست‌های یک طرفه ANOVAو Tukey، برای تحلیل‌های آماری و بررسی اختلاف‌های بین گروه‌ها استفاده شد(P<0.05). آنالیز آماری نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSSو Prism(GraphPad Software CO, USA) انجام شد.

نتایج:

۱. تست برادفورد

بعد از کشت انگل لیشمانیا، در زمان‌های مختلف، محیط کشت رویی انگل جمع‌آوری شده و میزان پروتئین‌های ترشحی–تراوشی انگل موجود در آن اندازه گرفته شد. براساس نتایج حاصل، میزان تولید این پروتئین در ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از کشت انگل، اختلاف معناداری با مقدار آن در زمان‌های دیگر داشت(0.01P<). در حالی‌که بین زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت اختلاف معناداری دیده نمیشود(0.05P<). بعد از چندین بار کشت انگل و جمع‌آوری سوپرناتانت و جداسازی پروتئین‌ها، در انتها mg24 پروتئین به دست آمد که در مراحل مختلف مورد استفاده قرار گرفت.



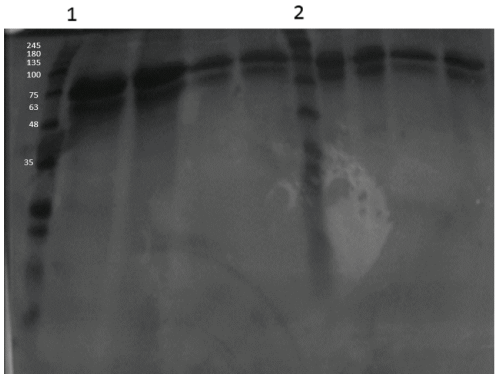
شکل ۱. نمودار مقدار پروتئین موجود در سوپرناتانت کشت انگل لیشمانیا ماژور در زمان‌های مختلف
علامت ستاره اختلاف معنادار با زمان‌های مختلف را نشان می‌دهد(P<0.01)

۲. SDS-PAGE

آنتی‌ژن‌های ترشحی– تراوشی انگل لیشمانیا ماژور مخلوطی از آنتی‌ژن‌ها با وزن مولکولی ۱۱۰–۳۵ کیلودالتون بوده که اکثر پروتئینها وزنی در محدوده ۱۱۰–۷۵ کیلودالتون را دارند. نمونه الگوی استفاده شده، وزنی در محدوده ۲۴۵–۲۵کیلودالتون دارد که در عکس موجود، باندهای جدا شده به خوبی وزن مولکولی آنتی‌ژن‌های ترشحی–تراوشی انگل را در محدوده نام برده نشان می‌دهد.

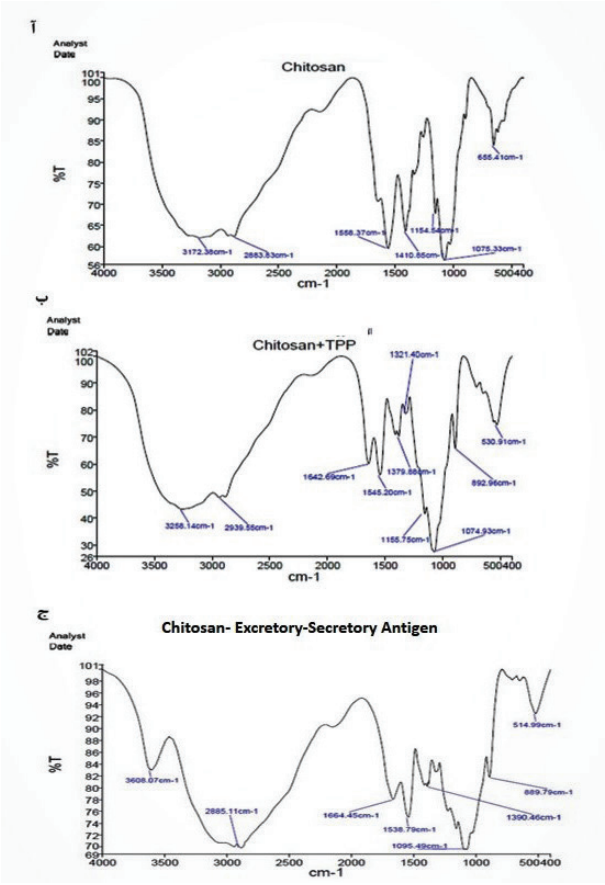
۳. آنالیز FTIR مربوط به کیتوزان

پیک مربوط به کیتوزان از محدوده ۶۰۰۰–۶۰۰ است. در شکل A پیک‌های محدوده ۳۴۰۰– ۳۲۰۰ ترکیبی از پیکهای مربوط به گروه‌های کششی OH و پیوندهای درون مولکولی هیدروژنی هستند. پیک ۱۶۵۴ مربوط به گروه



شکل ۲. تصویر SDS پروتئین‌های جدا شده.
شماره ۱ و ۲ نمونه الگو هستند.

R-CO-NH2 و ۱۰۷۵ مربوط به C-O-C است. در شرایط اسیدی گروه‌های آمین کیتوزان پروتونه شده و میتوانند در ایجاد پیوندهای عرضی با یونهای تری پلی فسفات شرکت کنند. دو پیک۱۵۷۶و ۱۴۱۱ در شکل B مربوط به گروه خمشی +NH4بوده که نشاندهنده تشکیل میان کنش بین گروه‌های فسفات TPP و گروه‌های آمین کیتوزان است. در شکل C پیک ۱۰۹۵ گروه P-O-C و پیک ۱۶۶۷ گروه C=Oمربوط به پروتئین است.



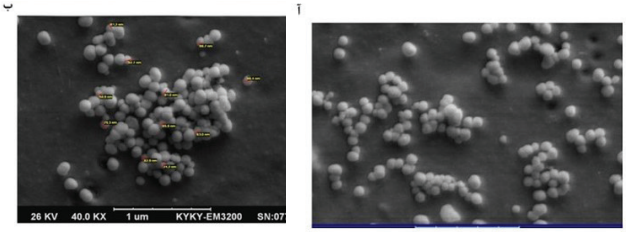
شکل ۳. آنالیز FTIR : آ) نانوذره کیتوزان، ب) کیتوزان+ TPP، ج) کیتوزان همراه شده با آنتی ژن ترشحی–تراوشی

۴. Scanning electron microscopy (SEM)

ذرات کیتوزان بسته به نسبت ترکیب شدن با TPP، اندازه‌هایی متفاوت خواهند داشت. اندازه ذرات کیتوزان دراین مطالعه زیر nm200 است و حالتی کروی دارد.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

همان طور که در شکل‌های زیر مشخص است، اندازه و مورفولوژی نانوذرات کیتوزان قبل و بعد از اتصال به آنتی‌ژن‌های ترشحی – تراوشی، تغییری نکرده است.



شکل ۴. تصویر SEM آ) نانوذه کیتوزان، ب) نانوذره کیتوزان همراه شده با آنتی‌ژن‌های ترشحی-تراوشی

۵. محاسبه درصد اتصال نانوپارتیکل کیتوزان به آنتی‌ژن ترشحی – تراوشی

بعد از ساختن نانوذره با غلظت‌های مختلف، برای تعیین بهترین غلظت در همراهی با پروتئین مورد نظر، میزان OD این غلظت‌ها قبل و بعد از سانتریفیوژ ترکیب نانوذره و پروتئین، با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد که مقادیر زیر به دست آمد. بعد از قرار دادن اعداد به دست آمده در فرمول زیر، بیشترین درصد همراهی پروتئین با نانوذره درصد۷۶ بود که مربوط به غلظت ۲۵۰ µg/ml پروتئین بوده است.

A= 0/483

B= 0/112

%Loading= (A-B/A) ×100= %76

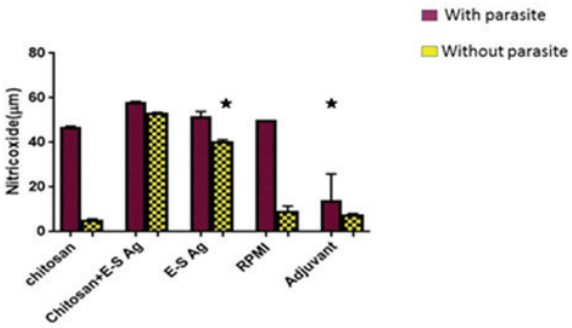
۶. MTT

این تست برای بررسی اثر سمیت نانوذره کیتوزان روی سلول‌های ماکروفاژ انجام شد. ماکروفاژهای موجود در چاهک با غلظتهای مختلفی از نانوذرات و آنتی‌ژن ترشحی – تراوشی انگل لیشمانیا مجاور شدند. (غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰۰ µg/ml). فعالیت سلول‌ها در مدت زمان ۴۸ ساعت بعد از مجاور شدن اندازه‌گیری شد. این تست نشان داد که در این غلظت‌های استفاده شده، بیشتر از ۹۵درصد سلول‌ها زنده هستند.

اختلاف معناداری بین این غلظت‌ها دیده نمی‌شود($p>0.05$).

۷. بررسی میزان تولید NO درماکروفاژهای جداشده از موش‌های حساس شده

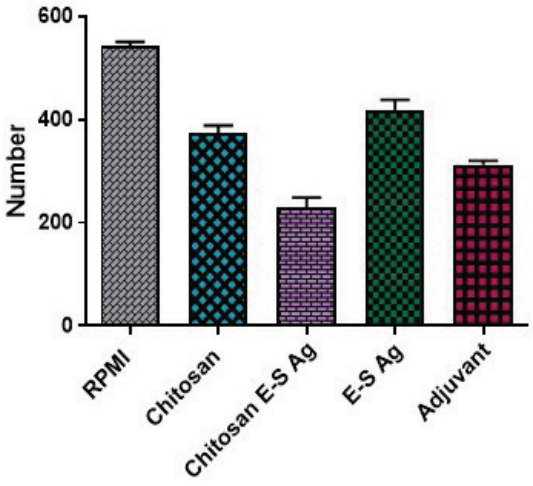
میزان نیتریک اکساید تولید شده در ماکروفاژهای تیمار شده و بدون تیمار با تست گریس اندازه‌گیری شده است. نتایج به دست آمده از این اندازه‌گیری‌ها، در جدول زیر قابل مشاهده است.



شکل۵. میزان تولید NO در گروه‌های مختلف در حضور انگل و عدم حضور آن. علامت ستاره به معنای وجود اختلاف معنادار گروه موردنظر با گروه‌های مشابه است($P<0/01$).

۸. شمارش انگل‌های آزاد شده از ماکروفاژ

همان‌طور که در نمودار زیر مشخص است، تعداد پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در گروه کنترل از همه بیشتر بوده و دارای اختلاف معناداری با تمام گروه‌ها هستند. تعداد انگل‌های آزاد شده در گروه کیتوزان – پروتئین کمتر است. تعداد انگل‌های آزاد شده در گروه پروتئین ترشحی – تراوشی انگل لیشمانیا ماژور نیز از بقیه گروه‌ها بیشتر است.



شکل۷. میزان انگل شمارش شده در هرگروه.

بحث:

این مطالعه برای بررسی اثر نانوذره کیتوزان در تقویت فعالیت ماکروفاژها در از بین بردن انگل لیشمانیا انجام شد. ماکروفاژها سلول‌های اصلی عمل‌کننده علیه انگل لیشمانیا بوده و تقویت فعالیت آن‌ها می‌تواند به از بین بردن انگل و بهبود بیماری منجر شود. انگل لیشمانیا ماژور دارای مکانیسمهای متفاوتی برای فرار از سیستم ایمنی است، علاوه بر آن پاسخ‌های ایمنی ضد آنتی‌ژن‌های انگل لیشمانیا برای ایجاد حفاظت علیه انگل کافی نیست. به همین دلیل برای ایمنی‌زایی بهتر، این آنتی‌ژن‌ها باید همراه با سیستم‌های تقویتی (سیستم‌های همراه) و ادجوانت‌ها در معرض سلول‌های ایمنی بدن قرار گیرند. در واقع نانو و میکرو ذرات به عنوان عوامل محرک سیستم ایمنی نقش مهمی دارند[۱۹]. پروتئین‌های ترشحی-تراوشی انگل لیشمانیا ماژور در تمام مراحل چرخه زندگی آزاد شده و یک نقش حفاظتی و تعدیل‌کنندگی ایمنی را دارا هستند. این پروتئین‌ها مانع از تخریب انگل توسط سیستم ایمنی می‌شوند. پروماستیگوت‌های گونه‌های مختلف لیشمانیا، انواع متنوعی از پروتئین‌ها را در مراحل مختلف رشد خود درون بدن پشه خاکی یا ماکروفاژهای انسانی و همچنین در محیط تولید و آزاد می‌کنند. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ از سوی دکتر مهرانی و همکاران روی این آنتی‌ژن‌ها انجامک شد، مشخص شد این‌ها مخلوطی از پروتئین‌ها با وزن مولکولی ۱۱۰-۳۵ کیلودالتون بوده و می‌توانند به عنوان کاندیدایی برای تولید واکسن علیه لیشمانیا معرفی شوند[۲۰].

همچنین در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۲ از سوی کمار و همکارانش انجام شد، ثابت شد که این پروتئین‌ها توانایی تولید NO درون ماکروفاژ را دارند[۲۱]. پروتئین‌های ترشحی-تراوشی در همه گونه‌های انگل لیشمانیا وجود دارند که از نظر فعالیت با یکدیگر متفاوتند. برای مثال، اکثر این پروتئین‌ها در گونه‌های دیگر به جز لیشمانیا ماژور خاصیت اسید فسفاتازی دارند. در گونههای نماتود نیز نوعی پروتئین ترشحی-تراوشی دیده شده است که خاصیت استیل کولین استرازی دارند. بر همین اساس در این مطالعه تصمیم گرفته شد که از این

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

آنتی ژن‌ها همراه با نانوذرات به عنوان سیستم‌های تقویت کننده برای مقابله با انگل استفاده شود.

کیتوزان دارای خواصی است که آن را برای استفاده در انتقال دارو ممتاز کرده‌است. این ماده ازنظر سم‌شناسی ایمن و زیست سازگار است و تجویز آن در انسان هیچ گونه خطری در بر نخواهد داشت[۲۲]. نانوذرات کیتوزان اندازهای معادل ۲۰۰-۲۰ نانومتر دارد که حتی می‌تواند ذراتی بزرگ‌تر یا کوچک‌تر را نیز ایجاد کنند. این اندازه بستگی به غلظت کیتوزان و TPP به کار رفته در تشکیل نانوذره دارد.

در سال ۲۰۰۴، بیواس بنیتا از نانوذره کیتوزان همراه با DNA آنتی‌ژن‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس برای تقویت پاسخ‌های ایمنی استفاده کرد[۲۳].

در سال ۲۰۰۹ نانوذره کیتوزان به همراه پروتئین ESAT-6 در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس برای بررسی پاسخ‌های ایمنی ناشی از تزریق آن از سوی دکتر تبیانیان استفاده شد. در این مطالعه ثابت شد که نانوذرات همراه با پروتئین از نظر تقویت سیستم ایمنی و پیشبرد پاسخ‌ها به سمت TH1 بهتر عمل کردهاند[۲۴].

در سال ۲۰۱۱ دکتر دانش بحرینی و همکارانش از نانوذره کیتوزان به همراه آنزیم سوپراکسید دسیموتاز انگل لیشمانیا ماژور برای بررسی خاصیت ایمونوژنیسیته آن استفاده کردند. در این مطالعه مشخص شد که کیتوزان میتواند قدرت ایمنی‌زایی آنزیم سوپراکسید دسیموتاز را به وسیله افزایش در اندازه آن و تحریک بهتر سیستم ایمنی به دلیل خاصیت ادجوانیسیت‌های که دارد، افزایش دهد[۲۵].در سال ۲۰۱۳، مطالعهای روی ساخت نانوذره کیتوزان با روش تشکیل ژل و با کمک TPP انجام شد. در این مطالعه، غلظت‌های مختلفی از کیتوزان و TPP، برای تشکیل کارآمدترین نانوذره از نظر انتقال دارو، بررسی شد[۲۶]. در سال ۲۰۱۵، از نانوذرات کیتوزان برای سیستم انتقالی برای ارسال مهارکننده کپسید در درمان HBV استفاده شد[۲۷].در سال ۲۰۱۷، نانوذره کیتوزان کونژوگه شده با پلی اتیلن گلیکول، به عنوان سیستم انتقالی در درمان سرطان استفاده شد[۲۸]. بر همین اساس در این مطالعه تصمیم گرفته شد که از این آنتی‌ژن‌ها همراه با نانوذرات به عنوان سیستم‌های تقویت کننده برای مقابله با انگل استفاده شود.

در مطالعه انجام شده، در پنج گروه پنج تایی، موش‌های BALB/c در روزهای ۰،۱۰،۲۱ با غلظت‌های مختلفی از نانوذره و نانوذره همراه با آنتی ژن حساس شدند. بعد از جداسازی ماکروفاژهای صفاقی در روز ۲۸، مجاورت با انگل انجام و پس از آن میزان تولید نیتریک اکساید در ماکروفاژها، میزان مهار رشد انگل در ماکروفاژهای تیمار شده آلوده نسبت به گروه ماکروفاژ تیمار نشده، اندازه‌گیری شد. در تست MTT غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم از نانوذره آزمایش شد. براساس این تست ثابت شد که نانوذره کیتوزان تا غلظت ۱۰۰ میکروگرم که بیشترین غلظت استفاده شده در تزریق به موش است، خاصیت کشندگی بر سلول‌های ماکروفاژی ندارند. در این بررسی از LPS به عنوان محرک سلول که سبب افزایش متابولیسم سلول‌ها میشود، استفاده شده است. گرچه بررسی‌ها نشان می‌دهند که LPS در مقادیر بالا از راه افزایش TNF-α سبب آپوپتوز در ماکروفاژها می‌شود اما در این پژوهش مقادیر LPS استفاده شده در حد القای آپوپتوز نبوده است. بر این اساس، نتایج ما نشان می‌دهد که نانوذره استفاده شده نه تنها سمی نبوده بلکه فعالیت اکسیداسیون -احیای سلول را در حد تحریک با LPS حفظ کرده است[۲۹].

با توجه به نتایج به دست آمده از تست سنجش نیتریک اکساید، کیتوزان به تنهایی تولید NO را در غیاب انگل نسبت به گروه ماکروفاژ تیمار نشده افزایش نمی‌دهد، ولی در حالت همراهی با آنتی‌ژن باعث افزایش تولید NO میشود و در حضور انگل نیز نقش تقویتی در تولید NO دارد.

آنتی‌ژن‌های ترشحی – تراوشی انگل لیشمانیا ماژور نیز میتوانند سبب القای تولید NO شوند که در مطالعه‌های قبلی این مورد ثابت شده است.

براساس نتایج به دست آمده از این مطالعه، در تست شمارش انگل از ماکروفاژهای تخریبی، بیشترین تعداد انگل مربوط به گروه ماکروفاژ تیمار نشده است. در واقع ماکروفاژ به تنهایی نتوانسته به خوبی رشد و تکثیر انگل را مهار کرده و انگل با تخریب ماکروفاژ از آن خارج شده است. این کار باعث آلوده شدن ماکروفاژهای بیشتر و از بین رفتن آن‌ها میشود. درگروه‌های تیمار شده با کیتوزان تعداد انگل کمتری نسبت به گروه ماکروفاژ تیمار نشده شمارش شد. در واقع کیتوزان ایمنی سلولی علیه انگل را راه اندازی کرده که به افزایش فعالیت سیستم ماکروفاژی حیوان علیه انگل منجر شده است. کیتوزان نوعی ادجوانت محسوب شده که قابلیت تحریک سیستم ایمنی مخاطی و سیستمیک را دارد. علاوه بر این، کیتوزان میتواند باعث القای دست‌های از سایتوکاینها و کموکاینها ازجمله IFN-γ و IL-2 شود[۳۰].

برتری این مطالعه نسبت به موارد مشابه، استفاده همزمان آن از پروتئین‌های ترشحی-تراوشی و نانوذره کیتوزان است که در مطالعات دیگر به چشم نمی‌خورد. این مطالعه به صورت Ex vivo انجام شده است که پیشنهاد می‌شود برای بررسی بهتر اثر آن در بهبود عملکرد ماکروفاژها و در نهایت بهبود زخمهای حاصل از انگل، به صورت In vivo انجام گیرد. همچنین میتوان میزان تولید فاکتورهای دیگر مانند سایتوکاین‌ها را نیز در در پژوهش های بعدی، بررسی نمود.

نتیجه‌گیری:

براساس نتایج به دست آمده از این مطالعه، دیده شد در حالتی که نانوذرات با پروتئین ترشحی – تراوشی انگل لیشمانیا ماژور همراه هستند، عملکرد بهتری نسبت به گروه کنترل از نظر اثر بر ماکروفاژ دارند. میزان تولید NO در گروه‌های تیمار شده با نانوذره همراه با پروتئین، در نبود انگل بیشتر از گروه ماکروفاژ تیمار نشده است. همچنین گروه نانوذره همراه شده با پروتئین در مهار رشد انگل و جلوگیری از تکثیر آن، ، بهتر عمل کرده و رشد انگل را بیشتر کاهش می‌دهند. در واقع کیتوزان به دلیل توانایی در فعال کردن سیستم ایمنی و حمل آنتیژن مورد نظر و آزادسازی آسان آنتی‌ژن درون سلول، امروزه مورد توجه قرار گرفته است. پروتئین‌های ترشحی-تراوشی نیز به عنوان عاملی مهم در بیماریزایی به خصوص در تهاجم انگل به درون سلول و فرار از سیستم ایمنی، شناخته شدهاند. از این‌رو الحاق آن به نانوذراتی مانند کیتوزان سبب در دسترس قرار گرفتن آن‌ها از سوی سلول‌های ایمنی شده و به بهبود بیماری کمک می‌کند.

منابع:

1. Klaus SN, Frankenburg S, Ingber A. Epidemiology of cutaneous leishmaiasis. Clinics in dermatology. 1999;17(3):257-60.

2. Smith DM, Simon JK, Baker JR. Applications of nanotechnology for immunology. Nat Rev Immunol 2013; 13(8): 592-605.

3. Azadi A, Hamidi M, Rouini M-R. Methotrexate-loaded chitosan nanogels as 'Trojan Horses' for drugdelivery to brain. Preparation and in vitro/in vivo characterization, International Journal of Biological Macromolecules pp.2013; 523-530.

4. Rampinoa A, Borgognaa M, Blasi b P, and Bellicha B. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability, International Journal of Pharmaceutics 2013.

5. Bulmera C, Margaritisa A, and Xenocostasb A. Production and characterization of novel chitosan nanoparticles for controlled release of rHu-Erythropoietin, Biochemical Journal, pp. 2012;61-69.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

6. Patel J.K, and Jivani N.P. Chitosan based nanoparticles in Drug Delivery, International journal of pharmaceutical sciences and Nanotechnology, pp.2009; 517-522.
7. Zhao L, Shi L, Zhang Zh. Preparation and application of chitosan nanoparticles and nanofibers, Brazilian Journal of Chemical Engineering, pp. 2011;353-362.
8. Chenik M, Lakhal S, Benkhalef N, Louzir H. Approaches for the identification of potential excreted/secreted proteins of Leishmania major parasites. Parasitology journal. 2006;132:493-509.
9. Lippert DN, Dwyer DM, Li F, Olafson RW. Phosphoglycosylation of a secreted acid phosphatase from Leishmania donovani. Glycobiology. 1999; 9: 627-36.
10. Han C, Yu J, Zhang Z, et all. Immunomodulatory effects of Trichinella spiralis excretory-secretory antigens on macrophages. Experimental Parasitology. 2018.
11. Selkirk ME, Lazari O, Matthews JB. Functional genomics of nematode acetylcholine esterases. Parasitology 131. 2005; Suppl: S3-S18.
12. Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro and nanoparticles in drug delivery. J Control Release 2004;100:5–28.
13. Kamat V, Bodas D, Paknikar K. Chitosan nanoparticles synthesis caught in action using microdroplet reactions. Sci. Rep.2016.
14. Yongmei Xu, Yumin Du. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. International journal of pharmaceutics. 2003;250: 215-226.
۱۵. اصغری م، ابراهیمی سامانی س، سراج ز. بهینه سازی سنتز نانوذرات کیتوزان. زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس. ۱۳۹۲؛۳(۴):۲۱-۲۹.
16. تهمتن ع، براتی م، حسینی شکوه ج، چاراستاد ج. مروری بر انواع ادجوانت های محرک و تقویت کننده سیستم ایمنی و عملکردشان. مجله علوم پیراپزشکی و بهداشت نظامی. ۱۳۹۵؛۱۱(۳).
17. Sadeghi S, Seyed N, Etemadzadeh MH, Abediankenari S, Rafati S, Taheri T In Vitro Infectivity Assessment by Drug Susceptibility Comparison of Recombinant Leishmania major Expressing Enhanced Green Fluorescent Protein or EGFP-Luciferase Fused Genes with Wild-Type Parasite. Korean J Parasitol. 2015 : 53(4): 385–394.
18. Khan MA, Maruno M, Khaskhely NM, Ramzi ST, Hosokawa A, Uezato H, Landires EA, Hashiguchi Y, Nonaka S.Inhibition of intracellular proliferation of Leishmania parasites in vitro and suppression of skin lesion development in BALB/c mice by a novel lipid A analog (ONO-4007). Am J Trop Med Hyg. 2002 Aug;67(2):184-90.
19. Hariharan M, Varghese N, Cherian B, Sreenivasan PV, Paul J, Antony A. Synthesis and characterisation of Ca-Co3 (Calcite) Nano Particles from Cockle Shells using Chitosan as Precursor. Int J Sci Res Publ 2014;4(10):1-5.
20. Mehrani H, Mahmoodzadeh A. Immunological Effects of Leishmania major Secretory and Excretory products on cutaneous Leishmaniasis in BALB/C Mice. Mol Biochem Parasitology 2007; 9-19.
21. Jalaj K. Gour. Identification of TH1-responsive leishmanial excretory – secretory antigens. 2012: 355-361.
22. He P, Davis SS, Illum L. In-vitro evaluation of the muco-adhesive properties of chitosan microspheres. Int J Pharm 1998; 166: 75-88.
23. Bivas-Benita M, van Meijgaarden KE, Franken KL. Pulmonary delivery of chitosan-DNA nanoparticles enhances the immunogenicity of a DNA vaccine encoding HLA-A*0201-restricted T-cell epitopes of Mycobacterium tuberculosis. Vaccine 2004; 22(13–14): 1609 1615.
۲۴. بیانیان م. تولید فیوژن پروتئین HSP70-ESAT۶ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و ارزیابی پاسخ‌های ایمنی متعاقب تجویز آن از طریق بینی. دکترا، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۸۸
25. Danesh-bahreini MA, SHokri J, Samiei A, Kamali-Sarvestani E, Barzegar-jalali M, Mohammadi-samani S. Nanovaccine for leishmaniasis: preparation of chirosan nanoparticles containing leishmanial superoxide dismutase and evaluation of its immunogenicity in BALB/C mice. International kournal of nanomedicine 2011:6 835-842.
26. Rampino A, Borgogna M, Blasi P, et al. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. International Journal of Pharmaceutics. 2013 ;455 :219– 228.
27. Xue M, Hu S, Lu Y, et al. Development of chitosan nanoparticles as drug delivery system for a prototype capsid inhibitor. International Journal of Pharmaceutics. 2015;495:771-782.
28. Sharma A, Kumar U, Madan J, et al. Soluble telmisartan bearing poly (ethylene glycol) conjugated chitosan nanoparticles augmented drug delivery, cytotoxicity, apoptosis and cellular uptake in human cervical cancer cells. Materials Science and Engineering. 2017;72:69-76.
29. Xaus J, Comalada M, Lloberas J, et all. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF-α. Blood .2000; 95:3823-3831.
30. Boonyo W, Junginger HE, Waranuch N, Polnok A, Pitaksuteepong T. Chitosan and trimethyl chitosan chloride (TMC) as adjuvants for inducing immune responses to ovalbumin in mice following nasal administration. J Control Release. 2007; 121(3):168-175.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]