Research on Medicine *Original Article*

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

Study of the Immune Adjuvant Effect of Chitin Microparticles on Plasma Levels of IgG1 and IgG2a during Immunization against Leishmania Infection in BALB/c mice

Mahdieh Azizi[1], Roya Yousefi[1], Farshid Yeganeh[1], Mostafa Haji Molla Hoseini*[1]

Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 2018/10/1 Accept:2018/12/17)

Abstract

Background: *There are reports on the ability of chitin microparticles to modulate the TH1 and TH2 responses, depending on the size and administration route. The purpose of the present study was to investigate the immunoadjuvant effects of the small-sized (less than 40 microns) chitin microparticles (CMP) in vaccination against Leishmania major for preventing leishmaniasis in BALB /c mice by determining IgG1 and IgG2a.*

Methods: *BALB/c mice in test and control groups (6 mice per group), during 21 days were immunized subcutaneously three times with soluble Leishmania antigens (SLA) or SLA/CMP. Three weeks after the last immunization, blood sampling was performed and immunoglobulin isotype was determined using ELISA. Then 2 × 105 L. major promastigotes were injected into the base of the tail of the mice. Next, onset and size of the lesions were measured in each group. In the eighth week, blood samples were obtained from the eye for evaluation of IgG1 and IgG2a level and then the mice were sacrificed and their lymph nodes were isolated to determine the parasitic burden using Limiting dilution assay (LDA).*

Results: *The SLA / CMP-immunized mice in compared to the non-immunization group, the onset of the wound were postponed and the parasitic load [(0.41±3.9 Vs.0.82±5.8 Log (Parasites per lymph node)] (P≤0.05) and the extended area of the wound (P≤0.007) were significantly decreased. The results of the serum IgG1 and IgG2a assay showed that immunization by chitin microparticles caused significant decrease in the serum IgG1 level before (P≤0.001) and after (P≤0.014) the challenge but not IgG2a.*

Conclusion: *Co-administration of CMP/SLA cause significant inhibition of IgG1 responses. It seems that CMP could downregulate unbridled TH2 response in Leishmania infection.*

Keywords: *Chitin microparticles; Leishmania major; Immunoadjuvant*

**Correspondinauthor:Mostafa Haji Molla Hoseini*
Email:hajimolahoseini@yahoo.com

[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، ۱۹۸، صفحات ٦٤ تا ٧٠

بررسی تاثیر ایمونوادجوانتی میکروپارتیکل‌های کیتین بر میزان IgG1 و IgG2a سرمی در ایمونیزاسیون موش‌های BALB/c علیه عفونت لیشمانیا ماژور

مهدیه عزیزی، رویا یوسفی، فرشید یگانه، مصطفی حاجی ملاحسینی*

گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۷/۰۹ تاریخ پذیرش مقاله:۱۳۹۷/۰۹/۲۶

چکیده:

سابقه‌وهدف: گزارش‌هایی درباره قابلیت میکروپارتیکل‌های کیتین در تعدیل پاسخ‌های *TH1* و *TH2* با توجه به اندازه ذرات و مسیر تجویز آن وجود دارد. هدف از انجام این مطالعه بررسی آثار ایمونوادجوانتی میکروپارتیکل‌های کیتین با اندازه کمتر از ۴۰ میکرون به عنوان ادجوانت در واکسیناسیون علیه لیشمانیا ماژور برای پیشگیری از بیماری لیشمانیازیس در موش‌های *BALB/c* با سنجش *IgG1* (نماد *TH2*) و *IgG2a* (نماد *TH1*) بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی گروه‌های مختلف اعم از تست و گواه که هر گروه شامل شش سر از موش‌های *BALB/c* بود، به شیوه زیر جلدی سه مرتبه با فاصله ۲۱ روز با لایزیت انگل یا مخلوط لایزیت و میکروپارتیکل کیتین ایمونیزه شدند. سه هفته بعد از آخرین ایمونیزاسیون، بررسی نتیجه ایمونیزاسیون و تعیین ایزوتایپ ایمونوگلوبولینی با استفاده از خون‌گیری از چشم و آزمایش الایزا انجام شد، سپس تعداد 2×10^5 پروماستیگوت فاز ایستایی انگل به قاعده دم موش‌ها تزریق شد و بعد در مدت هشت هفته زمان بروز زخم و وسعت آن تحت نظر قرار گرفته شد. در پایان هفته هشتم مجدد خون‌گیری از چشم برای سنجش *IgG1* و *IgG2a* انجام شد، سپس موش‌ها قرباني شدند و غدد لمفاوي آن‌ها جهت تعیین بار انگلي به روش میکروتیتراسیون (*LDA*) جدا شد.

یافته‌ها: در موش‌های گروه ایمونیزه شده با لایزیت انگل و میکروپارتیکل‌های کیتین در مقایسه با گروه غیرایمونیزه زمان شروع زخم پس از چالش با انگل به تعویق افتاده بود و همچنین وسعت زخم ایجاد شده *(P≤0.007)* و میزان بار انگلی *(P≤0.05)* *[(Log(Parasites per lymph node (3.9±0.41 Vs.5.8±0.82)]* به صورت معناداری کاهش یافته بود. نتیجه سنجش *IgG1* و *IgG2a* سرمی نشان داد که ایمونیزاسیون با میکروپارتیکل‌های کیتین زمینه ساز کاهش معنادار سطح سرمی *IgG1* قبل *(P≤0.001)* و بعد *(P≤0.014)* از چالش شده ولی بر میزان سرمی *IgG2a* اثرگذار نبوده است.

نتیجه‌گیری: در ایمونیزاسیون با میکروپارتیکل‌های کیتین به همراه لایزیت انگل پاسخ‌های *IgG1* به صورت معنادار مهار شده بود، به این سبب به نظر می‌رسد میکروپارتیکل‌های کیتین قادر به فروتنظیمی پاسخ‌های آسیب‌زای *TH2* ایجاد شده در عفونت لیشمانیا هستند.

واژگان کلیدی: میکروپارتیکل‌های کیتین، لیشمانیا ماژور، ادجوانت

مقدمه:

تولید واکسن موثر با هزینه پایین، یکی از اولویتهای سازمان بهداشت جهانی است. علاوه بر آنتی‌ژن حفاظتی که جزو اصلی واکسن است، ادجوانتها همواره یکی از اجزای مهم در فرمولاسیون واکسن محسوب می‌شوند. نزدیک به یک قرن، توسعه ادجوانتهایی که قابلیت مصارف انسانی داشته باشند، پیشرفت چندانی نداشته و همچنان آلوم شناخته شده‌ترین ادجوانتی است که برای مصارف انسانی از سویت موسسه غذا و داروی آمریکا (FDA) تایید شده است. بنابراین ابداع واکسن‌های جدید، همچنان که نیازمند شناخت آنتی‌ژن‌های حفاظتی است، به توسعه ادجوانتها نیز وابسته است(۱).

در حال حاضر عفونت انگل لیشمانیا معضلی برای بهداشت جهانی محسوب میشود و به ویژه نوع جلدی آن در برخی از نقاط کشور ما شایع است. متاسفانه با وجود تلاش‌های بسیار، در حال حاضر واکسن موثر پیشگیری کننده‌ای نیز برای این

نویسنده مسئول: مصطفی حاجی ملاحسینی
پست الکترونیک: *m.mollahoseini@sbmu.ac.ir* *hajimolahoseini@yahoo.com*

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

بیماری وجود ندارد که برخی مطالعه‌ها مطرح کرده‌اند، نبود واکسن مناسب علیه لیشمانیازیس به دلیل نبود ادجوانت مناسب است(۲). اولین واکسن لیشمانیازیس که شامل کل انگل کشته شده بود به فازIII کارآزمایی بالینی راه یافت اما اثر بخشی چندانی طی استفاده از آن مشاهده نشد(۳). در مطالعه‌های بعدی مشخص شد حضور یک ادجوانت می‌تواند اثر بخشی واکسن را بهبود بخشد و BCG اولین ادجوانتی بود که به همراه واکسن اولیه لیشمانیازیس استفاده شد(۴). ترکیب ادجوانت آلوم و انگل کشته شده به همراه BCG برای پیشگیری از بیماری لیشمانیا به فاز I و II کارآزمایی بالینی رسیده است اما اثر بخشی و ایمن بودن آن به طور قطعی تایید نشده است و دارای محدودیت هایی است(۵). کیتین هوموپلی ساکاریدی متشکل از واحدهای بتا-۱-۴-ان استیل گلوکز آمین است و بعد از سلولز فراوان ترین بیوپلیمر موجود در طبیعت است و به دلیل دارا بودن ویژگی‌هایی از جمله؛ زیست تجزیه‌پذیری، سازگاری زیستی و نبود سمیت، کاربردهای فراوانی در پزشکی و بیوتکنولوژی پیدا کرده است و دارای آثار ضد التهاب، ضد انعقاد، ضد توموری و آنتی اکسیدانی است. مطالعه‌های انجام شده در زمینه علم ایمونولوژی، حاکی از تاثیر مواد کیتینی بر سیستم ایمنی است. این مطالعه‌ها نشان داده‌اند که کیتین در ساختمان بدن پستانداران وجود ندارد و با توجه به سایز(۹-۷) درصد خلوص(۱۰)، دوز و غلظتی (۱۱)که استفاده می‌شود به عنوان PAMPs سبب فعال شدن سیستم ایمنی شده و توسط گیرنده‌های شناساگر الگو ایمنی ذاتی در سلول‌های میلوئیدی از جمله؛ Mannose ، Dectin1، Toll Like Receptor، NKR-P1، FIBCD1 و RegIIIc Receptor شناسایی می‌شود(۱۲). از این رو کیتین به عنوان ادجوانت چند وجهی معروف شده است که میتوان در پاسخهای ایمنی از آن بهره برد. با توجه به نقش میکروپارتیکل‌های کیتینی کمتر از ۴۰ میکرون در تقویت پاسخ‌های TH1 با تحریک ترشح IL-12، TNFα و IL-18 از ماکروفاژها و القای تولید IFNγ از سلول‌های NK و TH1 (۱۳) و کاهش پاسخ های TH2 با مهار تولید IL-4 و IL-5، به انضمام القای تولید IL-10 به نظر می‌رسد این میکروپارتیکل‌ها علاوه بر توانایی القای پاسخهای ایمنی نوع یک از پاسخهای افسار گسیخته سیستم ایمنی نیز جلوگیری می‌کنند. مطالعه‌های اخیر ما نشان دادهاند میکروپارتیکلهای کیتین با اندازه کمتر از ۴۰ میکرون می‌توانند در شرایط آزمایشگاهی پاسخ‌های ضد لیشمانیایی ماکروفاژهای صفاقی موش علیه لیشمانیا را تشدید کنند(۱۴) و سبب افزایش پاسخهای TH1 توام با تولید IL-10 و بهبود زخمهای لیشمانیازیس جلدی در موشهای BALB/c آلوده به انگل لیشمانیا ماژور شوند(۱۵،۱۶) و همچنین قادر به القای ترشح سایتوکاینهای IFNγ،TNFα و IL-10 از سوسپانسیون سلولی غدد لنفی موشهای آلوده به انگل لیشمانیا هستند(۱۶). از طرفی برخی از مطالعه‌ها گزارش کرده‌اند که سایتوکاین‌های مرتبط با TH1/TH2 ایزوتایپ ایمونوگلوبینی را که در پاسخ به میکروارگانیسم‌ها القا می‌شوند؛ کنترل می‌کنند(۱۷)، بنابراین در مدل‌های موشی نیز سنجش میزان IgG1(نماد TH2 (۱۸)) و IgG2a (نماد TH1 (۱۹)) می‌تواند نشان‌دهنده نوع پاسخ ایمونولوژیک ایجاد شده و موثر بودن درمان و یا واکسن باشد(۲۰،۲۱). به طور کلی هدف از انجام تحقیق حاضر بررسی آثار ایمونوادجوانتی میکروپارتیکلهای کیتین در واکسیناسیون علیه بیماری لیشمانیازیس با تعیین ایزوتایپ آنتی بادی بود.

مواد وروش‌ها:

تحقیق به روش تجربی انجام شد. جمعیت مورد مطالعه، موش‌های BALB/c ماده با سن چهار تا شش هفته بودند که پس از خریداری از انستیتوپاستور کرج و سازگاری با مکان نگه‌داری، در شرایط نوری ۱۲ ساعت نور، ۱۲ ساعت تاریکی در درجه حرارت ۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت مناسب، درحالی که امکان دسترسی به آب و غذا برای آن‌ها فراهم بود، در اتاق حیوانات گروه ایمونولوژی نگه‌داری شدند و تمام آزمایش‌ها براساس مصوبه شورای نگه‌داری از حیوانات دانشگاه شهید بهشتی تهران انجام شده‌اند.

تهیه لایزیت انگل (Soluble Leishmania Antigen):

ابتدا سوسپانسیون حاوی انگل‌هایی که در فاز عفونت‌زایی قرار داشتند (مرحله ایستایی) سه بار همراه با PBS+5mM EDTA استریل (چهار درجه سانتی‌گراد ، pH=7.4) در دور rcf ۴۰۰ به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد شست‌وشو داده شد. بعد از آخرین مرحله شست‌وشو، مایع رویی دور ریخته شد، یک میلی‌لیتر از PBS+5mM EDTA سرد و استریل روی پلت ریخته و به کرایوتیوپ انتقال داده شد. در مرحله بعد برای تهیه انگل کشته شده حدود ده بار از ذوب (دمای اتاق) و انجمادهای (تانک ازت) متوالی استفاده شد. بعد از فرآیند ذوب و فریز محتویات کرایوتیوپ به میکروتیوپ منتقل و از آن لام گرفته شد و از لحاظ میکروسکوپی، سوسپانسیون بررسی شد و عدم حضور انگل زنده یا پیکره کامل انگل تایید شد که تاییدی بر کشته شدن کامل انگل بود. بعد از این مرحله سوسپانسیون سه بار به مدت ۲۰ ثانیه سونیکه شد و سپس میکروتیوپ به مدت ۱۵ دقیقه در دور rpm ۱۲۰۰۰ و دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و در نهایت پس از سانتریفیوژ در زیر هود بیولوژیک، مایع رویی میکروتیوپ که حاوی پروتئین‌های محلول انگل بود با کمک سرنگ برداشته شد و با رد کردن از فیلترهای ۰،۲۲ میکرون استریل شد. تعیین غلظت لایزیت به روش برادفورد انجام شد(۲۲) و لایزیت انگل به دست آمده در حجم‌های مورد نظر تقسیم شد و به فریزر ۲۰- و یا ۷۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

تهیه میکروپارتیکل‌های با سایز کمتر از ۴۰ میکرون کیتین:

از پودر کیتین(C-7170, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) یک سوسپانسیون ۱۰ mg/ml در آب مقطر تهیه شد. سوسپانسیون تهیه شده به مدت دو ساعت با سونیکاتور، سونیکه شد(دامنه نوسان دستگاه روی ۹۰ درصد و دوره گردش آن روی یک تنظیم شود). سپس سوسپانسیون سونیکه شده به ترتیب از سه مش ۱۰۰-۷۰ و ۴۰ میکرونی عبور داده شد. بعد از این مرحله سوسپانسیون حاوی ذرات کیتین زیر ۴۰ میکرون با دور rcf 3000 سانتریفیوژ شده و محلول رویی تا حد امکان خارج شد(۲۳). برای حذف LPS از میکروپارتیکل‌های کیتین از محلول NaOH 0.1% استفاده شد. سوسپانسیون حاوی میکروپارتیکل‌های کیتین در دور rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی دور ریخته شد، سپس کیتین رسوب کرده دو مرتبه با الکل ۷۰درصد شست‌وشو داده شد. بعد از این مرحله کیتین با NaOH 0.1% سانتریفیوژ شد و پس از خارج کردن کامل محلول رویی، رسوب به دست آمده در دمای ۴۰ تا ۵۰ درجه سانتی گراد در داخل فور خشک شد. سوسپانسیونی با غلظت 2 mg/ml برای بررسی اندازه ذرات کیتین تهیه شد و با اعمال ضریب شکست کیتین (معادل ۱،۵۲۳ است(۲۴)) اندازه میکروپارتیکل های کیتین به روش بهره‌گیری از لیزر(Malvern Master Sizer, Malvern Instruments, Ltd., Worcestershire, UK) تعیین شد و برای اطمینان از نبود آلودگی به LPS سوسپانسیون کیتین از تست LAL طبق دستور العمل کیت (Cambrex, USA) استفاده شد. پس از اطمینان از اندازه ذرات (متوسط اندازه ذرات ۳۵/۷۷ میکرون) پودر حاصل وزن شده و از آن سوسپانسیونی با غلظت مورد نظر در آب مقطر استریل (آب فاقد LPS) تهیه شد. سپس سوسپانسیون حاصل در کرایوتیوپ تقسیم شده و اتوکلاو شد و در نهایت در حجم‌های مشخص به فریزر ۲۰- انتقال داده شد.

ایمونیزاسیون و چالش

برای انجام فرآیند واکسیناسیون موش‌ها به صورت تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند، که هر گروه شامل شش سر موش بود.

۱) موش‌های گروه اول به عنوان گروه کنترل تنها برای داشتن استرس ناشی از تزریق، ۱۰۰ میکرولیتر PBS استریل دریافت کردند.

۲) موش‌های گروه دوم ۱۰۰ میکروگرم در۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن محلول انگل(SLA) را بدون ادجوانت به عنوان واکسن دریافت کردند.

۳) موش‌های گروه سوم ۱۰۰ میکروگرم در۱۰۰ میکرولیتر از میکروپارتیکل‌های کیتین با اندازه کمتر از ۴۰ میکرون (ادجوانت مورد مطالعه) را دریافت کردند.

۴) موش‌های گروه چهارم ۱۰۰ میکروگرم در ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن محلول انگل (SLA) را به همراه ۱۰۰ میکروگرم در ۱۰۰ میکرولیتر از میکروپارتیکل‌های کیتین (ادجوانت مورد مطالعه) به عنوان واکسن دریافت کردند.

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

ایمونیزاسیون در سه مرحله با فواصل زمانی سه هفته اجرا شد و تزریق‌ها به صورت زیر جلدی (SC) در قاعده دم موش‌ها انجام شد. سه هفته بعد از آخرین ایمونیزاسیون خون‌گیری از چشم موش‌ها برای بررسی ایمونیزه شدن آن‌ها در پاسخ به واکسیناسیون و بررسی ایزوتایپ ایمونوگلوبولینی انجام شد و میزان IgG total ضد آنتی‌ژن لیشمانیا، IgG1 و IgG2a در سرم آن‌ها سنجیده شد. بعد از این مرحله برای چالش ۲×۱۰^{۵} پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور سویه (MRHO/IR/75/ER) که در فاز ایستایی قرار داشتند به صورت زیر جلدی در قاعده دم موش‌های هر چهار گروه تزریق شد و سپس گروه‌ها به مدت هشت هفته از نظر بروز زخم بررسی شدند که بعد از آشکار شدن زخم در موش‌ها اندازه زخم‌ها هر هفته با کولیس ورنه اندازه‌گیری شد، در پایان هفته هشتم مجدد خون‌گیری از چشم برای بررسی میزان IgG1 وIgG2a سرمی انجام شد و موش‌ها با روش استفاده از CO2 قربانی شدند؛ سپس غدد لنفاوی آن‌ها برای بررسی بار انگلی جدا شد.

تایید ایمونیزاسیون و بررسی میزان IgG1 و IgG2a

برای تایید ایمونیزاسیون سنجش کیفی حضور IgG توتال علیه لایزیت انگل به روش الایزا در حضور کنترل مثبت و منفی انجام شد. به اختصار اینکه ابتدا پلیت الایزا (SPL life science ,Korea) با ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن‌های محلول انگل لیشمانیا (SLA) در غلظت 10 *µg/ml* کوت شد. پس از بلاک کردن ۱۰۰ میکرولیتر نمونه سرم با رقت یک به ۱۰۰ به هر چاهک اضافه شد و بعد از پایان زمان انکوباسیون و شستوشو آنزیم کونژوگه پراکسیداز (HRP-conjugated goat anti-mouse secondary antibody, sigma,USA)با یک به ۲۰هزار ریخته شد و در نهایت از سوبسترا TMB (pishtazteb, Iran) استفاده و خوانش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از الایزا ریدر (Anthos, Austria)انجام شد. در قیاس با نمونه کنترل مثبت (سرم موش آلوده) و کنترل منفی (سرم موش غیرآلوده) نمونه‌های ایمونیزه مشخص شدند. برای سنجش IgG1 و IgG2a از کیت‌های تجاری Mouse IgG1 ELISA Redy-SET (Go,eBioscience,Austria) مطابق دستورالعمل کیت استفاده شد. حساسیت این کیت‌ها به ترتیب ۳/۱۳ و ۳/۹۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر بود.

سنجش بار انگلی

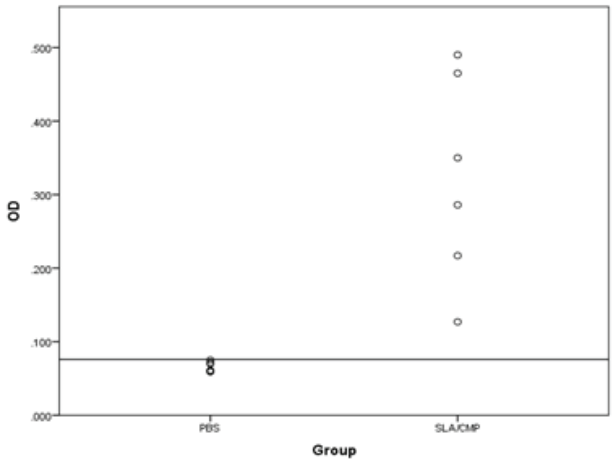
تعیین بار انگلی به روش تهیه رقت‌های متوالی مطابق با گزارش قبلی ما انجام شد(۱۵)، به اختصار اینکه موش‌های مورد مطالعه در پایان هفته هشتم پس از چالش قربانی شدند، غدد لمفی اینگوئینال (به دلیل تزریق در قاعده دم) آن‌ها در شرایط استریل خارج شد و از آن‌ها سوسپانسیون سلولی تهیه شد. تعداد سلول‌های زنده برحسب $n\times10^{6}$ cell/ml مشخص و حجم سوسپانسیون سلولی با استفاده از محیط کشت سلولی به دو میلی‌لیتر رسانده شد و به داخل یک میکروتیوب 2ml منتقل شد. سپس رقیق سازی ۱۰ برابری (10-Fold) سوسپانسیون سلولی هر یک از موش‌ها به طور جداگانه در ۱۲ میکروتیوب به ترتیب انجام شد و پلیت ۹۶ خانه برای توزیع هشت تکرار از هریک از رقت‌ها استفاده شد؛ به این ترتیب میزان۲۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون به صورت هشت تایی به هر پلیت اضافه شد، به طوری که هر ستون در پلیت مربوط به یک رقت بود. بعد از ریختن سوسپانسیون در چاهکها، در پلیت را بسته، اطراف آن را پارافیلم کشیده و در داخل انکوباتور ۲۴ درجه، به مدت حداکثر هفت روز نگهداری کرده و بعد از گذشت سه روز پلیت برای کنترل از انکوباتور خارج شد و زیر میکروسکوپ معکوس ازنظر حضور پروماستیگوت‌های زنده انگل و همچنین آلودگی بررسی شد. پس ازهفت روز پلیت برای ثبت اطلاعات بازبینی شد و آنالیز نتایج با LDA نرم افزار انجام شد. (۲۵)

روش تجزیه و تحلیل آماری:

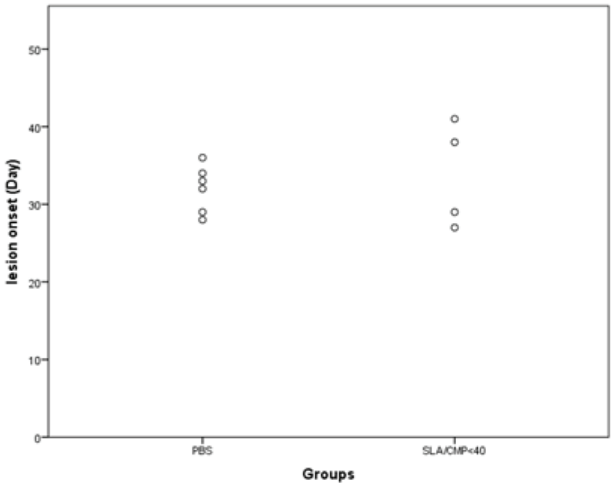
برای انجام محاسبه‌های آماری و رسم نمودارها از نرم‌افزار Graph pad prism 7.04 و SPSS 21 استفاده شد. ابتدا برای تعیین نرمال و غیرنرمال بودن نمونه از نظر متغیر مورد نظر از آزمون Shapiro-Wilk به عنوان آزمون آماری مناسب استفاده شد. سپس برای مقایسه بار انگلی، زمان شروع زخم، قطر زخم و میزان IgG1 و IgG2a بین دو گروه در یافت کننده SLA/CMP و گروه کنترل از آزمون آماری Mann-Whitnet U استفاده شد و P- Value ≤0.05 مبنای معناداری آماری در نظر گرفته شد.

نتایج:

۱-۳) نتایج بررسی شروع زخم، قطر زخم و بار انگلی در دو گروه تست و گواه بعد از انجام آخرین ایمونیزاسیون خون‌گیری از چشم موش‌ها انجام شد و میزان IgG Total اختصاصی آنتی‌ژن انگل در آن‌ها سنجیده شد و مشاهده شد که گروه‌های مختلف با تولید IgG اختصاصی در مقابل SLA تزریقی هنگام ایمونیزاسیون ایمونیزه شده‌اند، در صورتی که گروه PBS که آنتی‌ژنی را دریافت نکرده است، آنتی‌بادی اختصاصی ضد آنتی‌ژن انگل تولید نکرده است(نمودار ۱-۳ الف). بعد از مرحله چالش موش‌های گروه‌های مختلف از نظر زمان بروز زخم به صورت روزانه کنترل شدند. میانگین روزهای شروع زخم در گروه‌های مختلف با هم متفاوت بود اما ارتباط آماری معناداری بین آن‌ها یافت نشد(P≤0.24). مقایسه نتایج گروه تست (SLA/CMP<40µm) در مقایسه با گروه شاهد غیر ایمونیزه(PBS) در نمودار ۱-۳ ب به تصویر کشیده شده است.



نمودار ۱-۳ الف: میزان IgG Total ضد انگل لیشمانیا تولید شده در موش‌های مورد مطالعه: موش‌های گروه تست پس از دریافت لایزیت انگل لیشمانیا در مقابل این انگل با تولید IgG اختصاصی ایمونیزه شده‌اند.

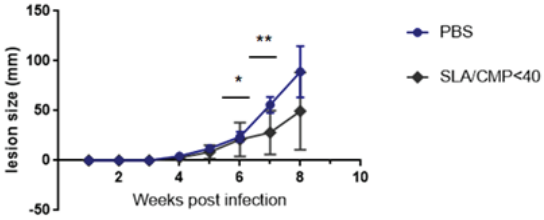


نمودار ۱-۳ ب: زمان شروع زخم در گروه‌های مختلف: شروع زخم در موش‌های گروه ایمونیزه شده در مقایسه با گروه غیرایمونیزه دیرتر آغاز شده است، در دو موش از گروه ایمونیزه شده زخمی ایجاد نشده بود.

اندازه‌گیری سایز زخم بعد از بروز زخم به صورت هفتگی انجام شد. در تعدادی از

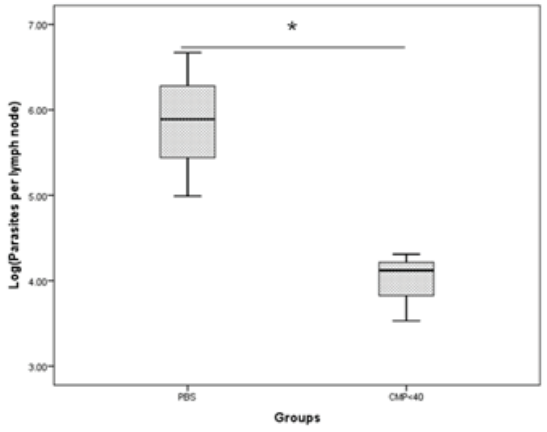
[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

موش‌های گروه تست تا پایان هفته هشتم زخمی ایجاد نشد. به گونه‌ای که نسبت زخم به نبود زخم در گروه تست چهار به دو ولی در گروه کنترل غیر ایمونیزه در هر شش سر موش زخم ایجاد شده بود. سایز زخم موش‌های گروه‌های مختلف (بدون در نظر گرفتن موش‌هایی که در آن‌ها زخم ایجاد نشده بود) در پایان هر هفته با هم مقایسه شد که در پایان هفته شش($P\leq0.045$) و هفته هفت ($P\leq0.007$)از لحاظ آماری تفاوت در بین گروه‌های تست و گواه دیده شد. نمودار ۱-۳ ج تفاوت قطر زخم در گروه تست و گواه را نشان می‌دهد.



نمودار۱-۳ ج: اندازه قطر زخم بعد از چالش به همراه انگل لیشمانیا ماژور در گروه‌های مورد مطالعه: بعد از انجام مرحله چالش میانگین قطر زخم در موش‌های گروه‌های تست و گواه پس از بروز زخم، به مدت هشت هفته اندازه‌گیری شد.

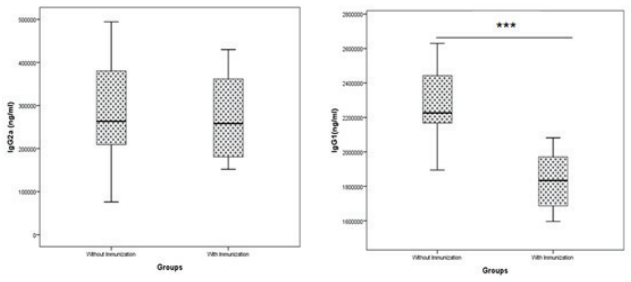
نتایج سنجش بار انگلی نشان داد که میزان بار انگلی در موش‌های گروه‌های دریافت‌کننده SLA/CMP نسبت به سایر گروه‌ها از جمله گروه گواه کاهش معناداری داشته است. در سلول‌های غده لمفی موش‌های گروه SLA/CMP میانگین بار انگلی معادل [3.9±0.41 Log(Parasites per lymph node)] بود که در مقایسه با میانگین بارانگلی در گروه [5.8±0.82 Log(Parasites per lymph node)] PBS، ارتباط آماری معناداری ($P\leq0.05$) را نشان داد (تصویر ۱-۳ د).



نمودار ۱-۳ د: اندازه بار انگلی در موش‌های گروه‌های مختلف: میانگین بار انگلی در سلول‌های غده لمفی موش‌های گروه ایمونیزه SLA/CMP در مقایسه با گروه غیر ایمونیزه کاهش یافته است و از نظر آماری معنادار است ($P\leq0.05$).

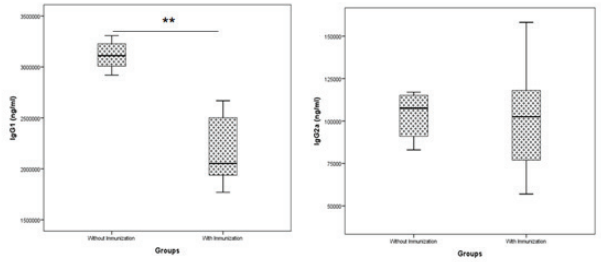
۲-۳) مقایسه میزان سرمی IgG1 و IgG2a در گروه‌های تست و گواه

پس از ایمونیزاسیون در مرحله قبل از چالش با انگل مقدار IgG2a سرمی) نماد الگوی پاسخ (TH1 در گروه ایمونیزه با غیر ایمونیزه تفاوت آماری و کلینیکی نداشت (۲۹۷±۳۷ میکروگرم در میلی‌لیتر در گروه واکسینه نشده در مقابل ۲۶۹±۲۸ درگروه واکسینه)، اما در مقدار سرمی IgG1 (نماد پاسخ TH2) کاهش معنادار ($P\leq0.001$) در گروه واکسینه دیده شد(نمودار ۲-۳الف).



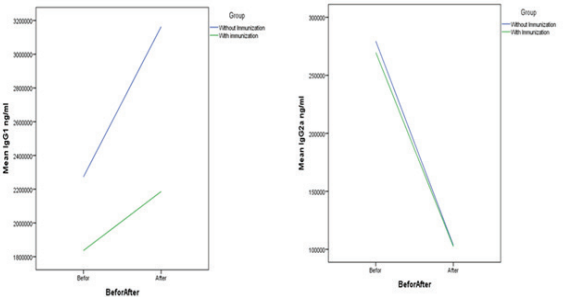
نمودار۲-۳الف : مقادیر سرمی IgG1 و IgG2a موش‌های BALB/c در گروه‌های تست و گواه . در گروه کنترل که شامل موش‌های ایمونیزه نشده بود نسبت IgG1/ IgG2a معادل ۷/۶۲ برآورد شد در حالی‌که در گروه واکسینه این نسبت به ۶/۸۰ تقلیل یافته بود.

پس از گذشت هشت هفته ازعفونت انگل لیشمانیا مشاهده شد که موش‌های ایمونیزه شده به صورت معناداری ($P\leq0.014$) میزان کمتری IgG1 سرمی دارند و گرایش به پاسخ TH2 مهار شده بود؛ اگرچه پاسخ TH1 تقویت نشده بود و میزان IgG2a در گروه تست و گواه تفاوت معنادار نداشتند(نمودار۲-۳ب).



نمودار۲-۳ب : مقایسه مقادیر سرمی IgG1 و IgG2a موش‌های آلوده واکسینه و غیر واکسینه. درموش‌های ایمونیزه شده مقدار IgG1 در هفته هشتم پس از عفونت به طور متوسط۲۱۸۶±۱۷۱میکروگرم در میلی‌لیتر بود حال آنکه در موش‌های فاقد مصونیت ۳۱۶۳±۶۵برآورد شد($P\leq0.014$). از نظر مقادیر سرمی IgG2a تفاوتی در موش‌های تست وکنترل دیده نشد ((X±SE)

مقایسه IgG1 و IgG2a در گروه‌های تست و شاهد قبل و بعد از چالش در نمودار ۲-۳ج به تصویر کشیده شده است و نشان می‌دهد که علاوه بر اینکه موش‌های ایمونیزه شده پیش از عفونت پاسخ‌های TH2 ضعیف‌تری دارند پس از چالش هم روند سیر صعودی افزایش IgG1 نسبت به گروه کنترل کمتر بوده است اما از نظر وضعیت پاسخ TH1 قبل و بعد از چالش تفاوتی در گروه‌های تست و کنترل وجود ندارد؛ به این معنا که عفونت در هر دو گروه زمینه‌ساز افول پاسخ‌های TH1 شده است.



نمودار۲-۳ج.مقایسه روند پاسخ‌های مولد IgG1 و IgG2a در موش‌های ایمونیزه و غیر ایمونیزه پس از عفونت با انگل لیشمانیا: ایمونیزاسیون مانع از روند صعودی پاسخ‌های مولد IgG1 (نماد TH2) می‌شود، ولی باعث گرایش پاسخ به طرف IgG2a (نماد TH1) نمی‌شود.

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

بحث:

در این تحقیق در ادامه تحقیقات قبلی از میکروپارتیکل های کیتین کوچک‌تر از ۴۰ میکرون در تعدیل پاسخ‌های ضد لیشمانیا استفاده شد، با این تفاوت که این بار کیتین به عنوان ادجوانت به همراه لایزیت انگل لیشمانیا به کار برده شد. یافته‌های این تحقیق نشان داد که در گروه ایمونیزه شده به همراه میکروپارتیکل‌های کیتین قطر زخم ایجاد شده و میزان بار انگلی غده لمفی در مقایسه با گروه غیرایمونیزه کاهش داشته است و متوسط روز شروع ضایعات در گروه دریافت‌کننده ادجوانت کیتین افزایش یافته است که این یافته‌ها در تطبیق با نتایج مطالعه‌های پیشین بود که از میکروپارتیکل‌های کیتین به عنوان تعدیل‌کننده ایمنی (Immunomodulator) در موش‌های BALB/c آلوده شده به انگل لیشمانیا ماژور استفاده شده بود و نتایج آن‌ها نشان داد در گروه تیمار شده با میکروپارتیکل‌های کیتین میزان بار انگلی و قطر زخم نسبت به گروه تیمار نشده کاهش و همچنین متوسط روز شروع زخم نیز در گروه تیمار شده افزایش یافته بود که نشانه بروز دیرتر زخم بود(۱۵،۱۶). Hasegawa و همکارانش نیز در کاری مشابه به کار ما از میکروپارتیکل‌های کیتین با سایز ۲۰-۲ میکرون به عنوان ادجوانت در کنار واکسن غیر فعال آنفلوانزا استفاده کردند و گزارش کردند که میزان بار ویروسی در گروه دریافت کننده میکروپارتیکل‌های کیتین در مقایسه با گروه کنترل کاهش داشته است و همچنین میزان Anti-HA-IgA در مخاط و Anti-HA-IgG در سرم این گروه افزایش یافته است(۲۶). در لیشمانیوز به دلیل القای پاسخ‌های ایمنی TH2 بیماری پیشرفت می‌کند؛ بنابراین شناخت و معرفی یک ادجوانت مناسب که پاسخ‌های ایمنی TH2 را مهار کند در واکسیناسیون علیه انگل لیشمانیا لازم است(۲۷). مطالعه‌های متعددی نشان می‌دهد که میکروپارتیکل‌های کیتین می‌توانند با درگیر کردن رسپتورهای ایمنی ذاتی، پاسخ‌های التهابی ایمنی ذاتی و سپس پاسخ‌های TH1 را فعال کنند(۳۰-۲۸)؛ بنابراین می‌وانند به عنوان یک ادجوانت موثر در ایجاد پاسخ‌های ایمنی استفاده شوند. این تحقیق در راستای تحقیق‌های پیشین پیرامون اثر تعدیل ایمنی میکروپارتیکل‌های کیتین در تقویت پاسخ ضد لیشمانیا انجام شد. نتایج تحقیق‌های پیشین ما نشان داده‌اند که میکروپارتیکل‌های کیتین در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی قادر به تعدیل پاسخ‌های ضد لیشمانیا هستند و به نظر می‌رسد میکروپارتیکل‌های کیتین با سازوکار تحریک ترشح سایتوکاین‌های IFN-γ و IL-10 به همراه TNF-α قادر به تعدیل پاسخ‌های TH2 موثر بر آسیب‌زایی لیشمانیا هستند(۱۶-۱،۱۴). همان‌طور که پیش از این ذکر شد سایتوکاین‌های مرتبط با TH1/TH2 ایزوتایپ ایمونوگلوبینی که در پاسخ به میکروارگانیسم‌ها القا می‌شوند را کنترل می‌کنند و به این ترتیب آنتی بادی‌ها نشان‌دهنده نوع پاسخ ایمنی ایجاد شده هستند. نتیجه سنجش نسبت IgG1 وIgG2a سرمی نشان داد که ایمونیزاسیون با میکروپارتیکل‌های کیتین زمینه‌ساز کاهش سطح سرمی IgG1 شده، ولی بر میزان سرمی IgG2a اثرگذار نبوده است. به عبارتی این روش ایمونیزاسیون همراه کیتین، گرایش پاسخ به طرف TH2 را در موش‌هایBALB/c نسبت به گروه شاهد مهار کرده است (تصویر ۲-۳الف) اگرچه زمینه‌ساز پیشبرد پاسخ‌های مبتنی بر افزایش تولید IgG2a نشده است(تصویر ۲-۳الف). اندازه‌گیری زیرکلاس‌های مزبور پس از چالش با انگل نیز نشان‌دهنده تداوم این اثر است(تصویر ۲-۳ب) با این حال عفونت با انگل لیشمانیا افول پاسخ‌های TH1 را به دنبال دارد(۳۱) و نتایج سنجش IgG2a سرمی در این تحقیق نیز این موضوع را تایید کرد اما در عین حال نتایج ما بیانگر این است که دراثر ایمونیزاسیون با میکروپارتیکل‌های کیتین به همراه لایزیت انگل لیشمانیا پاسخ‌های IgG1 به صورت معنادار مهار شده است. در مطالعه‌های دیگری که از ادجوانت BCG و یا سایر ادجوانت‌ها در کنار لایزیت انگل استفاده شده است نیز تغییر در الگوی پاسخ IgG1 و IgG2a مشابه نتایج تحقیق ما دیده می‌شود و به نظر می‌رسد ادجوانت موثر در کنترل عفونت انگل باعث القای تولید IgG2a و مهار تولیدIgG1 می‌شود(۲۱،۲۲،۳۲) همچنین در مطالعه دیگری که از نانوپارتیکل‌های کیتوزان در واکسن انگل لیشمانیا استفاده شد، افزایش نسبت IgG2a/IgG1 گزارش شده است(۳۳). بنابراین به نظر می رسد میکروپارتیکل های کیتین قادر به فروتنظیمی پاسخ‌های آسیب‌زای TH2 ایجاد شده در عفونت لیشمانیا باشند و شاید IFN-γ و IL-10 در فروتنظیمی پاسخ TH2 تحت تاثیر کیتین نقش داشته باشند(۱،۱۵،۱۶).

از طرفی مطالعه‌های انجام شده ما در زمینه لیشمانیا و میکروپارتیکل‌های کیتین نشان می‌دهد که تزریق زیرجلدی میکروپارتیکل‌های کیتین زیر ۴۰ میکرون در غلظت متوسط $100\mu g/ml$می‌تواند پاسخ‌های ایمنی TH2 را در لیشمانیوز جلدی مهار کند. Koller و همکارانش در تحقیقی کراتینوسیت‌ها را به همراه میکروپارتیکل‌های کیتین انکوبه کردند و نشان دادند که مواجهه کیتین با کراتینوسیت‌ها سبب القای ترشح سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها التهابی توسط این سلول‌ها می‌شود و همچنین بیان TLR-4 را در آن‌ها افزایش می دهد؛ بنابراین برخورد با کیتین می تواند پاسخ‌های ایمنی ذاتی را در پوست تنظیم کند و موجب فراخوانی سایر سلول‌های ایمنی ذاتی در پاسخ به عفونت‌های جلدی شود(۳۴) به نظر می‌رسد تزریق زیرجلدی کیتین و مواجهه آن با کراتینوسیت‌ها به القای پاسخ‌های ایمنی ذاتی منجر می‌شود که پیشنهاد می‌شود این موضوع در مدل عفونت لیشمانیا بررسی شود. اگرچه شناخت آثار ایمونوادجوانتی کیتین نیازمند مطالعه‌های بیشتر است، در مجموع به نظر می‌رسد CMP به عنوان یک کربوهیدرات با تحریک لکتین‌های مختلف زمینه‌ساز تحریک ایمنی ذاتی شده و به عنوان یک ادجوانت می‌تواند در عفونت لیشمانیا ماژور مورد توجه قرار گیرد. در انتها پیشنهاد می‌شود تاثیر میکروپارتیکل‌های کیتین به عنوان ادجوانت در روش‌های مختلف واکسیناسیون ضد لیشمانیا استفاده شود.

منابع:

1. Moradi M HMHM. Effect of chitin and chitosan microparticles on interferon-γ and interlukine-5 production by leishmania infected lymph nodes cell suspensions of the Balb/c mice. Pejouhandeh 2015;20(5):240-248. 2015;021.
2. Mutiso JM, Macharia JC, Gicheru MM. A review of adjuvants for vaccine candidates. 2010;24(1):16–25.
3. Noazin S, Modabber F, Khamesipour A, Smith PG, Moulton LH, Nasseri K, et al. First generation leishmaniasis vaccines: A review of field efficacy trials. Vaccine. 2008;26(52):6759–67.
4. Armijos RX, Weigel MM, Aviles H, Maldonado R, Racines J. Field Trial of a Vaccine against New World Cutaneous Leishmaniasis in an At-Risk Child Population : Safety , Immunogenicity , and Efficacy during the First 12 Months of Follow-Up. (V):1352–7.
5. Momeni AZ, Jalayer T, Emamjomeh M, Khamesipour A, Zicker F, Labaf R, et al. A randomised , double-blind , controlled trial of a killed L . major vaccine plus BCG against zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. 1998;17:466–72.
6. Ngo DH, Kim SK. Antioxidant effects of chitin, chitosan, and their derivatives. 1st ed. Vol. 73, Advances in Food and Nutrition Research. Elsevier Inc.; 2014. 15-31 p.
7. 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.
8. Da Silva CA, Chalouni C, Williams A, Hartl D, Lee CG, Elias JA. Chitin Is a Size-Dependent Regulator of Macrophage TNF

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

and IL-10 Production. J Immunol. 2009;182(6):3573–82.
9. Kogiso M, Nishiyama A, Shinohara T, Nakamura M, Dorey CK, Ruth Ιυ Ιυ, et al. Chitin particles induce size-dependent but carbohydrate-independent innate eosinophilia. 2011;90(July):167–76.
10. Bueter CL, Lee CK, Rathinam VAK, Healy GJ, Taron CH, Specht CA, et al. Chitosan but Not Chitin Activates the Inflammasome by a Mechanism Dependent upon Phagocytosis *. 2011;286(41):35447–55.
11. Vautier S, Wagener J, Malireddi RKS, Lenardon MD, Ko M, Maccallum DM, et al. Fungal Chitin Dampens Inflammation through IL-10 Induction Mediated by NOD2 and TLR9 Activation. 2014;10(4).
12. Komi D, Sharma L, Dela Cruz CS. Chitin and Its Effects on Inflammatory and Immune Responses. Clin Rev Allergy Immunol. 2017;54(2):1–11.
13. Shibata Y, Foster LA, Bradfield JF, Myrvik QN. Oral Administration of Chitin Down-Regulates Serum IgE Levels and Lung Eosinophilia in the Allergic Mouse. 2015;
14. Dehghani F, Molla H, Memarnejadian A, Yeganeh F. Immunomodulatory Activities of Chitin Microparticles on Leishmania major -infected Murine Macrophages. Arch Med Res. Elsevier Inc; 2011;42(7):572–6.
15. Ghotloo S, Haji M, Hoseini M, Hossein M. Parasitology International Immunomodulatory effects of chitin microparticles on Leishmania major -infected BALB / c mice. Parasitol Int. Elsevier Ireland Ltd; 2015;64(2):219–21.
16. Haji M, Hoseini M, Moradi M, Hossein M. Parasitology International Immunotherapeutic effects of chitin in comparison with chitosan against Leishmania major infection. Parasitol Int. Elsevier Ireland Ltd; 2016;65(2):99–104.
17. Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, Urban JF, Beckmann MP, Park LS, et al. Lymphokine Control of In Vivo Immunoglobulin Isotype Selection. Annu Rev Immunol. Annual Reviews; 1990 Apr 1;8(1):303–33.
18. Dobakhti F, Naghibi T, Taghikhani M, Ajdary S, Rafinejad A, Bayati K, et al. Adjuvanticity effect of sodium alginate on subcutaneously injected BCG in BALB/c mice. Microbes Infect. Elsevier Masson SAS; 2009;11(2):296–301.
19. Haile M, Schröder U, Hamasur B, Pawlowski A, Jaxmar T, Källenius G, et al. Immunization with heat-killed Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin (BCG) in EurocineTM L3 adjuvant protects against tuberculosis. Vaccine. 2004;22(11–12):1498–508.
20. Tafaghodi, M.1, Eskandari, M.1, Kharazizadeh, M.1, Khamesipour, A.2 and Jaafari MR 3. Immunization against leishmaniasis by PLGA nanospheres loaded with an experimental autoclaved Leishmania major (ALM) and Quillaja saponins. Development. 2010;27(3):639–50.
21. Soudi S, Hosseini AZ, Hashemi SM. Co-administration of rectal BCG and autoclaved Leishmania major induce protection in susceptible BALB/c mice. Parasite Immunol. 2011;33(10):561–71.
22. Dobakhti F, Khalili G, Niknam HM, Khaze V, Mahmoodabadi TN, Aalinejad S. Role of imiquimod as adjuvant for vaccination against Leishmania major infection in BALB / c mice. 2013;1(69):27–35.
23. Shibata Y, Foster LANN, Metzger WJ, Myrvik QN, Enterprises M, Carolina N. Alveolar Macrophage Priming by Intravenous Administration of Chitin Particles , Polymers of N -Acetyl- D -Glucosamine , in Mice. 1997;65(5):1734–41.
24. Nayak B, Parida PK, Routa P, Ray P, Panda AK, Ray AR, et al. Chitosan micro and nanoparticles for delivery of drugs and therapeutic proteins.
25. Kropf P, Kadolsky UD, Rogers M, Cloke TE, Müller I. The leishmaniasis model. Methods Microbiol. 2010;37(C):307–28.
26. Roy RM, Wuthrich M, Klein BS. Chitin Elicits CCL2 from Airway Epithelial Cells and Induces CCR2-Dependent Innate Allergic Inflammation in the Lung. J Immunol. 2012;189(5):2545–52.
27. Reed SG, Coler RN, Mondal D, Kamhawi S, Valenzuela JG. Leishmania vaccine development: Exploiting the host-vector-parasite interface. Expert Rev Vaccines. 2016;15(1):81–90.
28. Shibata Y, Foster LA, Bradfield JF, Myrvik QN. Oral Administration of Chitin Down-Regulates Serum IgE Levels and Lung Eosinophilia in the Allergic Mouse. 2017;
29. Strong P, Clark H, Reid K. Intranasal application of chitin microparticles down-regulates symptoms of allergic hypersensitivity to Dermatophagoides pteronyssinus and Aspergillus fumigatus in murine models of allergy. Clin Exp Allergy. 2002;32(12):1794–800.
30. Elieh Ali Komi D, Sharma L, Dela Cruz CS. Chitin and Its Effects on Inflammatory and Immune Responses. Clin Rev Allergy Immunol. Clinical Reviews in Allergy & Immunology; 2017;
31. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. Nat Rev Immunol. Nature Publishing Group; 2002 Nov 1;2:845.
32. Rostami N. Immune response of BALB / c mice against an experimental vaccine of Alum precipitated autoclaved Leishmania major (Alum-ALM) mixed with BCG or Mycobacterium vaccae. 2010;27(1):89–102.
33. Danesh-Bahreini MA, Shokri J, Samiei A, Kamali-Sarvestani E, Barzegar-Jalali M, Mohammadi-Samani S. Nanovaccine for leishmaniasis: preparation of chitosan nanoparticles containing Leishmania superoxide dismutase and evaluation of its immunogenicity in BALB/c mice. Int J Nanomedicine. 2011;6:835–42.
34. Koller B, Müller-Wiefel AS, Rupec R, Korting HC, Ruzicka T. Chitin modulates innate immune responses of keratinocytes. PLoS One. 2011;6(2):1–7.

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