

بررسی نقش نانوذره کیتوزان (Chitosan) همراه شده با پروتئین‌های ترش‌حی-تراوشی لیشمانیا ماژور بر میزان اپوپتوز ماکروفاژهای موشی حساس شده با انگل

الهام فیض‌آبادی، احمد زواران حسینی*، سارا صعودی، آرزو خسروجردی

گروه ایمنی شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

E-mail: zavarana@modares.ac.ir

* نویسنده مسئول: احمد زواران حسینی

چکیده

مقدمه و هدف: لیشمانیوز یک معضل بهداشت عمومی است که توسط گونه‌های مختلف لیشمانیا ایجاد می‌شود. القای اپوپتوز در ماکروفاژهای آلوده از مکانیسم‌های اصلی فرار انگل از سیستم ایمنی است. جلوگیری از اپوپتوز و تقویت توانایی کشندگی ماکروفاژها می‌تواند در درمان و یا کنترل لیشمانیوز موثر باشد. در این مطالعه اثر نانوذره کیتوزان همراه شده با پروتئین‌های ترش‌حی-تراوشی لیشمانیا ماژور بر میزان اپوپتوز ماکروفاژها در مواجهه با لیشمانیا بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: پروتئین‌های ترش‌حی-تراوشی از سوپرناتانت کشت لیشمانیا ماژور جدا شد. محدوده وزن مولکولی پروتئینی و غلظت آن به روش SDS-PAGE و برادفورد تعیین گردید. آنتی‌ژن‌ها با نانوذره کیتوزان همراه شدند. همراه شدن آنتی‌ژن و نانوذره به روش FTIR تأیید گردید. سمیت نانوذره بر ماکروفاژها به روش تست MTT تعیین گردید. موش‌های آزمون در روزهای ۰، ۱۰، ۲۱ به صورت داخل صفاقی با پروتئین‌های ترش‌حی-تراوشی لیشمانیا، نانوذره کیتوزان و پروتئین‌های ترش‌حی-تراوشی لیشمانیا همراه شده با نانوذره کیتوزان تیمار شدند. بعد از ۲۸ روز ماکروفاژها جدا شده و درصد اپوپتوز آن‌ها در حضور و عدم حضور انگل به روش فلوسیتومتری بررسی گردید.

نتایج: بیشینه تولید پروتئین‌های ترش‌حی-تراوشی لیشمانیا ماژور ۷۲ ساعت بعد از کشت انگل است. پروتئین‌ها در محدوده ۱۱۰-۳۵ کیلوالتون قرار دارند. در غلظت 250 µg/ml بیشترین درصد همراهی با نانوذره برابر ۷۶٪ دیده می‌شود. نتایج MTT عدم سمیت تمامی غلظت‌های نانوذره کیتوزان همراه شده با پروتئین‌های ترش‌حی-تراوشی را تأیید کرد. نتایج حاصل از سنجش اپوپتوز به روش انکسین نشان داد که میزان اپوپتوز در ماکروفاژهای تیمار شده با نانوذره کیتوزان و کیتوزان همراه شده با پروتئین‌های ترش‌حی-تراوشی به طور معنی‌داری ($P \leq 0.05$) از ماکروفاژهای تیمار نشده کمتر است.

نتیجه‌گیری: کیتوزان همراه شده با پروتئین‌های ترش‌حی-تراوشی لیشمانیا می‌تواند از راه کاهش اپوپتوز، توانایی ماکروفاژهای آلوده را در حذف انگل افزایش دهد.

واژگان کلیدی: پروتئین‌های ترش‌حی-تراوشی، کیتوزان، لیشمانیا ماژور، اپوپتوز، ماکروفاژ

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وششم-شماره ۱۳۹
اسفند ۱۳۹۷

دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۰۶
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۷/۱۱/۲۱
پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۲۹

مقدمه

می‌توانند از طریق تعامل با سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی بدن، روی عملکرد سیستم ایمنی تأثیرگذار باشند (۸).

کیتوزان یکی از کارآمدترین نانو ذرات مورد استفاده در پزشکی است که زیست‌تخریب‌پذیر نیز است (۹، ۱۰). کیتوزان مشتق قلیایی و داستیله شده کیتین است که از پوسته خارجی سخت‌پوستان به دست می‌آید. کیتوزان برعکس کیتین، در محلول‌های اسیدی حل و پروتئین‌ها می‌شود (۱۶). ذرات کیتوزان می‌توانند به صورت میکروکپسول، میکروسفر و نانو ذرات تولید شوند (۱۱، ۱۲). کیتوزان از طریق گروه‌های آمین خود در واکنش‌های شیمیایی مختلف شرکت می‌کند (۱۳). امروزه استفاده از کیتوزان به عنوان ادجوانتی مناسب برای ارتقای اثربخشی واکسن‌ها رونق بسیار یافته است. هدف از این پژوهش، بررسی اثر نانوذره کیتوزان همراه شده با پروتئین‌های ترش‌حی- تراوشی لیشمانیا ماژور بر میزان اپوپتوز در ماکروفاژهای مجاور شده با لیشمانیا ماژور است. در این مطالعه سودمندی استفاده از نانو ذرات کیتوزان در بهبود عملکرد ماکروفاژهای آلوده به انگل نیز بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها

کشت لیشمانیا ماژور

لیشمانیا ماژور از بافت طحال موش‌های آلوده به لیشمانیا ماژور سویه MRHO IR75 ER جدا شده است. این انگل‌ها در محیط NNN تکثیر شده سپس به محیط DMEM با 5% FBS منتقل شدند. انگل‌ها بدون اضافه کردن محیط تازه حدود ۲ هفته در دمای 26°C قرار گرفته تا پروماستیگوت‌ها وارد فاز ایستا شوند. پروماستیگوت‌های فاز ایستا پس از سانتریفیوژ در 3000g به مدت ۱۵ دقیقه، شمارش شده و برای آلوده سازی ماکروفاژها در *in vitro* مورد استفاده قرار گرفته است.

تهیه پروتئین‌های ترش‌حی-تراوشی لیشمانیا ماژور

پروماستیگوت‌های فاز ایستا 4 بار با استفاده از محیط RPMI بدون FBS و با کمک سانتریفیوژ در دور

لیشمانیوز عفونت حاصل از انگل لیشمانیا است که بوسیله نوعی پشه خاکی منتقل می‌شود. این بیماری به صورت اندمیک در آسیا، آفریقا، آمریکا و منطقه مدیترانه وجود دارد و بیش از ۳۵۰ میلیون نفر در بیش از ۹۸ کشور جهان، تحت تأثیر آن قرار دارند (۱). تلاش‌های فراوانی برای درمان این بیماری و حتی تولید واکسن انجام گرفته که تاکنون موفقیت‌آمیز نبوده و تعداد مبتلایان همچنان رو به افزایش است (۲).

بیش از ۲۰ نوع انگل لیشمانیا و ۳۰ نوع پشه خاکی در بروز لیشمانیوز نقش دارند. لیشمانیوز به سه شکل لیشمانیوز پوستی، پوستی-مخاطی و احشایی بروز می‌کند.

لیشمانیا ماژور همچون هر پاتوژن موفق دیگری شیوه فرار از سیستم ایمنی و حفظ و بقای خود را آموخته است. یکی از مکانیسم‌های فرار انگل، القای اپوپتوز در سلول‌های ماکروفاژی است. لیشمانیا ماژور با این عمل، سلول‌های ماکروفاژی را از بین برده و به سایر سلول‌ها انتشار می‌یابد (۳)؛ بنابراین هر اقدامی که بتواند میزان اپوپتوز را کاهش دهد، به عنوان یک راه درمانی مطرح خواهد بود.

لیشمانیا ماژور با تولید پروتئین‌های مختلف می‌تواند سیستم ایمنی را تحت تأثیر قرار دهد. برای مثال پروتئین‌های ترش‌حی- تراوشی که در تمام مراحل چرخه زندگی انگل ترشح می‌شوند نقش حفاظتی و تعدیل‌کنندگی سیستم ایمنی را دارند؛ به عبارت دیگر این پروتئین‌ها مانع از تخریب انگل توسط سیستم ایمنی می‌شوند (۴).

از جمله مواردی که امروزه در درمان بیماری‌ها به خصوص بیماری‌های انگلی مورد توجه قرار گرفته است، استفاده از بخش‌های بیماری‌زای انگل به همراه نانو ذرات به عنوان ادجوانت است. نانو ذرات به ترکیباتی با سایز حدود ۱-۱۰۰۰ نانومتر گفته می‌شود که کارایی متفاوتی خواهند داشت. از مزایای این ذرات برای استفاده گسترده به خصوص در پزشکی، عبور آسان آن‌ها از سد‌های بیولوژیکی است. این ترکیبات

رقیق شده (غلظت ۰/۰۵۴ مولار) و آب دیونیزه به عنوان حلال کیتوزان استفاده شد.

محلول کیتوزان با غلظت ۲mg/ml ساخته و با نسبت ۱:۲ به اسید استیک اضافه گردید. محلول روی روتور (با دور ۱۰۰۰) به مدت ۲ تا ۳ ساعت قرار گرفته تا کیتوزان در اسید استیک حل شود.

بعد از این مدت، هر ۵ml از این محلول به صورت قطره قطره به ۲ml محلول TPP (سدیم تری پلی فسفات) و آب دیونیزه با غلظت ۱mg/ml اضافه گردید. بعد از گذشت ۱ ساعت از حل شدن دو ماده، محلول مورد نظر با دور ۲۰۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و بعد از دور ریختن مایع رویی، نانوذره مورد نظر به صورت پلت سفیدرنگی ته‌نشین شد.

ساخت غلظت‌های مختلفی از نانوذره کیتوزان

با استفاده از محیط کشت، پلت به صورت محلول درآمده و میزان کیتوزان موجود در آن اندازه‌گیری شد. سپس مقدار مناسبی از محلول به هر چاهک اضافه گردید.

به منظور بررسی عدم آلودگی نانو ذرات با LPS، تست لیمولوس (LAL Test) انجام شد. در این تست که از کیت خریداری شده از شرکت Sigma استفاده شد، نانو ذرات از نظر آلودگی به LPS توسط آنزیم موجود در این کیت مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به دست آمده حاکی از عدم وجود آلودگی به LPS در نانو ذرات بوده است.

بررسی اثر سمیت نانوذره کیتوزان بر ماکروفاژهای صفاقی به روش MTT

ماکروفاژهای صفاقی از موش Balb/c جداسازی شدند. بدین صورت که بعد از قطع حیات حیوان به روش اخلاقی آتانازی، محیط کشت سرد بدون FBS به صفاق موش تزریق گردید و سلول‌ها توسط عمل لاواژ صفاقی جمع‌آوری شدند. سلول‌ها با دور ۱۵۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید که نتیجه آن رسوب سلولی حاوی ماکروفاژهای صفاقی است. ماکروفاژها به تعداد 10^5 سلول در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ریخته شدند. پلیت حاوی ماکروفاژ به مدت ۲۴ ساعت

۳۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه، شسته شدند. به منظور دست‌یابی به تعداد نهایی 10^4 سلول در هر میلی‌لیتر محیط، پروماستیگوت‌های شسته شده به محیط RPMI بدون FBS انتقال داده شدند. انکوباسیون در 22°C انجام شد. بعد از ۲۴ تا ۷۲ ساعت انکوباسیون، انگل‌ها توسط سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰g در دمای 4°C به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه حذف شده و مایع رویی جمع‌آوری شده است. برای حذف انگل‌های باقی‌مانده، مایع رویی از فیلتر ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد.

اولتراسانتریفیوژ

محیط کشت جمع‌آوری شده از مرحله قبل به لوله‌های اولتراسانتریفیوژ منتقل شدند. اولتراسانتریفیوژ در دور ۱۰۰۰۰۰g و دمای 4°C ، به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت (۱۵،۱۴). رسوب حاصل در ۲ml محیط RPMI بدون FBS معلق گردید.

الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید (SDS-PAGE)

به منظور تأیید حضور پروتئین‌های ترشحی-تراوشی لیسمانیا ماژور از الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید استفاده گردید. ژل مورد استفاده با ضخامت ۱mm و ۱۲٪ آکریل آمید در بخش Resolving و ۶٪ در بخش Stacking ساخته شد. بعد از بستن ژل درون قالب شیشه‌ای، نمونه‌ها با حجم مساوی درون چاهک‌ها ریخته شدند و داخل تانک الکتروفورز قرار گرفت. پروتئین‌های ترشحی-تراوشی لیسمانیا ماژور بر اساس وزن مولکولی، از یکدیگر جدا شده و باندها با کمک رنگ کوماسی بلو قابل رؤیت گردید.

تست برادفورد

برای انجام تست برادفورد، مقدار ۲۰ میکرو لیتر از محلول پروتئین را درون چاهک یک پلیت الایزا ریخته و به آن ۲۰۰ میکرو لیتر معرف برادفورد اضافه گردید. طول موج این محلول در ۵۴۰ نانومتر قرائت شد و با توجه به نمودار غلظت‌های استاندارد، نمودار آن نیز توسط نرم‌افزار Excel رسم گردید. بر این اساس مقدار وجود پروتئین در سوپرناتانت حاصل قابل محاسبه است.

تهیه و تأیید نانوذره کیتوزان

برای تهیه نانو ذرات کیتوزان از اسید استیک

از نانو ذرات ساخته شده با غلظت‌های متفاوت کیتوزان، به همراه مقداری آب مقطر در دستگاه اسپکتروفوتومتر، OD گرفته شد (A). بعد از سانتریفیوژ و ته‌نشین شدن نانوذره، از مایع رویی حاصل نیز OD گرفته شد (B) و درصد اتصال پروتئین‌های ترش‌حی-تراوشی لیشمانیا ماژور به نانوذره کیتوزان با استفاده از فرمول زیر به دست آمد.

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

حساس کردن موش‌های Balb/c و گروه‌های آزمایش
۲۵ سر موش Balb/c ماده ۸-۶ هفته‌ای از انستیتو پاستور کرج خریداری شدند. آن‌ها در اتاق مخصوص حیوانات آزمایشگاهی در دانشگاه تربیت مدرس که ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و درجه حرارت 21°C داشت، با دسترسی آسان به آب و غذا نگهداری شدند. موش‌ها به ۵ گروه تقسیم شدند:

۱. موش‌های تیمار شده با نانوذره کیتوزان
۲. موش‌های تیمار شده با محیط کشت به عنوان کنترل
۳. موش‌های تیمار شده با پروتئین‌های ترش‌حی-تراوشی لیشمانیا ماژور
۴. موش‌های تیمار شده با پروتئین‌های ترش‌حی-تراوشی لیشمانیا ماژور همراه شده با نانوذره کیتوزان
۵. موش‌های تیمار شده با پروتئین‌های ترش‌حی-تراوشی لیشمانیا ماژور همراه شده با ادجوانت کامل فروند

تزریق در روزهای ۲۱-۱۰-۰ به صورت داخل صفاقی صورت گرفته است (در نوبت اول ۱۵ میکروگرم، در نوبت دوم ۷ میکروگرم و در نوبت سوم ۵ میکروگرم) و در روز ۲۸ ماکروفاژها از صفاق موش‌ها جداسازی شدند.

جداسازی و کشت ماکروفاژهای صفاقی موش‌های Balb/c
ماکروفاژها به روش لاواژ صفاقی از موش‌های Balb/c گروه‌های آزمون و کنترل پس از اتمام دوره تیمار با آنتی‌ژن، جداسازی شدند. ماکروفاژها به تعداد ۴۰۰۰۰ سلول درون چاهک‌های پلیت ۶ خانه‌ای ریخته و به آن‌ها محیط کشت اضافه گردید. سلول‌ها به

انکوبه شده تا سلول‌ها به کف پلیت متصل شوند. بعد از این مدت، ماکروفاژهای موجود در چاهک با غلظت‌های مختلفی از نانوذره کیتوزان و پروتئین‌های ترش‌حی-تراوشی لیشمانیا ماژور مجاور شدند (غلظت‌های ۰.۰۱، ۰.۱، ۱۰، ۱۰۰). بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار فعالیت سلول‌ها بررسی گردید.

سپس در زمان‌های گفته شده، محیط رویی چاهک‌ها تخلیه و به هر کدام ۱۰۰ میکرو لیتر محیط بدون FBS و ۱۰ میکرو لیتر معرف زرد رنگ MTT اضافه شد. بعد از افزودن معرف، پلیت به مدت ۵-۴ ساعت درون انکوباتور قرار گرفت. بعد از این مدت، محتویات چاهک تخلیه و به هر چاهک ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO (Sigma-آلمان) اضافه گردید. سپس OD تست MTT در ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت ریدر (Eppendorf, USA) قرائت شد. برای کنترل منفی از ماکروفاژ به تنهایی و برای کنترل مثبت از تیمار ماکروفاژهای صفاقی با غلظت‌های مختلف LPS در سه تکرار استفاده شد.

همراه کردن پروتئین‌های ترش‌حی-تراوشی لیشمانیا ماژور با نانوذره کیتوزان

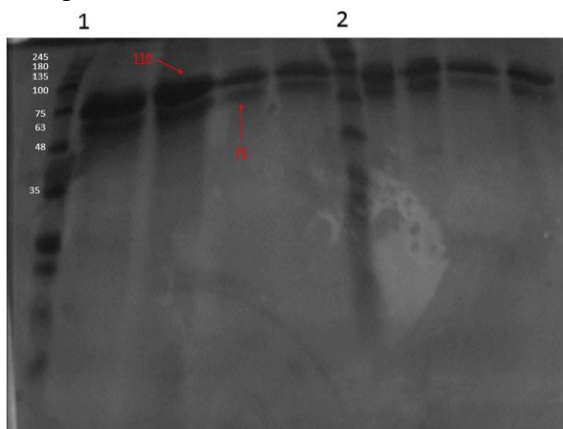
پروتئین‌های مورد نظر با غلظت‌های مختلف در محلول TPP (1mg/ml) حل شده و به صورت قطره‌قطره به نسبت ۲ به ۵ با محلول کیتوزان (2mg/ml) ترکیب گردید. بعد از گذشت ۱ ساعت، محلول مورد نظر سانتریفیوژ شده و پلت حاوی نانوذره همراه شده با پروتئین‌های ترش‌حی-تراوشی لیشمانیا ماژور حاصل شد. به منظور تأیید اتصال نانوذره کیتوزان به TPP و پروتئین‌های ترش‌حی-تراوشی لیشمانیا ماژور از میکروسکوپ الکترونی SEM (Zeiss EM10C 80KW) استفاده گردید.

بررسی درصد اتصال نانوذره کیتوزان به پروتئین‌های ترش‌حی-تراوشی لیشمانیا ماژور به وسیله اسپکتروفوتومتر

اتصال پروتئین‌های ترش‌حی-تراوشی لیشمانیا ماژور به نانوذره کیتوزان در طول موج ۲۸۰ نانومتر بررسی گردید. به منظور به دست آوردن درصد اتصال پروتئین به نانوذره از معادله زیر استفاده شده است.

SDS-PAGE

در عکس موجود، باندهای جدا شده وزن مولکولی پروتئین‌های ترش‌جی-تراوشی لیشمانیا ماژور را در محدوده ۱۱۰-۳۵ کیلودالتون نشان می‌دهد (شکل ۱).



شکل ۱. تصویر ژل حاصل از SDS-PAGE پروتئین‌های ترش‌جی-تراوشی انگل لیشمانیا ماژور.

پروتئین‌های استخراج شده از کشت انگل در محدوده ۷۵-۱۱۰ قرار گرفته‌اند.

آنالیز FTIR مربوط به نانوذره کیتوزان

پیک مربوط به کیتوزان از محدوده ۶۰۰-۶۰۰۰ است. در شکل A پیک‌های محدوده ۳۴۰۰-۳۲۰۰ ترکیبی از پیک‌های مربوط به گروه‌های کششی OH و پیوندهای درون مولکولی هیدروژنی‌اند. پیک ۱۶۵۴ مربوط به گروه R-CO-NH₂ و ۱۰۷۵ مربوط به C-O-C است. در شکل C پیک ۱۰۹۵ گروه P-O-C و پیک ۱۶۶۷ گروه C=O پروتئین است (نمودار ۲).

مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور 37°C قرار گرفتند. پس از اتمام انکوباسیون، سلول‌های غیرچسبنده از محیط حذف گردید.

آلوده‌سازی ماکروفاژها با لیشمانیا ماژور و سنجش اپوپتوز

بعد از ۲۴ ساعت از کشت ماکروفاژها، لیشمانیا ماژور به نسبت ۱ به ۱۰ به هر چاهک اضافه گردید. بعد از گذشت ۱ ساعت، محیط چاهک‌ها جمع‌آوری و بعد از اضافه کردن محیط جدید، پلیت درون انکوباتور قرار داده شد. ۷۲ ساعت پس از آلوده شدن ماکروفاژها با لیشمانیا ماژور، میزان اپوپتوز ماکروفاژها با استفاده از کیت Annexin V و PI به روش فلوسایتومتری تعیین گردید.

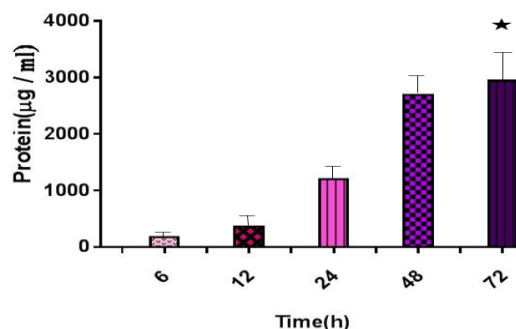
آنالیز آماری

تست‌های یک‌طرفه ANOVA و Tukey، برای تحلیل‌های آماری و بررسی اختلاف بین گروه‌ها استفاده شد ($P < 0.05$). آنالیز آماری نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS و Prism (GraphPad Software CO, USA) انجام گرفت.

نتایج

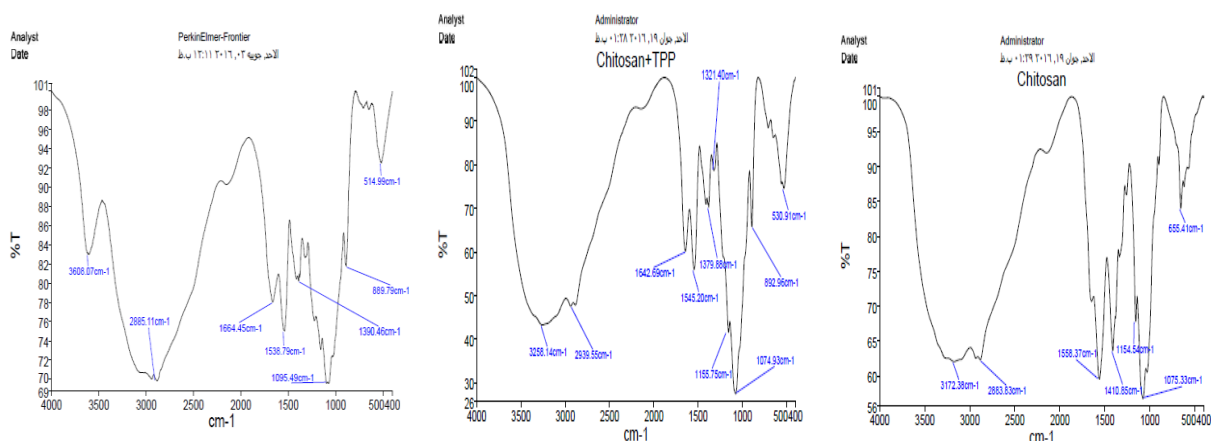
تست برادفورده

بر اساس نتایج حاصل، بهترین زمان جهت جمع‌آوری سوپرناتانت، ۷۲ ساعت است. بعد از جمع‌آوری سوپرناتانت و جداسازی پروتئین‌ها، در نهایت ۲۴mg پروتئین برای انجام مراحل مختلف آزمایش به دست آمد (نمودار ۱).



نمودار ۱. میزان پروتئین موجود در سوپرناتانت کشت لیشمانیا ماژور در زمان‌های مختلف نشان داده شده است.

علامت ستاره نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) است.

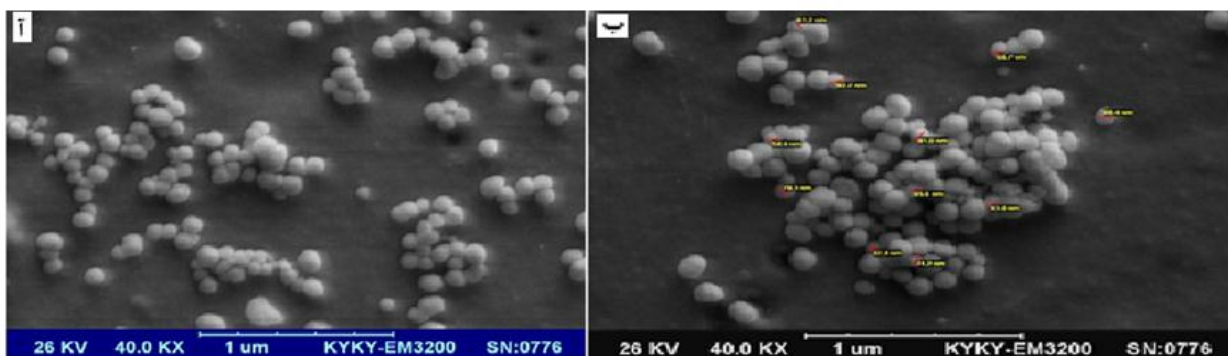


نمودار ۲. آنالیز FTIR (FTIR) نانوذره کیتوزان قبل از همراهی با پروتئین ترش‌حی- تراوشی لیشمانیا ماژور، (ب) FTIR نانوذره کیتوزان متصل شده به TPP، (ج) FTIR نانوذره کیتوزان همراه شده با پروتئین‌های ترش‌حی-تراوشی لیشمانیا ماژور

Scanning electron microscopy (SEM)

ذرات کیتوزان بسته به نسبت ترکیب شدن با TPP، اندازه‌هایی متفاوت دارند. اندازه ذرات کیتوزان در این مطالعه زیر ۲۰۰nm است و حالتی کروی دارد. همان طور که در شکل ۲ مشخص است، اندازه و مورفولوژی

ذرات کیتوزان بسته به نسبت ترکیب شدن با TPP، اندازه‌هایی متفاوت دارند. اندازه ذرات کیتوزان در این مطالعه زیر ۲۰۰nm است و حالتی کروی دارد. همان طور که در شکل ۲ مشخص است، اندازه و مورفولوژی



شکل ۲. تصویر میکروسکوپ SEM از نانوذره کیتوزان، مورفولوژی و سایز نانوذره کیتوزان قبل

(آ) و بعد از همراه شدن با پروتئین‌های ترش‌حی-تراوشی انگل لیشمانیا ماژور (ب) را نشان می‌دهد.

MTT

نتیجه تست نشان می‌دهد که در تمامی غلظت‌های مورد استفاده در آزمایش، بیشتر از ۹۵٪ سلول‌ها زنده هستند (نمودار ۳).

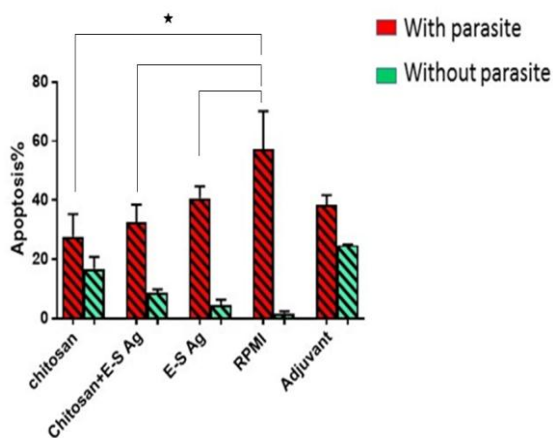
محاسبه درصد اتصال نانوذره کیتوزان به پروتئین‌های ترش‌حی-تراوشی لیشمانیا ماژور بعد از قرار دادن اعداد به دست آمده در فرمول زیر، نشان داده شد که بیشترین درصد همراهی پروتئین با نانوذره ۷۶٪ بوده که مربوط به غلظت ۲۵۰ μg/ml پروتئین است.

$$A = 0/483$$

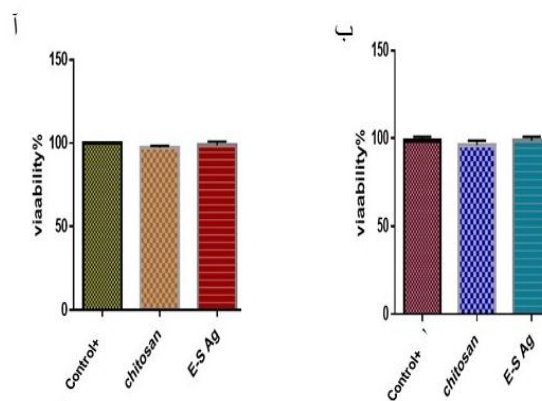
$$B = 0/112$$

$$\% \text{Loading} = (A-B/A) \times 100 = 76\%$$

شده با کیتوزان به تنهایی کمترین اپوپتوز را نشان می‌دهد. گروهی که با نانوذره کیتوزان تیمار شده‌اند در مقایسه با گروه تیمار شده با ادجوانت کامل فروند، اپوپتوز را بیشتر کاهش می‌دهند. بعلاوه اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های آزمون و گروه کنترل (ماکروفاژهای تیمار شده با محیط کشت) وجود دارد ($P < 0.05$). (نمودار ۴ و ۵).



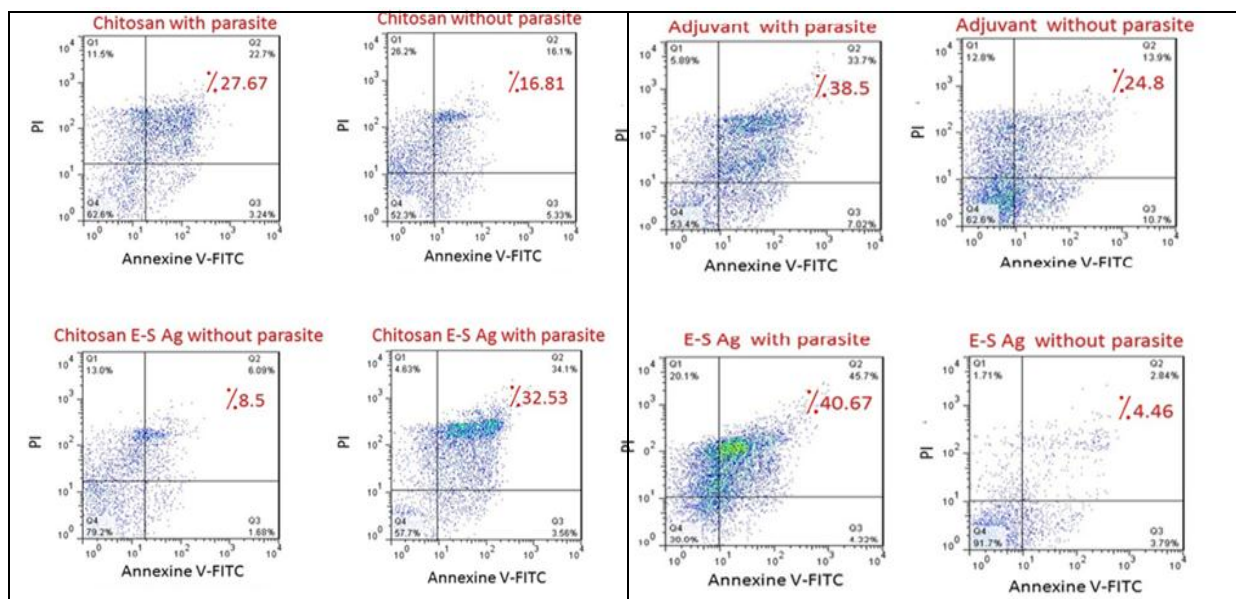
نمودار ۴. درصد اپوپتوز ماکروفاژهای گروه‌های آزمون و کنترل را بر اساس میزان سلول‌های انکسین مثبت به روش فلوسیتومتری نشان می‌دهد. علامت ستاره نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) است.



نمودار ۳. درصد زنده ماندن ماکروفاژهای صفایی در حضور غلظت‌های مختلف کیتوزان (A) بعد از گذشت ۲۴ ساعت (B) بعد از گذشت ۴۸ ساعت. علامت ستاره نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$)

روش سنجش اپوپتوز در ماکروفاژها

نمودارهای زیر مربوط به میانگین درصد اپوپتوز در گروه‌های مختلف است. بر طبق نتایج به دست آمده، میزان اپوپتوز در ماکروفاژهای تیمار شده با محیط RPMI بیشترین است. میزان اپوپتوز در گروه تیمار شده با پروتئین‌های ترش‌حی-تراوشی لیسمانیا ماژور به تنهایی در مقایسه با گروه تیمار شده با نانوذره کیتوزان همراه شده با پروتئین‌های ترش‌حی-تراوشی لیسمانیا ماژور بیشتر بوده است و میزان اپوپتوز در ماکروفاژهای تیمار



نمودار ۵. درصد اپوپتوز ماکروفاژها در گروه‌های مختلف بر اساس میزان سلول‌های انکسین مثبت به روش فلوسیتومتری در حضور و غیاب انگل

درصد اعلام شده به صورت میانگین سه تکرار بیان شده‌اند.

بحث

در بین نانو ذرات مورد استفاده در پزشکی کیتوزان دارای خواصی است که آن را برای استفاده در انتقال دارو ممتاز نموده است. این ماده از نظر سم‌شناسی کاملاً ایمن و زیست‌سازگار است و تجویز آن در انسان هیچگونه خطری دربر نخواهد داشت (۲۴).

در سال ۲۰۰۴، بیواس بنیتا از نانوذره کیتوزان همراه با DNA میکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده کرد که سبب افزایش در پاسخ‌های ایمنی شد (۲۵).

در سال ۲۰۰۹ نانوذره کیتوزان به همراه پروتئین ESAT-6 میکوباکتریوم توبرکلوزیس به منظور بررسی پاسخ‌های ایمنی ناشی از تزریق آن توسط دکتر تیبانیان مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه ثابت گردید که نانو ذرات همراه شده با پروتئین از نظر تقویت سیستم ایمنی و پیشبرد پاسخ‌ها به سمت TH1 بهتر عمل کرده‌اند (۲۶). در سال ۲۰۱۱ دکتر دانش بحرینی و همکارانش از نانوذره کیتوزان به همراه آنزیم سوپراکسید دسیموتاز لیشمانیا ماژور به منظور بررسی خاصیت ایمونوژنیسته آن استفاده کردند. در این مطالعه مشخص شد که کیتوزان می‌تواند قدرت ایمنی‌زایی آنزیم سوپراکسید دسیموتاز را به وسیله افزایش در اندازه آن افزایش دهد بعلاوه این نانوذره به عنوان ادجوان می‌تواند سبب بهبود پاسخ‌های سیستم ایمنی شود (۲۷). در سال ۲۰۱۷، نانوذره کیتوزان کونژوگه شده با پلی‌اتیلن‌گلیکول، به عنوان سیستم انتقالی در درمان سرطان مورد استفاده قرار گرفت (۳۰). نتایج ما نشان می‌دهد که نانوذره مورد استفاده نه تنها سمی نبوده بلکه فعالیت اکسیداسیون-احیای سلول را در هنگام تحریک با LPS حفظ کند (۳۱).

بر اساس نتایج به دست آمده در تست اپوپتوز ماکروفاژها، بیشترین میزان اپوپتوز در گروه کنترل و در حضور انگل است که نشان‌دهنده توانایی انگل در از بین بردن ماکروفاژ و گسترش به بخش‌های دیگر است (۵۷/۷٪). در مقایسه با گروه کنترل، میزان اپوپتوز در گروه‌های تیمار شده با کیتوزان همراه شده با پروتئین‌های ترش‌حی-تراوشی لیشمانیا ماژور در حضور

این مطالعه به منظور بررسی اثر نانوذره کیتوزان در میزان القای اپوپتوز در ماکروفاژها توسط لیشمانیا ماژور صورت گرفت. ماکروفاژها میزبان اصلی لیشمانیا ماژور هستند و می‌توانند در خط مقدم مبارزه با این انگل قرار بگیرند؛ اما لیشمانیا ماژور از راه‌های مختلفی می‌تواند بر مکانیسم‌های دفاعی ماکروفاژها غلبه کرده و حتی باعث اپوپتوز آن شود. این مکانیسم نه تنها سبب تضعیف سیستم مبارزه علیه انگل می‌شود بلکه به انتشار انگل به دیگر سلول‌ها نیز کمک می‌کند؛ بنابراین هر عاملی که بتواند میزان اپوپتوز ماکروفاژها را هنگام آلودگی با لیشمانیا ماژور کاهش دهد می‌تواند به عنوان روشی امیدبخش برای کنترل و یا درمان لیشمانیوز مورد توجه قرار گیرد.

در تمام مراحل چرخه زندگی لیشمانیا ماژور، پروتئین‌های ترش‌حی-تراوشی این انگل آزاد شده و مانع از تخریب انگل توسط سیستم ایمنی می‌شوند. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ توسط دکتر مهرانی و همکاران بر روی این آنتی‌ژن‌ها صورت گرفت، مشخص شد این مخلوط پروتئینی وزن مولکولی در محدوده ۱۱۰-۳۵ کیلودالتون داشته و می‌تواند به عنوان کاندیدایی برای تولید واکسن علیه لیشمانیا ماژور معرفی شود (۲۲). همچنین در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۲ توسط آقای کمار و همکارانش صورت گرفت، ثابت شد که این پروتئین‌ها توانایی تولید NO درون ماکروفاژ را دارند (۲۳).

با توجه به کافی نبودن پاسخ‌های ایمنی ضد پروتئین‌های ترش‌حی تراوشی لیشمانیا ماژور امروزه از همراهی ادجوانت‌ها برای تقویت پاسخ‌های ایمنی در بدن استفاده می‌شود (۲۱). از آنجایی که تا به حال دارو یا واکسن مؤثری برای مقابله با انگل لیشمانیا ماژور به دست نیامده و از طرفی ماکروفاژها سلول‌های اصلی مقابله‌کننده با این انگل هستند، لذا می‌توان گفت هر مطالعه‌ای که سبب افزایش طول عمر و قدرت فاگوسیتوزی ماکروفاژها شود می‌تواند نقش بازدارنده برای گسترش انگل و بهبود بیماری داشته باشد.

منابع

1. Torres-Guerrero E, Romano Quintanilla-Cedillo M, Ruiz-Esmenjaud J. Leishmaniasis: a review. *F1000Research* 2017; 6: 750.
2. Baneth G, Yasur-Landau D, Gilad M, Nachum-Biala Y. Canine leishmaniasis caused by *Leishmania major* and *Leishmania tropica*: comparative findings and serology. *Parasites & Vectors* 2017;10(1):113.
3. Gannavaram S, Debrabant A. Programmed cell death in leishmania: biochemical evidence and role in parasite infectivity. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2012; 2:95.
4. Chenik M, Lakhali S, Benkhalef N, Louzir H. Approaches for the identification of potential excreted/secreted proteins of *Leishmania major* parasites. *Parasitology* 2006;132:493-509.
5. Lippert DN, Dwyer DM, Li F, Olafson RW. Phosphoglycosylation of a secreted acid phosphatase from *Leishmania donovani*. *Journal of Glycobiology* 1999; 9: 627-36.
6. Han C, Yu J, Zhang Z, et al. Immunomodulatory effects of *Trichinella spiralis* excretory-secretory antigens on macrophages. *Experimental Parasitology* 2018.
7. Selkirk ME, Lazari O, Matthews JB. Functional genomics of nematode acetylcholine esterases. *Parasitology* 2005;131 Suppl:S3-18.
8. Smith DM, Simon JK, Baker JR. Applications of nanotechnology for immunology. *Nature Reviews Immunology* 2013; 13(8): 592-605.
9. Azadi A, Hamidi M, Rouini M-R. Methotrexate-loaded chitosan nanogels as 'Trojan Horses' for drug delivery to brain. Preparation and in vitro/in vivo characterization. *International Journal of Biological Macromolecules* 2013; 523-530.
10. Rampinoa A, Borgogna M, Blasi b P, and Bellicha B. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics* 2013.
11. Bulmera C, Margaritisa A, and Xenocostasb A. Production and characterization of novel chitosan nanoparticles for controlled release of rHu-Erythropoietin. *Biochemical Journal* 2012;61-69.
12. Munawar A, Jaweria T, Kishor M. An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. *Pharmaceutics* 2017; 9:53.
13. Grenha A. Chitosan nanoparticles: A survey of preparation methods. *Journal of Drug Targeting* 2012.
14. Wong W, Tan Z, Othman N, Mohamed Z, et al. Analysis of *Entamoeba histolytica* Excretory-Secretory Antigen and Identification of a New Potential Diagnostic Marker. *Clinical and Vaccine Immunology* 2011; 1913-1917.
15. E Sanin D, P Mountfor A. Sm16, a major component of *Schistosoma mansoni* cercarial excretory/secretory products, prevents macrophage classical activation and delays antigen processing. *Journal of Biomedical Science* 2014.
16. Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release* 2004;100:5-28.
17. Kamat V, Bodas D, Paknikar K. Chitosan nanoparticles synthesis caught in action using microdroplet reactions. *Scientific Reports* 2016.
18. 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.

انگل به مراتب کمتر است که این نشان دهنده توانایی این ترکیب در افزایش طول عمر ماکروفاژ است. میزان آپوپتوز در گروه‌های تیمار شده با پروتئین‌های ترشحی-تراوشی لیشمانیا ماژور و ادجوانت کامل فروند گرچه کمتر از گروه ماکروفاژ تیمار نشده است ولی نسبت به گروه‌های کیتوزان همراه شده با پروتئین‌های ترشحی-تراوشی لیشمانیا ماژور بیشتر است. در گروه‌های تیمار شده با کیتوزان نیز کاهش در میزان آپوپتوز در حضور انگل در مقایسه با گروه ماکروفاژ تیمار نشده نشان داده شده است. این کاهش آپوپتوز در ماکروفاژهای از قبل حساس شده با نانوذره، می‌تواند به دلایل مختلفی از جمله افزایش قدرت کشندگی ماکروفاژها توسط نانوذره کیتوزان و یا القای مسیر اتوفاژی در ماکروفاژها باشد. این در حالی است که در گروه ماکروفاژهای تیمار شده با آنتی‌ژن در غیاب انگل، اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها از نظر میزان آپوپتوز مشاهده نمی‌شود.

برتری این مطالعه نسبت به موارد مشابه، استفاده همزمان آن از پروتئین‌های ترشحی-تراوشی لیشمانیا ماژور و نانوذره کیتوزان است که در مطالعات دیگر به چشم نمی‌خورد. این مطالعه به صورت *In vitro* انجام گرفته است که پیشنهاد می‌گردد به منظور بررسی بهتر اثر آن بر عملکرد ماکروفاژها و در نهایت بهبود زخم‌های حاصل از انگل، به صورت *In vivo* بر روی موش‌های آلوده انجام گیرد.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان می‌دهد که نانوذره کیتوزان، با تحریک پاسخ‌های ایمنی به منظور حذف انگل درون سلول‌های ماکروفاژ، از رشد انگل جلوگیری کرده و به حذف آن توسط ماکروفاژها کمک می‌کند. پروتئین‌های ترشحی-تراوشی لیشمانیا ماژور نیز به عنوان یک عامل مهم در بیماری‌زایی به خصوص در تهاجم انگل به درون سلول و فرار از سیستم ایمنی، شناخته شده‌اند. از این رو الحاق آن به نانوذراتی مانند کیتوزان باعث دسترس قرار گرفتن آن‌ها توسط سلول‌های ایمنی شده و به بهبود بیماری کمک می‌کند.

19. Ansari M, Ebrahimi Samani S, Seraj Z, Khajeh K, HosseinKhani S. . Optimization of chitosan nanoparticles synthesis. *Modares Journal of Biotechnology* 2013;4 (2):65-73
20. Tahamtan A, Charostad J, Hoseini Shokouh J, Barati M. An Overview of Different Types of Immune Stimulating Adjuvants and Their Application. *Paramedical Sciences and Military Health* 2016; 11 (3) :43-51.
21. 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. *International Journal of Scientific and Research Publication* 2014;4(10):1-5.
22. Mehrani H, Mahmoodzadeh A. Immunological Effects of Leishmania major Secretory and Excretory products on cutaneous Leishmaniasis in BALB/C Mice. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2007; 9-19.
23. Jalaj K. Gour. Identification of TH1-responsive leishmanial excretory – secretory antigens 2012: 355-361.
24. He P, Davis SS, Illum L. In-vitro evaluation of the muco-adhesive properties of chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* 1998; 166: 75-88.
25. Bivas-Benita M, van Meijgaarden KE, Franken KL. Pulmonary delivery of chitosan-DNA nanoparticles enhances the immunogenicity of a DNA vaccine encoding HLA-A0201-restricted T-cell epitopes of Mycobacterium Tuberculosis. *Vaccine* 2004; 22(13-14): 1609 1615.
26. Tebianian M. Production of a mycobacterium tuberculosis fusion protein consist of ESAT-6 with HSP70 and evaluation of immune responses following intranasal administration. PhD Thesis. Tarbiat Modares University. 2009; 1-131.
27. 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.
28. Rampino A, Borgogna M, Blasi P, et al. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics* 2013;455:219–228.
29. 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.
30. 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.
31. 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.

Studying the role of chitosan nanoparticle loaded with *Leishmania major* Secretory and excretory antigens on the number of apoptotic macrophages in parasite sensitive mouse.

Elham Feizabadi, Ahmad Zavaran Hosseini*, Sara Soudi, Arezou Khosrojerdi

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

* Corresponding author e-mail: zavarana@modares.ac.ir

Abstract:

Background and Objective: Leishmaniasis is a public health problem caused by different types of *Leishmania*. The induction of apoptosis in infected macrophages is one of the main mechanisms for the escape of the parasite from the immune system. Preventing apoptosis and enhancing the ability to kill macrophages can be effective in treating or controlling leishmaniasis. In this study, the effect of chitosan nanoparticle loaded with *Leishmania major* secretory and excretory antigens on the number of apoptotic macrophages on exposure to *Leishmania* was investigated.

Materials and Methods: Secretory and excretory proteins were isolated from the supernatant of the *Leishmania major*. The protein molecular weight range and its concentration were determined by SDS-PAGE and Bradford method. Proteins were coupled with chitosan nanoparticles. The coupled proteins and nanoparticles were confirmed by FTIR. The nanoparticle toxicity on macrophages was determined by MTT assay. Rats were treated intraperitoneally with protein, nanoparticle, protein coupled with nanoparticles on days 0, 10, and 21. After 28 days, the macrophages were isolated and their apoptosis percentage in presence and absence of parasites was investigated by flow cytometry.

Results: The maximum production of *Leishmania major* secretory and excretory proteins was 72 hours after parasite culture. Proteins were in the range of 35-110 kDa. At a concentration of 250 µg/ml, the highest percentage of nanoparticles was 76%. The results of the MTT confirmed non-toxicity of all chitosan concentrations coupled with *Leishmania major* secretory and excretory proteins. The results of apoptotic measurements by Annexin showed that apoptosis in macrophages treated with chitosan and chitosan coupled with *Leishmania major* secretory and excretory proteins was significantly ($p < 0.05$) less than untreated macrophages.

Conclusion: Chitosan coupled with *Leishmania major* secretory and excretory proteins can increase the ability of infected macrophages to remove parasites by reducing apoptosis.

Keywords: Secretory and excretory proteins, Chitosan, *Leishmania major*, Apoptosis, Macrophage