Arak Medical University Journal (AMUJ)
2016; 19(109): 42-50

Original Article

Downregulating the Expression of CHID1 by Chitin Microparticles Mixed Leukocyte Culture

Masumeh Alimohammadi[1], Farshid Yeganeh[2], Mostafa Haji Molla Hoseini[2*]

1- M.S.c Student, Department of Immunology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Immunology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received:, Accepted:

Abstract

Background: chitin and its derivates microparticles (MPs) have immunomodulatory activities. In this study, we examined the effect of size, purity and acetylation degree of chitin MPs on CHID1-encoding SI-CLP, involved in inflammation- gene expression in mixed leukocyte culture.

Materials and Methods: Small (<40μ) and medium(40-70μ) sized chitin MPs were prepared by sonication, and they were used in treatment of leukocyte mixed culture in comparison with chitosan and also shrimp shell small-sized MPs. Neutral red uptake assay and microscopic examination of apoptosis were used to assess cytotoxicity of MPs. Finally, following cell treatment with MPs (100 μg/mL) for 48h, expression levels of CHID1 gene were determined by Real Time PCR.

Results: Different concentrations of chitinous MPs hadn't any cytotoxic effects. In gene expression analysis, small-sized chitin MPs (<40 μ) resulted in down regulation of CHID1 gene expression (p=0.004), while other MPs didn't change it significantly.

Conclusion: Size, purity and acetylation degree of chitin MPs influence their interference in immune cells interactions and it seems small-sized chitin MPs can potentially modulate immune responses through decreasing CHID1 gene expression. Using small-sized chitin MPs may be effective to treat allergies which their treatment strategies rely on modulating the immune responses.

Keywords: Chitin, Chitinase, chitosan, Immune modulation.

*Corresponding Author:
Address: Department of Immunology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Email: hajimolahoseini@yahoo.com

[Downloaded from jams.arakmu.ac.ir on 2023-12-06]

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۹، شماره ۴ (شماره پیاپی ۱۰۹)،تیر ۱۳۹۵، ۵۰-۴۲

کاهش بیان ژن CHID1 توسط میکروپارتیکل‌های کیتین در کشت مختلط لکوسیتی

معصومه علی محمدی[۱]، فرشید یگانه[۲]، مصطفی حاجی ملا حسینی[۲*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۲- استادیار، گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۱

چکیده

زمینه و هدف: میکروپارتیکل‌های کیتین و مشتقات آن خواص تعدیل پاسخ‌های ایمنی را دارند. در این تحقیق تاثیر اندازه، خلوص و میزان استیلاسیون میکروپارتیکل‌ها بر بیان ژن CHID1 - که پروتئین التهابی SI-CLP را کد می‌کند - در کشت مختلط لکوسیتی مورد سنجش قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: میکروپارتیکل‌های کیتین در اندازه کوچک(کمتر از ۴۰ میکرون) و متوسط(۴۰ تا ۷۰ میکرون) به روش سونیکاسیون تهیه شدند و در مقایسه با میکروپارتیکل‌های کوچک کیتین داستیله (کیتوسان) و ناخالص (پوسته میگو)، در تیمار کشت مختلط لکوسیتی مورد استفاده قرار گرفتند. برای بررسی توکسیسیتی میکروپارتیکل‌ها از روش نوترال رد و سنجش میکروسکوپی آپوپتوز استفاده شد. در نهایت به دنبال تیمار سلول‌ها با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر میکروپارتیکل‌ها به مدت ۴۸ ساعت، بیان ژن CHID1 به روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز زمان واقعی اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: میکروپارتیکل‌های متفاوت کیتینی در غلظت‌های مختلف اثرات سایتوتوکسیک نداشتند. در بررسی بیان ژن، فقط میکروپارتیکل‌های کوچک کیتین باعث کاهش بیان CHID1 شدند(p=۰/۰۰۴)، در حالی که سایر میکروپارتیکل‌ها تغییرمعنی‌داری در کاهش یا افزایش بیان این ژن ایجاد نکردند.

نتیجه‌گیری: مداخله میکروپارتیکل‌های کیتینی در میان‌کنش سلول‌های ایمنی متاثر از اندازه، خلوص و میزان استیلاسیون آن‌ها است و به نظر می‌رسد میکروپارتیکل‌های کوچک کیتین توان تغییر وتعدیل پاسخ‌های ایمنی را از طریق کاهش بیان ژن CHID1 داشته باشند. استفاده از میکروپارتیکل‌های کوچک کیتین ممکن است در درمان آلرژی‌ها که راه‌کار درمانی آن‌ها تعدیل پاسخ‌های ایمنی است موثر باشد.

واژگان کلیدی: کیتین، کیتیناز، کیتوسان، تعدیل ایمنی

* **نویسنده مسئول:** ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات فیتوشیمی، گروه ایمنولوژی

Email: hajimolahoseini@yahoo.com

[Downloaded from jams.arakmu.ac.ir on 2023-12-06]

مقدمه

کیتین پس از سلولز فراوان‌ترین بیو پلیمر موجود در طبیعت است و موجودات مختلفی در ساختار خود کیتین دارند و برخی از آلرژن‌های شایع شناخته شده به ارگانیسم‌های دارای کیتین مثل قارچ‌ها و مایت‌ها تعلق دارند(۱). با توجه به این که کیتین در ساختار بدن انسان وجود ندارد، حضور آن برای سیستم ایمنی یک سیگنال خطر محسوب شده و سیستم ایمنی را فعال می‌کند. در سطح سلول‌های ایمنی گیرنده‌هایی چون TLR-2 ، Dectin-1، مانوز و هم‌چنین فیکولین‌ها مسئول شناسایی آن می‌باشند(۲). تحقیقات زیادی وجود دارند که اثر تحریکی کیتین بر سیستم ایمنی را به صورت تحریک پاسخ‌های T_H1 ،فعال سازی کلاسیک ماکروفاژها و مقابله با بروز آلرژی بیان نموده‌اند. اما در این میان تحقیقاتی نیز وجود دارند که نتایج متناقضی با یافته‌های فوق داشته و دلالت بر اثر کیتین و مشتقات آن در جهت گرایش پاسخ ایمنی به طرف T_H2 و آلرژی‌زا بودن دارند(۵-۳). بر اساس مطالعات انجام شده، بخشی از این تناقضات مربوط به تفاوت در اندازه میکروپارتیکل‌های کیتین است(۶).

علی‌رغم عدم حضور کیتین پلی مری، در بدن، آنزیم‌های تجزیه کننده کیتین و پروتئین‌های شبه کیتیناز که ناحیه متصل شونده به کیتین را داشته ولی فعالیت تجزیه‌ای ندارند، در سلول‌های انسانی وجود دارند. کیتینازها و پروتئین‌های شبه کیتیناز، اعضای خانواده ژنی گلیکوزیل هیدرولاز ۱۸ (GH 18) می‌باشند(۷). GH 18 یک خانواده ژنی باستانی است که در گونه‌های مختلف از گیاهان تا پستانداران وجود دارد(۸). حفظ این خانواده پروتئینی در طی زمان تکاملی و گونه‌ها بیان‌گر نقش ضروری آن‌ها در بیولوژی می‌باشد. مطالعات اخیر هم این موضوع را تصدیق کرده است، به طوری که مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های خانواده GH 18 در انسان و موش عملکردهای متنوع آن‌ها در ایمنی و هومئوستاز بافتی را نشان داده‌اند(۱۱-۹). CHID1 (حاوی دومین کیتیناز ۱) آخرین GH18 شناخته شده در انسان است و بیان پروتئین آن یعنی SI-CLP (پروتئین شبه کیتیناز کنش‌گر با استابیلین) توسط ماکروفاژها، لنفوسیت‌های B ، T و برخی از رده‌های سلولی توموری گزارش شده است و ادعا شده است که SI-CLP قادر به اتصال به LPS و تحریک تولید سایتوکاین‌های التهابی از ماکروفاژها در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد(۱۲).

کیتین به عنوان جز اصلی متصل شونده به کیتینازها وشبه کیتینازها، ممکن است به عنوان یک تنظیم کننده(افزاینده یا کاهنده) بیان این ژن‌ها عمل کند و از این طریق در پاسخ‌های ایمنی مداخله نماید. لازم به ذکر است که حتی برای برخی از شبه کیتینازها فعالیتی مشابه سایتوکاین‌ها ذکر شده است.

در این پژوهش، اثر میکروپارتیکل‌های کیتین در دو اندازه متوسط (۴۰ تا ۷۰ میکرون) و کوچک (۱ تا ۴۰ میکرون) که گزارشاتی مبنی بر توانایی متفاوت آن‌ها در القای پاسخ‌های ایمونولوژیک وجود دارد(۶، ۱۳)، بر بیان ژن CHID1 که در شرایط التهابی افزایش بیان دارد(۱۴)، مورد مطالعه قرار گرفت. هم‌چنین از کیتوسان – مشتق داستیله کیتین- به منظور بررسی نقش میزان استیلاسیون و هم‌چنین کیتین ناخالص به منظور بررسی نقش پروتئین‌های همراه نیز در کنار میکروپارتیکل‌های کیتین استفاده شد. بدین منظور کشت مختلط لکوسیتی برای القای یک واکنش ایمنی قوی صورت پذیرفت واثر تیمار با میکروپارتیکل‌های کیتینی مختلف بر سنجش بیان ژن CHID1 مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه میکروپارتیکل‌های کیتین

در این مطالعه تجربی، از پودر کیتین (C-7170, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) و کیتوسان تجاری (C-3646, sigma Chemical Co.St.Louis,Mo) ، سوسپانسیون ۱ گرم در صد در آب مقطر تهیه گردید. سوسپانسیون تهیه شده به مدت ۲ ساعت و در ۸ زمان ۱۵ دقیقه‌ای با سونیکاتور، سونیکه شد. سوسپانسیون سونیکه شده به ترتیب از سه صافی ۴۰، ۷۰ و

[Downloaded from jams.arakmu.ac.ir on 2023-12-06]

۱۰۰ میکرونی عبور داده شد. سوسپانسیون زیر صافی ۴۰ و ذرات روی صافی ۴۰ میکرونی در دو لوله فالکون مجزا جمع‌آوری و با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. رسوب حاصل از سانتریفیوژ به مدت ۶ ساعت با دستگاه فریز درایر (Christ Alpha 1-2 LD,Uk) خشک شد. از میکروپارتیکل‌های کیتین در بافر فسفات، سوسپانسیون یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شده و اتوکلاو گردید. سوسپانسیون ذرات کیتینی، تحت شرایط استریل و زیر هود در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری تقسیم شد و برای تیمار سلول‌ها مورد استفاده قرار گرفت. بررسی تقریبی اندازه ذرات با بررسی میکروسکوپی صورت گرفت و بررسی دقیق‌تر هم‌چون تحقیقات پیشین (۱۵، ۱۶) با استفاده ازسیستم لیزری (Malvern Master Sizer.Malvern Instruments.Ltd.Worcestershaier ، بریتانیا) انجام شد. به منظور تهیه کیتین پروتئین زدایی نشده ، از روش‌های مرسوم استحصال کیتین از پوسته میگو بهره گرفته شد. بدین ترتیب که پوسته میگو با جریان آب گرم روان شست و شو داده شد تا مواد ارگانیک محلول حذف شود. سپس به مدت یک ساعت در آب جوش قرار گرفت. پس از خشک شدن، از پودر آسیاب شده پوسته میگو که وارد فرآیند نمک زدایی و پروتئین‌زدایی نگردید، در آزمایشات تحت عنوان کیتین ناخالص استفاده شد.

کشت مختلط سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی

به منظور ایجاد شرایط کشت مختلط سلول‌های تک هسته‌ای، از پنج فرد داوطلب سالم خون‌گیری در لوله حاوی EDTA صورت گرفت و با هم مخلوط شد. به دنبال آن جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای(PBMCs) از این مخلوط توسط روش شیب غلظت فایکول تحت شرایط استریل انجام گرفت. پس از سنجش درصد سلول‌های زنده به روش‌تریپان بلو و شمارش سلول‌ها با لام نئوبار، رسوب سلولی در محیط کشت کامل سوسپانسیون شده و تعداد 10^6 سلول به ازای هر چاهک از پلیت ۱۲ خانه برای آزمایشات مختلف استفاده شد. هر آزمایش حداقل در سه نوبت مجزا انجام شد.

بررسی بقای سلولی

بعد از ۴۸ ساعت تیمار سلول‌ها با میکرو پارتیکل‌های کیتینی مختلف در غلظت‌های ۱۰،۱۰۰و۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بقای سلولی در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل به روش نوترال رد (زیست رویش- ایران) ارزیابی شد. در این روش، نوترال رد پس از جذب توسط سلول، درون لیزوزیم‌های سلول‌های زنده قرار می‌گیرد. پس از لیز سلول‌ها در حلال آلی و آزادسازی رنگ ذخیره شده در لیزوزوم‌ها، شدت رنگ تولید شده با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری می‌گردد. شدت رنگ رابطه مستقیمی با تعداد سلول‌های زنده دارد. هم‌چنین برای تائید این روش به موازات آن، آزمایش آپوپتوز با استفاده از روش مخلوط رنگ اتیدیوم بروماید- آکریدین اورنج (زیست رویش- ایران) هم انجام شد. به طور خلاصه پس از آن که کمی رسوب سلولی در ۲۵ میکرولیتر بافر فسفات سرد سوسپانسیون شد، ۵ میکرولیتر مخلوط رنگ با غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اضافه گردید و سلول‌ها فوراً با میکروسکوپ فلورسنت مجهز به فیلتر ۴۸۰/۳۰ جهت تهییج رنگ و آئینه دی کروماتیک LP ۵۰۵ وفیلتر ۵۳۵/۴۰ جهت مشاهده نور فلورسنت ساطع شده بررسی شدند.

اندازه‌گیری IL-6

به منظور حصول اطمینان از رخ داد واکنش مختلط لکوسیتی، میزان IL-6 در مایع رویی کشت سلول‌ها در پایان انکوباسیون مورد سنجش قرار گرفت. بدین منظور در سوپرناتانت کشت سلولی از روش الایزا (Blender Medsystems، اتریش) مطابق دستورالعمل استفاده شد. حساسیت این کیت ۰/۹۲ پیکوگرم بر میلی لیتر بود.

سنجش بیان ژن CHID1

به منظور سنجش بیان ژن از روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز زمان واقعی استفاده شد و نسبت بیان ژن CHID1 به ژن خانه‌دار درهر یک از گروه‌های تست با

[Downloaded from jams.arakmu.ac.ir on 2023-12-06]

نسبت بیان این ژن به ژن خانه‌دار در گروه کنترل مقایسه شد. بدین منظور ابتدا استخراج RNA صورت پذیرفت. با استفاده از محلول RNX Plus(سینا کلون-ایران) طبق دستورالعمل استخراج RNA انجام شد. پس از ارزیابی کیفی وکمی، RNA استحصال شده جهت ساخت cDNA با استفاده از کیت تجاری (Cat No:25081 شرکت اینترون، کره) و براساس دستور کار مورد استفاده قرار گرفت.

توالی ژن‌های هدف (CHID1) و خانه‌دار(HPRT1) از بانک اطلاعاتی Ensemble برداشت شد و پرایمرهای پیش رو (5′-GGGGCTCAACTTCTATGGTATGGA-3′) و پس رو(5′-TCCCACTGCGGCTCTTCTTGT-3′) برای ژن CHID1 و پرایمرهای، پیش رو (5′-TGA CAC TGG CAA AAC AAT GCA-3′) و پس رو (5′-GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT-3′) جهت ژن خانه‌دار از طریق نرم افزار Beacon designer طراحی شدند. واکنش زنجیره‌ای پلی مراز زمان واقعی به روش سایبرگرین انجام شد. با استفاده ازMaster Mix (آمپلیکن، دانمارک)، پرایمرها، آب دیونیزه (عاری از RNase و DNase) و cDNA سنتز شده، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز زمان واقعی در برنامه دمایی مناسب مطابق با پیشنهاد موجود در کیت مسترمیکس(جدول ۱) برای ژن‌های هدف و مرجع در گروه‌های تیمار و کنترل راه اندازی گردید.

جدول ۱. برنامه دمایی دستگاه واکنش زنجیره‌ای پلی مراز زمان واقعی

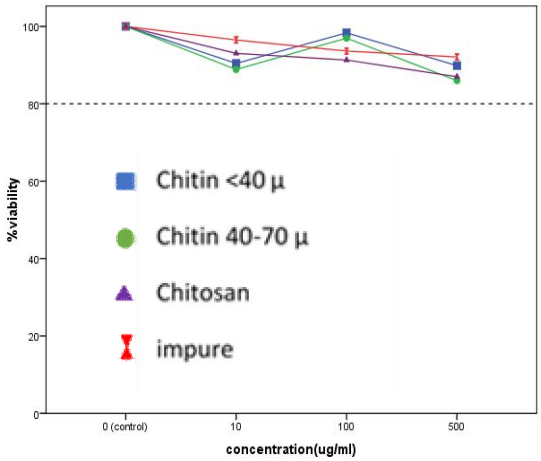
مرحله	زمان	دما	تعداد سیکل
واسرشت سازی اولیه	۱۵ دقیقه	۹۵ (℃)	۱
واسرشت سازی	۱۰ ثانیه	۹۵ (℃)	
اتصال پرایمر به رشته الگو	۱۰ ثانیه	۶۱ (℃)	۴۰
گسترش	۳۰ ثانیه	۷۲ (℃)	

برای تحلیل داده‌های واکنش زنجیره‌ای پلی مراز زمان واقعی از دو نرم افزار Rotor-Gene Q Series و REST استفاده شد. بدین منظور دو پارامتر «رشد سریع» و «تقویت» وamplification مربوط به ژن‌های هدف و ژن خانه‌دار به دست آمده از نرم افزار Rotor-Gene Q Series Software به برنامه REST وارد شد. این نرم افزار داده‌های مربوط به گروه‌های کنترل و مورد مطالعه را تحلیل کرده و پس از انجام تست آماری نتایج را بر اساس مقدار p کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌داری گزارش می‌دهد.

یافته‌ها

غیر توکسیک بودن میکروپاتیکل‌ها برای سلول‌ها

آزمایش نوترال رد و بررسی آپوپتوز بعد از ۴۸ ساعت تیمار با میکرو پارتیکل‌های متفاوت کیتینی در غلظت‌های مختلف انجام شد. در بررسی میکروسکوپی سلول‌ها با روش تریپان بلو در میکروسکوپ نوری و روش اتیدیوم-آکریدین در میکروسکوپ فلورسنت در تمامی غلظت‌های انواع میکروپارتیکل‌ها، همواره بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها زنده بودند. آزمایش نوترال رد نیز یافته‌های میکروسکوپی را تأیید کرد و نشان داد که میکروپارتیکل‌های کیتینی در غلظت‌های به کار رفته اثر سایتوتوکسیک نداشته و درصد بقای گروه‌های تیمار مشابه گروه کنترل و در همه موارد بدون تغییر معنی‌دار مشاهده شد(نمودار ۱). بنابراین بر اساس تجارب قبلی(۱۵، ۱۶) و نتایج این تحقیق غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به منظور تیمار سلول‌ها در آزمایشات بررسی IL-6 و بیان ژن انتخاب شد.



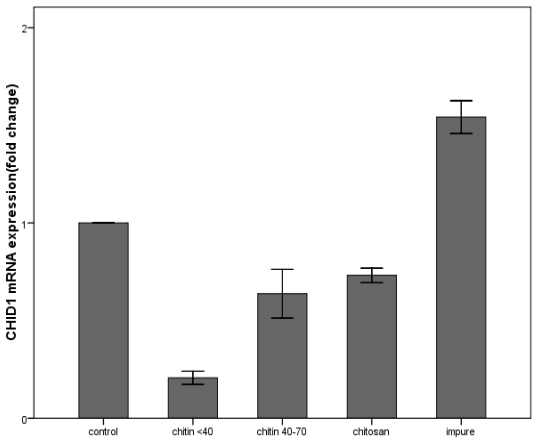
نمودار ۱. عدم وجود اثر توکسیک میکروپارتیکل ها دربررسی تأثیر غلظت های مختلف انواع میکروپارتیکل ها بر بقای سلولی به روش نوترال رد.

[Downloaded from jams.arakmu.ac.ir on 2023-12-06]

تولید IL-6 و تاثیر میکروپارتیکل‌های مختلف بر بیان ژن CHID

تیمار کشت مختلط لکوسیتی به مدت ۴۸ ساعت در حضور انواع میکروپارتیکل‌های کیتینی قرار گرفت. میزان IL-6 در مایع رویی کشت سلول حتی پس از ۲۰ بار رقیق سازی مایع رویی کشت سلول بالاتر از بیشترین مقدار استاندارد بود که مبین میزان بیش از حد IL-6 در محیط واکنش و بروز واکنش مختلط لکوسیتی بود. اما در این شرایط، مقایسه اثر تیمارهای مختلف بر میزان IL-6 امکان پذیر نشد.

نتایج بررسی بیان ژن (نمودار ۲) نشان داد که میکروپارتیکل‌های کوچک کیتین برخلاف میکروپارتیکل‌های متوسط، ناخالص و کیتوسان، کاهش بیان ژن CHID1 را به صورت معنی‌داری رقم زدند(p=۰/۰۰۴). نسبتی معادل ۰/۲۲۴ با سطح اطمینان(۰/۸۸۹-۰/۰۳۷ CI، ۹۵ درصد) از بیان ژن در قیاس با کنترل، در گروه تیمار شده با میکروپارتیکل‌های کوچک کیتین مشاهده شد که نشان دهنده کاهش معنی‌دار بیان ژن CHID1 است. این نسبت برای گروه میکروپارتیکل‌های متوسط معادل ۰/۵۷۵، برای کیتوزان ۰/۷۱۳و برای کیتین ناخالص معادل ۱/۵۸۴ بود که البته در هیچ یک از این موارد این نسبت‌ها به معنای افزایش معنی‌دار بیان ژن CHID1 نبود(نمودار ۲).



نمودار۲. تغییر بیان ژن CHID1 در کشت مختلط سلول‌های تک هسته‌ای بعد از تیمار با میکروپارتیکل‌های مختلف کیتینی(*p<۰/۰۵).

بحث

این تحقیق نشان دادکه در مواجه با شرایط التهابی، تنها میکروپارتیکل‌های زیر ۴۰ میکرون کیتین قادر به کاهش بیان ژن CHID1 – ژنی که افزایش بیان آن در هر دو نوع پاسخ التهابی T_H1 و T_H2 دیده شده است، بودند(۱۴). اثرات متفاوت ایمونولوژیک میکروپارتیکل‌های کیتین را به تفاوت در اندازه آن‌ها نسبت می‌دهند(۱۷). ذرات بزرگ‌تر از ۱۰۰ میکرون و نانوپارتیکل‌های کیتین و کیتوسان را فاقد اثرات تحریک ایمنی می‌دانند. ولی پارتیکل‌های ۱ تا ۷۰ میکرون را واجد خواص تحریک ایمنی بیان کرده‌اند(۲). از این رو، در این مطالعه میکروپارتیکل‌های کیتین در دو سایز متوسط (۴۰ تا ۷۰ میکرون) و کوچک (کوچک‌تر از ۴۰ میکرون) به کار برده شدند. نتایج حاکی از آن است که میکروپارتیکل‌های متوسط برخلاف میکروپارتیکل‌های کوچک، قادر به کاهش بیان CHID1 در شرایط التهابی نیستند. گروه داسیلوا در سال ۲۰۰۹ مشاهده کردند که هر دو پارتیکل‌های کوچک و متوسط، القاگر تولید TNF-α از طریق مسیر TLR2 و NF-kβ از ماکروفاژهای صفاقی موشی که ذرات را به صورت استنشاقی دریافت کرده بود، هستند. ولی تنها میکروپارتیکل‌های زیر ۴۰ میکرون منجر به القا تولید IL-10 از طریق مسیر Dectin-1 می‌شوند(۱۷). یافته ما مبنی بر پاسخ متفاوت میکروپارتیکل‌هایی با اندازه متفاوت و اثر میکروپارتیکل‌های کوچک کیتین در کاهش بیان ژن CHID1 و احتمالا تخفیف التهاب با این تحقیق تطابق دارد.

تفاوت اصلی کیتین و کیتوسان درجه استیلاسیون آن‌ها می‌باشد. کیتوسان (فرم داستیله کیتین) در بسیاری از خواص بیولوژیک متفاوت از کیتین عمل می‌کند؛ از جمله این که کیتوسان حلالیت، ویسکوزیته، زیست سازگاری، قابلیت چسبندگی به سطوح مخاطی و خاصیت آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به کیتین دارد. اما کیتین و کیتوسان‌های با میزان داستیلاسیون پایین و وزن مولکولی پایین با سرعت بیشتری در بدن تجزیه شده و متعاقباً می‌توانند یک واکنش التهابی را تعدیل نمایند(۱۸). براساس یافته‌های

[Downloaded from jams.arakmu.ac.ir on 2023-12-06]

ما نیز نشان می‌دهد که کیتین بیش از کیتوسان می‌تواند در یک واکنش ایمونولوژیک مداخله نماید. مطالعات مختلف به پتانسیل متفاوت کیتین و کیتوسان در القا پاسخ ایمنی اشاره دارند؛ از جمله مطالعات بواتر در سال‌های ۲۰۱۱ و ۲۰۱۴ نشان می‌دهد که کیتوسان و نه کیتین در فعال کردن اینفلامازوم در ماکروفاژها از طریق اثر گذاری بر فاگوسیتوز موثر است(۱۹، ۲۰). این در حالی است که مطالعات دیگری وجود دارد که اثر گذاری کیتین به عنوان یک تعدیل کننده پاسخ ایمنی را اثبات کرده‌اند، از جمله مجموعه مطالعاتی که به سرپرستی شیباتا یکی از پیشگامان مطالعه اثرات تعدیل ایمنی میکروپارتیکل‌های کیتین صورت گرفت، حکایت از این دارد که ذرات قابل فاگوسیتوز کیتین خاصیت ادجوانتی داشته و سیستم ایمنی را تحریک می‌نماید(۲۱، ۲۲). مطالعات اخیری که تاکنون به منظور بررسی قابلیت تعدیل ایمنی کیتین به صورت درون تنی و برون تنی انجام داده‌ایم(۱۵، ۱۶) نیز پتانسیل تعدیلی میکروپارتیکل‌های کیتینی را بر پاسخ‌های ایمنی نشان داده است و با استناد به نتایج تحقیق فعلی به نظر می‌رسد کیتین بیش از کیتوسان در شرایط التهابی قادر به مداخله در واکنش‌های ایمنی و تعدیل آن‌ها باشد.

با توجه به این که برخی مطالعات که البته اکثر آن‌ها از میکروپارتیکل‌های با سایز بیش از ۴۰ میکرون استفاده کرده‌اند، آلرژی زایی کیتین را مورد تاکید قرار داده‌اند(۳، ۵) و نیز با توجه به شیوع بالای آسم در افرادی که با مواد کیتینی کار می‌کنند(۲۳، ۲۴)، این فرض مطرح است که کیتین موجود در ساختار که با پروتئین‌ها و نمک‌ها همراه است ممکن است متفاوت از کیتین فراوری شده در تحریک سیستم ایمنی عمل نماید. از این رو، در این تحقیق از پوسته میگو که فرآیند نمک‌زدایی و پروتئین‌زدایی را طی نکرده بود، به عنوان شکل ناخالص کیتین استفاده شد. بر مبنای نتایج حاصل به نظر می‌رسد کیتین نمک‌زدایی و پروتئین‌زدایی نشده بر خلاف کیتین نسبتاً خالص تجاری قادر به مهار بیان ژن CHID1 نیست. به بیان دیگر در مهار بیان این ژن موثر در التهاب، میکروپارتیکل کوچک کیتین و نسبتاً خالص موثر بود و این مسئله شاهدی بر تأثیر درجه خلوص کیتین بر قابلیت تعدیل پاسخ‌های ایمنی است. از این رو شاید بتوان این فرض را مطرح کرد که اثرات ایمونولوژیک کیتین فرآوری شده با کیتین موجود در ساختار طبیعی متفاوت است و هیچ‌گونه نگرانی از بابت آلرژی‌زا بودن میکروپارتیکل‌های کوچک کیتین در طراحی داروها یا استفاده از آن‌ها به عنوان حامل دارو وجود ندارد.

مسیر ورود کیتین و نوع سلوهای پاسخ دهنده نیز مهم هستند و ممکن است در مواجه با سلول‌های مختلف نتایج متفاوتی حاصل شود. در مطالعه‌ای سلول‌های اپی تلیال ریوی به دنبال اتصال به میکروپارتیکل‌های کوچک کیتین، CCL2 آزاد کردند که منجربه تمایز ماکروفاژهای آلترناتیو شد(۴). و یا تجویز خوراکی میکروپارتیکل‌های کوچک کیتین در مطالعه گروه ناگاتانی باعث افزایش تولید IL-10 در روده‌ی مدل موشی کولیت و بهبود آن‌ها گردید(۲۵). از این رو می‌بایست اثرگذاری میکروپارتیکل‌های کوچک کیتینی در مدل‌های حیوانی با توجه به مسیرهای تجویز مختلف و در مدل‌های آزمایشگاهی با نظر به نوع سلول پاسخ دهنده مورد تفسیر قرار گیرد تا علت تناقضات در مطالعات مختلف مشخص گردد.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که اندازه، ساختار(میزان استیلاسیون) و درجه خلوص میکرو پارتیکل‌های کیتینی در تحت تاثیر قراردادن بیان ژن شبه کیتیناز CHID1 موثرند وکیتین به عنوان جز اصلی متصل شونده به کیتینازها وشبه کیتینازها، می‌تواند به عنوان یک تنظیم کننده(افزاینده یا کاهنده) بیان ژن شبه کیتینازها عمل کند و احتمالا از این طریق در پاسخ‌های ایمنی مداخله نماید. در حال حاضر، مطالعات کلینیکی مربوط به کاربرد اسپری مبتنی بر میکروپارتیکل‌های کوچک کیتین به استناد مطالعات قبلی که در موش‌های آزمایشگاهی خواص ضد آلرژیک را اثبات کرده‌اند(۲۶، ۲۷) در حال انجام است(۲۸). پیشنهاد می‌شود در این گونه مطالعات به منظور ارزیابی

[Downloaded from jams.arakmu.ac.ir on 2023-12-06]

دقیق‌تر اثر التهابی یا ضد التهابی میکروپارتیکل‌های کیتینی سنجش میزان کیتینازها و شبه کیتینازها که افزایش برخی از آن‌ها در بیماران آلرژیک گزارش شده است(۲۹، ۳۰) نیز صورت گیرد.

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به عدم بررسی تاثیر میکروپارتیکل‌های مختلف کیتینی بر روی بیان ژن CHID1 در کشت سلول‌های تک هسته‌ای به تنهایی اشاره کرد، چرا که در آن صورت با مقایسه با نتایج فعلی مربوط به کشت مختلط، امکان نتیجه‌گیری بهتری در خصوص تاثیر این پارتیکل‌ها بر شرایط التهابی فراهم بود.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم معصومه علی محمدی است که در قالب طرح پژوهشی در معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با کد ثبت ۶۱۴۲ تصویب گشت بدین وسیله از حمایت مالی آن معاونت و هم‌چنین از همکاران گروه ایمونولوژی به ویژه سرکار خانم دکتر ستاری به خاطر اهداء سخاوتمندانه کیت الیزا کمال تشکر را داریم. هم‌چنین از جناب آقای حسن دربندی و سرکار خانم سریرا شهنواز که درمراحل اجرای این تحقیق مساعدت نمودند سپاس‌گزاری می‌شود.

منابع

1. Lee CG, Da Silva CA, Lee J-Y, Hartl D, Elias JA. Chitin regulation of immune responses: an old molecule with new roles. Current opinion in immunology. 2008; 20(6): 684-9.
2. Da Silva CA, Hartl D, Liu W, Lee CG, Elias JA. TLR-2 and IL-17A in chitin-induced macrophage activation and acute inflammation. The Journal of immunology. 2008; 181(6): 4279-86.
3. Reese TA, Liang H-E, Tager AM, Luster AD, Van Rooijen N, Voehringer D, et al. Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. Nature. 2007; 447(7140):92-6.
4. Roy RM, Wüthrich M, Klein BS. Chitin elicits CCL2 from airway epithelial cells and induces CCR2-dependent innate allergic inflammation in the lung. The Journal of immunology. 2012; 189(5): 2545-52.
5. Van Dyken SJ, Mohapatra A, Nussbaum JC, Molofsky AB, Thornton EE, Ziegler SF, et al. Chitin activates parallel immune modules that direct distinct inflammatory responses via innate lymphoid type 2 and γδ T cells. Immunity. 2014; 40(3):414-24.
6. Kogiso M, Nishiyama A, Shinohara T, Nakamura M, Mizoguchi E, Misawa Y, et al. Chitin particles induce size-dependent but carbohydrate-independent innate eosinophilia. Journal of leukocyte biology. 2011; 90(1):167-76.
7. Lee CG, Da Silva CA, Cruz CSD, Ahangari F, Ma B, Kang M-J, et al. Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. Annual review of physiology. 2011; 73: 479-501.
8. Funkhouser JD, Aronson NN. Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. BMC evolutionary biology. 2007; 7(1):96.
9. Cruz CSD, Liu W, He CH, Jacoby A, Gornitzky A, Ma B, et al. Chitinase 3-like-1 promotes Streptococcus pneumoniae killing and augments host tolerance to lung antibacterial responses. Cell host & microbe. 2012; 12(1):34-46.
10. Lee CG. Chitin, chitinases and chitinase-like proteins in allergic inflammation and tissue remodeling. Yonsei medical journal. 2009; 50(1): 22-30.
11. Lee CG, Elias JA. Role of breast regression protein-39/YKL-40 in asthma and allergic responses. Allergy, asthma & immunology research. 2010; 2(1):20-7.
12. Meng G, Zhao Y, Bai X, Liu Y, Green TJ, Luo M, et al. Structure of human stabilin-1 interacting chitinase-like protein (SI-CLP) reveals a saccharide-binding cleft with lower sugar-binding selectivity. Journal of Biological Chemistry. 2010; 285(51):39898-904.
13. Wagener J, Malireddi RS, Lenardon MD, Köberle M, Vautier S, MacCallum DM, et al. Fungal chitin dampens inflammation through IL-10 induction mediated by NOD2 and TLR9 activation. PLoS Pathog. 2014;10(4):e1004050.

[Downloaded from jams.arakmu.ac.ir on 2023-12-06]

14. Xiao W, Meng G, Zhao Y, Yuan H, Li T, Peng Y, et al. Human Secreted Stabilin-1-Interacting Chitinase-like Protein Aggravates the Inflammation Associated With Rheumatoid Arthritis and Is a Potential Macrophage Inflammatory Regulator in Rodents. Arthritis & Rheumatology. 2014; 66(5):1141-52.
15. Ghotloo S, Hoseini MHM, Alimohammadian MH, Khaze V, Memarnejadian A, Rostami A. Immunomodulatory effects of chitin microparticles on Leishmania major-infected BALB/c mice. Parasitology international. 2015; 64(2): 219-21.
16. Hoseini MHM, Moradi M, Alimohammadian MH, Shahgoli VK, Darabi H, Rostami A. Immunotherapeutic effects of chitin in comparison with chitosan against Leishmania major infection. Parasitology international. 2016; 65(2):99-104.
17. Da Silva CA, Chalouni C, Williams A, Hartl D, Lee CG, Elias JA. Chitin is a size-dependent regulator of macrophage TNF and IL-10 production. The Journal of immunology. 2009; 182(6): 3573-82.
18. Dash M, Chiellini F, Ottenbrite R, Chiellini E. Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. Progress in polymer science. 2011; 36(8):981-1014.
19. Bueter CL, Lee CK, Rathinam VA, Healy GJ, Taron CH, Specht CA, et al. Chitosan but not chitin activates the inflammasome by a mechanism dependent upon phagocytosis. Journal of Biological Chemistry. 2011; 286(41): 35447-55.
20. Bueter CL, Lee CK, Wang JP, Ostroff GR, Specht CA, Levitz SM. Spectrum and mechanisms of inflammasome activation by chitosan. The Journal of immunology. 2014; 192(12): 5943-51.
21. Nishiyama A, Tsuji S, Yamashita M, Henriksen RA, Myrvik QN, Shibata Y. Phagocytosis of N-acetyl-d-glucosamine particles, a Th1 adjuvant, by RAW 264.7 cells results in MAPK activation and TNF-α, but not IL-10, production. Cellular immunology. 2006; 239(2): 103-12.
22. Shibata Y, Honda I, Justice JP, Van Scott MR, Nakamura RM, Myrvik QN. Th1 adjuvant N-acetyl-D-glucosamine polymer up-regulates Th1 immunity but down-regulates Th2 immunity against a mycobacterial protein (MPB-59) in interleukin-10-knockout and wild-type mice. Infection and immunity. 2001; 69(10): 6123-30.
23. Desjardins A, Malo J-L, L'Archevêque J, Cartier A, McCants M, Lehrer SB. Occupational IgE-mediated sensitization and asthma caused by clam and shrimp. Journal of allergy and clinical immunology. 1995; 96(5): 608-17.
24. Zhang Y, Matsuo H, Morita E. Cross-reactivity among shrimp, crab and scallops in a patient with a seafood allergy. The Journal of dermatology. 2006; 33(3):174-7.
25. Nagatani K, Wang S, Llado V, Lau CW, Li Z, Mizoguchi A, et al. Chitin microparticles for the control of intestinal inflammation. Inflammatory bowel diseases. 2012; 18(9): 1698-710.
26. Bae M-J, Shin HS, Kim E-K, Kim J, Shon D-H. Oral administration of chitin and chitosan prevents peanut-induced anaphylaxis in a murine food allergy model. International journal of biological macromolecules. 2013; 61:164-8.
27. Ozdemir C, Yazi D, Aydogan M, Akkoc T, Bahceciler N, Strong P, et al. Treatment with chitin microparticles is protective against lung histopathology in a murine asthma model. Clinical & Experimental Allergy. 2006; 36(7): 960-8.
28. Ye Y-L, Chuang Y-H, Chiang B-L. Strategies of mucosal immunotherapy for allergic diseases. Cellular & molecular immunology. 2011; 8(6):453-61.
29. Hartl D, Lee CG, Da Silva CA, Chupp GL, Elias JA. Novel biomarkers in asthma: chemokines and chitinase-like proteins. Current opinion in allergy and clinical immunology. 2009; 9(1):60-6.
30. Park SJ, Jun YJ, Kim TH, Jung JY, Hwang GH, Jung KJ, et al. Increased expression of YKL-40 in mild and moderate/severe persistent allergic rhinitis and its possible contribution to remodeling of nasal mucosa. American journal of rhinology & allergy. 2013; 27(5):372-80.

[Downloaded from jams.arakmu.ac.ir on 2023-12-06]