

Downregulating the Expression of CHID1 by Chitin Microparticles Mixed Leukocyte Culture

Masumeh Alimohammadi¹, Farshid Yeganeh², 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 derivatives 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 (<40 μ) and medium(40-70 μ) 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 μ g/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

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 ایمنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۲- استادیار، گروه ایمنولوژی، 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 مرز 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 ($p=0/004$)، در حالی که سایر میکروپارتیکل‌ها تغییر معنی‌داری 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 و تعدیل 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

مقدمه

کیتین پس از سلولز فراوانترین بیوپلیمر موجود در طبیعت است و موجودات مختلفی در ساختار خود کیتین دارند و برخی از آلرژنهای شایع شناخته شده به ارگانسیمهای 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 می کند. در سطح سلولهای ایمنی گیرندههایی چون TLR-2، Dectin-1، مانوز و هم چنین فیکولینها مسئول شناسایی آن می باشند(۲). تحقیقات زیادی وجود دارند که اثر تحریکی کیتین بر سیستم ایمنی را به صورت تحریک پاسخهای TH1، فعال سازی کلاسیک ماکروفاژها و مقابله با بروز آلرژی بیان نموده اند. 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 TH2 و آلرژی زا بودن دارند(۳-۵). بر اساس مطالعات انجام شده، بخشی از این تناقضات مربوط به تفاوت در اندازه میکروپارتیکل های کیتین است(۶).

علی رغم 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 تجزیه ای ندارند، در سلولهای انسانی وجود دارند. کیتینازها و پروتئینهای شبه کیتیناز، اعضای خانواده ژنی گلیکوزیل هیدرولاز ۱۸ (GH 18) می باشند(۷). GH 18 یک خانواده ژنی باستانی است که در گونه های مختلف از گیاهان تا پستانداران وجود دارد(۸). حفظ این خانواده پروتئینی در طی زمان تکاملی و گونه ها بیانگر نقش ضروری آنها در بیولوژی می باشد. 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 هموستاز بافتی را نشان داده اند(۹-۱۱). CHID1 (حاوی دومین کیتیناز ۱) آخرین GH18 شناخته شده در انسان است و بیان پروتئین آن یعنی SI-CLP (پروتئین شبه کیتیناز

کنشگر با استایلین) توسط ماکروفاژها، لنفوسیت های B، T و برخی از رده های 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 می باشد(۱۲).

کیتین به عنوان جز اصلی متصل شونده به کیتینازها و شبه کیتینازها، ممکن است به عنوان یک تنظیم کننده (افزاینده یا کاهشنده) 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 میکروپارتیکل های 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. هم چنین از کیتوسان - مشتق داستیله کیتین - به منظور بررسی نقش میزان استیلاسیون و هم چنین کیتین ناخالص به منظور بررسی نقش پروتئینهای همراه نیز در کنار میکروپارتیکل های کیتین استفاده شد. بدین منظور کشت مختلط لکوسیتی برای القای یک واکنش ایمنی قوی صورت پذیرفت و اثر تیمار با میکروپارتیکل های کیتینی مختلف بر سنجش بیان ژن CHID1 مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روشها

تهیه میکروپارتیکل های 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 دقیقه ای با سونیکاتور، سونیکه شد. سوسپانسیون سونیکه شده به ترتیب از سه صافی ۴۰، ۷۰ و

مختلف استفاده شد. هر آزمایش حداقل در سه نوبت مجزا انجام شد.

بررسی بقای سلولی

بعد از ۴۸ ساعت تیمار سلولها با میکرو پارتیکل های کیتینی مختلف در غلظت های ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بقای سلولی در گروه های 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 لیزوزیم های سلول های زنده قرار می گیرد. پس از لیز سلولها در حلال آلی و آزادسازی رنگ ذخیره شده در لیزوزومها، شدت رنگ تولید شده با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری اندازه گیری می گردد. شدت رنگ رابطه مستقیمی با تعداد سلول های زنده دارد. همچنین برای تأیید این روش به موازات آن، آزمایش آپتوتوز 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 میلی لیتر اضافه گردید و سلولها فوراً با میکروسکوپ فلورسنت مجهز به فیلتر ۴۸۰/۳۰ جهت تهییج رنگ و آئینه دی کروماتیک LP ۵۰۵ و فیلتر ۵۳۵/۴۰ جهت مشاهده نور فلورسنت ساطع شده بررسی شدند.

اندازه گیری IL-6

به منظور حصول اطمینان از رخ داد واکنش مختلط لکوسیته، میزان IL-6 در مایع رویی کشت سلولها در پایان انکوباسیون مورد سنجش قرار گرفت. بدین منظور در سوپرناتانت کشت سلولی از روش الیزا (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 زنجیره ای پلی مرز زمان واقعی استفاده شد و نسبت بیان ژن CHID1 به ژن خانه دار در هر یک از گروه های تست با

۱۰۰ میکرونی عبور داده شد. سوسپانسیون زیر صافی ۴۰ و ذرات روی صافی ۴۰ میکرونی در دو لوله فالکون مجزا جمع آوری و با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شدند. رسوب حاصل از سانتریفوژ به مدت ۶ ساعت با دستگاه فریز درایر (Christ Alpha 1-2 LD, Uk) خشک شد. از میکروپارتیکل های کیتین در بافر فسفات، سوسپانسیون یک میلی گرم در میلی لیتر تهیه شده و اتوکلاو گردید. سوسپانسیون ذرات کیتینی، تحت شرایط استریل و زیر هود در میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری تقسیم شد و برای تیمار سلولها مورد استفاده قرار گرفت. بررسی تقریبی اندازه ذرات با بررسی میکروسکوپی صورت گرفت و بررسی دقیق تر هم چون تحقیقات پیشین (۱۶، ۱۵) با استفاده از سیستم لیزری (Malvern Master Sizer. Malvern Instruments. Ltd. Worcestershaier، بریتانیا) انجام شد. به منظور تهیه کیتین پروتئین زدایی نشده، از روش های 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 پروتئین زدایی نگردید، در آزمایشات تحت عنوان کیتین ناخالص استفاده شد.

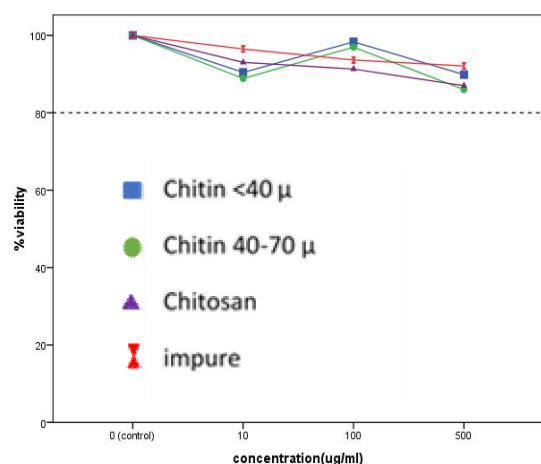
کشت مختلط سلول های تک هسته ای خون محیطی

به منظور ایجاد شرایط کشت مختلط سلول های تک هسته ای، از پنج فرد داوطلب سالم خون گیری در لوله حاوی EDTA صورت گرفت و با هم مخلوط شد. به دنبال آن جداسازی سلول های تک هسته ای (PBMCs) از این مخلوط توسط روش شیب غلظت فایکول تحت شرایط استریل انجام گرفت. پس از سنجش درصد سلول های زنده به روش تریپان بلو و شمارش سلولها با لام نئوبار، رسوب سلولی در محیط کشت کامل سوسپانسیون شده و تعداد ۱۰^۶ سلول به ازای هر چاهک از پلیت ۱۲ خانه برای آزمایشات

«تقویت» و amplification مربوط به ژن های هدف و ژن خانه دار به دست آمده از نرم افزار Rotor-Gene Q Series Software به برنامه REST وارد شد. این نرم افزار داده های مربوط به گروه های 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 معنی داری گزارش می دهد.

یافته ها

غیر توکسیک بودن میکروپارتیکل ها برای سلول ها آزمایش نوترال رد و بررسی آپوپتوز بعد از ۴۸ ساعت تیمار با میکروپارتیکل های متفاوت کیتینی در غلظت های مختلف انجام شد. در بررسی میکروسکوپی سلول ها با روش تریپان بلو در میکروسکوپ نوری و روش اتیدیوم-آکریدین در میکروسکوپ فلورسنت در تمامی غلظت های انواع میکروپارتیکل ها، همواره بیش از ۹۰ درصد سلول ها زنده بودند. آزمایش نوترال رد نیز یافته های میکروسکوپی را تأیید کرد و نشان داد که میکروپارتیکل های کیتینی در غلظت های به کار رفته اثر سایتوتوکسیک نداشته و درصد بقای گروه های تیمار مشابه گروه کنترل و در همه موارد بدون تغییر معنی دار مشاهده شد (نمودار ۱). بنابراین بر اساس تجارب قبلی (۱۵، ۱۶) و نتایج این تحقیق غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر به منظور تیمار سلول ها در آزمایشات بررسی IL-6 و بیان ژن انتخاب شد.



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

نسبت بیان این ژن به ژن خانه دار 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 و کمی، 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 ژن های هدف (CHID1) و خانه دار (HPRT1) از بانک اطلاعاتی Ensemble برداشت شد و پرایمرهای پیش رو (5'-GGGGCTCAACTTCTATGGTATGGA-3') و پس رو (5'-TCCCCTGCGGCTCTTCTTGT-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 خانه دار از طریق نرم افزار Beacon designer طراحی شدند. واکنش زنجیره ای پلی مرز زمان واقعی به روش سایرگرین انجام شد. با استفاده از Master Mix (آمپلیکن، دانمارک)، پرایمرها، آب دیونیزه (عاری از RNase و DNase) و cDNA سنتز شده، واکنش زنجیره ای پلی مرز زمان واقعی در برنامه دمایی مناسب مطابق با پیشنهاد موجود در کیت مسترمیکس (جدول ۱) برای ژن های هدف و مرجع در گروه های تیمار و کنترل راه اندازی گردید.

جدول ۱. برنامه دمایی دستگاه واکنش زنجیره ای پلی مرز زمان واقعی

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

برای تحلیل داده های واکنش زنجیره ای پلی مرز زمان واقعی از دو نرم افزار Rotor-Gene Q Series و REST استفاده شد. بدین منظور دو پارامتر «رشد سریع» و

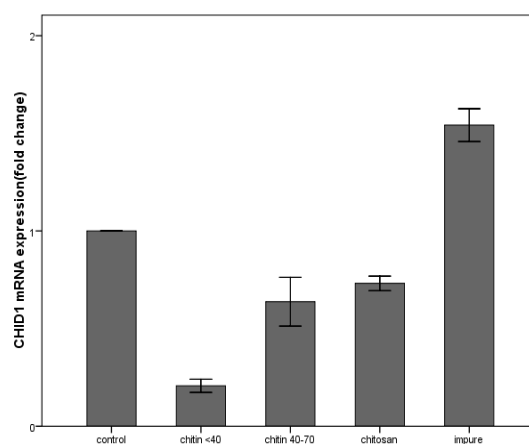
بحث

این تحقیق نشان داد که در مواجهه با شرایط التهابی، تنها میکروپارتیکل های 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 میکروپارتیکل های کیتین را به تفاوت در اندازه آن ها نسبت می دهند (۱۷). ذرات بزرگتر از ۱۰۰ میکرون و نانوپارتیکل های کیتین و کیتوسان را فاقد اثرات تحریک ایمنی می دانند. ولی پارتیکل های ۱ تا ۷۰ میکرون را واجد خواص تحریک ایمنی بیان کرده اند (۲). از این رو، در این مطالعه میکروپارتیکل های 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 میکروپارتیکل های متوسط برخلاف میکروپارتیکل های کوچک، قادر به کاهش بیان CHID1 در شرایط التهابی نیستند. گروه داسیلوا در سال ۲۰۰۹ مشاهده کردند که هر دو پارتیکل های کوچک و متوسط، الفاکر تولید $TNF-\alpha$ از طریق مسیر $TLR2$ و $NF-k\beta$ از ماکروفاژهای صفاقی موشی که ذرات را به صورت استنشاقی دریافت کرده بود، هستند. ولی تنها میکروپارتیکل های زیر ۴۰ میکرون منجر به القا تولید $IL-10$ از طریق مسیر $Dectin-1$ می شوند (۱۷). یافته ما مبنی بر پاسخ متفاوت میکروپارتیکل هایی با اندازه متفاوت و اثر میکروپارتیکل های کوچک کیتین در کاهش بیان ژن CHID1 و احتمالاً تخفیف التهاب با این تحقیق تطابق دارد. تفاوت اصلی کیتین و کیتوسان درجه استیلاسیون آنها می باشد. کیتوسان (فرم داستیله کیتین) در بسیاری از خواص بیولوژیک متفاوت از کیتین عمل می کند؛ 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 کیتوسان های با میزان داستیلاسیون پایین و وزن مولکولی پایین با سرعت بیشتری در بدن تجزیه شده و متعاقباً می توانند یک واکنش التهابی را تعدیل نمایند (۱۸). براساس یافته های

تولید IL-6 و تاثیر میکروپارتیکل های مختلف بر بیان ژن CHID1

تیمار کشت مختلط لکوسیتی به مدت ۴۸ ساعت در حضور انواع میکروپارتیکل های 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 میکروپارتیکل های کوچک کیتین برخلاف میکروپارتیکل های متوسط، ناخالص و کیتوسان، کاهش بیان ژن CHID1 را به صورت معنی داری رقم زدند ($p=0/004$). نسبتی معادل $0/224$ با سطح اطمینان $0/37-0/889$ ، CI، ۹۵ درصد) از بیان ژن در قیاس با کنترل، در گروه تیمار شده با میکروپارتیکل های کوچک کیتین مشاهده شد که نشان دهنده کاهش معنی دار بیان ژن CHID1 است. این نسبت برای گروه میکروپارتیکل های متوسط معادل $0/575$ ، برای کیتوزان $0/713$ و برای کیتین ناخالص معادل $1/584$ بود که البته در هیچ یک از این موارد این نسبت ها به معنای افزایش معنی دار بیان ژن CHID1 نبود (نمودار ۲).



نمودار ۲. تغییر بیان ژن CHID1 در کشت مختلط سلول های تک هسته ای بعد از تیمار با میکروپارتیکل های مختلف کیتینی ($p < 0/05$).

و نسبتاً خالص موثر بود و این مسئله شاهدهی بر تأثیر درجه خلوص کیتین بر قابلیت تعدیل پاسخ های 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 هیچ گونه نگرانی از بابت آلرژی زا بودن میکروپارتیکل های کوچک کیتین در طراحی داروها یا استفاده از آنها به عنوان حامل دارو وجود ندارد.

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

نتیجه گیری

در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که اندازه، ساختار (میزان استیلاسیون) و درجه خلوص میکرو پارتیکل های کیتینی در تحت تاثیر قراردادن بیان ژن شبه کیتیناز CHID1 موثرند و کیتین به عنوان جز اصلی متصل شونده به کیتینازها و شبه کیتینازها، می تواند به عنوان یک تنظیم کننده (افزاینده یا کاهنده) بیان ژن شبه کیتینازها عمل کند و احتمالاً از این طریق در پاسخ های ایمنی مداخله نماید. در حال حاضر، مطالعات کلینیکی مربوط به کاربرد اسپری مبتنی بر میکروپارتیکل های کوچک کیتین به استناد مطالعات قبلی که در موش های آزمایشگاهی خواص ضد آلرژیک را اثبات کرده اند (۲۶، ۲۷) در حال انجام است (۲۸). پیشنهاد می شود در این گونه مطالعات به منظور ارزیابی

ما نیز نشان می دهد که کیتین بیش از کیتوسان می تواند در یک واکنش ایمونولوژیک مداخله نماید. مطالعات مختلف به پتانسیل متفاوت کیتین و کیتوسان در القا پاسخ ایمنی اشاره دارند؛ از جمله مطالعات بوآتر در سال های ۲۰۱۱ و ۲۰۱۴ نشان می دهد 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 کرده اند، از جمله مجموعه مطالعاتی که به سرپرستی شیباتا یکی از پیشگامان مطالعه اثرات تعدیل ایمنی میکروپارتیکل های کیتین صورت گرفت، حکایت از این دارد که ذرات قابل فاگوسیتوز کیتین خاصیت ادجوانتی داشته و سیستم ایمنی را تحریک می نماید (۲۱، ۲۲). مطالعات اخیر که تاکنون به منظور بررسی قابلیت تعدیل ایمنی کیتین به صورت درون تنی و برون تنی انجام داده ایم (۱۵، ۱۶) نیز پتانسیل تعدیلی میکروپارتیکل های کیتینی را بر پاسخ های ایمنی نشان داده است و با استناد به نتایج تحقیق فعلی به نظر می رسد کیتین بیش از کیتوسان در شرایط التهابی قادر به مداخله در واکنش های ایمنی و تعدیل آنها باشد.

با توجه به این که برخی مطالعات که البته اکثر آنها از میکروپارتیکل های با سایز بیش از ۴۰ میکرون استفاده کرده اند، آلرژی زایی کیتین را مورد تاکید قرار داده اند (۳، ۵) و نیز با توجه به شیوع بالای آسم در افرادی که با مواد کیتینی کار می کنند (۲۳، ۲۴)، این فرض مطرح است که کیتین موجود در ساختار که با پروتئین ها و نمک ها 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 نمک زدایی و پروتئین زدایی را طی نکرده بود، به عنوان شکل ناخالص کیتین استفاده شد. بر مبنای نتایج حاصل به نظر می رسد کیتین نمک زدایی و پروتئین زدایی 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

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 $\gamma\delta$ 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.

دقیق تر اثر التهابی یا ضد التهابی میکروپارتیکل های کیتینی سنجش میزان کیتینازها و شبه کیتینازها که افزایش برخی از آن ها در بیماران آلرژیک گزارش شده است (۲۹، ۳۰) نیز صورت گیرد.

از محدودیت های این مطالعه می توان به عدم بررسی تاثیر میکروپارتیکل های مختلف کیتینی بر روی بیان ژن CHID1 در کشت سلول های تک هسته ای به تنهایی اشاره کرد، چرا که در آن صورت با مقایسه با نتایج فعلی مربوط به کشت مختلط، امکان نتیجه گیری بهتری در خصوص تاثیر این پارتیکل ها 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 هم چنین از همکاران گروه ایمنونولوژی به ویژه سرکار خانم دکتر ستاری به خاطر اهداء سخاوتمندانه کیت الیزا کمال تشکر را داریم. هم چنین از جناب آقای حسن دربندی و سرکار خانم سیرا شهنواز که در مراحل اجرای این تحقیق مساعدت نمودند سپاس گزاری می شود.

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

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, Yazici 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.