

## *Immunological Effects of Chitosan Nanoparticles on Breast Cancer Cells in Animal Model*

Neda Soleimani<sup>1\*</sup>, Ashraf Mohabati Mobarez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology & Microbial Biotechnology, Faculty of Life Sciences & Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

<sup>2</sup>Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

**\*Corresponding Author:**

**Neda Soleimani,**  
Department of Microbiology & Microbial Biotechnology, Faculty of Life Sciences & Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

Email:  
n\_soleimani@sbu.ac.ir

Received: 10 Apr, 2016

Accepted: 23 Apr, 2016

### **Abstract**

**Background and Objectives:** Cancer is one of the leading causes of death around the world with a very high degree of mortality. Conventional therapies by cytotoxic drugs have high levels of side-effects for patient. Chitosan is a biocompatible and biodegradable compound. Thus, according to the minimum systemic toxicity for peptide and drug delivery, it is considered in applied programs. In this study, the Immunological effect of chitosan nanoparticles, was investigated on breast cancer cells in animal model.

**Methods:** In this experimental model, chitosan nanoparticles were synthesized. The size and electrical charge were determined using DLS apparatus and SEM. After creation of tumor model in female BALB/c mice. Injections in the test and control groups, were performed intraperitoneally. IL-4 and IFN- $\gamma$  were assayed using ELISA method to investigate the immunomodulatory effects of the nanoparticles.

**Results:** Electric charge and size of the nanoparticles were determined and confirmed to be +11 mv and 200 nm, respectively. The nanoparticle-treated group produced large amounts of IFN- $\gamma$  (213 pg/ml), while IL-4 level decreased ( $p < 0.5$ ).

**Conclusion:** These nanoparticles has the potential to shift immune responses from a Th2 to Th1 through IFN- $\gamma$  production. Hence, these nanoparticles may be an appropriate and effective candidate for cancer therapy.

**Keywords:** Neoplasms; Nanoparticles; Immune system.

## اثرات ایمونولوژیکی نانوذرات کیتوزان بر سلول‌های سرطانی سینه در مدل حیوانی

ندا سلیمانی<sup>۱\*</sup>، اشرف محبتی مبارز<sup>۲</sup>

### چکیده

**زمینه و هدف:** سرطان از علل عمده مرگ و میر در سراسر جهان است. درمان‌های دارویی، متعارف با استفاده از داروهای سیتوتوکسیک دارای سطح بالایی از عوارض جانبی برای بیمار هستند. کیتوزان یک ترکیب زیست سازگار و زیست تخریب پذیر می‌باشد. بنابراین، با توجه به حداقل مسمومیت سیستمیک برای تحویل پپتید یا دارو، در برنامه‌های کاربردی مطرح است. در این مطالعه اثرات ایمونولوژیکی نانوذرات کیتوزان بر سلول‌های سرطانی سینه در مدل حیوانی بررسی گردید.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، نانوذرات کیتوزان سنتز شد. سپس با دستگاه DLS و SEM، اندازه و بار الکتریکی آن شناسایی گردید. پس از ایجاد مدل توموری در موش بالبی ماده، تزریقات گروه تست و کنترل به روش داخل صفاقی انجام شد. برای بررسی اثرات ایمونومدولاتوری نانوذرات، IL-4 و IFN- $\gamma$  به روش ELISA سنجش شد.

**یافته‌ها:** بار الکتریکی و سایز نانوذرات +۱۱ و سایز نانوذرات، حدود ۲۰۰ نانومتر تعیین و تأیید گردید. گروه‌های تیمار شده با نانوذرات در اثر تحریک، مقدار زیادی IFN- $\gamma$  (۲۱۳ پیکوگرم بر میلی لیتر) تولید کردند، در حالی که سطح IL-4 کاهش داشت ( $p < 0/5$ ).

**نتیجه گیری:** این نانوذرات با داشتن پتانسیل تغییر پاسخ‌های سیستم ایمنی، سبب تغییر فنوتیپ از Th2 به فنوتیپ Th1 به واسطه تولید اینترفرون - گاما می‌شود، لذا این نانوذرات ممکن است به عنوان کاندید مناسب و مؤثر جهت درمان سرطان در آینده باشد.

**کلید واژه‌ها:** سرطان؛ نانوذرات؛ سیستم ایمنی.

گروه میکروبی‌شناسی و زیست فناوری میکروبی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

\*نویسنده مسئول مکاتبات:

ندا سلیمانی، گروه میکروبی‌شناسی و زیست فناوری میکروبی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

n\_soleimani@sbu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۲۲

تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۴

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Soleimani N, Mohabati Mobarez A. Immunological effects of chitosan nanoparticles on breast cancer cells in animal model.

Qom Univ Med Sci J 2017;11(1):1-9. [Full Text in Persian]

## مقدمه

سرطان در نتیجه تقسیم غیرقابل کنترل سلول‌ها به وجود می‌آید که اثرات عوامل محیطی و اختلالات ژنتیکی مسبب آن است. علاوه بر مواد شیمیایی؛ اشعه آفتاب، امواج UV، ویروس‌ها و باکتری‌ها نیز در تولید انواع سرطان نقش مهمی دارند. سرطان سینه (Breast cancer)، شایع‌ترین بیماری بدخیم در میان زنان و یکی از عوامل مهم مرگ و میر در کشورهای توسعه‌یافته و در حال توسعه است (۱). هرچند ایران از جمله کشورهایی است که در آن میزان بروز سرطان پستان نسبت به بقیه کشورها کمتر می‌باشد، اما افزایش میزان آن در سالهای اخیر، این بیماری را به عنوان رایج‌ترین بدخیمی در میان زنان ایرانی نشان داده است (۲). علی‌رغم وجود روش‌های درمانی مختلف، هنوز هم جراحی به عنوان اولین روش درمانی برای سرطان سینه محسوب می‌شود. درمان‌های رایج ممکن است اندازه تومور را کاهش دهند، اما گذرا بوده و بر بقای بیمار اثر مثبتی ندارند و احتمال عود بیماری نیز وجود دارد (۳-۸). عوارض جانبی بالا، اختصاصیت پایین و احتمال بروز مجدد بیماری، از محدودیت‌های روش‌های فوق می‌باشد، لذا نیاز به جایگزینی درمان‌های مؤثرتر، اختصاصی‌تر و دارای عوارض جانبی کمتر، بسیار احساس می‌شود. شیوع بالای سرطان پستان در سنین پایین در ایران و مشکلات ناشی از این بیماری برای خانواده‌ها، لزوم بررسی تحقیقات انجام‌شده برای معرفی ترکیبات جدید درمانی با خاصیت ایمونومدولاتوری و عوارض جانبی کمتر را مطرح می‌سازد. امروزه، ترکیباتی که خاصیت ایمونومدولاتوری دارند، مطرح است که از جمله این ترکیبات می‌توان به کیتوزان اشاره کرد (۹). کیتین و مشتقات آن همچون کربوکسی متیل کیتین و دی‌هیدروکسی پروپیل کیتین دارای اثرات تعدیل ایمنی (ایمونومدولاتوری) هستند و با تأثیر بر ایمنی ذاتی و اکتسابی سبب افزایش فعالیت سلول‌ها، ترشح سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها می‌شوند. با توجه به اینکه کیتین و مشتقات آن در ساختار بدن انسان وجود ندارد، حضور آن برای سیستم ایمنی، یک فعال‌کننده محسوب می‌شود و در سطح سلول‌های ایمنی، گیرنده‌هایی چون Detectin-1، TLR-2 و مانوز، مسئول شناسایی آن برای فعال‌سازی هستند (۱۰، ۱۲).

همانند کموتاکسی و فعال‌سازی ماکروفاژها را دارند. همچنین باعث ترشح سایتوکاین‌های تحریکی می‌شوند. این پلیمر، پاسخ آنتی‌بادی را افزایش داده و سلول‌های T سایتوتوکسیک و نیز سلول‌های کشنده طبیعی را فعال می‌کند. کیتوزان سمیت بسیار پایینی را در سلول‌های نرمال نشان داده است (۱۱). این پلیمر یک ترکیب زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر است (۱۳). بنابراین، با توجه به حداقل مسمومیت، سیستمیک در برنامه‌های کاربردی مطرح است. همچنین این نانوذرات قادر است ضمن افزایش میزان پاسخ سیستم ایمنی، در جهت‌دهی و هدایت این سیستم به سمت ایجاد نوع خاصی از پاسخ نیز مؤثر باشد. با توجه به اهمیت سیستم ایمنی بدن، به‌ویژه پاسخ‌های ایمنی سلولی در دفاع ضد توموری و غلبه آنها بر ایمنی هومورال که عامل مهمی در دفاع ضد توموری است؛ در این مطالعه سایتوکاین‌های معرف پاسخ‌های ایمنی سلولی تیپ ۱ و ۲ (IL-4 و IFN $\gamma$ ) بررسی گردید.

## روش بررسی

در این مطالعه تجربی، برای تولید و آماده‌سازی نانوذرات، ابتدا ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از کیتوزان در محلول ۱٪ اسید استیک حل شد. محلول کیتوزان بر روی استیر با دور ۳۰۰ در دمای اتاق قرار گرفت، سپس تری پلی فسفات (TPP) ۰/۱٪ در آب مقطر حل شد. محلول TPP به یک‌باره به روش Flush mix به آن اضافه گردید. نسبت حجم محلول کیتوزان به TPP، ۲:۱ بود و واکنش به مدت یک‌ساعت در این شرایط ادامه یافت. جهت بررسی خصوصیات ذرات اتصال‌یافته (شکل، اندازه، پراکندگی و یکنواختی)، از میکروسکوپ الکترونی و دستگاه ZETA SIZER مجدداً استفاده شد. نانوذرات از قطعات کیتوزان آزاد، با استفاده از سانتریفیوژ (سرعت ۱۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۵ درجه سانتیگراد) جدا گردید (۱۴).

DLS (Dynamic Light Scattering) یا Zetasizer، دستگاهی است که با استفاده از تابش نور مرئی با طول موج ۶۳۳ نانومتر به نمونه سوسپانسیون می‌تواند برخی از خواص آن را از قبیل بار الکتریکی و توزیع اندازه ذرات در ابعاد نانو اندازه‌گیری کند. به‌منظور تعیین بار الکتریکی، پراکندگی و یکنواختی نانوذرات کیتوزان از دستگاه ZETA SIZER (Malvern) استفاده شد (۱۵).

پس از حذف گلبول‌های قرمز به وسیله محلول لیزکننده، سوسپانسیون سلول‌های طحالی بر مبنای  $10^6 \times 5/0$  سلول بر میلی‌لیتر، تهیه و در پلیت‌های ۲۴ حفره‌ای و در مجاورت محیط غنی شده RPMI کشت داده شدند. سپس فیتو هم‌گلوتینین (به میزان ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به محیط کشت فوق افزوده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور حاوی ۵٪ دی‌اکسید کربن انکوبه شد. پس از این مدت محلول رویی، جمع‌آوری و در ۷۰- درجه سانتیگراد ذخیره گردید. برای سنجش سایتوکاین‌ها، از کیت R&D استفاده شد و آماده‌سازی محلول‌ها طبق دستورالعمل کیت انجام گرفت. میزان تولید سایتوکاین‌های IFN- $\gamma$  و IL-4 در سوپ رویی کشت سلول‌های طحالی به روش ELISA اندازه‌گیری شدند. محدوده اندازه‌گیری برای IL-4، کمتر از ۳ و برای IFN- $\gamma$ ، کمتر از ۱۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر بود. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول توقف (Stopping) به هر کدام از چاهک‌ها افزوده شد و سپس با استفاده از دستگاه ELISA reader، میزان جذب نوری نمونه در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید. با استفاده از نمونه استاندارد؛ کیت، منحنی استاندارد، رسم و نمونه‌های مورد آزمایش ارزیابی شدند (۱۸). جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ استفاده شد. نتایج داده‌های کمی بر اساس میانگین سه تکرار مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. داده‌های کمی از لحاظ دارابودن توزیع نرمال، بررسی و از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (برای توزیع نرمال)، و از روش Lsd (برای Post Hoc) با سطح معنی‌داری ۵٪ ( $\alpha=0/05$ ) استفاده گردید.

### یافته‌ها

سایز نانوذرات، پراکندگی و یکنواختی نانوذرات کیتوزان به وسیله دستگاه DLS (Malvern) تعیین شد. سایز نانوذرات کیتوزان به‌طور میانگین با سه تکرار، ۲۱۰ نانومتر تعیین شد. داده‌های دستگاه DLS در مورد این نمونه نشان داد بیش از ۹۵٪ از نمونه‌های مورد آزمایش در محدوده سایزی ۲۱۰ نانومتر و پیک بزرگتر قرار دارند و حدود ۵٪ از مابقی در محدوده ۷۰-۲۰ نانومتر و به‌طور میانگین ۴۵ نانومتر هستند (شکل شماره ۱).

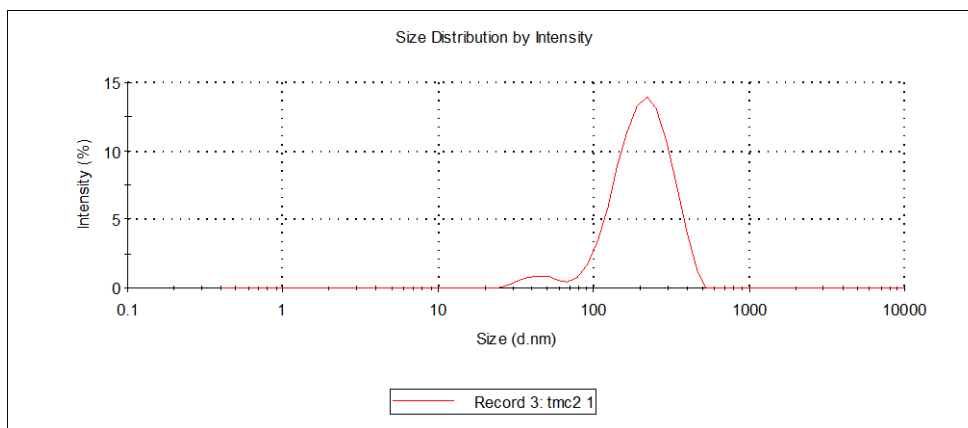
مبنای عملکرد میکروسکوپ الکترونی روبشی که به آن Scanning Electron Microscope یا به اختصار SEM نیز گفته می‌شود؛ برهمکنش پرتوی الکترونی با ماده است. پرتوهای ساطع شده از این برهمکنش می‌تواند جهت بررسی‌ها مورد استفاده قرار گیرد. همچنین به‌منظور تعیین شکل و اندازه، از میکروسکوپ الکترونی موجود در سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران استفاده گردید و این پارامترها در نانوذرات به صورت ۳ بار تکرار تعیین شدند (۱۶). در این مطالعه از رده سلولی موشی سرطانی سینه 4T1، استفاده شد. رده سلولی از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران، تهیه و در شرایط مناسب محیط کشت RPMI (شرکت Gibco) کامل (حاوی 10٪ FBS)، کشت داده شد و در ۳۷ درجه سانتیگراد و 5٪ CO2 نگهداری شد تا تعداد مناسب به دست آید (۱۷).

در این مطالعه، تعداد ۳۰ عدد موش ماده ۶-۵ هفته‌ای تهیه شده از انستیتو پاستور ایران، به دو گروه تست و بقا تقسیم شدند.

رقت‌های  $10^5 \times 7 - 10^6 \times 1$  از سلول‌ها پس از ۲ بار شست‌وشو با بافر PBS در حجم ۱۰۰ میکرولیتر تهیه گردید و به تمام موش‌ها به‌صورت زیرجلدی در ناحیه فلانک راست تزریق گردید (روز تزریق سلول، به‌عنوان روز صفر در نظر گرفته شد). در ادامه، به‌طور روزانه ایجاد برجستگی تومور در زیر پوست ارزیابی و پیگیری شد.

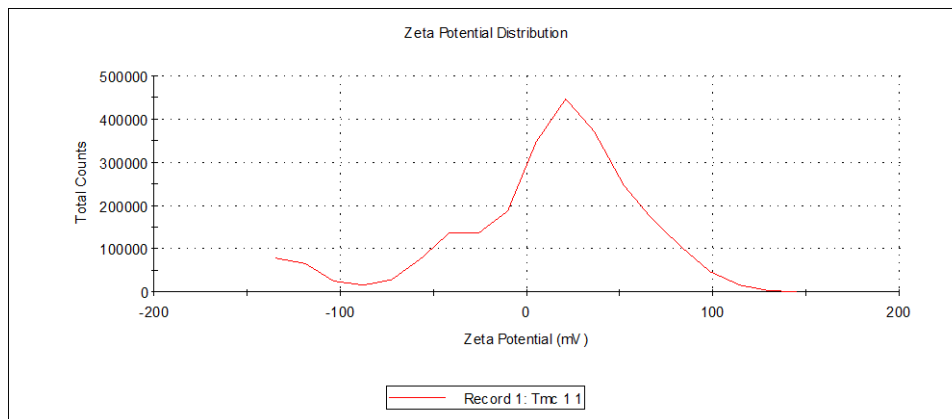
در گروه تست، گروه‌ها به ترتیب گروه اول به‌عنوان موش‌های توموری با نانوذرات کیتوزان تیمار شدند. در گروه دوم، موش‌های توموری، نرمال‌سالین دریافت کردند و در گروه سوم موش‌های سالم بدون تومور بودند. گروه بقا نیز به‌همین صورت تقسیم‌بندی شد.

میزان رشد تومور به‌صورت روزانه اندازه‌گیری و ثبت گردید. برای سنجش زمان بقا، گروهی از موش‌های تحت آزمایش به مدت ۶۰ روز مورد بررسی قرار گرفتند. ۱۸ روز بعد از تزریق نانوذرات کیتوزان و سرم فیزیولوژی، موش‌ها کشته و سلول‌های طحالی آنها استخراج شد.



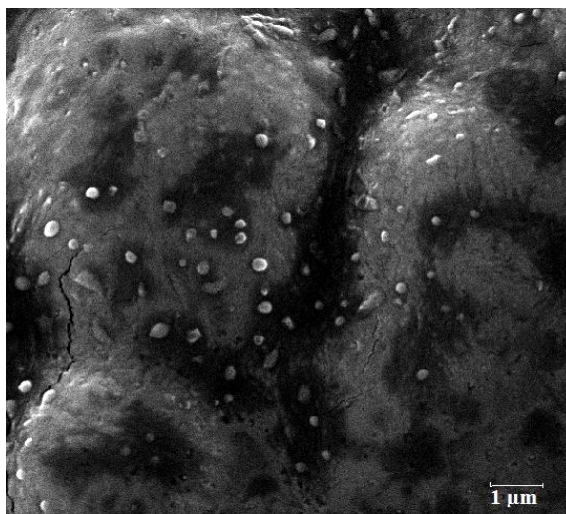
شکل شماره ۱: سایز نانوذرات کیتوزان با دستگاه DLS براساس نانومتر.

بار الکتریکی، پراکندگی و یکنواختی نانوذرات کیتوزان به وسیله دستگاه ZETA SIZER (Malvern) تعیین گردید. بار الکتریکی نانوذرات کیتوزان به طور میانگین با سه تکرار +۱۱ میلی‌ولت تعیین شد. داده‌های دستگاه DLS نشان داد نمودار، تک پیک بوده و همولوژی وجود دارد (شکل شماره ۲).



شکل شماره ۲: بار الکتریکی نانوذرات کیتوزان با دستگاه ZETA SIZER براساس میلی‌ولت.

برهمکنش پرتوی الکترونی با ماده، سبب نمایان شدن شکل ظاهری نانوذرات شد. از پرتوهای ساطع شده از این بررسی‌ها استفاده گردید. شکل شماره ۳ تصویر نانوذرات کیتوزان با میکروسکوپ SEM را نشان می‌دهد.

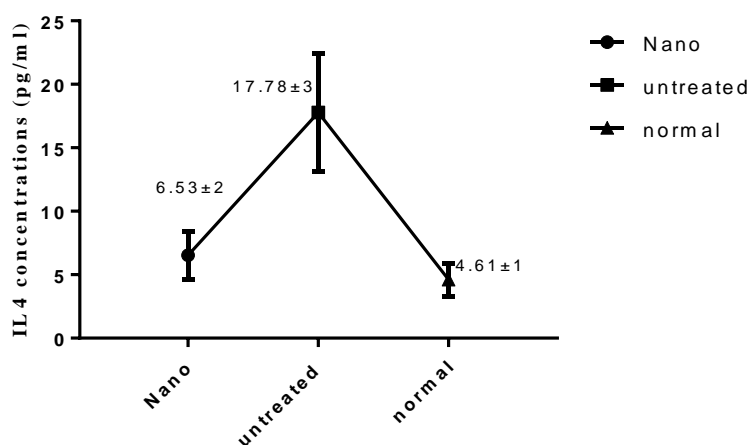


شکل شماره ۳: تصویر نانوذرات کیتوزان حامل پروتئین با میکروسکوپ SEM.

سطح IL-4 در مقایسه با گروه موش سالم، اختلاف معنی‌داری نداشت. کاهش در سطح IL-4 در مقایسه با گروه کنترل، شیف پاسخ‌های سلول‌های لنفوسیتی را به سمت Th1 نشان داد (نمودار شماره ۱).

به‌منظور ارزیابی اثرات نانوذرات کیتوزان در مدل توموری بر روی پاسخ‌های ایمنی، میزان سایتوکاین‌های تولیدشده در سوپ رویی کشت سلول‌های طحالی گروه‌های مختلف اندازه‌گیری شد. در میزان IL-4 در موش‌های توموری تیمارشده با نانوذرات در مقایسه با گروه‌های توموری بدون تیمار، کاهش معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) مشاهده شد.

IL4 production splenocytes treated with Cancer lysate

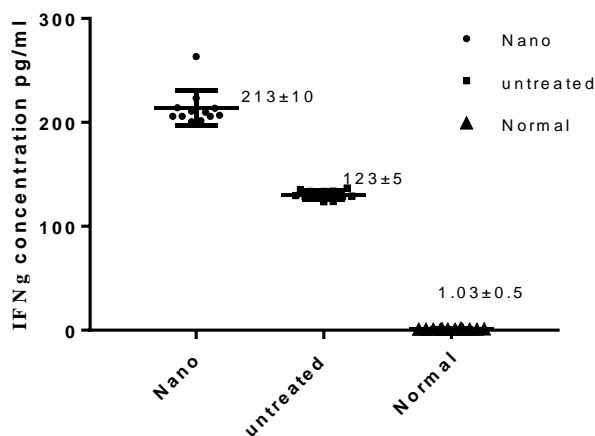


نمودار شماره ۱: تولید IL-4 در گروه‌های مختلف تست و کنترل در موش‌های مورد مطالعه ( $p < 0.05$ ).

افزایش در سطح IFN- $\gamma$  در مقایسه با گروه کنترل ( $p < 0.001$ )، شیف پاسخ‌های سلول‌های لنفوسیتی را به سمت Th1 نشان داد (نمودار شماره ۲).

در موش‌های توموری تیمارشده با نانوذرات، افزایش معنی‌داری در سطح IFN- $\gamma$  در مقایسه با موش‌های توموری بدون درمان و گروه موش سالم ( $p < 0.001$ ) دیده شد.

interferon gamma production splenocytes treated with Cancer lysate



نمودار شماره ۲: تولید IFN- $\gamma$  در گروه‌های مختلف تست و کنترل در موش‌های مورد مطالعه ( $p < 0.05$ ).

## بحث

اطلاعات به دست آمده از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی کیتوزان باعث شده تا این پلیمر به عنوان ماده‌ای برای رهاسازی دارو، به ویژه برای رهاسازی ماکرومولکول‌ها پیشنهاد گردد. استفاده از پلیمرهایی مانند کیتوزان برای انتقال داروها به محل‌های مناسب در سیستم‌های بیولوژیک، مورد توجه زیادی است. Zhang و همکاران با توجه به کاربردهای کیتوزان، بیان داشتند می‌توان از نانوذرات کیتوزان به عنوان حامل دارو استفاده کرد (۱۹). Vila و همکاران از نانوذرات کیتوزان به عنوان حامل پروتئین برای واکسن کزاز استفاده کردند (۲۰). حسین‌زاده و همکاران از نانوذرات کیتوزان به عنوان یک سیستم دارورسانی برای درمان سرطان استفاده کردند (۱۵). در تحقیق حاضر، پاسخ سیستم ایمنی بدن در مدل سلول‌های سرطانی سینه در برابر تأثیرات نانوذرات کیتوزان در محیط *in vivo* به عنوان یک گزینه محرک سیستم ایمنی در ایمنی درمانی مطرح شد. نانوذرات در محدوده سایز ۳۰۰-۱۰۰ نانومتری، قابلیت تحریکی سیستم ایمنی را دارد. سایز نانوذرات کیتوزان با دستگاه DLS، حدود ۲۰۰ نانومتر تعیین شده است. این سایز با SEM مورد تأیید قرار گرفته که نشان‌دهنده قرارگیری در این رنج است. در این سایز، نانوذرات کیتوزانی، قابلیت تحریک سیستم ایمنی همانند کموتاکسی، فعال‌سازی ماکروفاژها و افزایش فعالیت فاگوسیتوز را دارد. این نانوذرات با سایز یادشده، به خوبی موجب تحریک تولید و ترشح سایتوکاین  $IFN-\gamma$  می‌شود.  $IFN-\gamma$ ، نماینده سیتوکین‌های ترشحی در ایمنی سلولی بوده که تولید آن، نشان‌دهنده تحریک این سیستم است. نقش محافظتی  $IFN-\gamma$  در بسیاری از تومورها تأیید شده؛ به طوری که  $IFN-\gamma$  بر تعداد زیادی از سلول‌های توموری که دارای گیرنده هستند، اثر ضدتکثیری و القای آپوپتوز دارد که این عمل وابسته به فعال کردن مسیر انتقال سیگنال (Signal Transducers, and Activators of Transcription) STAT1 می‌باشد. به علاوه،  $IFN-\gamma$  با مهار رگ‌سازی می‌تواند مانع گسترش تومورها شود، به طوری که سبب القای تولید کموکاین‌های IP10 (Interferon Inducible Protein) و Mig (Monokine Induced by Interferon  $\gamma$ ) که در مهار رگ‌سازی نقش مهمی دارند، می‌شود.

گزارش‌های اخیر نشان می‌دهند رابطه معنی‌داری بین تأثیر ضدسرطانی ترشح  $IFN-\gamma$  و پاسخ سیستم ایمنی وجود دارد (۲۱)، که این پاسخ نه تنها سبب تکثیر بیشتر لنفوسیت‌ها؛ بلکه باعث افزایش در ترشح  $IFN-\gamma$  و تغییر میزان اینترلوکین‌ها نیز می‌شود (۲۲)، به طوری که این یافته‌ها حاکی از ورود  $IFN-\gamma$  در فاز III کلینیکال برای درمان سرطان تخمدان است (۲۳). Garcia و همکاران در مطالعه خود با بررسی تأثیر  $IFN-\gamma$  و رسپتور آن بر روی سلول‌های سرطانی سینه، نشان دادند  $IFN-\gamma$  موجب مهار رشد این سلول‌ها می‌شود (۲۴). همچنین  $IFN-\gamma$  می‌تواند موجب فعال‌سازی کاسپاز ۸ و القای مرگ سلولی از نوع آپوپتوز گردد (۲۵). در مطالعه حاضر رابطه معنی‌داری بین تأثیر تحریکی نانوذرات و پاسخ سیستم ایمنی وجود داشت که این پاسخ نه تنها موجب تکثیر بیشتر لنفوسیت‌ها شد؛ بلکه افزایش در ترشح  $IFN-\gamma$  و تغییر میزان اینترلوکین‌ها نیز به تبع آن مشاهده گردید، همچنین لنفوسیت‌های تحریک‌شده در گروه نانوذرات، به مراتب بیشتر از سایر گروه‌ها بود ( $p < 0.05$ ). در مورد سیتوکین‌های  $IFN-\gamma/IL-4$ ، در لنفوسیت‌های تحریک‌شده با نانوذرات، اختلاف بین گروه نانوذرات با گروه کنترل معنی‌دار بود که می‌تواند بیانگر تحریک شدن سیستم ایمنی علیه سلول‌های توموری باشد. همچنین میزان بقای گروه دریافت‌کننده کیتوزان در مقایسه با سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری را نشان داد. حضور  $IL-4$  به معنای هدایت پاسخ‌های ایمنی به سمت  $Th2$  بوده و نماینده هدایت پاسخ‌های ایمنی به سوی ایمنی هومورال است. از سوی دیگر، حضور  $IFN-\gamma$  به معنای افزایش لنفوسیت‌های نوع  $Th1$  بوده و این سلول‌ها، مهم‌ترین سلول‌های تحریک‌کننده سیستم ایمنی جهت درمان سلول‌های توموری به شمار می‌آیند. نتایج نشان می‌دهد این ترکیبات موجب کاهش تولید  $IL4$  شده و در نتیجه موجب کاهش لنفوسیت‌های نوع  $Th2$  و افزایش لنفوسیت‌های نوع  $Th1$  به واسطه حضور  $IFN-\gamma$  می‌شود که می‌توان این برداشت را ناشی از اثر این کمپلکس بر کارآمدی بیشتر پاسخ‌های ایمنی و وضعیت دفاعی بدن در مقابل تومور دانست. در مطالعه حاضر، مقدار  $IL-4$  در مقایسه با گروه شاهد، کاهش معنی‌داری را نشان داد ( $p < 0.05$ )، که این کاهش نشان‌دهنده تأثیر کمپلکس‌های طراحی‌شده بر تومور در مقایسه با گروه شاهد بود.

## نتیجه‌گیری

انتقال انواع مختلفی از داروها و داروهای ضدسرطان؛ بلکه به‌عنوان یک گزینه درمانی در کنار مکمل‌ها مطرح است.

با توجه به مشاهده اثرات ایمونولوژیکی نانوذرات کیتوزان، به‌دلیل ویژگی‌های منحصربه‌فرد آن، این ترکیب نه تنها برای

## References:

1. Hashemzadeh Sh, Aligholipour Maleki R, EJ Golzari S .The incidence of breast cancer in Northwest Iran (2003 - 2008). *J Cardiovasc Thorac Res* 2012;4(1):5-9.
2. Duffy M. CA 15-3 and related mucins as circulating markers in breast cancer. *Ann Clin Biochem* 1999;36(Pt 5):579-86.
3. Man Y, Stojadinovic A, Mason J. Tumor-infiltrating immune cells promoting tumor invasion and metastasis: Existing theories. *J Cancer* 2013;4(1):84-95.
4. Kahlenborn C, Modugno F, Potter DM, Severs WB. Oral contraceptive use as a risk factor for premenopausal breast cancer: A meta-analysis. *Mayo Clin Proc* 2006;81(10):1290-302.
5. Nelson HD, Zakher B, Cantor A, Fu R, Griffin J, O'Meara ES, et al. Risk factors for breast cancer for women aged 40 to 49 years: A systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2012;156(9):635-48.
6. Russo J, Rivera R, Russo IH. Influence of age and parity on the development of the human breast. *Breast Cancer Res Treat* 1992;23(3):211-8.
7. Townsend CM, Jr. Treatment of breast cancer. *Clin Symp* 1997;49(1):1-32.
8. Ueda T, Volinia S, Okumura H, Shimizu M, Taccioli C, Rossi S, et al. Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: A microRNA expression analysis. *Lancet Oncol* 2010;11(2):136-46.
9. Stockler M, Wilcken NR, Ghersi D, Simes RJ. Systematic reviews of chemotherapy and endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2000;26(3):151-68.
10. Sieval A, Thanou M, Kotze AF, Verhoef CJ, Brussee J, Junginger HE. Preparation and NMR characterization of highly substituted N-trimethyl chitosan chloride. *Carbohydr Polym* 1998;36(2-3):157-65.
11. Grinberg O, Gedanken A, Patra CR, Patra S, Mukherjee P, Mukhopadhyay D. Sonochemically prepared BSA microspheres containing Gemcitabine, and their potential application in renal cancer therapeutics. *Acta Biomater* 2009;5(8):3031-7.
12. Tan ML, Choong PF, Dass CR. Review: Doxorubicin delivery systems based on chitosan for cancer therapy. *J Pharm Pharmacol* 2009;61(2):131-42.
13. Saremi S, Atyabi F, Akhlaghi SP, Ostad SN, Dinarvand R. Thiolated chitosan nanoparticles for enhancing oral absorption of docetaxel: Preparation, in vitro and ex vivo evaluation. *Int J Nanomedicine* 2011;6:119-28.
14. Soleimani N, Mobarez A, Jafari Olia M, Atyabi F. Synthesis, Characterization and effect of the antibacterial activity of chitosan nanoparticles on vancomycin-resistant enterococcus and other gram negative or gram positive bacteria. *J Pure Appl Sci Technol* 2015;26(1):14-23.
15. Hosseinzadeh H, Atyabi F, Dinarvand R and Naser Ostad S. Chitosan-Pluronic nanoparticles as oral delivery of anticancer gemcitabine: Preparation and in vitro study. *Int J Nanomedicine* 2012;7:1851-63.



16. Soleimani N, Mohabati-Mobarez A, Atyabi F, Hasan-Saraf Z, Haghghi M. Preparation of chitosan nanoparticles carrying recombinant helicobacter pylori neutrophil-activating protein. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2014;23(2):134-44. [Full Text in Persian]
17. Daneshmandi S, Hajimoradi M, Soleimani N, Sattari M. Modulatory effect of *Acetobacter xylinum* cellulose on peritoneal macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2011;33(1):164-8.
18. Yousofi A, Daneshmandi S, Soleimani N, Bagheri K, Karimi MH. Immunomodulatory effect of Parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil on immune cells: Mitogen-activated splenocytes and peritoneal macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2012;34(2):303-8.
19. Zhang H, Wu S, Tao Y, Zang L, Su Z. Preparation and characterization of water soluble chitosan nanoparticles as protein delivery system. *J Nanomater* 2010;2010:ID 898910.
20. Vila A, Sánchez A, Janes K, Behrens I, Kissel T, Vila Jato JL, et al. Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *Eur J Pharm Biopharm* 2004;57(1):123-31.
21. Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13(2):95-109.
22. Ebbinghaus C, Ronca R, Kaspar M, Grabulovski D, Berndt A, Kosmehl H, et al. Engineered vascular-targeting antibody-interferon-gamma fusion protein for cancer therapy. *Int J Cancer* 2005;116(2):304-13.
23. Windbichler GH, Hausmaninger H, Stummvoll W, Graf AH, Kainz C, Lahodny J, et al. Interferon-gamma in the first-line therapy of ovarian cancer: A randomized phase III trial. *Br J Cancer* 2000;82(6):1138-44.
24. Garcia-Tunon I, Ricote M, Ruiz AA, Fraile B, Paniagua R, Royuela M. Influence of IFN-gamma and its receptors in human breast cancer. *BMC Cancer* 2007;7:158.
25. Ruiz-Ruiz C, Muñoz-Pinedo C, López-Rivas A. Interferon-gamma treatment elevates caspase-8 expression and sensitizes human breast tumor cells to a death receptor-induced mitochondria-operated apoptotic program. *Cancer Res* 2000;60(20):5673-80.