

Effects of treatment with chitin micro-particles on *Leishmania Major* burden in Balb/c mice by using titration method

Mostafa Haji Molla Hoseini^{1*}, Somayeh Ghotloo¹, Vahid Khazee shahgoli²

1. Department of Immunology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Immunology Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

(Received: 2015/5/13 Accept: 2015/10/4)

Abstract

Background: Chitin micro-particles have the ability to modulate immune responses. In order to investigate immunoadjuvant potential of chitin, the parasite burden in Balb/c mice infected with *Leishmania Major* under treatment with chitin microparticles was evaluated. In measuring the parasitic load, titration method, which is the most accurate assessment of the effectiveness of therapies and vaccine evaluation in experimental models of *Leishmania* infection was used.

Methods: Balb/c mice were intradermally infected with 2×10^5 stationary phase of *Leishmania Major* promastigotes into their base of the tail and eight weeks later; parasite burden were measured and compared between test (6 mice/group) that received 100 µg/ml microparticle subcutaneously at the base of the tail every two days and control groups (6 mice/group) that received PBS. The onset and size of ulcer among two groups were compared as well.

Results: Onset of ulcers in the treated mice compared to control showed a significant delay ($p < 0.02$) and the lesion development in the micro-particle recipient mice were significantly smaller. Although the parasite load in treated mice was lower but statistically significant differences were not found between the test group and control ($p < 0.88$).

Conclusion: The combined use of monitoring the size of the cutaneous lesions and the determination of the parasite burden will reflect more accurately the status of disease. Although the removal of the visualized parasite was not found among chitin treated group, but onset and size of ulcer was impressed. Immunoadjuvant effects of chitin microparticles in *Leishmania* infection models requires further studies.

Keywords: Chitin; *Leishmania major*; Parasite burden

* Corresponding authors: Mostafa Haji Molla Hoseini, Department of Immunology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Email: m.mollahoseini@sbmu.ac.ir or hajimolahoseini@yahoo.com

بررسی اثر تیمار با میکروپارتیکل‌های کیتین بر بار انگلی لیشمانیا ماژور در موش‌های Balb/c به روش تهیه رقت‌های متوالی

مصطفی حاجی ملاحسینی*^۱، سمیه قتلو رابری^۱، وحید خاضع شاهگلی^۲

۱. گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲. آزمایشگاه بخش ایمنولوژی انیستیتو پاستور ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۲/۲۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۷/۱۲

چکیده

سابقه و هدف: میکروپارتیکل‌های کیتین قابلیت تعدیل پاسخ‌های ایمنی را دارند. به منظور بررسی قابلیت ایمنوآدجوانتی کیتین در عفونت با لیشمانیا ماژور، میزان بار انگلی در موش‌های *Cl blaB* آلوده به لیشمانیا ماژور و تحت تیمار با میکروپارتیکل‌های کیتین ارزیابی شد. در اندازه‌گیری بار انگلی از روش تهیه رقت‌های متوالی که دقیق‌ترین ارزیابی اثربخشی روش‌های درمانی و ارزیابی واکنش‌های سلولی در مدل تجربی عفونت لیشمانیاست، استفاده شد. **روش بررسی:** موش‌های *Balb/c* با 2×10^5 پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور در فاز ایستایی، در قاعده دم و به طریقه داخل جلدی آلوده شدند و پس از هشت هفته با استفاده از روش تیتراسیون سلولی، میزان بار انگلی در گروه تحت تیمار (شش سر موش) که به صورت دو روز در میان $100 \mu\text{g/ml}$ میکروپارتیکل به صورت زیرجلدی در قاعده دم دریافت کردند و گروه کنترل (شش سر موش) که *PBS* دریافت کردند، تعیین و مقایسه شد. از نظر زمان بروز زخم و وسعت ضایعات هم دو گروه باهم مقایسه شدند.

یافته‌ها: بروز زخم در موش‌های تحت تیمار نسبت به موش‌های کنترل با تأخیر معنی‌دار ($p < 0.02$) همراه بود و وسعت ضایعات ایجادشده در موش‌های دریافت‌کننده میکروپارتیکل کوچک‌تر بود. بار انگلی باوجود اینکه در موش‌های تحت تیمار کمتر بود ولی تفاوت آماری معنی‌دار بین گروه تست و کنترل دیده نشد ($P < 0.88$).

بحث و نتیجه‌گیری: تلفیق دو روش بررسی ضایعه سنجش بار انگلی برآورد دقیق‌تر و صحیحی از وضعیت عفونت و پاسخ ایمنی ضد آن ارائه می‌دهد. اگرچه حذف انگل راه‌یافته به احشای تحت تأثیر تیمار با کیتین دیده نشد اما بروز زخم و وسعت ضایعات تحت تأثیر قرار گرفت. بررسی آثار ایمنوآدجوانتی میکروپارتیکل‌های کیتین در مدل‌های عفونت لیشمانیایی نیاز به مطالعات بیشتر دارد.

واژگان کلیدی: کیتین، لیشمانیا ماژور، بار انگلی

مقدمه

میکروپارتیکل‌های کیتوزان پاسخ‌های ضد لیشمانیا را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۵)، درصد برآمدیم بار انگلی در غدد لنفی موش‌های آلوده به لیشمانیا ماژور و تحت درمان با میکروپارتیکل‌های کیتین را در مقایسه با موش‌های درمان نشده به‌وسیله روش مرجع تیتراسیون سلولی سنجیده، اثر ایمنوآدجوانتی میکروپارتیکل‌های کیتین را دقیق‌تر ارزیابی کنیم.

در حال حاضر تحقیقات بسیاری در سراسر جهان پیرامون دارودرمانی و واکنش‌های ایمنی عفونت انجام می‌شود که در بخش عمده آن‌ها از مدل‌های حیوانی برای بررسی اثربخشی داروهای جدید استفاده می‌کنند و آزمایش‌های مختلفی که در آن‌ها بار انگلی، درصد زنده‌بودن انگل، مرگ انگل، رشد انگل، بررسی زمان ظهور زخم و توسعه زخم، منای بررسی است، وجود دارد که ابزار کار محققان در پیگیری اثربخشی روش‌های درمانی و پیشگیری در برابر عفونت لیشمانیا هستند. (۶) از این میان روشی

در حال حاضر انواع عفونت‌های ناشی از انگل لیشمانیا یک معضل بهداشت جهانی محسوب می‌شوند و به‌ویژه نوع جلدی عفونت در نقاط مختلف کشور ما شایع است. باوجود تلاش زیاد محققان، تاکنون واکنش یا درمان به‌طور کامل مؤثر و بدون عارضه‌ای برای لیشمانیازیس ارائه نشده است (۱) و تحقیق در این زمینه از اولویت‌های پژوهشی کشور است. در ادامه تحقیقات پیشین که نشان دادیم میکروپارتیکل‌های کیتینی کوچک اندازه - میکروپارتیکل‌های کیتین با اندازه کمتر از ۴۰ میکرون را میکروپارتیکل‌های کوچک می‌نامند - (۲)، قادر به مهار رشد انگل در ماکروفاژها در شرایط آزمایشگاهی هستند (۳)، همچنین واجد قابلیت تعدیل ایمنی و ایجاد گرایش به طرف پاسخ T_H1 در موش آلوده به لیشمانیا هستند (۴). میکروپارتیکل‌های کیتینی بیش از

نویسنده مسئول: مصطفی حاجی ملاحسینی، استادیار گروه ایمنولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
تلفن/ فاکس: ۰۲۱-۲۲۳۳۹۹۷۰
موبایل: ۰۹۱۲۶۱۱۸۳۲

Email: m.mollahoseini@sbm.ac.ir or hajimolahoseini@yahoo.com

ج) توزیع سوسپانسیون سلولی:

پلیت ۹۶ خانه برای توزیع هشت تکرار از هر یک از رقت‌ها مورد استفاده قرار گرفت و در هشت ستون که هر یک متشکل از هشت چاهک است، میزان ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون به هر چاهک اضافه شد. (شکل ۱)

بعد از ریختن سوسپانسیون در چاهک‌ها، در پلیت را بسته، اطراف آن را پارافین کشیده در داخل انکوباتور ۲۴ درجه، به مدت ۱۰ روز نگهداری کردیم. بعد از گذشت سه روز پلیت برای کنترل از انکوباتور خارج شده، زیر میکروسکوپ معکوس از نظر حضور پروماستیگوت‌های زنده انگل و همچنین آلودگی بررسی شد. پس از ۱۰ روز پلیت برای ثبت اطلاعات بازیابی شد.

د) ثبت اطلاعات پلیت:

رویت چاهک‌ها از نخستین چاهک در نخستین ستون آغاز شده و تمام سطح چاهک از بالا تا پایین و از چپ به راست بررسی شد. به محض دیدن پروماستیگوت‌های متحرک، علامت + در جدولی که معادل نمای پلیت بود ثبت و چاهک مجاور در ستون دوم در همان ردیف بررسی شد (شکل ۲). روش کار در این تکنیک به این صورت است که بعد از رسیدن به چاهکی که از نظر حضور انگل منفی است، چاهک مجاورش نیز بررسی شده در صورتی که منفی باشد، نیازی به دیدن چاهک‌های بعد از آن نیست.

جهت خوانش پلیت

	Responding group											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

شکل ۲. جهت خوانش پلیت و چگونگی پر کردن جدول نما اطلاعات جدول نما شامل:

- تعداد ستون‌های پاسخگو (Responding groups) یعنی ستون‌هایی که شامل هردو نمونه، نمونه مثبت منفی است (مانند ستون‌های ۸، ۹ و ۱۰ در شکل ۲)
- تعداد چاهک‌های منفی مربوط به ستون‌های پاسخگو (چهار، شش و هفت چاهک منفی به ترتیب برای ستون ۸، ۹ و ۱۰)
- تعداد سلول‌های مینا برحسب $n \times 10^6$
- تعداد سلول‌های مرتبط به هر یک از ستون‌های پاسخگو برحسب تعداد سلول موجود در چاهک

اطلاعاتی هستند که در آنالیز نیاز است. داده‌ها با نرم‌افزار ELIDA که بر مبنای روش آماری ارائه شده توسط Taswell کار می‌کند (۸) ارزیابی شد و تعداد انگل به ازای یک گره لئوای به دست آمد.

آنالیز آماری

برای انتخاب آزمون آماری مناسب، ابتدا توزیع متغیر مورد نظر در هر گروه از نظر نرمال یا غیرنرمال بودن بررسی شد. برای تعیین نرمال یا غیرنرمال بودن نمونه از نظر متغیر مورد نظر، بر اساس نظر متخصص آماری، به علت کم بودن تعداد نمونه‌ها، آزمون Shapiro-Wilk به عنوان آزمون آماری مناسب، مینا قرار گرفت. در صورتی که هر دو گروه متغیرهای مورد نظر دارای توزیع نرمال بودند، از آزمون آماری t-test و در صورتی که هر دو دارای توزیع غیرنرمال بودند یا اینکه یکی دارای توزیع نرمال و دیگری دارای توزیع غیرنرمال بود، از آزمون آماری Mann-Whitney U برای مقایسه استفاده و $p \text{ value} < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تأخیر در بروز ضایعات در موش‌های تحت تیمار با میکروپارتیکل
شروع ضایعه با ایجاد یک برجستگی بدون زخم (ندول) بود. ثبت روز شروع ایجاد ندول نشان داد که موش‌های تحت درمان با میکروپارتیکل‌های کیتین

که Titus و همکارانش به عنوان روشی برای مطالعه بار انگلی پایه‌گذاری کردند، بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۷) و همچنان مرجع بسیاری از تحقیقاتی است که اثرگذاری روش‌های درمان و واکنش‌های سوسپانسیون ضد لیشمانیا را در مدل‌های حیوانی کنکاش می‌کنند، بنابراین در این تحقیق از این راهکار برای بررسی اثر میکروپارتیکل‌های کیتین استفاده شد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی و تزریق پروماستیگوت‌های انگل به موش و تیمار موش‌ها با میکروپارتیکل‌ها

مطابق تحقیقات قبلی میکروپارتیکل‌هایی از کیتین (C-7170 Sigma chemical Co. St. Louis, MO) تهیه شد (۵-۳).

از پروماستیگوت‌های انگل (سویه ایرانی MRHO/IR/75/ER) که در مرحله ایستایی قرار داشتند، سوسپانسیون انگلی به تعداد $10^5 \times 2$ در ۱۰۰ میکرولیتر با فرسفات سالیین تهیه و در قاعده دم موش‌های Balb/c ماده با سن پنج تا هفت هفته و به صورت داخل جلدی تزریق شد. ۱۲ سر موش Balb/c ماده خالص با سن پنج تا هفت هفته به دو گروه (یک گروه کنترل و یک گروه تیمار) تقسیم شدند. گروه‌های تحت تیمار تا پایان هفته هشتم پس از تزریق انگل به صورت دو روز در میان با تزریق $100 \mu\text{g/ml}$ میکروپارتیکل به صورت زیر جلدی در قاعده دم تیمار شدند و گروه کنترل ۱۰۰ میکرولیتر محلول PBS دریافت کرد. برای هریک از موش‌ها زمان ظهور ضایعه به صورت روزانه و وسعت ضایعات در پایان هفته هشتم ثبت شد و در پایان هم به روش تیتراسیون سلولی به شرح ذیل بار انگلی تعیین شد.

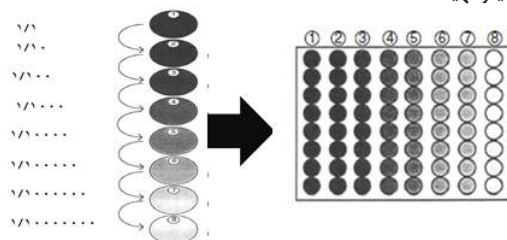
تعیین بار انگلی به روش تهیه رقت‌های متوالی

الف) تهیه سوسپانسیون سلولی از غدد لنفی موش آلوده به لیشمانیا:

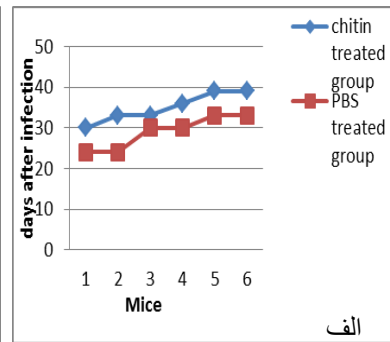
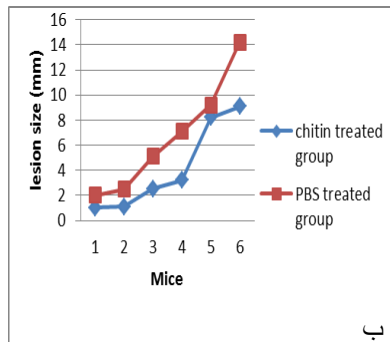
موش‌های آلوده در پایان هفته هشتم پس از عفونت کشته شدند. گره‌های لنفوی کشاله ران چپ و راست آن‌ها خارج و از آن‌ها سوسپانسیون سلولی تهیه شد. به این منظور گره‌های لنفی به پلیت استریل حاوی ۳ میلی لیتر محیط RPMI که روی یخ قرار گرفته منتقل شد تا متورم شده و از بافت چربی اطراف متمایز شود. سپس با تیغ جراحی بافت چربی از گره لنفی جدا شده، آنگاه برای جداسازی سلول‌ها گره لنفی روی صافی استریل غوطه‌ور در پلیت دیگر حاوی محیط کشت منتقل شده به آرامی له شد. سوسپانسیون سلولی حاصل با استفاده از محیط کشت و سانتریفیوژ یخچال دار شست‌وشو داده شد. در انتها پس از افزودن یک میلی لیتر محیط کشت به رسوب سلولی شسته شده، شمارش با لام نتویار و تعیین درصد زنده بودن سلول‌ها با رنگ تریپان بلو انجام شد. به این ترتیب تعداد سلول‌های زنده برحسب $n \times 10^6 \text{ cell/ml}$ مشخص و حجم سوسپانسیون سلولی با استفاده از محیط کشت سلولی به ۲ میلی لیتر رسانده شد.

ب) رقیق‌سازی سوسپانسیون سلولی:

رقیق‌سازی سوسپانسیون سلولی هر یک از موش‌ها به طور جداگانه به این ترتیب انجام شد که رقیق‌سازی ۱۰ برابری (10-Fold) در ۸ میکرو تیوب انجام شد، به هریک از میکرو تیوب‌های شماره ۲ تا ۷، حجم ۱۸۰۰ میکرولیتر محیط کامل اشنایدر (Sigma chemical Co. St. Louis, MO) اضافه کرده سپس از میکرو تیوب مینا (شماره یک و حاوی $n \times 10^6 \text{ cell}$) ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی به لوله شماره دو اضافه کرده، خوب مخلوط شد و سوسپانسیونی با رقت ۱/۱۰ حاصل شد. از میکرو تیوب شماره ۲ ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون به لوله سوم منتقل شد و این فرآیند به صورت متوالی تا رقت ۱/۱۰۰۰۰۰۰۰ در میکرو تیوب ۷ ادامه یافت. به این ترتیب در ۸ میکرو تیوب سوسپانسیون سلولی از رقت ۱/۱ تا ۱/۱۰۰۰۰۰۰۰ در حجم ۱۸۰۰ میکرولیتر تهیه شد.



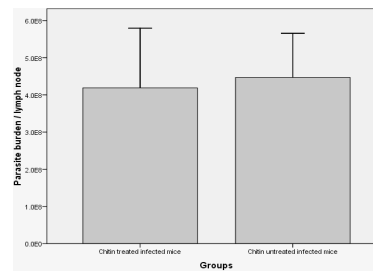
شکل ۱. نمای چگونگی رقیق‌سازی و توزیع ۸ تکرار از هر رقت سوسپانسیون سلولی در پلیت ۹۶ خانه



شکل ۳) زمان شروع ضایعه در هر موش بعد از تلقیح انگل (تصویر الف). زمان شروع ضایعه در موش های تحت تیمار از روز ۳۰ تا ۳۹ (متوسط ۳۵) و در گروه کنترل از روز ۲۴ تا ۳۳ (متوسط ۲۹) بعد از تلقیح انگل بود. وسعت ضایعه در هر موش و میانگین قطر ضایعات بر حسب میلی متر (تصویر ب). میانگین اندازه ضایعات در موش های تحت درمان با میکروپارتیکل های کیتین (۴/۱۸ ± ۱/۴) و در گروه کنترل (۶/۶۸ ± ۱/۸۷) (P=۰.۳۱) بود.

به طور متوسط در روز ۳۵ بعد از عفونت و موش های گروه کنترل در روز ۲۹ (شکل ۳ الف)، شروع به ایجاد ضایعه کردند که تفاوت آماری معنی داری را نشان می داد $p \leq 0.02$. موش های آلوده ای که میکروپارتیکل های کیتین را دریافت کرده بودند، بعد از گذشت هشت هفته ضایعه کوچک تری ایجاد کردند. میانگین اندازه ضایعه در گروهی که میکروپارتیکل های کیتین را گرفته بودند، ۴/۱۸ میلی متر و در گروهی که PBS دریافت کرده بودند، ۶/۶۸ میلی متر بود (شکل ۳ ب).

عدم کاهش بار انگلی در موش های تحت تیمار با میکروپارتیکل
 اگرچه میانگین تعداد انگل در گره های لنفاوی در هفته هشتم بعد از آلوده کردن موش ها، در گروه تحت تیمار با میکروپارتیکل های کیتین که تا آن زمان به صورت دو روز در میان تزریق میکروپارتیکل داشتند از میانگین تعداد انگل در موش های گروه کنترل کمتر بود (شکل ۴)، ولی این تفاوت به لحاظ آماری ($P > 0/8$) معنی دار و از نظر کلینیکی هم اهمیت ندارد.



شکل ۴) میانگین بار انگلی گروه موش های آلوده دریافت کننده میکروپارتیکل های کیتین (4.5 ± 1.0) به ازای یک گره لنفاوی) در مقابل گروه شاهد (4.8 ± 1.0) در زمان هشت هفته بعد از تلقیح انگل. اختلاف آماری معنی داری بین دو گروه تا هفته هشتم دیده نمی شود ($P > 0/8$)

بحث

نتایج این تحقیق نشان داده تیمار با میکروپارتیکل های کیتین سبب به تعویق انداختن شروع ضایعات لیشمانیایی و کاهش اندازه ضایعات شده اما سبب کاهش معنی دار بار انگلی در مدل موشی عفونت لیشمانیا ماژور نمی شوند. موش های تحت تیمار، از نظر زمان شروع ضایعه تفاوت معنی داری نسبت به گروه کنترل داشتند. وسعت زخم اگرچه به طور متوسط در گروه تیمار ۲/۵ میلی متر کوچک تر از گروه کنترل بود و این میزان از نظر تجربی و بالینی حائز اهمیت است، ولی از نظر آماری تفاوت معنی دار نشد که به نظر نمی رسد با افزایش حجم نمونه معنی داری آماری هم حاصل شود. سنجش بار انگلی نشان داده در غدد لنفی موش هایی که تیمار هشت هفته ای با میکروپارتیکل ها داشتند، کاهش معنی داری از نظر تعداد انگل چه به لحاظ آماری و چه از دیدگاه بالینی ایجاد نشده است. این نتایج اثبات می کند که رصد ضایعه لیشمانیایی که در ایران منای مطالعات مختلفی قرار گرفته است (۹-۱۱) به تنهایی روش دقیقی برای ارزیابی پاسخ ایمنی به عفونت نیست. با توجه به اینکه بروز، ظهور و وسعت ضایعه لیشمانیایی تحت تأثیر عوامل متعددی قرار می گیرد (۶) بنابراین افزایش یا کاهش وسعت ضایعه معیار مناسبی در بررسی پاسخ به درمان نمی تواند باشد و چه بسا موجب تفسیر نادرست از پیشرفت بیماری شود. ضایعه ممکن است در غیاب انگل رویت شود

یا با وجود انگل ضایعه دیده نشود (۱۳-۱۲). بنابراین در عفونت لیشمانیا وسعت ضایعه با تعداد انگل زنده در بافت همواره رابطه معنی دار ندارند، بنابراین تلفیق دو روش بررسی ضایعه و سنجش بار انگلی برآورد دقیق تر صحیحی از وضعیت عفونت ارائه می کند.
 با توجه به نتایج تحقیق های قبلی ما که در شرایط آزمایشگاهی اثر ضد لیشمانیایی میکروپارتیکل های کیتین را نشان می دهد (۳) و تحقیق دیگری که نشان داد که در پایان هفته دوم بعد از تلقیح انگل، افزایش میانگین غلظت IFN- γ و کاهش میانگین IL-5 در موش های آلوده دریافت کننده میکرو پارتیکل های کیتین، در مقایسه با موش هایی آلوده گروه کنترل وجود دارد، به طوری که نسبت IFN- γ به IL-5 در موش های آلوده و دریافت کننده میکرو پارتیکل های کیتین، به طور معنی داری بالاتر از گروه کنترل است، بنابراین پاسخ ها به سمت T_H1 گرایش دارد (۴) و همچنین با استناد به تحقیق های دیگران در زمینه میکروپارتیکل های کیتین از جمله نتایجی که Shibata و همکارانش در دانشگاه کارولینای شرقی گزارش کرده اند (۱۴) یا strong و همکارانش در مدل های موشی آلرژیک (۱۵) یا Baaten و همکاران در موش های آلوده شده با ویروس آنفلوآنزا تیپ A عنوان می کنند (۱۶)، به نظر می رسد میکروپارتیکل های کیتین واجد خاصیت ایمونودجوانتی در عفونت لیشمانیا باشند، اگرچه با توجه به نتایج این تحقیق به نظر می رسد به تنهایی نقشی در بهبود عفونت لیشمانیا نداشته باشند. برای بررسی آثار ایمونودجوانتی میکروپارتیکل های کیتین، انجام مطالعه ای دیگر که در آن الگوی تیمار موش ها تغییر کرده، به صورتی که تزریق میکروپارتیکل ها تا پایان هفته دوم - مرحله حساس شدن سیستم ایمنی (Sensitization Phase) - ادامه یابد و آنگاه متوقف شود و حیوانات در پایان هفته هشتم یا بیشتر از نظر بار انگلی و تولید سایتوکاین ها بررسی شوند، پیشنهاد می شود. همچنین می توان قابلیت ایمونودجوانتی کیتین را در همراهی با آنتی ژن های کاندید واکسن ارزیابی کرد. علاوه بر این با توجه به نتیجه این تحقیق که نشان می دهد ذرات کیتین موجب تقویت عفونت زایی انگل لیشمانیا نمی شوند می توان از کیتین و مشتقات آن در غالب میکروپارتیکل و نانو پارتیکل به عنوان ناقل داروهای رایج ضد لیشمانیا استفاده کرد.

از جمله معضلات برای انجام آزمایش بررسی بار انگلی نبود دسترسی به نرم افزار ELIDA است. به علاوه اینکه این نرم افزار با سیستم های عامل جدید سازگار نیست و شاید به همین دلایل محققان به گزارش زمان بروز ضایعه و وسعت زخم بسنده می کنند، بنابراین پیشنهاد می شود محققان با استفاده از روش ارائه شده در این مقاله از نرم افزار مشابهی بانام Leishmania LDA که تحت وب به آدرس <http://www.imperial.ac.uk/theoreticalimmunology/lda> وجود دارد برای آنالیز نتایج استفاده کنند، با این تفاوت که باید برای حصول نتایج دقیق ۱۶ تکرار از هر یک از رقت ها را داشت. بنابراین سوسپانسیون سلولی در دو پلیت توزیع شود. نرم افزار اخیر به ادعای مولفان آن می تواند تعداد انگل در یک سلول را تعیین کند. همچنین اگر به جای سلول از بافت برای تهیه سوسپانسیون استفاده شده باشد، تعداد انگل در یک نانوگرم بافت را محاسبه کند. (۶)

تشکر و قدردانی: این تحقیق بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد ایمونولوژی خانم سمیه قتلو بود که با حمایت مالی دانشکده پزشکی در قالب طرح پژوهشی شماره ۱۳/۲۷۰ انجام شد. از حمایت های معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی صمیمانه سپاسگزاریم.

منابع

1. McGwire BS, Satskar AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM*, 2014;107 (1): 7-14.
2. 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. *J Immunol*. 2009; 182 (6): 3573-82.
3. Dehghani F, Haji Molla Hoseini M, Memarnejadian A, Yeganeh F, Rezaei AM, Khaze V. Immunomodulatory activities of chitin microparticles on Leishmania major-infected murine macrophages. *Arch Med Res*. 2011; 42 (7): 572-6.
4. Ghotloo S, Haji Molla Hoseini M, Alimohammadian MH, Khaze V, Memarnejadian A, Rostami A. Immunomodulatory effects of chitin microparticles on Leishmania major-infected BALB/c mice. *Parasitol Int*. 2015; 64 (2): 219-21.
5. Moradi M, Alimohammadian M, Yeganeh F, Khaze V, Haji Molla Hoseini M. Comparison of immune modulating effects of chitin microparticles with chitosan microparticles on leishmania infected lymph nodes cell suspensions of the mice. *Pejouhesh*. 2014; 38 (1): 19-24
6. KropfP, Kadolsky UD, Rogers M, Cloke TE, Müller L. The Leishmaniasis Model. *Method in microbiology*,2010;37: 307-28.
7. Titus RG, Marchand M, Boon T, Louis JA. A limiting dilution assay for quantifying Leishmania major in tissues of infected mice. *Parasite Immunol*. 1985;7: 545-555.
8. Eskandari F, Alipour Talesh G, Paroie M, Jaafari MZ, Khamesipour A, Saberi Z, et al. Immunoliposomes containing Soluble Leishmania Antigens (SLA) as a novel antigen delivery system in murine model of leishmaniasis. *Experimental Parasitology*,2014;146: 78-86
9. Ghasemi F, Nahrevanian H Application of L-Arginine as nitric oxide inducer and Indomethacin as prostaglandin inhibitor in Balb/c mice infected with Leishmania major MRHO/IR/75/ER. *IJ Army Univ Med Sci*. 2013; (1): 1-10
10. hmadi K, mahmoud zade A, cheraghali A, esfahani A. Effect of Garlic extract on cutaneous Leishmaniasis and the role of Nitric Oxide. *J Shahrekord Univ Med Sci*. 2002; 4 (2): 1-7
11. Tolouei S, Hasheminia S, Narimani M, Khamesipour A, Shatalebi M, Hejazi Sh. Leishmanicidal Activity of Films Containing Paromomycin and Gentamicin Sulfate both In Vitro and In Vivo. *Iran J Parasitol*. 2011;6: 60-5.
12. Vieira LQ, GoldschmidtM, Nashleanas M, Pfeffer K, Mak T. ScottP. Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with Leishmania major, but control parasite replication. *J. Immunol*,1996; 157: 827-35.
13. Lima HC, Bleyenbergh J A, Titus RG. A simple method for quantifying Leishmania in tissues of infected animals. *Parasitol. Today*,1997; 13: 80-2.
14. Shibata Y, Foster LA, Bradfield JF, Myrvik QN. Oral administration of chitin down-regulates serum IgE levels and lung eosinophilia in the allergic mouse. *J Immunol*. 2000;164 (3): 1314-21.
15. Strong P, Clark H, Reid K. Intranasal application of chitin microparticles down-regulates symptoms of allergic hypersensitivity to Dermatophagoides pteronyssinus and Aspergillus fumigatus in murine models of allergy. *Clin Exp Allergy*. 2002;32 (12): 1794-800.
16. Baaten BJ, Clarke B, Strong P, Hou S. Nasal mucosal administration of chitin microparticles boosts innate immunity against influenza A virus in the local pulmonary tissue. *Vaccine*. 2010;28 (25): 4130-7