

## *Last Decade Developments on Leishmania Vaccines with Emphasis on Nanovaccines*

Javad Akhtari<sup>1</sup>,  
Masoud Soosaraei<sup>2</sup>,  
Hajar Ziaei<sup>3</sup>,  
Mahdi Fakhar<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Assistant Professor, Department of Physiology and Pharmacology, Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>2</sup> PhD Student in Medical Parasitology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Department of Parasitology, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>4</sup> Associate Professor, Department of Parasitology, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received December 10, 2016 ; Accepted February 12, 2017)

### **Abstract**

Leishmaniasis is an infectious disease caused by the protozoan parasites of the genus *Leishmania*. Leishmaniasis annually affects the socioeconomic status of some societies. Evidence show that vaccination could prevent *Leishmania* and many studies are done on this, particularly nanovaccines. So, this article aimed at reviewing recent developments in this field. In current narrative review article, five English databases including Ebsco, Science Direct, PubMed, Google Scholar, and Scopus and four Persian databases including Magiran, Elm Net, Barakat Knowledge Network System, and the Scientific Information Database (SID) were searched for articles published between 2005 and 2016. Current treatment of leishmaniasis is based on chemical drugs but their application is limited due to high cost, toxicity, side effects, and low efficacy. In addition, vaccines can modulate the immune response in removing *Leishmania* in favor of the hosts. We attempted to review different types of *Leishmania* vaccine and their development trends, carriers, vaccine candidates, and strategies and delivery systems in last decade. It was found that nanovaccines consisting of multiple antigens and adjuvant are well developed in conjunction with IL-12 as Leish-111f and MPL-SE, therefore, they could be more successful. Current researches on vaccination clearly indicate the need for more research and investment in developing *Leishmania* vaccine.

**Keywords:** leishmaniasis, nanovaccine, liposome, nanoparticle

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 26 (146): 232-253 (Persian).

## پیشرفت های دهه اخیر در خصوص واکسن های لیشمانیا با تاکید بر نانواکسن ها

جواد اختری<sup>۱</sup>

مسعود سوسرایی<sup>۲</sup>

هاجر ضیایی<sup>۳</sup>

مهدی فخار<sup>۴</sup>

### چکیده

لیشمانیوز یک بیماری عفونی ناشی از انگل تک یاخته‌ای از جنس لیشمانیا است. این بیماری سالانه عوارض اقتصادی و اجتماعی فراوانی بر جوامع تحمیل می‌کند. شواهد میدانی، حاکی از قابل پیشگیری بودن بیماری لیشمانیوز به وسیله واکسیناسیون می‌باشند. با توجه به این که مطالعات وسیعی در خصوص واکسن‌ها علیه لیشمانیا به ویژه انواع نانو واکسن‌ها انجام شده است، لذا هدف از مطالعه حاضر، بررسی مطالعات انجام شده در خصوص پیشرفت‌های اخیر درباره این واکسن‌های جدید می‌باشد. این مطالعه مروری غیر نظام مند طی سال‌های ۲۰۰۵ تا ۲۰۱۶ به جستجو در پنج پایگاه انگلیسی زبان (Science Direct, Scopus, Ebsco, PubMed and Google Scholar) و چهار پایگاه داده‌های فارسی (Barakat Kowlege Network system, Magiran, Elm Net, Scientific Information Database (SID)) می‌پردازد. درمان فعلی انواع لیشمانیوز بر اساس داروهای شیمیایی می‌باشد، اما کاربرد آن‌ها با محدودیت‌های جدی مانند هزینه بالا، سمیت، عوارض مصرف دارو و اثربخشی کم مواجه است. علاوه بر این، واکسن‌های علیه لیشمانیا به ویژه انواع نانو واکسن‌ها می‌توانند با تعدیل پاسخ ایمنی در از بین بردن انگل لیشمانیا به نفع میزبان در تعامل باشند. لذا در مطالعه حاضر تلاش شد تا انواع واکسن‌های لیشمانیایی و روند توسعه آن‌ها، انواع حاملین، انواع کاندیدهای واکسن، استراتژی‌ها و سیستم‌های رهایش از گذشته تا حال مرور شود. در پایان می‌توان گفت نانو واکسن‌های ترکیبی متشکل از آنتی‌ژن‌های متعدد و به خوبی توسعه یافته همراه با ادجوانت اینترلوکین ۱۲ مانند Leish-111f و MPL-SE، بهترین شانس برای موفقیت در این زمینه است. موفقیت‌هایی که در زمینه واکسیناسیون لیشمانیا به دست آمده، به‌طور مشخص نشانگر نیاز بیش‌تر به انجام تحقیقات و سرمایه‌گذاری در زمینه تولید واکسن مناسب علیه لیشمانیا می‌باشد.

واژه های کلیدی: لیشمانیوز، نانو واکسن، لیپوزوم، نانوذره

### مقدمه

لیشمانیوزها از جمله بیماری‌های انگلی غفلت شده گرمسیری هستند که طیف وسیعی از علائم بالینی و پراکندگی جغرافیایی متنوعی را به خود اختصاص می‌دهند. این بیماری در شمار بیماری‌های زنونوز است که بیمارزایی (پروماستیگوت) آن توسط نیش پشه خاکی فلپوتوموس (Phelobotomus) ماده منتقل می‌شوند.

لیشمانیوزها از جمله بیماری‌های انگلی غفلت شده گرمسیری هستند که طیف وسیعی از علائم بالینی و پراکندگی جغرافیایی متنوعی را به خود اختصاص می‌دهند.

E-mail: mahdif53@yahoo.com

مؤلف مسئول: مهدی فخار - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی

۱. استادیار گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، مرکز تحقیقات ژنتیک ایمنی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشجوی دکتری انگل شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. استادیار گروه انگل شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. دانشیار گروه انگل شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۹/۲۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۹/۲۰ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱۱/۲۴

جوندگان و سگ سانان، میزبان های مخزن و انسان میزبان اتفاقی است (۱). این بیماری بیش تر به سه شکل لیشمانیوز احشایی (کالا آزار)، پوستی (سالک)، لیشمانیوز پوستی - مخاطی (اسپوندیا) مشاهده می شود. در انسان لیشمانیوز احشایی (VL)، پوستی (CL) و پوستی - مخاطی (MCL) به ترتیب در اثر عفونت ماکروفاژها در سراسر سیستم مونسیت- ماکروفاژ، پوست و مخاط حلق و بینی به وجود می آید (۲). براساس آمار سازمان جهانی بهداشت، موارد لیشمانیوز موجود در دنیا ۱۲ میلیون نفر و تعداد افراد در معرض خطر ۳۵۰ میلیون نفر تخمین زده می شود (۳). سالک از انواع دیگر بیماری (احشایی و پوستی - مخاطی) شایع تر است، به طوری که هر ساله نزدیک به ۷۰ درصد کل موارد جدید گزارش شده (حدود ۱-۱/۵ میلیون نفر) مربوط به این شکل بیماری می باشد و ۹۰ درصد موارد سالک جهان، از کشورهای ایران، اتیوپی، الجزیره، افغانستان، سودان شمالی، سوریه، برزیل، پرو، کلمبیا و کاستاریکا گزارش شده است (۴).

#### ضرورت تهیه واکسن برای بیماری لیشمانیوز

درمان لیشمانیوز به کمک ترکیبات آنتیموان (Antimuan) صورت می گیرد که از لحاظ اقتصادی به صرفه نبوده و همراه با عوارض جانبی است و متأسفانه همیشه مؤثر نیست. هم چنین مقاومت دارویی به خصوص در انواع آنتروپونوتیک گزارش شده است. مبارزه با مخازن و ناقلین نیاز به بودجه کلان دارد و خصوصاً در مواردی که مخزن بیماری انسان نیست، تقریباً موفق آمیز نبوده است. به نظر می رسد که تنها راه مبارزه با این بیماری، یافتن واکسنی مؤثر می باشد و بنا به دلایل متعدد از جمله مصونیت دراز مدت بعد از بهبودی از این بیماری و غیره، پژوهشگران بر این باورند که یافتن چنین واکسنی امکان پذیر است و یافتن واکسنی مؤثر، گامی بلند در رفع این مشکل خواهد بود (۵). از نظر تاریخی، موثرترین روش پیشگیری، لیشمانیواسیون

است، این روش از قرن ها پیش به عنوان روش پیشگیری در ایران باستان مرسوم بوده است، اما به دلیل مشکلاتی از جمله فقدان روش مناسب استاندارد کردن لیشمانیا *ماژور (ل. ماژور)*، که باعث عدم کنترل میزان بروز زخم و پیشرفت ضایعه می گردد، امروزه لیشمانیواسیون کم تر مورد توجه قرار گرفته است. روش پیشگیری ایده آل می بایست عوارض جانبی قابل قبول و اثربخشی لازم را داشته باشد که تاکنون در مورد لیشمانیواسیون امکان دسترسی به آن نبوده است و اگر عوارض ناشی از تلقیح انگل زنده را بتوان به نحوی کاهش داد، شاید بتوان از لیشمانیواسیون به عنوان روش پیشگیری و ارزیابی واکسن ها استفاده کرد. درمان مورد نیاز بر اساس محل ابتلاء به بیماری، گونه های لیشمانیا و نوع عفونت تعیین می شود (۶). برخی از داروهای ممکن برای درمان نوع احشایی بیماری شامل این موارد هستند:

آمفوتریسین B، ترکیبات آنتی موان پنج ظرفیتی (گلوکانتیم و پنتوستام)، پارومایسین (۷) و میلنفوسین (۸). البته برای درمان نوع پوستی بیماری، داروهای پارومایسین، فلوکونازول یا پنتامیدین می توانند مؤثر باشند (۹). بسیاری از این داروهای آلی که برای درمان لیشمانیوز استفاده می شده اند، امروزه به خاطر مقاومت دارویی بی اثر شده اند. انگل لیشمانیا *دونووانی (ل. دونووانی)* در صورت عدم درمان می تواند کشنده باشد و داروهای معمول آلی آن به علت مقاومت دارویی تقریباً بی اثر شده اند (۱۰). گزارشات متعدد بالینی به خصوص در مناطقی که بیماری به صورت اپیدمیک یافت می شود، حاکی از افزایش بیماران مقاوم نسبت به ترکیبات آنتی موان است (۱۱).

مطالعات اخیر در مورد چگونگی مقاومت انگل های لیشمانیا نسبت به ترکیبات آنتی موان در محیط برون تنی نشان می دهد که عدم پاسخ گویی بیمار به درمان با این ترکیبات، به علت پیدایش سوش های انگل مقاوم به درمان و میزان اثربخشی متغیر و سمیت آن ها است (۱۶-۱۲). مطالعات دیگر مؤید این نظر است که

اکوسیستم انگل وجود دارد. در حال حاضر هیچ واکنشی برای انسان در برابر لیشمانیوز وجود ندارد، اگرچه چندین واکنس در مرحله آزمایشات بالینی می باشد، اما هنوز بیش تر تحقیقات به صورت اولیه و در حال توسعه هستند. در حالت ایده آل برای محدود کردن استفاده از داروهای شیمیایی یک واکنس موثر علیه لیشمانیوز نیاز به ایمن سازی طولانی مدت است، که شامل یک پاسخ ایمنی متعادل و قوی از TH1 و TH2 در واکنسینون می باشد. با توجه به این که مطالعات وسیعی در خصوص واکنس های ضد لیشمانیا به ویژه انواع نانو واکنس ها در دنیا انجام شده است، لذا هدف از مطالعه حاضر، تجزیه و تحلیل انواع مطالعات انجام شده در خصوص این نوع واکنس های جدید، انواع حاملین و ادجوانت ها و معرفی کشورهای پیشتاز در این حوزه می باشد.

## مواد و روش ها

مطالعه از نوع مروری غیر نظام مند می باشد که به تازه ترین مطالب در سال های اخیر در زمینه نانو واکنس ها و واکنسینون علیه بیماری لیشمانیوز و هم چنین میزان مشارکت کشورهای مختلف در حوزه واکنس های لیشمانیا با استفاده از تکنیک های علم سنجی و بر اساس نمایه نامه های استنادی تامسون پرداخته است.

جستجو طی سال های ۲۰۰۵ تا ۲۰۱۶ در پنج پایگاه انگلیسی زبان ( Science Direct, Scopus, Ebsco, PubMed and Google Scholar ) و چهار پایگاه فارسی زبان ( Elm Net, Barakat Knowledge Network System, Magiran, and the Scientific Information Database (SID) ) انجام شد. تمام مقالات مربوط به لیشمانیوز، واکنسینون و نانو واکنس ها انتخاب شدند. واژه های مورد جستجو: "Leishmaniasis"، "Leishmania"، "Vaccine"، "Nanovaccine and delivery"، "Antileishmania" در نظر گرفته شدند.

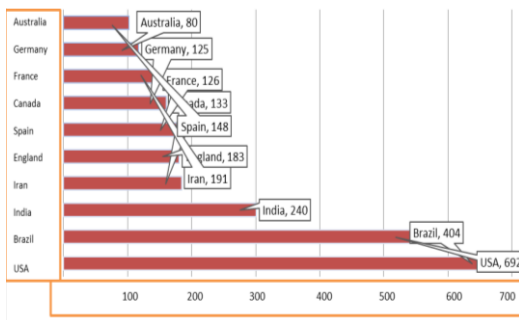
بروز مقاومت به داروهای از جمله ترکیبات آنتی موان، نتیجه درمان ناقص یا ناکافی بیماران بوده که در بعضی از آن ها باعث عود بیماری شده است (۱۷). هم چنین مطالعه دیگری نشان داد که سوش مقاوم انگل، قدرت بیماری زایی و تکثیر بیش تری نسبت به سوش حساس ندارد (۱۸). مقاومت لیشمانیا دنوووانی به داروی سدیم اسیبوگلوکونات (با نام تجاری پنتوستام)، داروی معمول برای درمان بیماری، بسیار گسترده است. محققان دریافتند که در سلول انگل های مقاوم، غلظت تیول ها (ترکیبات حاوی گوگرد) افزایش می یابد. آن ها هم چنین آنزیم تریپانوتیون ردوکتاز و نیز ژن MRPA (multiple resistance and pH adaptation) را در انگل های مقاوم شناسایی کردند. این سه فاکتور موجب افزایش برداشت و حذف دارو از داخل سلول انگل و در نتیجه، مقاومت دارویی می گردد. آمفوتریسین B در سال ۱۹۸۰ معرفی شد. این دارو به خاطر فرمولاسیون چربی آن تا حد زیادی باعث کاهش سمیت آن شده است، اما هزینه بالا و سمیت، آن را از دسترس بیماران دور می کند (۱۹، ۲۰). میلنفوسین داروی انتخابی دیگری است که تنها داروی خوراکی برای درمان لیشمانیوز احشایی است، با این حال کاهش اثر بخشی میلنفوسین در تعدادی از مطالعات بالینی گزارش شده است (۲۱، ۲۲). درمان ترکیبی یک روش برای غلبه بر مشکل مقاومت و سمیت داروهای موجود است. با این حال، هنوز هم خطر افزایش سمیت داروها در بیماران مقاوم به دارو که دچار بیماری ایدز می باشند، وجود دارد؛ این بدان معنی است که حتی با درمان ترکیبی، عفونت به سختی به درمان جواب می دهد (۲۳). در لیشمانیوز احشایی، در مقایسه با هزینه های درمان های رایجی که صورت می گیرد، یک واکنس تنها پنج سال می تواند اثر حفاظتی ۵۰ درصدی در برابر بیماری داشته باشد که هنوز هم می تواند موثر باشد (۲۴، ۲۵). بنابراین نیاز ضروری برای تهیه واکنس مناسب برای CL و VL در طیف گسترده ای از حالات بیماری، از جمله سطوح مختلف انتقال انگل و

## روند توسعه واکسن های لیشمانیا

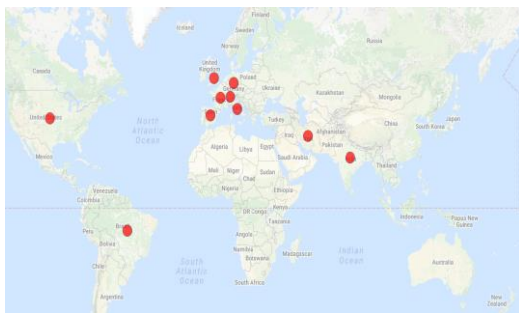
شواهد آزمایشگاهی و بالینی فراوانی، حاکی از قابل کنترل بودن لیشمانیا به وسیله واکسیناسیون می باشند. دو شاهد که امکان تهیه و تولید واکسن موثر علیه لیشمانیوزها را قوت می بخشد، شامل تست پوستی (مونه نگر) مثبت در افرادی که قبلاً به بیماری مبتلا شده و بهبود یافته اند (فعال بودن سیستم ایمنی سلولی) و دیگری لیشمانیزاسیون با استفاده از پروماستیگوت های زنده *L. ماژور* می باشد که باعث محافظت شخص در برابر عفونت های بعدی لیشمانیوز پوستی می گردد (۲۶). اما این روش به دلیل ایجاد ضایعات غیر قابل پذیرش از سوی بیماران از جمله موارد بهبود نیافته و ایجاد زخم های بد شکل در ایران و سایر کشورها ادامه نیافت. از آن جایی که لیشمانیوز احشایی سالیانه باعث مرگ و میر فراوان در سطح دنیا شده و از نظر اقتصادی هزینه های زیادی بر دولت ها و افراد جامعه وارد می کند و از طرفی کنترل ناقلین و مخازن حیوانی بسیار مشکل و پرهزینه و دارو درمانی نیز کارایی چندانی ندارد، لذا دسترسی به یک واکسن موثر و کم هزینه به خصوص در مناطق اندمیک بسیار ضروری بوده و کم هزینه ترین استراتژی جهت کنترل بیماری است (۲۷، ۲۸). اولین واکسنی که برای لیشمانیوز احشایی انسان استفاده شد، واکسن اتوکلاو شده انگل *L. ماژور* بود که در شرق سودان مورد ارزیابی قرار گرفت. در حال حاضر، تلاش محققین بر روی آنتی ژن ها و ادجوانت های جدید، واکسن های زنده تخفیف حدت یافته، پروتئین های زیر واحدی (Sub-unit) و نو ترکیب (Recombinant)، DNA برهنه (Naked-DNA) و سلول های دندریتیک به عنوان هدف می باشند. یک واکسن ایده آل علیه لیشمانیوز بایستی دارای چندین خصوصیت باشد، از جمله: ایمن بودن، کم ترین تعداد ایمن سازی توأم با محافظت طولانی مدت علیه اکثر گونه های ایجاد کننده بیماری، عاری بودن از محصولات حیوانی، مقرون به صرفه بودن و نهایتاً قابلیت مصرف واکسن هم برای درمان و هم

به منظور پیشگیری. البته سایر خصوصیات مانند تک دوز بودن و استفاده از واکسن بدون سر سوزن را نیز می توان در نظر گرفت. لازم به ذکر است علی رغم تلاش های فراوانی که در زمینه واکسن های لیشمانیوز پوستی و احشایی در سطح ایران و جهان انجام گرفته است، تاکنون واکسن ایده آلی برای این دو بیماری وارد بازار نشده است. امروزه واکسنی را که حاوی چندین آنتی ژن بوده و ترجیحاً شامل آنتی ژن هایی باشد که در میان گونه های مختلف انگل، ثابت (Conserved) باشد و در سطح آماستیگوت ها به فراوانی بیان شود، به عنوان واکسن ایده آلی معرفی نموده اند. البته شناسایی آنتی ژن های مناسب به تنهایی برای تهیه واکسن ایده آل مناسب نیستند، بلکه استفاده از ادجوانت هایی که بتواند به طور قوی پاسخ های Th1 را تحریک کند نیز بسیار ضروری است. به طور مثال ادجوانت هایی که تاکنون به کار گرفته شده، آلوم و اسکوالن می باشند که القاکننده های ضعیفی برای Th1 هستند. اما آخرین ادجوانتی که با موفقیت به کار رفته، IL-12 می باشد. جدیدترین واکسن تهیه شده علیه لیشمانیوزها، واکسن نو ترکیب و مرکب از سه آنتی ژن LeIF, TSA, LmST11 می باشد که به نام Leish-111f نامگذاری شده است و ادجوانت آن IL-12 می باشد. آنتی ژن هایی که در این واکسن به کار رفته است هم در پروماستیگوت و هم در آماستیگوت انگل وجود دارد و در میان بیش تر گونه های لیشمانیا از جمله *L. اینفانتوم* و *L. ماژور* موجود است (۵). بنابراین با استفاده از این واکسن، مصنوعیت علیه چند گونه از انگل ایجاد می شود. از مزایای دیگر این واکسن می توان به کاربرد همزمان برای پیشگیری و درمان بیماران (موارد مقاوم به درمان) اشاره نمود. مرحله اول کار آزمایی بالینی واکسن در آمریکا با موفقیت به پایان رسیده است و واکسن وارد مرحله دوم کار آزمایی شده است و این تنها واکسن لیشمانیوز است که وارد مرحله دوم کار آزمایی بالینی شده است. تاکنون تنها واکسن ضد لیشمانیا موجود به صورت تجاری، واکسنی با

در تصویر شماره ۱ و ۲ آمده است. از نکات جالب تصویر شماره ۱، حضور ایران در زمره کشورهای پیشتاز (رتبه چهارم)، پس از هندوستان می باشد و این که علی خامنه‌ای پور از ایران بیشترین مطالعات و پژوهش را در زمینه واکسن لیثمانیا در دنیا به انجام رسانده است. یکی از مواردی که باعث تأثیرگذاری یک پژوهشگر در حوزه تخصصی اش می شود، نحوه تعامل او با سایر پژوهشگران است. توانایی تأثیرگذاری بر دیگران از این طریق باعث می گردد تا آن پژوهشگر از نفوذ اجتماعی بالاتری برخوردار شود (۳۰). به عبارت دیگر پژوهشگر دارای نفوذ اجتماعی بالاتر است که قادر باشد از طریق تعاملات اجتماعی با سایر پژوهشگران بتواند افکار را تغییر دهد.



تصویر شماره ۱: ده کشور پیشتاز در حوزه پژوهش های واکسن لیثمانیا



تصویر شماره ۲: پراکندگی ۱۰ کشور پیشتاز در پژوهش های واکسن لیثمانیا

همین طور که در تصویر شماره ۲ مشخص است، از نظر توزیع جغرافیایی، کشورهای اروپایی با داشتن چهار نماینده در بین ده کشور فعال جهان، فعالیت بیشتری

نام تجاری Leishmun برای سگ بوده که حاوی Native fucose mannose-ligand antigen complex می باشد. دلایل متعددی محققین را برای پژوهش در زمینه تولید واکسن ترغیب می کند، از جمله ایجاد مصونیت دائمی بعد از بهبودی از زخم سالک، امکان مطالعه واکسن در مدل های حیوانی، امکان کشت پروماستیگوت گونه های لیثمانیا به صورت خالص و نیز این که معمولاً افراد بومی که در مناطق آندمیک بیماری زندگی می کنند، بیش از یک بار به لیثمانیوز مبتلا نمی شوند و بیماری در این افراد خفیف تر است. بنا به دلایل مذکور و تلاش های نسبی جهان و این که تولید و ارزیابی واکسن لیثمانیوز جزو اولویت های سازمان بهداشت جهانی در دهه اخیر بوده است (۲۹)، واکنش‌یون مناسب ترین فرصت برای پیشگیری و درمان بی خطر همه اشکال بیماری لیثمانیوز می باشد؛ بنابراین توسعه یک واکسن ضد لیثمانیای ایمن، موثر و مقرون به صرفه یکی از اولویت های اصلی بهداشت عمومی جهانی است، که این رویکرد امیدوارکننده ترین باقی مانده است. این مقاله به آخرین اطلاعات در مورد واکسن های نسل اول، نسل دوم، نسل سوم و واکسن های زنده و به خصوص نانو واکسن های ضد لیثمانیا اشاره دارد.

کشورهای پیشتاز در حوزه پژوهش های واکسن لیثمانیا بررسی میزان مشارکت هر یک از کشورهای جهان در پژوهش های بین المللی در ارتباط با واکسن لیثمانیا از موارد دیگری است که در این پژوهش با استفاده از تکنیک های علم سنجی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان می دهد که ایالات متحده آمریکا با انجام ۶۹۲ پژوهش لیثمانیا در مقایسه با سایر کشورهای جهان در رتبه نخست قرار دارد. در بازه زمانی ۳۶ سال (۱۹۸۰-۲۰۱۵)، پژوهشگران این کشور در بالغ بر ۳۰ درصد از پژوهش های لیثمانیا در جهان سهیم بوده اند. کشور ایران نیز با ۱۹۱ مقاله در این حوزه در رتبه چهارم جهان قرار دارد. ده کشور پر تولید در حوزه پژوهش های لیثمانیا

پیرامون پژوهش های واکسن لیثمانیا دارند و قاره آسیا با دو کشور هند و ایران در این میان وضعیت نسبتاً خوبی دارد؛ هر یک از قاره های آمریکای شمالی دو نماینده و آمریکای جنوبی و اقیانوسیه نیز یک نماینده در این بین دارند. این در حالی است که قاره آفریقا نماینده ای در بین کشورهای فعال ندارد.

#### واکسن های نسل اول

تحقیقات در مورد تولید و ارزیابی واکسن های نسل اول که منحصر به استفاده از انگل لیثمانیای کشته شده به تنهایی یا همراه با BCG بود، در دنیای جدید و در دنیای قدیم تحت شرایط GMP تولید و در انسان و سگ مورد ارزیابی قرار گرفت. در دنیای قدیم، واکسن از انگل *L. ماژور* توسط موسسه واکسن و سرم سازی رازی به تولید انبوه رسید. ابتدا واکسن تجربی شامل لیثمانیای کشته به وسیله حرارت (ALM) مخلوط با مقدار کمی (۰/۱ دوز معمولی) از واکسن سل (BCG) در ایران و پاکستان و سودان مورد ارزیابی بالینی قرار گرفت. نتایج ارزیابی این واکسن نشان داد که اگر چه واکسن بی خطر است، اما در برابر ابتلاء به لیثمانیوز (سالک) مصونیت کافی ایجاد نمی نماید (۳۱). در ادامه انواع واکسن های نسل اول به طور مختصر شرح داده می شود:

#### واکسن حاوی سویه های تضعیف شده

تاکنون چند سویه ضعیف به صورت واکسن پروماستیگوت مورد مطالعه قرار گرفته اند. از جمله سویه ضعیف شده لیثمانیا برزیلیسیس که بر روی ۲۰۴ نفر داوطلب بررسی و هیچ حفاظتی در افراد تحت تزریق قرار گرفته مشاهده نشد، ولی ۵۸ درصد افراد واکسینه از نظر واکنش پوستی لیثمانین مثبت شدند (۳۲).

همچنین در مطالعه ای از یک سویه *L. دونووانی* که به طور طبیعی ضعیف بود، برای ایمن سازی علیه لیثمانیوز احشایی استفاده کرد. در این مطالعه حدود ۳۰۰۰ نفر تحت بررسی قرار گرفتند که به دو گروه

شاهد و آزمایش تقسیم شدند. نتایج مشخص کرد که هیچ اختلافی در میزان بروز ضایعه لیثمانیوز پوستی بین دو گروه وجود ندارد (۲۶). این نتایج مایوس کننده با نتایج ایمن سازی علیه لیثمانیوز پوستی با استفاده از سویه بیماری زا مطابقت داشت. چرا که در لیثمانیوز پوستی فقط در صورت ظهور زخم ایمنی ایجاد می شود (۳۲).

#### واکسن کشته شده

در عصر قدیم، تلاش های محققین از جمله Berberian در سال ۱۹۴۴ برای ایجاد یک واکسن با استفاده از پروماستیگوت های کشته شده مایوس کننده بوده است (۳۳). در قاره آمریکا پیشگام این مطالعات Salles Gomes بوده است که به افراد دارای ضایعات پوستی لیثمانیایی، عصاره پروماستیگوت های کشته شده را تزریق کرد و پاسخ های متفاوتی بر اساس این که تزریق چگونه انجام شده بود، مشاهده کرد. وی بر اساس این مشاهدات، نتیجه گیری کرد که با این روش می توان به واکسنی علیه لیثمانیا دست یافت (۳۴). یک سال بعد، ایده او توسط Pessoa در برزیل به کار گرفته شد و واکسنی که از سویه های مختلف لیثمانیا ساخته شده بود، مورد ارزیابی قرار گرفت (۳۴). ۳۵ سال بعد یعنی در سال ۱۹۸۷، Mayrink و همکاران این مطالعات را با استفاده از تلقیح یک واکسن کشته شده پروماستیگوت که حاوی ۵ سویه متفاوت لیثمانیا از نواحی مختلف برزیل بود، تجدید کردند (۳۵). از دو تجربه دیگر که در ناحیه آمازون صورت گرفت، نتیجه گیری شد که این واکسن قادر است میزان بروز سالیانه لیثمانیوز پوستی را در میان افراد واکسینه شده که پس از دریافت واکسن دارای یک آزمایش جلدی مثبت بوده اند، تا ۷۰ درصد کاهش دهد. در ایران سویه ای از *L. ماژور* که برای لیثمانیوز احشایی استفاده می شد، در تولید یک واکسن با شرایط GMP توسط انستیتو رازی حصارک مورد استفاده قرار گرفت. فاز ۱ و ۲ مطالعات از سال ۱۹۹۱ آغاز شد و

دوزهایی از آنتی ژن‌های کشته شده *لیشمانیا* به داوطلبان داده می‌شد و در خلال آن برخی از آزمون‌های آزمایشگاهی و پارامترهای ایمنی‌شناسی مثل تغییر وضعیت آزمون جلدی سنجش می‌شد.

در روند این مطالعات مشخص شد که فرآورده آنتی ژن *لیشمانیا* بسیار ناپایدار است و نگهداری واکسن حتی در  $-70^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد، مانع فعالیت پروتولیتیک آنزیمی نمی‌شود (۳۳). این امر منجر به جستجوی روشی برای ثابت نگهداشتن واکسن شد. مطالعات مدل حیوانی واکسن‌های کشته شده با استفاده از چند جنس مختلف صورت گرفته است.

در نخستین ایمن‌سازی موفقیت آمیز در مدل موش، با استفاده از ارگانیسیم‌های کشته شده، Howard و همکاران در سال ۱۹۸۲ نشان دادند تزریق داخل صفاقی یا درون وریدی که *ل. مائور* در معرض اشعه گاما قرار گرفته بود، به گروه‌های مختلف حیوان، آن‌ها را در مقابل چالش عفونت زامقاوم می‌کند. با این وجود، موش‌ها در زمان چالش، DTH منفی بوده‌اند (۳۶).

در این مطالعه و بررسی‌های دیگر، راه‌های مختلف ایمن‌سازی از قبیل زیر پوستی یا داخل عضلانی نه فقط مصونیت ایجاد نکرده است بلکه موجب وخیم‌تر شدن بیماری شده است (۳۷).

در مدل میمون‌های *Vervet*، تزریق داخل پوستی پروماستیگوت‌های کشته شده *ل. مائور* همراه با BCG یا بدون آن موجب برانگیختن پاسخ قوی DTH شده است، ولی تولید اینترفرون گاما کم بوده یا اصلاً وجود نداشته است. پس از چالش حیوانات ایمن شده با پروماستیگوت‌های ویرولان *ل. مائور*، حفاظت قاطعی مشاهده نشده است (۳۸).

#### واکسن‌های نسل دوم

واکسن‌های نسل دوم یا واکسن‌های نو ترکیب در واقع قطعات نو ترکیب از پروتئین‌های ایمونوژنیک انگل

*لیشمانیا* می‌باشند. هدف از مطالعات واکسن نسل دوم، واکسن‌های ساب یونیت متشکل از پروتئین‌های نو ترکیب یا پلی پروتئین تولید شده توسط کلونینگ DNA می‌باشد. نسل دوم واکسن‌های خالص شده، مثل پروتئین‌های نو ترکیب همراه با ادجوانت‌ها و یا بیان شده در دیگر وکتورهای میکروبی است، که نشان دادند برای واکسیناسیون همگانی، بیش‌تر کاربرد دارند (۲۹، ۳۱). بنابراین، پاسخ به دست آمده از واکسن نسل دوم می‌تواند با ادجوانت‌های مربوطه بیش‌تر تقویت شود (۳۱). با این حال، واکسن نسل دوم با ادجوانت‌های مختلف و قدرت بیش‌تری همراه است. چون آنتی‌ژن‌های خام حاوی بسیاری از ایمونوژن‌های ناشناخته است، به منظور محدود نمودن تاثیرات سوء واکسن بهتر است واکسن‌ها حاوی آنتی‌ژن‌های خالص یا مشتقاتی از آن‌ها باشند که ویژگی‌های ایمنی‌شناسی آن‌ها به دقت تعیین شده باشد. مطالعات نشان داده است که نه فقط آنتی‌ژن‌های غشایی انگل *لیشمانیا* قادر به ایجاد حفاظت هستند (۳۹)، بلکه آنتی‌ژن‌های غیر غشایی نیز همین حفاظت را ایجاد می‌کند (۴۰).

محققین در سال‌های گذشته ثابت کرده‌اند که اجزاء آنتی‌ژن ممکن است موجب حفاظت و یا وخیم‌تر شدن بیماری شود. راهی که آنتی‌ژن به سیستم دفاعی میزبان عرضه می‌شود، اغلب سرنوشت بیماری را متعاقب عفونی شدن تعیین می‌کند (۴۰). در این زمینه، سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن دارای نقشی حساس هستند. بسیاری از اجزاء ایمونوژن مربوط به غشاء یا سیتوپلاسم *لیشمانیا* در مطالعات سال‌های اخیر واکسن مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۴۱). آخرین گزینه‌هایی که برای واکسن‌های نسل دوم به عنوان کاندید مطرح می‌باشند شامل gp63, HASPB1, LCR1, P/36 KACK, SP15 PSA-2, LeIF, H1, LmST11 آنتی ژن‌های LD1، سیستمین پروتئیناز A و B، TSA و gp46 (M-2) می‌باشند که در ادامه به آن‌ها اشاره می‌شود.



لیپوفسفوگلیکان (LPG)<sup>۱</sup>

LPG در همه گونه های لیثمانیا یافت می شود و فراوان ترین ترکیب سطحی انگل است (۴۳). LPG با اشکال متفاوتی در سطح آماستیگوت و پروماستیگوت ظاهر می شود و حاوی ساکاریدهای فسفریله شده است که توسط یک هسته هیدرات کربن به یک قلاب لیپیدی متصل است. این ماده فوق العاده ایمنوزن است و ایمن سازی موش های حساس با LPG خالص شده ل. مائورر (۴۰) و یا ایمن سازی موش های حساس با LPG خالص شده لیثمانیا مکزیکانا منجر به حفاظت کامل یا نسبی شده است. به نظر می رسد حضور جزء لیپیدی این مولکول برای حفاظت ضروری است زیرا تزریق جزء فاقد لیپید تنها باعث تشدید بیماری پس از عفونت می شود (۴۲). جدا سازی LPG با روش های مذکور همراه با اتصال این ماده با مواد پیتیدی بوده است و بنابراین روشن نیست که LPG خود حاوی اپی توپ های سلول T باشد. گروهی پیشنهاد می دهند که پاسخ سلول های انسان به LPG در حقیقت پاسخ به این مانده های پروتئینی متصل به LPG است زیرا که در معرض پروتئیناز قرار گرفته است و قادر به تحریک پاسخ سلول T نیست. بنابراین مکانیسم حفاظت و استفاده احتمالی از واکسنی بر اساس LPG نیاز به مطالعات بیش تری دارد (۳۱).

## گلیکوپروتئین ۶۳ (gp63)

گونه های مختلف لیثمانیا دارای یک گلیکوپروتئین بر روی سطح شان هستند که گلیکوپروتئین سطحی اصلی لیثمانیا می باشد و gp63 نامیده می شود. این گلیکوپروتئین یک متالوپروتئیناز سطحی می باشد و ۶۳ کیلو دالتون وزن مولکولی آن است (۴۳). این پروتئین نقش مهمی در ورود انگل به ماکروفاژها و متعاقباً زنده ماندن درون فاگوزوم ها دارد. gp63 به عنوان یک لیگاند برای اتصال انگل به گیرنده ماکروفاژ عمل

می کند (۴۴). gp63 هم در فرم پروماستیگوت و هم در فرم آماستیگوت انگل *L. major* بیان می شود. این گلیکوپروتئین هم چنین یک واکسن کاندید برای مقابله با لیثمانیوز می باشد (۴۵).

در پروماستیگوت، gp63 به میزان زیادی روی سطح انگل عرضه می شود و بیش از ۳۶ ساعت داخل ماکروفاژ روی سطح انگل زنده می ماند. به همین دلیل پیشنهاد می شود که gp63 می تواند به عنوان یک فاکتور بیماری زا در فاز اولیه عفونت وارد عمل شود (۴۶). برای مقابله با لیثمانیوز و ابداع واکسن، نوع نو ترکیب gp63 یعنی (rgp63)<sup>۲</sup> نیز تهیه شده است (۴۷). در مقایسه با gp63 طبیعی فاقد مولکول های متصل قندی بوده و وزن مولکولی آن ۵۴ تا ۵۸ کیلو دالتون می باشد. نشان داده شده است که rgp63 به صورت ایمونولوژیک به وسیله مونوکلونال آنتی بادی های موشی (mAbs) تهیه شده علیه gp63. مائورر و هم چنین سلول های T انسانی شناخته می شود. سلول های T پر ایم شده به gp63 قادر به شناسایی rgp63 دناتوره شده نیز می باشند. در یک مطالعه نشان داده شده است rgp63 باعث DTH مثبت در میمون های *Vervet* که زخم های سالکی مشابه انسان ایجاد می کنند، می شود، ولی به تنهایی یا به همراه BCG به عنوان ایمونوآدجوانت برای القاء ایمنی سلولی فقط به مقدار نسبی (۵۰ درصد) از میمون ها در مقابل چالش با انگل زنده محافظت می کند (۴۸). در مطالعات دیگر، فرم های لیپوزومی rgp63 قادر به ایجاد مصونیت تا ۷۵ درصد در مقایسه با گروه های کنترل شده می باشد (۳۱). در یک بررسی توانایی rgp63 محصور در لیپوزوم برای القاء پاسخ ایمنی و محافظت در برابر عفونت ل. مائورر در موش های حساس بالب/سی (BALB/c) مورد مطالعه قرار گرفته است. در این بررسی لیپوزوم های حاوی rgp63 از لسیتین تخم مرغ و کلسترول با استفاده از روش حلالیت دترجنت تهیه شده اند. در مصون سازی

2. recombinant GP63

1. lipophosphoglycan

*Leishmania-derived recombinant poly-protein (Leish-111f) or LEISH-F1*

Leish-111F یک پلی آنتی ژنی که متشکل از سه آنتی ژن SA، LEIF، LMST11 است. آنتی ژن‌هایی که در این واکسن به کار رفته است هم در پروماستیگوت و هم در آماستیگوت انگل وجود دارد و در میان بیش‌تر گونه‌های لیشمانیا از جمله *L. اینفانتوم* و *L. مازور* موجود است. بنابراین با استفاده از این واکسن مصونیت علیه چند گونه از انگل ایجاد می‌شود. از مزایای دیگر این واکسن می‌توان به کاربرد هم زمان برای پیشگیری و درمان بیماران (موارد مقاوم به درمان) اشاره نمود. مرحله اول کارآزمایی بالینی واکسن در آمریکا با موفقیت به پایان رسیده است و واکسن وارد مرحله دوم کارآزمایی شده است و این تنها واکسن لیشمانیوز است که وارد مرحله دوم کارآزمایی بالینی شده است. هنگامی که با (MPL-SE) monophosphoryl lipid A-stable emulsion ترکیب می‌شود، باعث پاسخ ایمنی قوی از نوع Th1 می‌شود. در مطالعه Coler و همکارانش بر روی این ژن، افزایش پاسخ ایمنی هومورال و سلول T قوی برای آنتی ژن واکسن را در موش بالب/سی (BALB/c) نشان داد. تجزیه و تحلیل پاسخ‌های ایمنی سلولی واکسینه موش سالم نشان داد که تزریق واکسن، افزایش قابل توجهی در CD4 (+) سلول‌های T، تولید اینترفرون گاما، اینترلوکین ۲ و سیتوکین فاکتور نکروز تومور و یک پاسخ ایمنی Th1 نشان می‌دهد. عفونت تجربی موش‌های واکسینه و هامستر نشان داد که Leish-111f + MPL-SE باعث حفاظت قابل توجهی در برابر عفونت *L. اینفانتوم* می‌شود (۵۰).

*Hydrophilic Acylated Surface Proteins (HASP)*

آنتی ژن HASP از خانواده Hydrophilic Acylated Surface Proteins است، که حاوی انواع گسترده و متنوع اسید آمینه‌های تکراری در ساختمانش است که در غشای پلاسمایی در عفونت

موش‌های بالب/سی (BALB/c)، rgp63 تنها، محافظت نسبی‌ای را نشان داده است در حالی که rgp63 محصور در لیپوزوم نشان‌دهنده افزایش قابل ملاحظه محافظت در برابر عفونت بوده است. مشاهده تعداد انگل در طحال موش‌های چالش شده با انگل *L. مازور* در گروه‌های مصون شده با rgp63 تنها و rgp63 محصور در لیپوزوم به‌طور معنی‌داری کم‌تر از گروه‌های کنترل بوده، هرچند کم‌ترین تعداد انگل در گروه rgp63 محصور در لیپوزوم مشاهده شده است. rgp63 تنها و rgp63 محصور در لیپوزوم هر دو پاسخ DTH قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه کنترل ایجاد کرده‌اند که این پاسخ نیز در گروه rgp63 تنها کم‌تر از rgp63 محصور در لیپوزوم بوده است. هم‌چنین تیترا ایزوتایپ‌های IgG ضد لیشمانیا (IgG2a/IgG1) غالب بودن پاسخ ایمنی نوع Th1 (ایمنی سلولی) را تنها در گروه rgp63 محصور در لیپوزوم نشان داده است. در نتیجه می‌توان گفت لیپوزوم می‌تواند ایمونودجوانت مناسبی در توسعه واکسن لیشمانیا باشد (۴۹). بنابراین rgp63 نیز می‌تواند به عنوان واکسن کاندید علیه لیشمانیا باشد ولی از نظر ایمن‌زایی ضعیف بوده و نیاز به تقویت اثر با استفاده از ایمونودجوانت‌های دیگر دارد.

*نوکلئاز (Leishmania major class I nucleases) LmaCIN*

LmaCIN یک نوکلئاز با وزن مولکولی ۳۵/۵ کیلو دالتون می‌باشد که دارای ۳۱۶ آمینواسید است. انگل‌های لیشمانیا قادر به سنتز اسیدهای نوکلئیک پورینی نیستند. بنابراین برای تهیه این نوع از اسیدهای نوکلئیک متکی به استفاده مجدد از نوکلئوتیدها می‌باشند. LmaCIN یک آنزیم نوکلئوتیداز می‌باشد که با هیدرولیز کردن اسیدهای نوکلئیک در ناحیه ۳-نوکلئوتید، باعث فراهم آمدن پورین‌ها می‌شود. این آنزیم فقط در فرم آماستیگوت داخل سلولی بیان می‌شود و نشان داده شده است که این پروتئین قادر به القاء ایمنی سلولی Th1 می‌باشد و می‌تواند واکسن کاندید مناسب برای مقابله با لیشمانیوز پوستی باشد (۴۷).

خارج سلولی (metacyclic) و داخل سلولی (amastigote) در گونه های لیشمانیای دنیای قدیم بیان می شود. در حالی که HASPs در میزبان آنتی ژنیک هستند و می توانند پاسخ های ایمنی حفاظتی بدن را القاء کنند، اما عملکردهای بیولوژیک از این پروتئین های اختصاصی لیشمانیا حل نشده باقی مانده است. تجزیه و تحلیل ژنوم قبلی نشان داده است که انگل از زیر جنس لیشمانیا (Viannia) ژن HASP از ژنوم خود را از دست داده اند (۵۱).

#### واکسن های نسل سوم

امیدوارکننده ترین و هیجان انگیزترین زمینه تحقیقاتی در واکسن ها به دنبال این مشاهده آغاز شد که تزریق پلاسمید DNA برهنه کدکننده آنتی ژن های کلون شده در عضله، منجر به بیان آنتی ژن بر روی سطح سلول های عضلانی و تولید پاسخ ایمنی شد. واضح است که DNA جذب شده و سپس به RNA تبدیل شده و سپس به صورت یک پروتئین بر روی سطح سلول بیان شده است و در آن جا سبب تحریک سیستم ایمنی شده است.

DNA واکسن ها جزء نسل سوم واکسن ها قرار می گیرند. آن ها به دلیل تولید راحت و ارزان مورد توجه می باشند (۳۶)، اما به دلایلی از قبیل بار منفی و اندازه بزرگ DNA و هم چنین عواقب نامعلوم ورود آن به ژنوم، استفاده محدودی دارند. هم چنین انتخاب وکتوری مناسب و کارآمد به منظور تهیه واکسن های نو ترکیب از موانع موجود در تهیه واکسن های نسل سوم می باشد (۴۸).

#### *Leishmania homologue for receptors of activated C kinase (LACK)*

ژن LACK یک پروتئین متصل شونده پلاسمینوژنی از *L. ماژور* است. این ژن یک آنالوگ از پروتئین های RACK (receptor for activated C-kinase) است که در یوکاریوت ها عرضه می شود که از خانواده پروتئین های WD40 می باشد. RACKs ها به خاطر نقش تثبیت

کنندگی فرم فعال پروتئین کیناز C شناخته می شود و علاوه بر این به عنوان پروتئین های واسطه فعل و انفعالات پروتئین- پروتئین و هم چنین به عنوان آداپتورهایی برای پروتئین های multicomplex در گیر در مسیرهای سیگنالی نقش دارند. عملکرد مولکولی ژن LACK به خوبی مشخص نشده است، اما عملکرد ایمونولوژیک آن به خوبی مورد مطالعه قرار گرفته است. LACK به عنوان واکسن های مدل موشی بیش تر استفاده می شود و ثابت شده که این آنتی ژن برای زنده ماندن انگل و برای پایداری انگل در بدن میزبان ضروری است (۵۲، ۵۳). هم چنین محصول ژن LACK پاسخ ایمنی سریعی علیه انگل ایجاد می کند. اگر در ایمنی زایی علیه لیشمانیوز، همراه با LACK DNA همراه با لیپوزوم استفاده شود، باعث انتقال و تولید ایمنی هومورال و سلولار و ایجاد اثرات حفاظتی خوبی علیه لیشمانیوز می شود (۵۲).

#### سایر واکسن ها

##### واکسن های علیه غدد بزاقی پشه خاکی

دسته دیگری از واکسن ها، واکسن های فاقد انگل لیشمانیا هستند که علیه بزاق پشه عمل می کنند. مشاهده افزایش بیماری زایی و تشدید عفونت لیشمانیا توسط عصاره غدد بزاقی پشه منجر شد که این واکسن ها در چند دهه اخیر مورد توجه قرار گیرند (۴۵). در نظر گرفتن این فرضیه که حضور اجزایی در بزاق پشه ناقل می تواند در ایجاد بیماری ضروری باشد، این راهکار را ارائه می دهد که ایجاد ایمنی در برابر آنتی ژن های مربوط به حامل به عنوان روشی غیر مستقیم جهت ایمن سازی علیه بیماری به کار رود (۵۴).

در بررسی غدد بزاقی پشه فلیبوتوموس پاپاتاسی (*Phlebotomus papatasi*)، تعداد نه پروتئین شناسایی شد که در میان آن ها، یک مولکول با وزن ۱۵ کیلو دالتون (SP15) بیش ترین توانایی را در ایجاد ایمنی در مقابل پیشرفت بیماری در موش نشان داد. واکسینه کردن

## لیپوزوم‌ها (Liposome)

لیپوزوم‌ها، وزیکول‌های میکروسکوپی هستند که از دو لایه فسفولیپیدی تشکیل می‌شوند و حاوی فازهای آبی هستند. ترکیبات مختلف درمانی (هم محلول در آب و هم محلول در چربی) را می‌توان وارد لیپوزوم کرده و کارآیی و اختصاصیت آن را افزایش داد (۵۶). علاوه بر این لیپوزوم‌ها ایمونوداجوانت‌های مؤثر برای آنتی‌ژن‌های پروتئینی هستند (۵۷، ۵۸). این وزیکول‌ها برای طیف‌های مختلفی از آنتی‌ژن‌ها قادر به تحریک هر دو پاسخ ایمنی هومورال و سلولی هستند (۵۹، ۶۰). یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های لیپوزوم‌ها به عنوان ایمونو ادجوانت، توانایی آن‌ها در تحریک سیستم ایمنی سلولی به صورت اختصاصی است (۵۸). این هدف به وسیله روش‌های مختلف مانند انتخاب فسفولیپید مناسب (۶۳-۶۱)، انتخاب بار الکتریکی مناسب روی سطح لیپوزوم‌ها (۶۴)، پوشش دادن لیپوزوم‌ها با ترکیب‌های قندی حاوی اولیگومانوز نظیر مانان (۶۵) و تهیه لیپوزوم‌ها به طوری که آنتی‌ژن در سطح لیپوزوم‌ها یا در قسمت دو لایه لیپوزوم‌ها قرار گیرد (به جای این که در فاز آبی داخلی لیپوزوم‌ها قرار گیرد) قابل دست‌یابی است (۶۶). Alving اولین فردی بود که از لیپوزوم به عنوان حامل برای درمان تجربی لیشمانیا استفاده کرد و نشان داد که لیپوزوم مورد استفاده برای به دام افتادن داروهای antimonials اثر بخشی آن ۷۰۰ برابر در مقایسه با داروی غیر محبوس (بدون لیپوزوم) افزایش یافته است (۶۷، ۶۸). بیش‌ترین مطالعات در زمینه واکنش‌های لیپوزومال لیشمانیا به ترتیب در کشورهای هند، ایالات متحده آمریکا، برزیل، ایران و انگلستان انجام گرفته است. مؤثرترین عملکرد لیپوزوم‌ها در کاربردهای مربوط به واکنش شامل حفاظت آنتی‌ژن‌ها در مقابل حذف از بدن و رهایش آن‌ها به سلول‌های تخصصی عرضه‌کننده آنتی‌ژن (APC) است. لیپوزوم‌ها قادرند فرایند مهاجرت آنتی‌ژن‌ها و رهایش آن‌ها را به APC‌ها تسهیل کرده و پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولار را تحت مسیرهای عرضه

موش با پلاسمیدی که مولکول SP15 را کد می‌کرد، با افزایش تولید آنتی‌بادی anti-SP15 و پاسخ افزایش حساسیت تأخیری در محل تزریق انگل، ایمنی بالایی را در موش القاء کرد. این مشاهدات دلایل محکمی بر مفید بودن ساخت یک واکنش با استفاده از بزاق پشه ناقل ارائه می‌دهد. از آنجایی که بزاق اکثر پشه‌های ناقل این بیماری، بیماری ایجاد شده توسط همه گونه‌های لیشمانیا را تشدید می‌کند، ایمن‌سازی میزبان علیه پروتئین‌های غدد بزاقی پشه می‌تواند او را در مقابل هر گونه‌ای از لیشمانیا و توسط هر پشه‌ای که منتقل شود، ایمن سازد (۵۴).

## انواع حاملین نانوذره‌ای

نانوتکنولوژی در تمامی جنبه‌های زندگی بشر وارد شده است و در پزشکی در زمینه دارورسانی، ژن‌رسانی و رهایش واکنش‌ها هم کاربردهای زیادی پیدا کرده است. بدون شک کاربرد نانوذرات به عنوان سیستم‌های کپسوله‌کننده اجزای فعال بیولوژیک کسر عظیمی از تحقیقات در این فناوری را شامل می‌شود. به طور کلی می‌توان گفت که این سیستم‌های رهش نانوذره‌ای از یک طرف واکنش‌ها را پایدار کرده و سبب می‌شوند که آنتی‌ژن‌ها شکل طبیعی خود را حفظ کنند و از طرف دیگر نقش ادجوانتی دارند. به علاوه بعضی از این نانوذرات قادرند که از مسیرهای مختلفی وارد سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن شوند و بدین وسیله پاسخ ایمنی به آن آنتی‌ژن را تنظیم کنند. ویژگی‌های نانوذرات آن‌ها را برای استفاده در سطوح موکوسی و تجویز داخل پوستی مناسب می‌سازد. نانو حامل‌ها در دسته‌های مختلفی همچون نانو ذرات ساخته شده از فلز، پلیمر، هیدروژل، سرامیک، نانو لوله‌های کربنی، کیتوزان، نانوذرات پروتئینی حامل‌های مبتنی بر لیپید مانند لیپوزوم‌ها، میسل‌ها، نانوذرات لیپیدی جامد (SLN)، ویرووزوم‌ها و نیوزوم‌ها طبقه‌بندی می‌شود (۵۵). در ادامه به انواع مطالعات در زمینه نانو واکنش‌های لیشمانیا در جهان اشاره می‌شوند.

آنتی ژن به وسیله MHC کلاس یک و دو القا کنند. لیپوزوم ها هم چنین می توانند بیان ژن های کمو کاین های متنوعی هم چون CCL2، CCL3 و CCL4 را به وسیله سلول های دندریتیک افزایش دهند. به علاوه این ساختارها، آنتی ژن ها را از تجزیه سریع داخل APC ها محافظت کرده و از این رو فعال سازی اولیه سلول های T را در شرایط درون تنی طولانی می کنند. ثابت شده تعادل بین پاسخ های Th1 و Th2 با تغییر اندازه وزیکول قابل دستیابی است. مورد دیگر، بار سطحی وزیکول هاست که بر خاصیت ادجوانتی لیپوزوم ها تاثیر گذار است. بار سطحی خالص لیپوزوم ها را می توان به صورت مثبت یا منفی در آورد و این کار به راحتی با تغییر ترکیب فسفولیپیدی آنها امکان پذیر است. نشان داده شده که ماهیت بار به حفاظت در مقابل لیشمانیوزیس و پاسخ های آنتی بادی موثر است (۶۹). در زمینه لیپوزوم ها و نقش آنها در رهایش داروهای سایتوتوکسیک، واکسن ها و ژن ها مطالعات بسیاری صورت گرفته است (۷۰، ۷۱). در سال ۲۰۰۸ طی مطالعه ای توسط بدیعی با استفاده از لیپوزوم CpGODN در برابر لیشمانیوزیس در موش BALB/c، نشان داد که مهار معنی داری ( $p < 0.001$ ) از عفونت در موش های واکسینه با لیپوزوم rLmSTII-CpG ODN نسبت به گروه های دیگر دیده می شود و هیچ انگلی از ل. مائور در طحال این گروه پس از ۱۴ هفته دیده نشد (۷۲).

علوی زاده و همکاران با مطالعه روی نقش نانوذرات لیپوزوم Protamin-DNA حاوی CpG در عفونت ناشی از ل. مائور در موش های BALB/c نشان دادند که در گروه دریافت کننده نانوذرات لیپوزومی، ضایعات به طور قابل توجهی کوچک تر بوده و در این گروه، کاهش تعداد انگل ل. مائور در طحال و غدد لنفاوی دیده می شود. به علاوه استفاده از لیپوزوم حاوی CPG پاسخ ایمنی از نوع Th1 با غلبه تیترا ایزوتیپ IgG2a ایجاد می کند (۷۳).

هروی شرق و همکاران در طی مطالعه ای، اثر لیپوزوم SA (استاریل آمین) همراه با PO CpG ODNs

یا PS CpG ODNs بر روی انگل لیشمانیا، نشان دادند که درصد بالاتری از حفاظت فرمولاسیون لیپوزومال نسبت به گروه کنترل در موش ها دیده می شود. علاوه بر این، تفاوت معنی داری در تولید پاسخ ایمنی وجود ندارد (۷۴). تحقیقات بر روی WLL کامل نشده و کیفیت و میزان القاء پاسخ ایمنی توسط آن هنوز به درستی مشخص نیست. اما دارای مزایایی نسبت به SLA (Soluble Leishmania Antigen) است. اولاً روش تولید آن ساده تر است و ثانیاً محتوای آنتی ژنی کامل تری نسبت به SLA دارد چرا که SLA تنها شامل پروتئین های محلول در آب انگل است ولی WLL شامل تمامی پروتئین ها، فسفولیپیدها و محتوای ژنتیکی انگل لیشمانیا می باشد.

#### نیوزوم (Niosome)

نیوزوم ها، وزیکول های تشکیل شده از سورفکتانت های غیر یونی هیدراته به اضافه کلسترول و یا مشتقات آن است. غشاء حبابچه ای نیوزوم ها متشکل از ترکیبات روغنی یا الکل است. این وزیکول ها می توانند به عنوان سیستم های رهایش آنتی ژن های لیشمانیا عمل کنند. این ساختارها قادرند که پاسخ های ایمنی هومورال و سلولار را در مقابل شماری از آنتی ژن ها همانند آلبومین سرم گاوی و هپاتیت B ایجاد کنند. در یک مطالعه نشان دادند که تجویز زیر پوستی gp63 خالص به صورت انکپسوله در نیوزوم می تواند پاسخ های ایمنی مناسبی در موش های C57BL/10 در مقابل لیشمانیوز پوستی فراهم کند (۷۵).

در مطالعه ای دیگر، پرداختی و همکاران گزارش کردند که نیوزوم های حاوی ل. مائور اتوکلاو شده در مقایسه با آنتی ژن های تنها (انگل های کشته شده به تنهایی) قادر به حفاظت بالاتری در موش های BALB/c است (۷۶).

در مقایسه با لیپوزوم ها، نیوزوم ها چندین مزیت دارند که آنها را کاندیدهای مناسبی برای رهایش دارو

یا آنتی‌ژن‌ها می‌سازد. به عنوان مثال تولید با قیمت مناسب، پایداری و خلوص بالا، ذخیره‌سازی آسان و امکان ساخت آن‌ها با اندازه‌های دلخواه توسط اکسترودر. نیوزم‌ها قادرند انواع مختلفی از داروها، پروتئین‌ها و واکسن‌ها را در خود به دام بیندازند (۷۷). از لحاظ ساختمانی شبیه به لیپوزوم‌ها و مانند آن‌ها کروی شکل‌اند. نیوزوم‌ها با غلبه بر برخی از معایب مرتبط با لیپوزوم، انطباق‌پذیری و تاثیرگذاری بیش‌تری را نسبت به آن‌ها فراهم می‌کند. با این حال، مطالعات محدودی در رهایش نیوزومی داروهای ضدلشمانیا انجام شده است.

#### ویروزوم

ویروزوم‌ها فرمولاسیون‌های لیپوزومی هستند که دو لایه فسفولیپیدی آن‌ها حاوی پروتئین‌های سطحی ویروس آنفولانزا می‌باشد. گنجاندن پروتئین‌های سطحی ویروس‌های پوشش‌دار (enveloped virus) در داخل غشاء دو لایه لیپوزومی اولین بار توسط Almeida و همکارانش در ۱۹۷۵ تشریح شد (۷۸). علت این گرایش، پدیده تغییر شکل ساختار پروتئینی پوشش‌های ویروسی در مواجهه با شرایط بیولوژیکی متفاوت است که به ورود موفق ویروس به داخل سیتوزول سلول هدف منجر می‌شود و در چند ویروس پوشش‌دار شامل ویروس آنفولانزا (*Influenza virus*)، ویروس عامل بیماری التهاب وزیکولی مخاط دهان (*vesicular stomatitis virus*)، ویروس عامل بیماری نیوکاسل (*Newcastle disease virus*) و ویروس سندایی (*Sendai virus*) مشاهده می‌گردد. یکی از سیستم‌های پیشرفته ویروزومال جهت دارو/آنتی‌ژن رسانی هدفمند (target delivery) با آزادسازی کنترل شده (controlled release) دارو/آنتی‌ژن، سیستم IRIVs (Immunopotentiating reconstituted influenza virosome) است که اساس آن‌ها حضور پروتئین پوشش ویروس آنفولانزا در دو لایه فسفولیپیدی می‌باشد. هم‌آگلوتینین (Hemagglutinin-HA) پروتئین اصلی آنفولانزا است که مسؤول فیوژن ویروس با غشاء

اندوزوم است. از طرفی ورود ویروس آنفولانزا به داخل سلول‌ها، از طریق اندوسیتوز (و تشکیل اندوزوم) با واسطه‌گری گیرنده‌های سیالیک اسید اتفاق می‌افتد. ویروزوم در مقایسه با لیپوزوم خواص ادجوانتی مناسب‌تری دارد، از جمله، توانایی ویژه آن در ورود به داخل سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن (Antigen presenting cells)، ارائه مناسب محتوای آنتی‌ژنی خود به سلول‌های ایمنی، توانایی تحریک بیش‌تر سیستم ایمنی سلولی و همورال. لازم به ذکر است که تاکنون دو محصول ویروزومال، یکی اینفلکسال (Inflexal®) (واکسن علیه ویروس آنفولانزا) و دیگری اپیکسال (Epaxal®) (واکسن علیه ویروس هپاتیت B) به صورت تجاری تولید شده‌اند که توان صنعتی شدن فرمولاسیون‌های تهیه شده علیه لیشمانیا را در صورت ایجاد مصونیت علیه لیشمانیوز نشان می‌دهد. مطالعات ایمونولوژی خصوصاً در مدل موشی نشان می‌دهد که مصونیت در لیشمانیوز، نیازمند بروز پاسخ ایمنی سلولی (پاسخ Th1، عمدتاً تولید IFN- $\gamma$ ) و عدم بروز پاسخ ایمنی همورال (پاسخ Th2، عمدتاً تولید IL-4) است. مدل ویروزومال این امکان را برای ما فراهم می‌کند تا با تغییر محل قرارگیری آنتی‌ژن (داخل ویروزوم، داخل دو لایه فسفولیپیدی یا اتصال به سطح) و هم‌چنین تغییر در نوع فسفولیپید به کار رفته در ساختار دو لایه لیپیدی که دمای تغییر فاز متفاوتی دارد، پاسخ ایمنی را به سمت دلخواه سوق داد. یعنی با به کار بستن استراتژی‌هایی مانند انکپسوله کردن آنتی‌ژن در داخل ویروزوم و هم‌چنین استفاده از فسفولیپیدهایی با دمای تغییر فاز بالا مانند HSPC (hydrogenated soy phosphatidylcholine)، می‌توان انتظار داشت که پاسخ ایمنی سلولی بر ایمنی همورال برتری یابد (۷۹).

پلیمر پلی‌لاکتیک-گلیکولیک اسید

پلیمر پلی‌لاکتیک-گلیکولیک اسید (PLGA)

یک ترکیب ایمن و زیست تخریب پذیر است که علاوه بر کاربرد در دارورسانی، به عنوان یک سامانه رهایش کنترل شده واکسن نیز استفاده شده است. عوامل آنتی ژنیک را می توان داخل این ساختار کپسوله کرد یا بر سطح آن قرار داد و با رهایش تدریجی آنتی ژن های لود شده در این ساختار، القای مناسب پاسخ های ایمنی صورت می گیرد. آنتی ژن های بیماری های مختلفی همانند هپاتیت B و تویر کلوزیس و لیشمانیا در این نانو ساختارها قرار داده شده است (۸۰).

به طور مثال در یک مطالعه، Santos و همکاران پروتئین غشایی کینتوپلاستید (KMP11) را در این ساختار قرار دادند. نتایج این مطالعه حاکی از کاهش قابل ملاحظه بار انگل بود. هم چنین در مطالعات برون تنی، فراخوانی نوتروفیل ها و ماکروفاژها در پاسخ به افزایش CCL2/MCP-1 و CXCL1/KC دیده شد. انکوباسیون ماکروفاژها با نانوذرات PLGA سبب فعال سازی کاسپاز ۱ و ترشح IL-1B و IL-18 شد (۸۱). در مطالعه دیگری، تفقدی و همکاران از لیشمانیا ماژور اتوکلاو شده (ALM) در نانو سفرهای PLGA استفاده کردند. آن ها از Quillaja saponins به عنوان ادجوانت استفاده کردند. با استفاده از تکنیک امولسیون دو گانه نانو سفرها ساخته شد و ویژگی های فیزیکی شیمیایی نانوذرات در ادامه بررسی گردید. میانگین سایز نانوذرات  $294 \pm 106$  nm به دست آمد و سپس فرمولاسیون ها در مدل موشی بررسی شدند. نتایج تست چالش عفونت نشان داد که ALM کپسوله شده در PLGA به همراه QS بالاترین سطح ایمنی را ایجاد می کند (۸۲).

#### نانوذرات لیپیدی جامد

نانوذرات لیپیدی جامد در سال ۱۹۹۱ معرفی شد که نشان دهنده یک روش جایگزین برای سیستم حامل دارورسانی سنتی می باشد. این نانوذرات کروی شکل و دارای قطر متوسط ۱۰۰-۱۰۰۰ نانومتر هستند. نانوذرات لیپیدی جامد به علت هسته سفت و سخت خود که

متشکل از چربی آبگریز با ثبات تر از لیپوزوم ها هستند، در دمای اتاق و درجه حرارت بدن جامد هستند. آن ها تنها توسط یک لایه فسفولیپیدها احاطه شده اند. این نانوذرات شامل یک هسته جامد چربی است که از تری گلیسرید و اسیدهای چرب ساخته شده است و به خوبی در بدن تحمل می شود و در ترکیبات چربی دوست، محلول هستند. نتایج دلگرم کننده ای از نانوذرات لیپیدی ساخته شده از tristearin و فسفاتیدیل کولین برای تحویل آمفوتریسین B به ماکروفاژهای آلوده به گونه (L. دونوانی) در شرایط برون تنی و درون تنی به دست آمده است (۸۳). تحویل آمفوتریسین B با استفاده از نانوذرات لیپیدی جامد نیز در آزمایشی در لیشمانیا آزمایش شده و مشخص شده است که فراهم زیستی نسبی و اثر بخشی آمفوتریسین B محصور، بسیار بالاتر از فرم آزاد این دارو بوده است (۸۴).

نانوذرات لیپیدی جامد دارای بار مثبت نانوحامل های قابل قبولی در زمینه های مختلف رهایش دارو و واکسن هستند. خصوصیات اصلی آن ها پایداری و مقاومت نسبت به اکسیداسیون است. در مقایسه با لیپوزوم ها، SLN ها پایداری شیمیایی بالایی داشته و در طراحی آن ها از لیپیدها و سورفکتانت های مختلف استفاده می شود. این نانو ذرات از طریق دو مکانیسم کپسوله کردن آنتی ژن در ماتریکس لیپیدی آن و جذب سطحی توسط برهمکنش های الکتریکی با نانوذرات کاتیونی در رهایش آنتی ژن عمل می کنند. البته به جز خصوصیات شیمیایی پارامترهای فیزیکی هم چون اندازه، پتانسیل زتا و پایداری عواملی هستند که بر پروفایل رهایش کنترل شده آنتی ژن های هدف اثر می گذارند.

#### آلژینات

آلژینات یک پلی ساکارید خطی و طبیعی محلول در آب می باشد که از واحدهای یک در میان آلفا-ال-گلوکورونیک اسید و بتا-دی-مانورونیک اسید تشکیل شده است. به خاطر ایمنی زیست تخریب پذیری

خاص به یک جمع‌بندی نسبی رسید و در هر کار آزمون کرد. پیچیدگی سیستم ایمنی و واکنش‌های متقاطع مختلفی که این‌ها با همدیگر دارند، نیاز به مطالعات اساسی و طولانی مدت را برای شناخت این مسیرها و پیش‌بینی پاسخ‌های ایمنی فراهم می‌کند.

سیستم‌های رهایش نانوذره‌ای به طور اختصاصی‌تری واکسن‌ها را به جایگاه عمل آن‌ها در بدن میزبان رسانده و پاسخ‌های ایمنی را افزایش می‌دهند. این حاملین نانوذره‌ای سبب افزایش و یا تسهیل جذب (Absorption) آنتی‌ژن‌ها توسط سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن می‌شوند. آن‌ها سبب پایداری شمار وسیعی از عوامل درمانی مانند پپتیدها، پروتئین‌ها و یا الیگونوکلئوتیدها شده و دوز واکسن‌ها را کاهش می‌دهند. هم‌چنین به عنوان مخزنی برای رهایش کنترل شده آنتی‌ژن‌ها عمل می‌کنند. نوع پاسخ ایمنی القاء شده را تنظیم می‌کنند و از ساختار و ماهیت آنتی‌ژن در مقابل تجزیه شدن محافظت می‌کنند. نانوذرات با افزایش حلالیت ترکیبات هیدروفوب در محیط‌های آبی، آن‌ها را برای تجویز تزریقی مناسب می‌سازند (۸۶).

در ایمنی‌زایی موکوسی، نانوذرات می‌توانند کاربردهای دیگری هم داشته باشند، مثلاً حفاظت از آنتی‌ژن‌ها در مقابل محیط‌های گوارشی (شامل آنزیم‌ها و اسیدها)، افزایش انتقال آنتی‌ژن‌ها به بافت لنفاوی همراه موکوس و سهولت رهایش از مسیرهای خوراکی و یا داخل بینی (۸۷). از نظر بیولوژی می‌توان گفت که سیستم‌های ذره‌ای از نظر اندازه مشابه پاتوژن‌هایی هستند که سیستم ایمنی برای مقابله با آن‌ها تکامل یافته است. رهایش آنتی‌ژن‌ها و ادجوانت‌ها به طور هم‌زمان ما را مطمئن می‌سازد که هر دو عامل به یک جمعیت یکسان از سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن رسیده و فعال‌سازی آن‌ها را افزایش می‌دهند. به علاوه تهیه نمودن یک ادجوانت تحریک‌کننده سیستم ایمنی در یک سیستم رهایش سبب کم شدن واکنش‌های ناخواسته از طریق محدود کردن گردش سیستمیک

و ارزان بودن این پلیمر به نظر می‌رسد که یک انتخاب مناسب در کاربردهای رهایش واکسن باشد. مطالعات اخیر پتانسیل این ماده را جهت کاربرد به عنوان ایمونو ادجوانت و سیستم رهایش واکسن نشان می‌دهد (۸۵). استفاده از میکروسفرهای آلژینات که حاوی پروتئین‌های آنتی‌ژنیک باشد، در ایمن‌سازی حیوانات سبب القای پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی می‌شود.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که مکانیسم القای ایمنی علیه لیشمانیا با استفاده از آنتی‌ژن‌های مختلف و یا DNA و در کل واکسن‌های نسل اول و دوم و سوم که کاملاً مشخص است و بسته به نوع آنتی‌ژن و ادجوانت تا حدودی متفاوت است. حاملین نانوذره‌ای بر موانعی که واکسن‌ها در رسیدن به سیستم ایمنی با آن مواجهند غلبه می‌کنند و سبب افزایش کارایی و کاهش دوز موثر واکسن به کار رفته می‌شوند. از طرف دیگر با توجه به شباهت با پاتوژن‌ها تا حدودی می‌توانند سبب القای موثرتر پاسخ‌های ایمنی شوند. با شناخت دقیق پاتوژن‌های مختلف و نوع برهمکنش بدن در حذف و ایجاد ایمنی علیه آن‌ها می‌توان نانوذرات مشابهی طراحی کرد که با تقلید از این سیستم‌ها، پاسخ ایمنی مورد انتظار را برای ما ایجاد کنند. نانوذراتی که تاکنون در واکسن‌های لیشمانیا استفاده شده‌اند، همان پاسخ‌های ایمنی طبیعی علیه آنتی‌ژن‌های سنتی را ایجاد می‌کنند، فقط چون ذره‌ای هستند و نقش ادجوانتی هم دارند و ترکیبات داخل خود را حفاظت می‌کنند و سلول‌های ایمنی این ذرات را بهتر می‌شناسند و سبب نفوذ بهتر به بافت، موکوس، رسیدن به اندام هدف یا سلول مورد نظر می‌شوند، کارایی را تغییر می‌دهند. نوع پاسخ ایمنی و شدت آن را هم می‌توان بسته به نوع نانوذره و شکل و خصوصیات سطحی و غیره تغییر داد که تاکنون مطالعات پراکنده‌ای در این زمینه انجام شده و هیچ پایگاه داده‌ای مشخصی که بتواند برای ما امکان پیش‌بینی را فراهم کند، هنوز وجود ندارد و تنها می‌توان با مرور مطالعات پراکنده قبلی در مورد یک نانوذره



پاتوژن انگل و پیچیدگی پاسخ های ایمنی مورد نیاز برای حفاظت افراد باشد. بنابراین تقریباً غیر ممکن است که براحتی یک واکسن ضد لیشمانیا تنها با یک آنتی ژن موفقیت آمیز باشد. نانو واکسن های ترکیبی متشکل از آنتی ژن های متعدد و به خوبی توسعه یافته همراه با ادجوانت مانند MPL-SE و Leish-111f، بهترین شانس برای موفقیت در این زمینه است. با توجه به اثر حفاظتی ضعیف واکسن های کشته شده و مشکلات در تدوین یک واکسن ساب یونیت، استفاده از نانو واکسن های DNA می تواند جایگزین امیدوار کننده ای باشند. در حال حاضر، چالش عمده پیشرو، نتیجه قابل اطمینان از ایمنی زایی است که به منظور ارزیابی واکسن ها، و توسعه سیستم های رهایش کارآمد و ادجوانت های بهبود یافته نیاز هستند. با توجه به پیشرفت سریع در زمینه ایمونولوژی انگل و مهندسی ژنتیک، واکسن ضد لیشمانیا موفق باید سریع تر از پیش دست یافتنی باشد.

ادجوانت می شود. سیستم های ذره ای با دو مکانیسم عمومی محتویات خود را به سلول ها می رسانند: هدفمندسازی فعال و غیرفعال. خصوصیات فیزیکی شیمیایی سیستم های ذره ای هم چون اندازه و بار سطحی نقش کلیدی را در هدفمندسازی غیرفعال سلول های عرضه کننده آنتی ژن بازی می کنند. هدفمندسازی فعال قصد دارد تا رهایش آنتی ژن ها را به جایگاه هدف از طریق استفاده از برهم کنش های اختصاصی در جایگاه هدف هم چون آنتی ژن-آنتی بادی یا لیگاند-گیرنده افزایش دهد (۸۸). واکسیناسیون مناسب ترین فرصت برای پیشگیری و درمان بی خطر همه اشکال بیماری لیشمانیوز می باشد. بنابراین توسعه یک واکسن ضد لیشمانیایی ایمن، موثر و مقرون به صرفه یکی از اولویت های اصلی بهداشت عمومی جهانی است. مطالعات صورت گرفته در زمینه واکسن لیشمانیا ثابت کرده است که کار دشوار و چالش برانگیزی در پیشرو داریم، که موانع آن عمدتاً می تواند دانش ناکافی از

## References

1. Grander PJ. Taxonomy of the genus leishmani: a review of nomenclature and classification. Trop Dis Bull 1977; 741(2): 1069-1088.
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences 2014; P. 544.
3. Postigo JA. Leishmaniasis in the World Health Organization Eastern Mediterranean Region. Int J Antimicrob Agents 2010; 36(1): 62-65.
4. World Health Organization (WHO). Manual for case management of cutaneous leishmaniasis in the WHO Eastern Mediterranean Region. Eastern Mediterranean Series. WHO Regional Publications; 2013.
5. Fakhari M, Mohebali M, Ahmadpoor E. Visceral Leishmaniasis (kala-azar). First ed. Gorgan, Iran, Nouroozi Pub; 2014.
6. World Health Organization (WHO). Leishmaniasis Fact sheet N°375". World Health Organization. January 2014. Retrieved 17 February 2014.
7. Sundar S, Chakravarty J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. Expert Opin Pharmacother 2013; 14(1): 53-63.
8. Dorlo TP, Balasegaram M, Beijnen JH, Vries PJ. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. J Antimicrob Chemother 2012; 67(11): 2576-2597.
9. Minodier P, Parola P. Cutaneous leishmaniasis treatment. Travel Med Infect Dis 2007; 5(3): 150-158.
10. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. Clin Microbiol

- Rev 2006; 19(1): 111-126.
11. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 2007; 5(11): 873-882.
  12. Arevalo I, Ward B, Miller R, Meng TC, Najar E, Alvarez E, et al. Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. *Clin Infect Dis* 2001; 33(11): 1847-1851.
  13. Sah AK, Jha RK, Sah P. The accuracy of drug promotional advertisements in nepal. *J Nepal Med Assoc* 2013; 52(191): 645-648.
  14. Brustoloni YM, Cunha RV, Consolao Z, Oliveira LL, Dorval ME, Oshiro ET. Treatment of visceral leishmaniasis in children in the Central-West Region of Brazil. *Infection* 2010; 38(4): 261-267.
  15. Collin S, Davidson R, Ritmeijer K, Keus K, Melaku Y, Kipnetich S, et al. Conflict and Kala-Azar: Determinants of Adverse Outcomes of Kala-Azar among Patients in Southern Sudan. *Clin Infect Dis* 2004; 38(5): 612-619.
  16. Thakur CP, Narayan S. A comparative evaluation of amphotericin B and sodium antimony gluconate, as first-line drugs in the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 2004; 98(2): 129-138.
  17. Gazanion E, Vergnes B, Seveno M, Garcia D, Oury B, Ait-Oudhia K, et al. In vitro activity of nicotinamide/antileishmanial drug combinations. *Parasitol Int* 2011; 60(1): 19-24.
  18. Ibrahim ME, Khalil EA, Sharief AA. Leishmania Donovanii: An In Vitro Study of Antimony-Resistant Amphotericin B-Sensitive Isolates. *Exp Parasitol* 2006; 114(4): 247-252.
  19. Monge-Maillo B, Lopez-Velez R. Therapeutic Options for Old World Cutaneous Leishmaniasis and New World Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Drugs* 2013; 73(17): 1889-1920.
  20. Sundar S, Mehta H, Suresh AV, Singh SP, Rai M, Murray HW. Amphotericin B Treatment for Indian Visceral Leishmaniasis: Conventional versus Lipid Formulations. *Clin Infect Dis* 2004; 38(3): 377-383.
  21. Islam S, Kenah E, Bhuiyan MAA, Mizanur Rahman K, Goodhew B. Clinical and immunological aspects of post-kala-azar dermal leishmaniasis in Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg* 2013; 89(2): 345-353.
  22. Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Fischer C, et al. Oral Miltefosine for Indian Visceral Leishmaniasis. *N Engl J Med* 2002; 347(22): 1739-1746.
  23. Griensven J, Balasegaram M, Meheus F, Alvar J, Lynen L, Boelaert M. Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2010; 10(3): 184-194.
  24. Bacon KM, Hotez PJ, Kruchten SD, Kamhawi S, Bottazzi ME, Valenzuela JG, et al. The potential economic value of a cutaneous leishmaniasis vaccine in seven endemic countries in the Americas. *Vaccine* 2013; 31(3): 480-486.
  25. Lee BY, Bacon KM, Shah M, Kitchen SB, Connor DL, Slayton RB. The economic value of a visceral leishmaniasis vaccine in Bihar state, India. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 86(3): 417-425.
  26. Bernasconi V, Norling K, Bally M, Höök F, Lycke NY. Mucosal Vaccine Development Based on Liposome Technology. *Journal of Immunology Research* 2016; 2016: 5482087.
  27. Alving CR, Peachman KK, Rao M, Reed SG.

- New Adjuvants for human vaccines. *Curr Opin Immunol* 2012; 24(3): 310-315.
28. Modabber F. Leishmaniasis vaccines: past, present and future. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;36(Suppl 1):S 58-61.
29. Alvar J, Croft SL, Kaye P, Khamesipour A, Sundar S, Reed SG. Case study for a vaccine against leishmaniasis. *Vaccine* 2013; 31(suppl 2): B244-249.
30. Khasseh A A, Soosaraei M, Fakhar M. Cluster Analysis and Mapping of Iranian Researchers in the Field of Parasitology: With an Emphasis on the Co-authorship Indicators and H Index. *Iran J Med Microb (IJMM)* 2016; 10(2): 63-74.
31. Noazin S. Evaluation of first generation vaccines against human leishmaniasis and the implication of leishmanin skin test (LST) response in disease prevalence. PhD Thesis. University of Basel: Switzerland; 2008.
32. Kumar A. Vaccines Against Leishmaniasis. *Parasite Immunol* 2016; 38(5): 273-281.
33. Khamesipour A, Dowlati Y, Asilian A, Hashemi-Fesharki R, Javadi A, Noazin S, et al. Leishmanization: Use of an old method for evaluation of candidate vaccines against leishmaniasis. *Vaccine* 2005; 23(28): 3642-3648.
34. Noazin S, Khamesipour A, Moulton LH, Tanner M, Nasser K, Modabber F, et al. Efficacy of killed whole-parasite vaccines in the prevention of leishmaniasis: a meta-analysis. *Vaccine* 2009; 27(35): 4747-4753.
35. Mayrink W, Mendonça-Mendes A, de Paula JC, Siqueira LM, de Resende Marrocos S, Dias ES, et al. Cluster randomised trial to evaluate the effectiveness of a vaccine against cutaneous leishmaniasis in the Caratinga microregion, south-east Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2013; 107(4): 212-219.
36. Mauel J. Vaccination Against Leishmania Infections. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2002; 2(3): 201-226.
37. Howard JG, Nicklin S, Hale C, Liew FY. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis: I. Protection induced in mice genetically vulnerable to fatal *Leishmania tropica* infection. *J Immunol* 1982; 129(5): 2206-2212.
38. Dumonteil E, Jesus RS, Javier EO, del Rosario GM. DNA vaccines induce partial protection against *Leishmania mexicana*. *Vaccine* 2003; 21(17): 2161-2168.
39. Felnerova D, Viret JF, Glück R, Moser C. Liposomes and virosomes as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs. *Curr Opin Biotechnol* 2004; 15(6): 518-529.
40. Uzonna JE, Späth GF, Beverley SM, Scott P. Vaccination with phosphoglycan-deficient *Leishmania major* protects highly susceptible mice from virulent challenge without inducing a strong Th1 response. *J Immunol* 2004; 172(6): 3793-3797.
41. Rezvan H, Moafi M. An overview on *Leishmania* vaccines: A narrative review article. *Vet Res Forum* 2015; 6(1): 1-7.
42. Handman E, Kedzierski L, Uboldi AD, Goding JW. Fishing for anti-leishmania drugs: principles and problems. *Adv Exp Med Biol* 2008; 625: 48-60.
43. McGwire BS, Chang KP, Engman DM. Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. *Infect Immun* 2003;71(2):1008-1010.
44. Mauel J. Vaccination Against Leishmania Infections. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2002; 2(3): 201-226.
45. Handman E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev*

- 2001; 14(2): 229-243.
46. Saxena A, Lahav T, Holland N, Aggarwal G, Anupama A, Huang Y, et al. Analysis of the *Leishmania donovani* transcriptome reveals an ordered progression of transient and permanent changes in gene expression during differentiation. *Mol Biochem Parasitol* 2007; 152(1): 53-65.
  47. Handman E, Elso C, Foote S. Genes and susceptibility to leishmaniasis. *Adv Parasitol* 2005; 59: 1-75.
  48. Javadian E, Nadim A, Tahvildare-Bidruni G, Assefi V. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Iran: B. Khorassan Part V: Report on a focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Esferayen. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1976; 69(2): 140-143.
  49. Bhowmick S, Ravindran R, Ali N. gp63 in stable cationic liposomes confers sustained vaccine immunity to susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 2008; 76(3): 1003-1015.
  50. Coler RN, Goto Y, Bogatzki L, Raman V, Reed SG. Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral Leishmaniasis by elicitation of CD4+ T cells. *Infect Immun* 2007; 75(9): 4648-4654.
  51. Stager S, Smith DF, Kaye PM. Immunization with a recombinant stageregulated surface protein from *Leishmania donovani* induces protection against visceral leishmaniasis. *J Immunol* 2000; 165(12): 7064-7071.
  52. Gomez-Arreaza A, Acosta H, Barros-Alvarez X, Concepción JL, Albericio F, Avilan L. *Leishmania mexicana*: LACK (*Leishmania* homolog of receptors for activated C-kinase) is a plasminogen binding protein. *Exp Parasitol* 2011; 127(4): 752-761.
  53. Kelly BL, Locksley RM. The *Leishmania* major LACK antigen with an immunodominant epitope at amino acids 156 to 173 is not required for early Th2 development in BALB/c mice. *Infect Immun* 2004; 72(12): 6924-6931.
  54. Valenzuela JG, Belkaid Y, Garfield MK, Mendez S, Kamhawi S, Rowton ED, et al. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J Exp Med* 2001; 194(3): 331-342.
  55. Gholami E, Zahedifard F, Rafati S. Delivery systems for *Leishmania* vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 2016; 15(7): 879-895.
  56. Alavizadeh SH, Akhtari J, Badiie A, Golmohammadzadeh S, Jaafari MR. Improved therapeutic activity of HER2 Affibody-targeted cisplatin liposomes in HER2-expressing breast tumor models. *Expert Opin Drug Deliv* 2016; 13(3): 325-336.
  57. Alving CR, Beck Z, Matyas GR, Rao M. Liposomal adjuvants for human vaccines. *Expert Opin Drug Deliv* 2016; 13(6): 807-816.
  58. Gregoriadis G. Liposomes in Drug Delivery: How It All Happened *Pharmaceutics* 2016; 8(2): pii: E19.
  59. Jaafari MR, Ghafarian A, Farrokh-Gisour A, Samiei A, Kheiri MT, Mahboudi F, et al. Immune response and protection assay of recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63) reconstituted with liposomes in BALB/c mice. *Vaccine* 2006; 24(29): 5708-5717.
  60. Reddy JA, Abburi C, Hofland H, Howard SJ, Vlahov I, Wils P, et al. Folate-targeted, cationic liposome-mediated gene transfer into disseminated peritoneal tumors. *Gene Ther* 2002; 9(22): 1542-1550.
  61. Afrin F, Rajesh R, Anam K, Gopinath M, Pal S, Ali N. Characterization of *Leishmania donovani* antigens encapsulated in liposomes

- that induce protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun* 2002; 70(12): 6697-6706.
62. Colletier JP, Chaize B, Winterhalter M, Fournier D. Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer. *BMC Biotechnol* 2002; 2(1): 9.
  63. Sohrabi Y, Jafari MR, Badiie A, Hejazi SH, Eskandari E, Mir Amin Mohammadi A, et al. Evaluation of immunogenicity and immune response to *Leishmania major* autoclaved Encapsulated in liposomes has a positive charge in a mouse model. *Iranian J Derm* 2007; 10(1): 53-57.
  64. Nakanishi T, Hayashi A, Kunisawa J, Tsutsumi Y, Tanaka K, Yashiro-Ohtani Y, Nakanishi M, Fujiwara H, Hamaoka T, Mayumi T. Fusogenic liposomes efficiently deliver exogenous antigen through the cytoplasm into the MHC class I processing pathway. *European J Immunol* 2000; 30(6): 1740-1747.
  65. Yanasarn N, Sloat BR, Cui Z. Negatively charged liposomes show potent adjuvant activity when simply admixed with protein antigens. *Mol Pharm* 2011; 8(4): 1174-1185.
  66. Fortin A, Hendrickx S, Yardley V, Cos P, Jansen H, Maes L. Efficacy and tolerability of oleylphosphocholine (OIPC) in a laboratory model of visceral leishmaniasis. *Journal of antimicrobial chemotherapy. J Antimicrob Chemother* 2012; 67(11): 2707-2712.
  67. Alving CR. Delivery of liposome-encapsulated drugs to macrophages. *Pharmacol Ther* 1983; 22(3): 407-424.
  68. Chapman WL, Hanson WL, Alving CR, Hendricks LD. Liposomes in leishmaniasis: effects of parasite virulence on treatment of experimental leishmaniasis in hamsters. *Ann Trop Med Parasitol* 1984; 78(3): 279-86.
  69. Afrin F, Anam K, Ali N. Induction of partial protection against *Leishmania donovani* by promastigote antigens in negatively charged liposomes. *J Parasitol* 2000; 86(4): 730-735.
  70. Akhtari J, Rezayat SM, Teymouri M, Alavizadeh SH, Gheybi F, Badiie A, et al. Targeting, bio distributive and tumor growth inhibiting characterization of anti-HER2 affibody coupling to liposomal doxorubicin using BALB/c mice bearing TUBO tumors. *Int J Pharm* 2016; 505(1): 89-95.
  71. Shokri A, Akhtari J, Keighobadi M, Fakhari M, Saeed Hosseini Teshnizi S, Emami S, et al. Promising antileishmanial effectiveness of Doxorubicin and Doxil against *Leishmania major*: an in vitro assay. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2016; 9(9): 2-9.
  72. Badiie A, Jaafari MR, Samiei A, Soroush D, Khamesipour A. Coencapsulation of CpG Oligodeoxynucleotides with Recombinant *Leishmania major* Stress-Inducible Protein 1 in Liposome Enhances Immune Response and Protection against Leishmaniasis in Immunized BALB/c Mice. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15(4): 668-674.
  73. Alavizadeh SH, Badiie A, Khamesipour A, Jalali SA, Firouzmand H, Abbasi A, et al. The role of liposome–protamine–DNA nanoparticles containing CpG oligodeoxynucleotides in the course of infection induced by *Leishmania major* in BALB/c mice. *Exp Parasitol* 2012; 132(3): 313-319.
  74. Heravi Shargh V, Jaafari MR, Khamesipour A, Jaafari I, Jalali SA, Abbasi A, et al. Liposomal SLA co-incorporated with PO CpG ODNs or PS CpG ODNs induce the same protection against the murine model of leishmaniasis. *Vaccine* 2012; 30(26): 3957-3964.

75. Gholami E, Zahedifard F, Rafai S. Delivery systems for Leishmania vaccine development. *Expert Rev Vaccin* 2016; 15(7): 879-895.
76. Pardakhty A, Varshosaz J, Rouholamini A. In vitro study of polyoxyethylene alkyl ether niosomes for delivery of insulin. *Int J Pharm* 2007; 328(2): 130-141.
77. Ruckmani K, Jayakar B, Ghosal SK. Nonionic surfactant vesicles (niosomes) of cytarabine hydrochloride for effective treatment of leukemias: encapsulation, storage, and in vitro release. *Drug Dev Ind Pharm* 2000; 26(2): 217-222.
78. Almeida JD, Edwards DC, Brand CM, Heath TD. Formation of virosomes from influenza subunits and liposomes. *Lancet* 1975; 2(7941): 899-901.
79. Bhattacharya S, Mazumder B. Virosomes: A novel strategy for drug delivery and targeting. *BioPharm International Supplements* 2011; 2(24): 9-14.
80. Allahyari M, Mohit E. Peptide/protein vaccine delivery system based on PLGA particles. *Hum Vaccin Immunother* 2016; 12(3): 806-828.
81. Santos DM, Carneiro MW, de Moura TR, Soto M, Luz NF, Prates DB, et al. PLGA nanoparticles loaded with KMP-11 stimulate innate immunity and induce the killing of Leishmania. *Nanomedicine* 2013; 9(7): 985-995.
82. Tafaghodi M, Eskandari M, Kharazizadeh M, Khamesipour A, Jaafari MR. Immunization against leishmaniasis by PLGA nanospheres loaded with an experimental autoclaved Leishmania major (ALM) and Quillaja saponins. *Trop Biomed* 2010; 27(3): 639-650.
83. Gupta S, Dube A, Vyas SP. Development and Characterization of amphotericin B Loaded Solid Lipid Nanoparticles Against Experimental Visceral Leishmaniasis. *Pharmaceut Nanotech* 2013; 1(1): 54-67.
84. Jain V, Gupta A, Pawar VK, Asthana S, Jaiswal AK, Dube A, et al. Chitosan-assisted immunotherapy for intervention of experimental leishmaniasis via amphotericin B-loaded solid lipid nanoparticles. *Appl Biochem Biotechnol* 2014; 174(4): 1309-1330.
85. Jebali A, Hekmatimoghaddam S, Kazemi B, Allaveisie A, Masoudi A, Daliri K, et al. Lectin coated MgO nanoparticle: its toxicity, antileishmanial activity, and macrophage activation. *Drug Chem Toxicol* 2014; 37(4): 400-409.
86. Badiie A, Shargh VH, Khamesipour A, Jaafari MR. Micro/nanoparticle adjuvants for antileishmanial vaccines: present and future trends. *Vaccine* 2013; 31(5): 735-749.
87. Heegaard PM, Dedieu L, Johnson N, Le Potier MF, Mockey M, Mutinelli F, et al. Adjuvants and delivery systems in veterinary vaccinology: current state and future developments. *Arch Virol* 2010; 156(2): 183-202.
88. Akhtari J, Abastabar M, Abediankenari S. Application of Nanocarriers in Immunogenicity against Diseases. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2015; 24(121): 431-445.