

Evaluation of the Effect of Liposome Carriers and Albumin Nanoparticles Containing Activated Melittin on Inhibiting the Growth of *Leishmania Major* Amastigote in vivo

Soheila Akhzari¹ , Sedigheh Nabian^{1*} , Parviz Shayan¹, Mohammad Taheri²

¹ Dept of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

² Rastegar Reference Laboratory, School of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Article Info

Article type:

Research article

Article History:

Received: 15 May 2021

Revised: 07 June 2021

Accepted: 18 September 2021

* Correspondence to:

Sedigheh Nabian

Dept of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
Email: nabian@ut.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: Leishmaniasis is an infectious and parasitic disease that is among the most important zoonotic diseases in tropical and subtropical regions, as well as developing countries. Despite the efforts of clinical researchers over the years, few signs of progress have been made in the treatment of cutaneous leishmaniasis leading to satisfactory clinical improvement. In this study, activated melittin was used to treat leishmaniasis caused by *Leishmania major*. Moreover, liposomes and nanoparticles of albumin were used separately for the entry of myelin into leishmania-infected macrophages. Furthermore, their effects on *Leishmania*-infected cells were compared in vivo.

Material & Methods: After designing activated melittin peptide for a selective expression using pep fold and expasy servers, liposomes and albumin nanoparticles were used to transfer the peptide into the cell and evaluate the function of transfer vectors on *Leishmania major*-infected cells. Finally, they were investigated in vivo to analyze the anti-leishmaniasis activity of carriers containing activated melittin and their uptake by macrophages.

(Ethnic code: 7506009/6/35)

Findings After wounding the BALB/c mice on the second week, an effective concentration of 100 µl of each of the nanoparticles of albumin and liposome containing 25 µg of activated melittin was injected into BALB/c mice as a therapeutic dose. After the fifth week, in the third group (control), the wound size increased significantly and eventually led to the death of the mice in the control group. However, in the first and second groups treated with liposomes containing peptide and nanoparticle albumin, at the beginning of the fifth week, the wound size got smaller, and the recovery process initiated (P<0.05).

Discussion & Conclusion: The results of this part of the study showed that the therapeutic effects with liposome carriers and albumin nanoparticles containing 25 µg/ml activated melittin in mice with leishmaniasis can be compared with those of the control group. Liposome and nanoparticle carriers of albumin-containing activated melittin have been suggested as an effective, appropriate, and even alternative treatment for cutaneous leishmaniasis.

Keywords: Albumin nanoparticles, *Leishmania major*, Liposomes, Melittin

How to cite this paper

Akhzari S, Nabian S, Shayan, Taheri M. Evaluation of the Effect of Liposome Carriers and Albumin Nanoparticles Containing Activated Melittin on Inhibiting the Growth of *Leishmania Major* Amastigote in vivo. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;29(6): 36-47.



بررسی اثر حامل های لیپوزوم و نانوذرات آلومین حاوی ملتین فعال شونده در جلوگیری از رشد آماستیگوت لیثمانیا ماژور در شرایط *in vivo*

سهیلا اختری^۱، صدیقه نبیان*^۱ ID، پرویز شایان^۱، محمد طاهری^۲

^۱ گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۲ آزمایشگاه مرکزی رستگار، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۲۵

تاریخ داوری: ۱۴۰۰/۰۳/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۷

نویسنده مسئول:

صدیقه نبیان

گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

Email: nabian@ut.ac.ir

مقدمه: لیثمانیازیس بیماری عفونی و انگلی است که از بیماری های مهم زئونوز در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری و در کشورهای درحال توسعه است. با وجود تلاش های محققان بالینی طی سال های متمادی، پیشرفت های اندکی در درمان لیثمانیوز پوستی که به بهبود بالینی رضایت بخش منجر شود، صورت گرفته است. در این مطالعه، برای لیثمانیوز ناشی از لیثمانیا ماژور از ملتین فعال شونده استفاده شد و به منظور ورود ملتین به داخل ماکروفاژهای آلوده به لیثمانیا، از لیپوزوم و نانوذرات آلومین به طور جداگانه استفاده گردید و آثار آن روی سلول های آلوده به لیثمانیا بررسی و مقایسه شد.

مواد و روش ها: پس از طراحی پپتید ملتین فعال شونده، برای بیان انتخابی که با استفاده از سرورهای pep fold, expasy صورت گرفت، برای انتقال پپتید به درون سلول و بررسی عملکرد حامل های انتقال روی سلول های آلوده به لیثمانیا ماژور، از لیپوزوم و نانوذرات آلومین استفاده گردید. در نهایت، برای تجزیه و تحلیل فعالیت ضدلیثمانیایی حامل های حاوی ملتین فعال شونده و جذب آن ها توسط ماکروفاژها در شرایط *in vivo* بررسی شدند.

یافته ها: پس از ایجاد زخم در موش های BALB/c در هفته دوم، غلظت مؤثر ۱۰۰ میکرولیتر از هرکدام از حامل های نانوذرات آلومین و لیپوزوم حاوی ۲۵ میکروگرم ملتین فعال شونده، به عنوان دوز درمانی به موش های BALB/c تزریق گردید. پس از گذشت هفته پنجم، در گروه سوم (کنترل) اندازه زخم به طور چشمگیری افزایش یافت که در نهایت، به مرگ موش های گروه کنترل منجر گردید؛ اما در گروه اول و دوم که تحت درمان با لیپوزوم حاوی پپتید و نانوذرات آلومین بودند، در شروع هفته پنجم، اندازه زخم ها کوچک تر و روند بهبودی آغاز شد ($P < 0.05$).

بحث و نتیجه گیری: نتیجه آثار درمانی با حامل های لیپوزوم و نانوذرات آلومین حاوی ۲۵ میکروگرم/میلی لیتر ملتین فعال شونده در موش های مبتلا به لیثمانیوز جلدی، در مقایسه با گروه کنترل در این بخش از مطالعات نشان داد که می توان حامل های لیپوزوم و نانوذرات آلومین حاوی ملتین فعال شونده را به عنوان یک روش درمانی مؤثر، مناسب و حتی جایگزین در درمان لیثمانیوز جلدی پیشنهاد کرد.

واژه های کلیدی: لیپوزوم، لیثمانیا ماژور، ملتین، نانوذرات آلومین

استناد: اختری، سهیلا؛ نبیان، صدیقه؛ شایان، پرویز؛ طاهری، محمد. بررسی اثر حامل های لیپوزوم و نانوذرات آلومین حاوی ملتین فعال شونده در جلوگیری از رشد آماستیگوت لیثمانیا ماژور در شرایط *in vivo*. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، اسفند ۱۴۰۰؛ ۲۹(۶): ۴۷-۳۶.



مقدمه

انواع لیشمانیوز که از بیماری‌های مشترک انسان و حیوان است، در همه نقاط جهان وجود دارد که به سه شکل پوستی (سالک)، احشایی (کالاآزار) و مخاطی-پوستی بروز می‌کند. انواعی از گونه‌های تک‌یاخته‌ای به نام لیشمانیا از راسته کینتوپلاستیدا عامل بیماری‌زای لیشمانیوز هستند که برحسب محیط زندگی خود، به دو شکل بدون تاژک آزاد (اماستیگوت یا جسم لیشمن) و تاژک‌دار (پروماستیگوت) دیده می‌شوند. این انگل در مهره‌داران در درون سلول‌های بیگانه‌خوار تک‌هسته‌ای زندگی و تکثیر می‌یابد. لیشمانیوز عموماً توسط گونه‌های پشه‌خاکی منتقل می‌گردد (۱).

وجود پیچیدگی‌های اپیدمیولوژیک در حلقه انتقال (مخازن و ناقلین گوناگون) موجب شده است این بیماری از اهمیت بسیار بالایی برخوردار باشد (۲). علی‌رغم تلاش‌های فراوان دست‌اندرکاران بهداشتی در دهه‌های اخیر، تاکنون کنترل مخزن ناقل چندان مؤثر نبوده است و درمان‌های دارویی نیز شامل ترکیبات آنتیموان پنج ظرفیتی از جمله استیو گلوونات سدیم (پنتوستام)، مگلو مین آنتیموان (گلوکانتیم) و آمفوتریسین B و... است که در عمل با مشکلات عدیده‌ای از جمله پاسخ ندادن و مقاومت دارویی مواجه شده‌اند و واکنشی کارآمد برای لیشمانیوز انسانی وجود ندارد. به همین سبب در سال‌های اخیر، سازمان جهانی بهداشت لیشمانیوز را به‌عنوان یک بیماری گرمسیری فراموش شده مطرح کرده است (۳، ۴).

ماتریکس متالوپروتئینازها خانواده‌ای از آنزیم‌های وابسته به زینک هستند که در هضم بسیاری از ترکیبات ماتریکس خارج سلولی و بافت غشای پایه نقش دارند و از این لحاظ در فرایندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی مهم‌اند. (Matrix metalloproteinase-9) MMP-9 یک پروتئین ۹۲ کیلودالتونی با فعالیت پروتئازی است که سوبسترای اصلی آن ماتریکس خارج سلولی و اتصالات بافت غشای پایه است. این پروتئین

یکی از مهم‌ترین اعضای خانواده ماتریکس متالوپروتئینازها و تنها عضو این خانواده است که قادر به اتصال و هضم کلاژن به‌عنوان مهم‌ترین ترکیب غشای پایه است (۵). برخی از انواع ماتریکس متالوپروتئینازها (MMP2,9) مهم‌ترین عامل در تخریب کلاژن‌ها و نبود بسترسازی مناسب برای ترمیم زخم هستند که به‌عنوان کلاژنازها عمل می‌کنند (۶). ضایعات التهابی ناشی از لیشمانیوز پوستی حاوی سلول‌های ایمنی متعدد از جمله لنفوسیت‌های T و B و فاگوسیت‌های تک‌هسته‌ای است. فعالیت‌های این سلول‌ها به تولید بالای سیتوکاین‌های اینترفرون گاما و TNF توسط سلول‌های خونی تک‌هسته‌ای منجر می‌شود. با روش فلوسیتومتری نشان داده شده است که مونوسیت‌های CD16 مجاورشده با آنتی‌ژن‌های محلول لیشمانیا، MMPs با مقادیر بالا را تولید می‌کنند (۷). در عفونت‌های ناشی از لیشمانیا افزایش تولید سایتوکاین TNF دیده می‌شود که خود سبب افزایش بیان MMPs در سلول‌ها و بافت‌های آلوده به انگل می‌گردد (۷). با توجه به مطالعات جدید درباره آثار ضد تک‌یاخته‌ای ملیتین (۱۰، ۹، ۸)، در طرح حاضر از این سم برای مقابله با لیشمانیوز جلدی استفاده شد. ملیتین (Melittin) یک پپتید ۲۶ اسید آمینه‌ای، کاتیونیک و آمفی پاتیک است و اصلی‌ترین ترکیب موجود در زهر زنبور عسل است (۱۱). تاکنون خواص مختلفی برای ملیتین گزارش شده است که از این قبیل می‌توان به آثار ضد میکروبی، ضد ویروسی، ضد تک‌یاخته‌ای، ضد التهابی و ضد سرطان اشاره کرد (۱۲). از آنجا که بخش C-terminal ملیتین کاتیونیک است؛ بنابراین، اتصال پپتید پلی آنیونیک حاوی ۷ اسید آمینه گلوتامیک (E7) از طریق لینکر قابل خرد شدن با MMP9,2 می‌تواند سبب مهار فعالیت ملیتین گردد (۱۳). در این مطالعه فرض بر این است که از طریق خرد شدن لینکر توسط MMPs، اتصال پپتید پلی آنیونیک با ملیتین در سلول‌های آلوده به انگل قطع و ملیتین آزاد می‌شود و به شکل فعال خود بازمی‌گردد

NCBI دریافت شد و لینکر خردشونده توسط MMP2,9 (۱۵) و ۷ اسید آمینه گلوتامیک به عنوان پپتید مهاری آنیونیک به آن اضافه گردید. تا خوردگی پپتید با استفاده از سرور آنالین pep fold بررسی شد و پس از انجام برخی آنالیزها از جمله محاسبه pH ایزوالکتریک توسط سرور expasy، سفارش پپتید برای سنتز به شرکت Biocompany کشور چین ارسال گردید.

GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQGG
PVGLIGKEEEEEEE

تهیه لیپوزوم و بارگذاری پپتید در لیپوزوم: برای تهیه لیپوزوم، مقدار ۳۰ میلی گرم لستین و ۱۰ میلی گرم کلسترول در ۵ سی سی کلروفرم و ۱۰۰۰ میکروگرم از پپتید در ۱۰۰ میکرولیتر DMSO حل شد و به کلروفرم اضافه گردید و محلول به دست آمده در حرارت ۴۵ درجه سانتی گراد و در حال چرخش قرار داده شد و پس از تبخیر کلروفرم، محلول به مدت ۱۲ ساعت در خلأ جای گرفت تا باقیمانده احتمالی کلروفرم نیز حذف گردد. مقدار یک سی سی بافر نمکی فسفات حاوی ۱۰۰ میلی مول ترهالوز به آن اضافه شد و به مدت یک دقیقه توسط سونیکاتور سونیکه گردید؛ سپس این محلول ابتدا با فیلتر سر سرنگی ۰/۴ و دوباره با فیلتر سر سرنگی ۰/۲ فیلتر شد. به منظور بررسی پپتید بارگذاری شده در لیپوزوم، پس از تهیه لیپوزوم، بارگذاری شده با پپتید و دو بار شستشو با آب دیونیزه، مقدار ۳۰۰ میکرولیتر اتانول به لیپوزوم اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت در دستگاه حمام التراسونیک قرار گرفت. با این روش، اتانول لیپوزوم را تخریب می کند و پپتید رها و وارد محیط اتانول می شود؛ سپس نمونه به مدت ۲۰ دقیقه و با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردید و OD محلول رویی در طول موج ۲۸۰ نانومتر خوانده شد.

تهیه نانوذرات آلومین حاوی پپتید: یک سی سی آلومین یک درصد تهیه گردید و به مدت دو ساعت در بن ماری ۶۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت و پس از قرار دادن در محیط آزمایشگاه، ۱۰۰ میکرولیتر از آن را با ۱۰۰ میکرولیتر از پپتید با غلظت ۱۰۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر

(ملیتین فعال شونده). MMP2, 9 در سلول های آلوده به انگل لیشمانیا سبب بیان و تنظیم پاسخ سلولی برای ایجاد عفونت لیشمانیا می شود (۱۳). با توجه به افزایش بیان MMP2,9 در سلول های آلوده به انگل می توان از آن ها به منظور طراحی پپتید برای درمان با استفاده از پپتیدهای سمی از جمله ملیتین استفاده کرد. نانوذرات آلومین قادر به حل کردن داروهای نامحلول در آب هستند و سمیت را در سلول های سالم کاهش می دهند و نوکلئیک اسیدها را از تخریب محافظت می کنند. در سامانه دارورسانی لیگاندهای مختلف می توانند به آلومین متصل شوند تا دارورسانی هدفمند را برای سلول های مشخصی انجام دهند. به علت حضور گروه های کاربردی آمین و کربوکسیل روی سطح نانوذرات، امکان اتصال پیوند کووالانسی به لیگاندهای مختلف برای هدف قرار دادن سلول ها وجود دارد (۱۴). لیپوزوم ها به سبب داشتن ساختاری ساده و خودسامان دهنده و در ضمن کم هزینه بودن استفاده از آن ها، ابزار مناسبی در زمینه انتقال پپتید به داخل سلول هستند. در این مطالعه، به منظور ایجاد یک سامانه شبه سلولی دربرگیرنده پپتید طی مرحله آنگیری و آب دهی پی در پی و با استفاده از لیپیدهای فسفاتیدیل کولین و کلسترول، پپتید در یک ساختار بسته لیپوزومی به دام افتاد که می توان از این ساختار برای انتقال پپتید به درون سلول استفاده کرد (۱۶). در این مطالعه، با بارگذاری ملیتین فعال شونده در لیپوزوم و نانوذرات آلومین، به بررسی اثر آن در جلوگیری از رشد آماستیگوت لیشمانیا ماژور در شرایط *in vivo* اقدام گردید.

مواد و روش ها

طراحی پپتید ملیتین فعال شونده برای بیان انتخابی: با توجه به افزایش بیان MMP2,9 در سلول های التهابی و آلوده به انگل، با استفاده از اتصال لینکر پپتیدی قابل برش با MMP2,9 که به رنگ قرمز نمایش داده شده است، به منظور طراحی پپتید ملیتین فعال شونده برای عملکرد انتخابی در این مطالعه، توالی ملیتین از پایگاه داده

مخلوط شد و ۲۰ میکرولیتر از محلول $ZnCl_2$ ۱۰۰ میلی مولار به آرامی به آن افزوده گردید. س از انجام این مراحل، پپتید در شبکه آلبومین به ابعاد ۱۰۰-۲۰۰ نانومتر به دام افتاد؛ سپس ۵۰ میکرولیتر از نانوذرات آلبومین حاوی پپتید را به ۲/۵ سی سی از محیط کشت حاوی ماکروفازهای RAW آلوده به پروماستیگوت لیثمانیا ماژور اضافه شد و پس از ۴۸ ساعت، نتایج مشاهده گردید.

کشت و آماده سازی پروماستیگوت های لیثمانیا ماژور:
در این تحقیق، از انگل لیثمانیا ماژور سویه ایران (MRHO/IR75/ER) تهیه شده از گروه انگل شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران استفاده شد. به منظور کشت و تولید انبوه پروماستیگوت ها، ۱ میلی لیتر از محیط کشت اولیه حاوی انگل در شرایط استریل به ۹ میلی لیتر محیط کشت تازه (RPMI1640 (pH=7.2) به اضافه سرم جنین گاوی ۱۰ درصد اضافه گردید. برای جلوگیری از آلودگی باکتریایی و قارچی، به فالكون ها آنتی بیوتیک پنی سیلین (۱۰۰ واحد بین المللی در یک میلی لیتر) به همراه استریتومایسین (۲۰۰ میکروگرم در یک میلی لیتر) افزوده شد؛ سپس فالكون ها در انکوباتور ۲۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. همه این مراحل بالا در زیر هود و در شرایط استریل انجام گردید.

ایجاد زخم لیثمانیوز در موش BALB/c و بررسی اثر لیپوزوم و نانوذرات آلبومین حاوی پپتید ملیتین فعال شونده: پس از تکرار پاساژ انگل تا زمانی که اشکال پروماستیگوت به مرحله ایستایی رسیدند، محتوای لوله های کشت سانتریفوژ شد و انگل های رسوب داده شده چند بار با بافر PBS استریل شستشو گردید؛ سپس رسوب به دست آمده با حجم مشخصی از PBS به گونه ای رقیق شد که به ازای هر ۱۰۰ میکرولیتر، حاوی ۵ میلیون انگل باشد. تعداد انگل ها در حجم توسط لام نوبار شمارش گردید. برای انجام این مطالعه، از موش های BALB/c در سنین ۸ تا ۷ هفتگی استفاده شد. موش ها از انستیتو پاستور تهران خریداری گردید و در بخش نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی

دانشگاه تهران، در قفس های مخصوص و در شرایط استاندارد (از نظر نور، دما، غذا و آب) تا پایان طرح نگهداری شدند. برای بررسی اثر لیپوزوم و نانوذرات آلبومین حاوی پپتید ملیتین فعال شونده، همه موش ها با انگل لیثمانیا ماژور تلقیح گردیدند، به طوری که ناحیه قاعده دم موش ها با اتانول ۷۰ درصد ضد عفونی شد و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون محتوی ۵ میلیون پروماستیگوت لیثمانیا ماژور به صورت زیر پوستی با سرنگ انسولین به هر یک از آن ها تلقیح گردید. موش های تلقیح شده به ۴ گروه ۳ تایی در قفس های جداگانه به شرح زیر تقسیم و قفس ها شماره گذاری شدند.

گروه اول: به موش های آلوده به لیثمانیا ماژور پس از ایجاد زخم، ۱۰۰ میکرولیتر لیپوزوم حاوی ۲۵ میکروگرم/میلی لیتر پپتید به مدت ۲۱ روز به صورت زیر جلدی تزریق شد.

گروه دوم: در این گروه از موش های آلوده به لیثمانیا ماژور پس از ایجاد زخم، تزریق به میزان ۱۰۰ میکرولیتر نانوذرات آلبومین حاوی ۲۵ میکروگرم/میلی لیتر پپتید به مدت ۲۱ روز به صورت زیر جلدی صورت گرفت.

گروه سوم: گروه شاهد که به آن ها آب مقطر به صورت زیر جلدی تزریق شد.

گروه چهارم: موش های آلوده به لیثمانیا ماژور پس از ایجاد زخم، به عنوان کنترل بررسی گردیدند.

برای اثبات وجود انگل و رشد آن به شکل آماستیگوت (لیثمانیایی) در ضایعات به وجود آمده در قاعده دم موش ها، از تعدادی از موش ها در همه گروه های آزمایش و کنترل، با خراش دادن کناره زخم ها نمونه برداری انجام و پس از تهیه گسترش روی لام و رنگ آمیزی با گیمسا، با استفاده از عدسی ۱۰۰× میکروسکوپ، اشکال آماستیگوت لیثمانیا جستجو شد. از هفته پنجم پس از تلقیح انگل، پس از ایجاد زخم های سالک در موش ها، اندازه گیری زخم ها به کمک caliper-vernier هفته ای یک بار تا ۵ هفته صورت گرفت و داده ها در دفتر مربوطه ثبت گردید. پس از تکمیل

۱ خلاصه شده است. در گروه شاهد هیچ‌گونه اثری از زخم دیده نشد؛ اما در دیگر گروه‌ها در هفته دوم ایجاد زخم، میانگین اندازه طول زخم‌ها ۶ میلی‌متر و عرض آن‌ها ۳ میلی‌متر بود. در این مرحله، به آن‌ها ۱۰۰ میکرولیتر لیپوزوم حاوی ۲۵ میکروگرم/میلی‌لیتر پپتید و نانوذرات آلومین حاوی ۲۵ میکروگرم/میلی‌لیتر پپتید به مدت ۲۱ روز، به صورت ۳ روز در میان، در زیر جلد در گروه اول و دوم تزریق شد. پس از گذشت هفته سوم در هر سه گروهی که زخم لیپوزوم ایجاد شده بود، پاپول فعال گردید و ضایعه بزرگ‌تر شد و اطراف آن را هاله قرمز رنگی فراگرفت. پس از گذشت ۴ هفته، در گروه چهارم (کنترل) پاپول به صورت دانه‌ای سرخ و برجسته با سطحی صاف، شفاف و قوامی نرم و در روی آن فرورفتگی به عمق ۲-۳ میلی‌متر که ته آن پوسته‌پوسته است، مشاهده گردید و به تدریج سطح این دانه نرم و مایع سرورزی ترشح می‌شد و بالاخره ضایعه به صورت زخمی باز درآمد که زخم، محدوده‌ای مشخص و حاشیه‌ای نامنظم و برجسته داشت. در نهایت، اندازه زخم در گروه کنترل که درمان نشده بود، به طور چشمگیری افزایش یافت و در پایان هفته پنجم پس از ایجاد زخم، به مرگ موش‌های گروه کنترل منجر گردید. با توجه به آزمون آنالیز واریانس، میان اندازه زخم در هفته اول و هفته پنجم، اختلاف معناداری وجود داشت (جدول شماره ۱ و ۲). در گروه اول و دوم که تحت درمان با لیپوزوم حاوی پپتید و نانوذرات آلومین بودند، در هفته چهارم، اطراف زخم هاله‌ای

اندازه‌گیری زخم‌های لیپوزوم جلدی در قاعده دم موش‌ها در همه گروه‌ها طبق روالی که پیش‌تر توضیح داده شد، برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، از آنالیز واریانس برای مقایسه میانگین سه گروه (نانوذرات آلومین، لیپوزوم و کنترل) و برای مقایسه میانگین‌های دو گروه (نانوذرات آلومین و لیپوزوم) از آزمون تی استفاده گردید. در همه موارد، حدود اطمینان به صورت ۹۵ درصد محاسبه و در تفسیر نتایج مقادیر P-value کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد. همه آزمایش‌ها بر اساس دستورالعمل‌های اخلاقی انجام گردید و مورد تأیید کمیته اخلاق (با شماره ۷۵۰۶۰۰۹/۶/۳۵) دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران قرار گرفت.

یافته‌ها

پس از تزریق پروماستیگوت‌های لیپوزوم به موش‌های (۷-۸ هفته) BALB/c و گذشت دوره کمون (۳-۴ هفته) بعد از تزریق، در ملامسه ناحیه تزریق، برجستگی و نندول احساس می‌شد و سپس زخم حاصل از رشد انگل در قاعده دم موش تشکیل گردید. پیش از شروع درمان، از همه زخم‌ها نمونه‌برداری شد و پس از رنگ آمیزی، در زیر میکروسکوپ بررسی گردیدند. گسترش‌های تهیه‌شده از ضایعات به وجود آمده در همه گروه‌ها و مشاهده میکروسکوپی آن‌ها اشکال آماستیگوت لیپوزوم را نشان داد و تأیید کرد که ضایعات همگی در اثر تلقیح انگل به وجود آمده بودند. اندازه قطر زخم‌ها با استفاده از caliper-vernie در هر یک از گروه‌ها در جدول شماره

جدول شماره ۱. مقایسه روند بیماری در زخم‌های ناشی از لیپوزوم مازور در موش‌های BALB/c تحت درمان با لیپوزوم حاوی پپتید و نانوذرات آلومین با گروه‌های شاهد

| گروه شاهد | گروه کنترل آلوده به لیپوزوم مازور | گروه لیپوزوم حاوی پپتید | گروه نانوذرات آلومین | گروه شاهد |
|-----------|-----------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| سالم | جستگی و نندول | جستگی و نندول | جستگی و نندول | هفته اول پس از ایجاد زخم |
| سالم | پاپول فعال شده | پاپول فعال شده | پاپول فعال شده | هفته دوم پس از ایجاد زخم |
| سالم | زخم و دلمه | زخم و دلمه | زخم و دلمه | هفته سوم پس از ایجاد زخم |
| سالم | عفونی شدن زخم | شروع بهبودی | شروع بهبودی | هفته چهارم پس از ایجاد زخم |
| سالم | مرگ موش | بهبودی کامل و به جای ماندن | بهبودی کامل و به جای ماندن | هفته پنجم پس از ایجاد زخم |

جدول شماره ۲. مقایسه میانگین اندازه قطر زخم‌های ناشی از لیسمانیا ماژور در موش‌های BALB/c تحت درمان با لیپوزوم حاوی پپتید و نانو ذرات آلبومین با گروه‌های شاهد، برحسب میلی‌متر

| اندازه زخم | گروه نانوذرات آلبومین | گروه لیپوزوم حاوی پپتید | گروه کنترل آلوده به لیسمانیا ماژور | گروه شاهد |
|------------|-----------------------|-------------------------|------------------------------------|-----------|
| هفته اول | ۳/۵۹ | ۳/۳۵ | ۳/۶۲ | . |
| هفته دوم | ۶/۳۶ | ۶/۲۳ | ۶/۸۲ | . |
| هفته سوم | ۳/۳۷ | ۳/۱۲ | ۱۳/۳۵ | . |
| هفته چهارم | ۲/۱۰ | ۱/۷۳ | ۲۷/۱۴ | . |
| هفته پنجم | . | . | ۳۸/۴۳ | . |

(جدول شماره ۳). پس از گذشت ۲ هفته، ضایعه کاملاً بهبود یافت و اثر آن به صورت جوشگاهی با حدود کاملاً مشخص باقی ماند، درحالی که میان دو گروه اول و دوم هیچ اختلاف معناداری ($P>0.05$) مشاهده نشد (جدول شماره ۴). بررسی‌های بالینی با اندازه‌گیری قطر زخم و ثبت مرگ‌ومیر به‌طور هفتگی بررسی گردیدند (شکل شماره ۱ و ۲).

صورتی‌رنگ داشت که در مقایسه با بافت‌های اطراف و زیر آن سفت به نظر می‌رسید و اندازه زخم‌ها کوچک‌تر و روند بهبودی آغاز شد که بهبودی زخم به تدریج از مرکز زخم شروع گردید و دلمه شروع به خشک شدن کرد که تفاوت معناداری در اندازه زخم گروه تحت درمان با لیپوزوم حاوی پپتید و نانوذرات آلبومین نسبت به گروه کنترل را نشان داد ($P<0.05$)

جدول شماره ۳. تحلیل واریانس یکی از پرکاربردترین آزمون‌های آماری است که در شاخه‌های مختلف علوم کاربرد فراوان دارد. این آزمون برای مقایسه بیش از دو میانگین کاربرد دارد. تحلیل واریانس به دو صورت انجام می‌گیرد: الف. یک‌طرفه ب. دوطرفه. تحلیل واریانس یک‌طرفه به منظور بررسی یک عامل کنترل‌شده به کار می‌رود، کوچک‌تر بودن مقدار P-value از ۰/۰۵ نشانگر معنادار بودن تفاوت میان منشأ تغییرات است. در این مطالعه، اختلاف معناداری میان نتایج درمان در گروه‌های نانوذرات و لیپوزوم حاوی ملیتین فعال‌شونده با گروه کنترل وجود دارد.

Anova: Single Factor

SUMMARY

| Groups | Count | Sum | Average | Variance |
|--------------|-------|-------|---------|----------|
| Nanoparticle | 5 | 15.42 | 3.084 | 5.38733 |
| Liposome | 5 | 14.43 | 2.886 | 5.27943 |
| Control | 5 | 89.36 | 17.872 | 213.5605 |

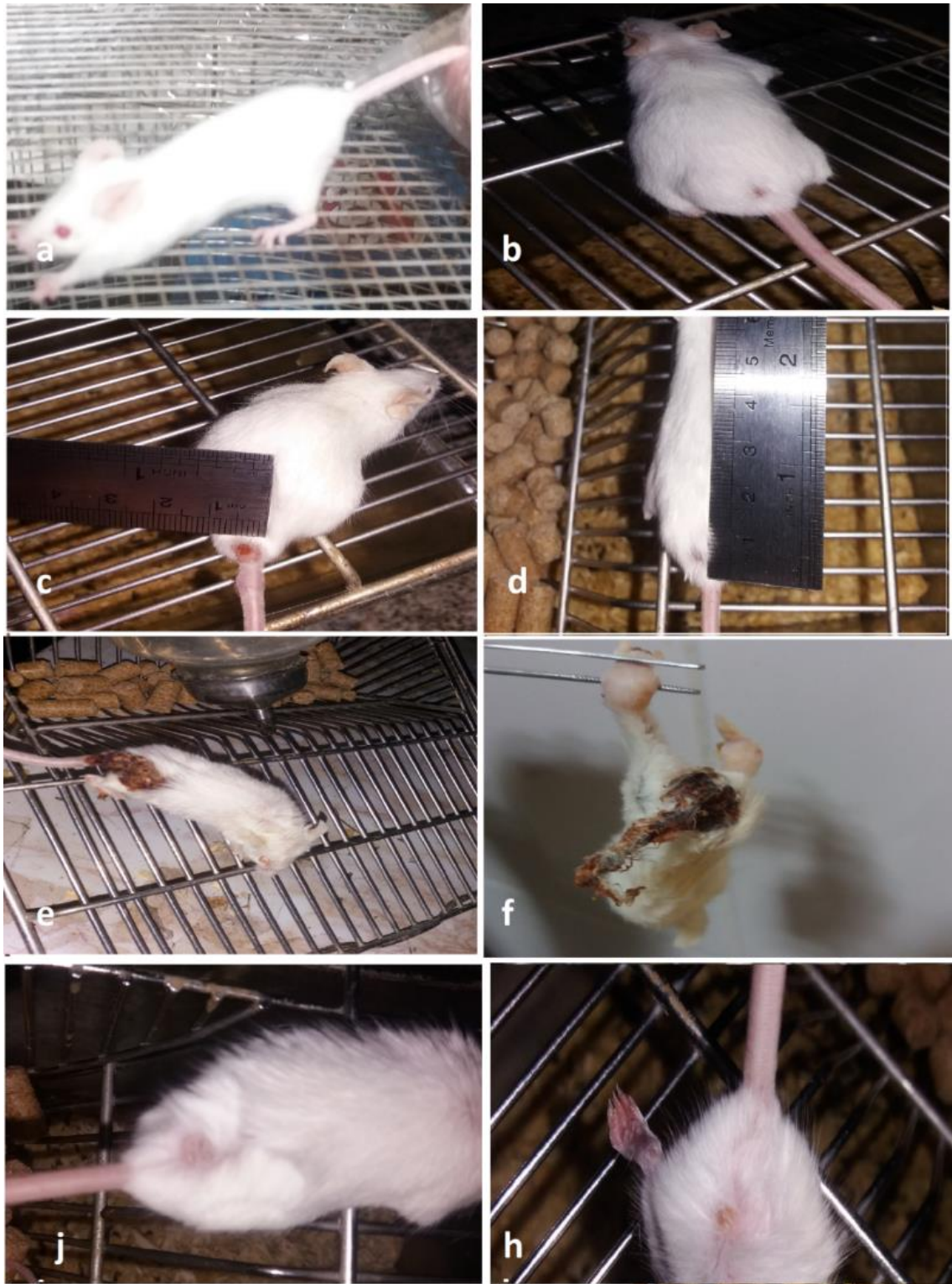
| ANOVA | SS | df | MS | F | P-value | F crit |
|---------------------|-------------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | | | | | | |
| Between Groups | 738.8405733 | 2 | 369.4203 | 4.942579 | 0.027176 | 3.885294 |
| Within Groups | 896.90892 | 12 | 74.74241 | | | |
| Total | 1635.749493 | 14 | | | | |

جدول شماره ۴. آزمون T یکی از آزمون‌های آماری است که هدف آن مقایسه میانگین دو مجموعه داده است. در این حالت، پس از انجام آزمون تی، با توجه به مقدار پی که بزرگ‌تر از ۰/۰۵ است، می‌توان نتیجه گرفت که میانگین دو گروه اختلاف معناداری ندارند. در این مطالعه، میان دو گروه تحت درمان نانوذرات آلبومین و لیپوزوم حاوی ملیتین فعال‌شونده تفاوت معناداری مشاهده نشد.

| t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances | Nanoparticle | Liposome |
|---|--------------|----------|
| Mean | 3.079333333 | 2.887333 |
| Variance | 5.411524444 | 5.288891 |
| Observations | 5 | 5 |
| Pooled Variance | 5.350207778 | |
| Hypothesized Mean Difference | 0 | |
| Df | 8 | |
| t Stat | 0.131245949 | |
| P(T<=t) one-tail | 0.449410659 | |
| t Critical one-tail | 1.859548038 | |
| P(T<=t) two-tail | 0.898821319 | |
| t Critical two-tail | 2.306004135 | |



شکل شماره ۱. تصاویر مربوط به ایجاد زخم لیشمانیوز در گروه کنترل و تحت درمان؛ تصویر a و b. طول و عرض زخم ناشی از لیشمانیا ماژور در هفته دوم پس از ایجاد زخم؛ تصویر c. زخم ناشی از لیشمانیا ماژور در هفته چهارم پس از ایجاد زخم در گروه کنترل؛ تصویر d. زخم ناشی از لیشمانیا ماژور در پایان هفته پنجم پس از ایجاد زخم در گروه کنترل؛ تصویر e. زخم ناشی از لیشمانیا ماژور در هفته چهارم پس از ایجاد زخم در گروه تحت درمان با نانوذرات حاوی پیتید؛ تصویر f. زخم ناشی از لیشمانیا ماژور در هفته پنجم پس از ایجاد زخم در گروه تحت درمان با نانوذرات حاوی پیتید؛ تصویر g. زخم ناشی از لیشمانیا ماژور در هفته چهارم پس از ایجاد زخم در گروه تحت درمان با لیپوزوم حاوی پیتید؛ تصویر h. زخم ناشی از لیشمانیا ماژور در هفته پنجم پس از ایجاد زخم در گروه تحت درمان با لیپوزوم حاوی پیتید.



شکل شماره ۲. تصاویر مربوط به ایجاد زخم لیشمانیوز در گروه کنترل و تحت درمان؛ تصویر a. تزریق پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور؛ تصویر b. ایجاد زخم لیشمانیا ماژور در هفته اول پس از ایجاد زخم؛ تصویر c. طول و عرض زخم ناشی از لیشمانیا ماژور در هفته دوم پس از ایجاد زخم؛ تصویر d. زخم ناشی از لیشمانیا ماژور در هفته چهارم پس از ایجاد زخم در گروه کنترل؛ تصویر e. زخم ناشی از لیشمانیا ماژور در هفته چهارم در گروه کنترل؛ تصویر f. زخم ناشی از لیشمانیا ماژور در پایان هفته پنجم پس از ایجاد زخم در کنترل؛ تصویر g. زخم ناشی از لیشمانیا ماژور در هفته پنجم پس از ایجاد زخم در گروه تحت درمان با لیپوزم حاوی پیتید؛ تصویر h. زخم ناشی از لیشمانیا ماژور در هفته چهارم پس از ایجاد زخم در گروه تحت درمان با نانوذرات حاوی پیتید.

بحث و نتیجه گیری

با وجود تلاش‌های محققان بالینی طی سال‌های متمادی، پیشرفت‌های اندکی در درمان لیشمانیوز پوستی صورت گرفته است که به بهبود بالینی رضایت‌بخش منجر شود. کمبود مطالعات کارآزمایی بالینی با کیفیت در این زمینه از علل مهم این مسئله بوده است که از وجود نداشتن متدولوژی استاندارد برای بررسی اثربخشی و پیامدهای مصرف ترکیبات مختلف در انجام این مطالعات ناشی می‌شود. ایجاد مقاومت دارویی انگل‌ها در برابر برخی ترکیبات یکی از معضلات درمان بیماری سالک است (۱۷، ۱۸). درمان اصلی بیماری سالک، استفاده از ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی‌موان است که به‌رغم سمیت شدید، هزینه بالا و مصرف دشوار، به‌طور گسترده‌ای تجویز می‌گردد (۱۹، ۲۰). باید یادآوری شود که ارزیابی اثربخشی هر عامل درمانی در بیماری، با بهبودی خودبه‌خودی از جمله لیشمانیوز پوستی بسیار دشوار است؛ بنابراین، با توجه به پاسخ ندادن بالینی مطلوب داروهای ضدلیشمانیایی موجود و عوارض جانبی آن‌ها، توجه به روش‌ها و درمان‌های جدید برای درمان لیشمانیوز جلدی ضروری است (۲۱).

در این طرح، به‌منظور درمان لیشمانیوزیس تجربی در موش و رفع عملکرد غیرانتخابی ملیتین، به تجویز ملیتین فعال‌شونده اقدام گردید. طراحی دقیق یک ساختار مولکولی با توالی‌های ملیتین برای هدف‌گیری انتخابی سلول‌های آلوده به لیشمانیا و تنظیم فعال شدن ملیتین با استفاده از میزان بیان بالای MMPها در سلول‌های آلوده امکان‌پذیر است. به‌منظور هدف‌گیری انتخابی، توالی‌هایی برای تولید ملیتین قابل تنظیم طراحی شد. با توجه به افزایش بیان MMP2,9 در سلول‌های آلوده به انگل و توانایی خرد کردن لینکر میان ملیتین و مهارکننده می‌توان از آن‌ها برای اختصاصی نمودن عملکرد پپتیدهای سمی از جمله ملیتین استفاده کرد؛ بنابراین در این بررسی، به‌منظور درمان لیشمانیوز ناشی از لیشمانیا ماژور از ملیتین فعال‌شونده استفاده گردید. به‌منظور ورود ملیتین به داخل ماکروفاژهای آلوده به لیشمانیا، از لیپوزوم و نانوذرات آلبومین به‌طور جداگانه استفاده شد و آثار آن روی

سلول‌های آلوده به لیشمانیا در شرایط *in vivo* بررسی و مقایسه گردید. پس از استفاده از دوزهای مختلف، غلظت مؤثر ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از حامل‌های نانوذرات آلبومین و لیپوزوم حاوی ۲۵ میکروگرم ملیتین فعال‌شونده تعیین شد و به‌عنوان دوز درمانی به موش‌های BALB/c تزریق گردید که نتیجه این بخش از مطالعات نشان داد که آثار درمانی با حامل‌های لیپوزوم و نانوذرات آلبومین حاوی ۲۵ میکروگرم/میلی‌لیتر ملیتین فعال‌شونده در موش‌های مبتلا به لیشمانیوز جلدی، در مقایسه با گروه کنترل که درمانی در آن‌ها صورت نگرفته بود، بسیار مؤثر بود، به‌نحوی که پس از گذشت ۲۸ روز پس از درمان با هر یک از موارد تزریقی، در گروه‌های تحت درمان بهبودی کامل حاصل شد، درحالی‌که در گروه کنترل پس از گذشت این زمان، مرگ موش‌ها اتفاق افتاد.

این داده‌ها نشان‌دهنده اثربخشی ملیتین فعال‌شونده محصور در لیپوزوم و نانوذرات آلبومین در برابر آماسیت‌گوت‌های داخل سلولی است (۲۲). این مطالعه بر اثربخشی بالقوه از سامانه‌های انتقال دارو، مانند استفاده از لیپوزوم و نانوذرات آلبومین برای درمان بیماری‌های عفونی شامل سامانه فاکوسیتیک تک‌هسته‌ای و به‌طور خاص‌تر، برای هدف قرار دادن عوامل ضدلیشمانیایی ماکروفاژهای آلوده تأکید می‌کند. این نتایج با مطالعات کارنیرو و همکاران (۲۰۱۰) همخوانی داشت که این محققین پس از بررسی فعالیت ضد لیشمانیایی لیپوزوم‌های حاوی پاروموماسین برای درمان لیشمانیوز جلدی در شرایط *in vivo* نشان دادند که استفاده از لیپوزوم‌ها، گزینه‌های بسیار مناسبی به‌عنوان یک سامانه تحویل دارو برای هدف قرار دادن بافت‌های آلوده به لیشمانیا و برای درمان مؤثرتر این بیماری انگلی است و بر اساس این تحقیق مشخص گردید که پاروموماسین محصور در لیپوزوم به‌طور چشمگیری در شرایط *in vivo* از داروی آزاد مؤثرتر است (۲۳)؛ همچنین درباره استفاده از نانوذرات آلبومین نیز برای درمان لیشمانیوز، تحقیقات بسیاری انجام شده که با نتایج به‌دست آمده از این مطالعه مطابقت دارد؛ از جمله مطالعات جیتان و همکاران

لیشمانیایی آنتی مونات لیپوزومی مگلو مین بر ماکروفاژهای آلوده به لیشمانیا بررسی شد و نتایج نشان داد که مهارکننده مهمی از دارو روی انگل و همچنین سمیت اندک آن در ماکروفاژهای آلوده در مقایسه با داروی آزاد است (۲۸). لیپوزومها ترجیحاً از راه سامانه فاکوسیت‌های تک‌هسته‌ای گرفته می‌شوند که عمدتاً توسط ماکروفاژهای کبد و طحال است که مخازن اصلی انگلی در لیشمانیا هستند؛ بنابراین، استفاده از لیپوزومها یک راهکار منطقی برای هدف قرار دادن این بافت‌ها با عوامل ضدلیشمانیایی برای درمان مؤثرتر این بیماری انگلی است. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که مگلو مین آنتیمونات محصور در لیپوزوم به‌طور چشمگیری در شرایط *in vitro* و *in vivo* از داروی آزاد مؤثرتر است (۲۹).

در مطالعه حاضر، انتقال ملیتین فعال‌شونده با استفاده از لیپوزوم و نانوذرات‌های آلبومین برای کپسوله کردن دارو انجام شد. استفاده از ترکیب فسفولیپیدهای دارای بار منفی در لیپوزومها جذب ماکروفاژها و کارایی داروی کپسوله را افزایش می‌دهد؛ همچنین علت استفاده از نانوذرات‌های آلبومین جذب ترجیحی دارو توسط بافت‌های التهابی و توانایی عبور از موانع بیولوژیکی برای رساندن دارو به محل مدنظر و دوام آن در جریان خون است، به‌طوری‌که این حامل‌های غیرسمی با غلظت ۲۵ میکروگرم پیتید ملیتین فعال‌شونده در ۱۰۰ میکرولیتر می‌تواند آثار ضدلیشمانیایی این دارو را بهبود بخشد و بهینه کند؛ همچنین برای تسریع در روند بهبود استفاده از لیپوزوم و نانوذرات آلبومین به‌عنوان حامل مؤثر می‌توانند استفاده شوند؛ بنابراین، این نوع دارو ممکن است بتواند جایگزین مناسبی برای داروهای فعلی ضدلیشمانیا باشد و پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری در این باره صورت گیرد.

کد اخلاق: ۷۵۰۶۰۰۹/۶/۳۵

که نشان دادند نانوذرات آلبومین حاوی آمفوتریسین-B می‌تواند سمیت دارو را تا هشت برابر کاهش دهد و جالب اینجاست که پس از تزریق دارو، تجمع آن در بافت‌های کبدی و طحال به‌طور چشمگیری بیشتر بود، به همین سبب نویسندگان این شکل دارویی را به‌عنوان جایگزین مناسبی برای آمفوتریسین-B معرفی کردند (۲۴).

همچنین می‌توان به نتایج تحقیقات پریرا و همکاران در سال (۲۰۱۶) اشاره کرد که نشان دادند طی بررسی تأثیر ملیتین بر ماکروفاژهای آلوده به لیشمانیا، میزان بیان ژن IL-12 افزایش و بیان ژن‌های IL-10, TNF- α کاهش یافت. نتایج نشان داد که ملیتین در شرایط آزمایشگاهی در برابر پروماستیگوت‌ها و آماستیگوت‌های داخل سلولی *Leishmania infantum* عمل می‌کند. علاوه بر این، آن‌ها می‌توانند به‌طور غیرمستقیم در آماستیگوت‌های داخل سلول‌ها از طریق یک اثر ایمنونوزی ماکروفاژ عمل نمایند (۲۵).

الطاهیر و خلیل در سال ۲۰۱۷، نتیجه مطالعات خود را طی جستجو برای آدپتورهای جدید واکسن لیشمانیا این‌چنین بیان کردند که ملیتین به‌طور معناداری القای پاسخ‌های ایمنی Th1 و Th2 را در موش سوری CD1 آلپینو سوئسی به‌طور چشمگیری تحت تأثیر قرار می‌دهد. ملیتین می‌تواند یک مکمل بالقوه مؤثر برای واکسن‌های ضد لیشمانیا باشد (۲۶).

نتیجه تحقیقات خلیلی در سال ۲۰۱۸، طی بررسی فعالیت یک پیتید ضد میکروبی علیه اشکال آماستیگوت لیشمانیا ماژور در شرایط برون تنی (*In Vitro*) نشان داد که پیتید سکروپین ملیتین (CM-11) اثر کشندگی بسیار بالایی بر لیشمانیا ماژور دارد و می‌توان استفاده از این پیتیدهای ضد میکروبی را در آینده به‌عنوان ترکیبات ضدلیشمانیایی مدنظر قرار داد (۲۷).

در مطالعه بوربورما و همکاران (۲۰۱۱)، اثر ضد

References

1. Akhbari S, Rezvan H, Zolhavarieh SM, Moafi M. Comparison of proinflammatory gene expression in lesions caused by either burn injuries or cutaneous Leishmaniasis. *Gene Cell Tis*2017;4: 81-6. doi.10.17795/gct-42887.
2. Cummings HE, Tuladhar R, Satoskar AR. Cytokines and their STATs in cutaneous and visceral leishmaniasis. *J Biomed Biotechnol*2010;

- 2:23-7. doi.10.1155/2010/294389
3. Blum J, Desjeux P, Schwartz E, Beck B, Hatz C. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. *J Antimicrob Chem* 2004;53:158-66. doi.10.1093/jac/dkh058.
 4. Santos DO, Coutinho CE, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, Nascimento SB, et al. Leishmaniasis treatment a challenge that remains: a review. *Parasitol Res*2008;103:41-6. doi.10.1007/s00436-008-0943-2.
 5. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure function and biochemistry. *Circul Res*2003;92:827-39. doi.10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D.
 6. Mast BA, Schultz GS. Interactions of cytokines, growth factors and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Rep Reg*1996;4:411-20. doi.10.1046/j.1524-475X.1996.40404.x.
 7. Ravindran R, Bhowmick S, Das A, Ali N. Comparison of BCG and MPL and cationic liposome adjuvant systems in leishmanial antigen vaccine formulations against murine visceral Leishmaniasis. *BMC Microbiol* 2010;10:1-7. doi.147-2180/10/181.
 8. Adade CM, Oliveira IR, Pais JA, Soutopadrón T. Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. *Toxicon*2013; 69:227-39. doi.10.1016/j.toxicon.2013.03.011.
 9. Wade D, Boman A, Wahlin B, Drain CM, Andreu D, Boman HG, et al. All di amino acid containing channel forming antibiotic peptides. *Proce Nat Acad Sci*1990 J;87:4761-5. doi. 10.1073/pnas.87.12.4761.
 10. BAZZO R, Tappin MJ, Pastore A, Harvey TS, Carver JA, Campbell ID. The structure of melittin a ¹H NMR study in methanol. *European J Biochem*1988 ;173:139-46. doi.10.1111/j.1432-1033.1988.tb13977.x.
 11. Tichy J, Novak J. Detection of antimicrobials in bee products with activity against viridans streptococci. *J Alt Comple Med* 2000;6:383-9. doi.10.1089/acm.2000.6.383
 12. Olson ES, Aguilera TA, Jiang T, Ellies LG, Nguyen QT, Wong EH, et al. In vivo characterization of activatable cell penetrating peptides for targeting protease activity in cancer. *Int Biol* 2009;1:382-93. doi.10.1039/b904890a.
 13. Marettimira AC, Pinho KM, Oliveira MP, Pirmez C, Craft N. MMP-9 activity is induced by *Leishmania braziliensis* infection and correlates with mucosal leishmaniasis. *Actatropica* 2011; 119:160-4. doi.10.1016/j.actatropica.2011.05.009.
 14. Turkey, Bulbul, Bharatbhushan, S. Prodrug encapsulated albumin nanoparticles as an alternative approach to manifest anti proliferative effects of suicide gene therapy. *Mate Sci Eng* 2017;73: 507-15. doi.10.1016/j.msec.2016.12.108
 15. Olson ES, Aguilera TA, Jiang T, Ellies LG, Nguyen QT, Wong EH, et al. In vivo characterization of activatable cell penetrating peptides for targeting protease activity in cancer. *Int Biol*2009;1:382-93. doi.10.1039/b904890a.
 16. Lainson R, Shaw JJ. Evolution classification and geographical distribution. 1th ed. Academic Publication.1987;P.213-23.
 17. Ouellette M, Drummelsmith J, Papadopoulou B. Leishmaniasis drugs in the clinic resistance and new developments. *Drug Res Up* 2004;7:257-66. doi.10.1016/j.drug.2004.07.002.
 18. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in Leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19:111-26. doi.10.1128/CMR.19.1.111-126.2006
 19. Croft SL, Yardley V. Chemotherapy of Leishmaniasis. *Cur Pharm Des*2002;8:319-42. doi.10.2174/1381612023396258.
 20. Maleki MA, Javidi Z, Taheri AR, Ebrahimi Rad M, Rasti MA. A study of hematologic, hepatic and renal side effects of intramuscular injection of meglumine antimoniate on patients with cutaneous leishmaniasis. *Med J Mashhad Uni Med Sci*2007;50:371-8. doi.10.22038/MJMS.2007.5555
 21. Zhang L, Falla TJ. Host defense peptides for use as potential therapeutics. *Cur Opin Inv Drug* 2009; 10:164-71. doi.10.1007/978-1-60761-594-1_19.
 22. Moghimipour E, Aghel N, Mahmoudabadi AZ, Ramezani Z, Handali S. Preparation and characterization of liposomes containing essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* leaf. *Jundishapur J Natural Pharm Prod* 2012;7:117. doi.10.5812/jjpharma.5261.
 23. Carneiro G, Santos DC, Oliveira MC, Fernandes AP, Ferreira LS, Ramaldes GA, et al. Topical delivery and in vivo antileishmanial activity of paromomycin-loaded liposomes for treatment of cutaneous Leishmaniasis. *J Lip Res* 2010;20:16-23. doi. 10.3109/08982100903015025.
 24. Jithan AV, Madhavi K, Madhavi M, Prabhakar K. Preparation and characterization of albumin nanoparticles encapsulating curcumin intended for the treatment of breast cancer. *International journal of pharmaceutical investigation*. 2011 1:119. doi.10.4103/2230-973X.82432.
 25. Pereira AV, Barros GD, Pinto EG, Tempone AG, Orsi RD, Santos LD, et al. Melittin induces in vitro death of *Leishmania infantum* by triggering the cellular innate immune response. *J Ven Anim Tox Includ Trop Dis* 2016;22:63-7. doi.10.1186/s40409-016-0055-x
 26. Eltahirsaeed WS, Gasimkhalil EA. Immune response modifying effects of bee venom protein melittin autoclaved *L.donovani* complex in CD1 Mice the search for new vaccine adjuvants. *J Vac* 2017;8:2. doi.10.4172/2157-7560.1000372.
 27. Khalili S, Mohebbali M, Ebrahimzadeh E, Shayan E, Mohammadiyeganeh S, Moghaddam MM, et al. Antimicrobial activity of an antimicrobial peptide against amastigote forms of *Leishmania major*. *Vet Res Forum* 2018 ;9: 323. doi.10.30466/vrf.2018.33107.
 28. Borborema SE, Schwendener RA, Junior JA, Andrade HF, Nascimento N. Uptake and antileishmanial activity of meglumine antimoniate containing liposomes in *Leishmania major* infected macrophages. *Int J Antimicrobial Age* 2011; 38:341-7. doi.10.1016/j.ijantimicag.2011.05.012
 29. Tempone AG, Perez D, Rath S, Vilarinho AL, Mortara RA, Andrade HF. Targeting *Leishmania chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. *J Antimicrob Chem* 2004 ;54:54-9. doi.10.1093/jac/dkh281