

بررسی تأثیر عصاره‌های هیدروالکلی و عصاره‌ی آبی زردچوبه و شیرین بیان بر انگل *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) در شرایط آزمایشگاهی

دکتر علی حسینی^۱، دکتر فریبا جعفری^۲، دکتر غلامرضا اصغری^۳، دکتر سید حسین حجازی^۴،
مهندس لیلا شیرانی بید آبادی^۵

چکیده

مقدمه: در حال حاضر ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی‌موان درمان اصلی لیشمانیوز جلدی می‌باشند. استفاده از این ترکیبات دارای محدودیت‌هایی از قبیل عدم تأثیر به روش خوراکی، طولانی بودن دوره‌ی درمان، عدم پاسخ درمانی در حدود ۱۵-۱۰ درصد موارد و داشتن سمیت شدید روی قلب و کلیه‌ها می‌باشد. از ریزوم زردچوبه Curcuminها به دست می‌آید که از مشتقات فنلی مؤثر بر لیشمانیا می‌باشند. Licochalcone A ماده‌ی مؤثر استخراج شده از ریشه‌ی شیرین بیان است. تزریق داخل صفاقی آن از ایجاد زخم در موش‌های Balb/c که به L. major آلوده شده‌اند، به طور کامل جلوگیری می‌کند. در سری تحقیقاتی که به منظور غربالگری گیاهان دارویی سنتی کشور در دست انجام بود، دو گیاه زردچوبه و شیرین بیان انتخاب شدند و اثر ضد لیشمانیایی آن‌ها در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: از عصاره‌ی خشک شده‌ی گیاه رقت‌های ۰/۴، ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شد. ۴۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون انگلی به هر کدام از ایندروف‌ها در سه سری اضافه شد. در نمونه‌ی شاهد منفی فقط ۵۰۰ میکرولیتر (۴۰۰ میکرولیتر محیط کشت به علاوه‌ی ۱۰۰ میکرولیتر محلول بافر نمکی خنثی) اضافه شد. از آمفوتریسین B با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. سپس میانگین تعداد پروماستیگوت در هر سه سری تعیین و فراوانی انگل زنده در هر زمان برای هر غلظت محاسبه و نتایج به صورت IC₅₀ بیان شد.

یافته‌ها: غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره‌ی تام زردچوبه سریع باعث کشته شدن تمام پروماستیگوت‌ها شد. در مقایسه با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره‌ی تام پس از ۸۸ ساعت انگل‌ها را از بین برد. غلظت‌های پایین شیرین بیان یعنی ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اثری مشابه شاهد منفی داشتند. با افزایش غلظت عصاره تا ۱۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اثر ضد انگلی افزایش یافت و تعداد پروماستیگوت‌های بیشتری کشته شدند.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره‌ی تام هر دو گیاه زردچوبه و شیرین بیان در غلظت‌های به کار رفته در محیط کشت دارای اثر ضد لیشمانیایی می‌باشند. اثر کلی شیرین بیان در مقایسه با زردچوبه خیلی کمتر است و در دوزهای بالاتری انگل را از بین می‌برد.

واژگان کلیدی: عصاره‌ی تام، زردچوبه، شیرین بیان، *Leishmania major*

مقدمه

کشور جهان به لیشمانیوز جلدی آلوده می‌باشند (۱).

میزان بروز این بیماری ۲۸ نفر در هر هزار نفر است

(۲). متأسفانه در ایران با وجود شیوع قابل توجه

لیشمانیوز روش پیش‌گیری، کنترل و درمان قاطعی برای

لیشمانیوز جلدی (سالک) دومین بیماری شایع منتقل

شده (پس از مالاریا) است که در بسیاری از کشورهای

مناطق حاره‌ی جهان شیوع دارد. در حال حاضر ۸۸

^۱ داروساز، مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و سالک صدیقیه طاهره (س)، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

^۲ دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و سالک صدیقیه طاهره (س)، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان و مرکز تحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم

پزشکی تهران، تهران، ایران

^۳ استاد، گروه فارماکونوزی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

^۴ دانشیار، گروه فارغ‌شناسی و انگل‌شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

^۵ کارشناسی ارشد حشره‌شناسی پزشکی، محقق، مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و سالک صدیقیه طاهره (س)، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: jaffary@pharm.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر فریبا جعفری

Zingiberaceae و از جنس Curcumin است که اغلب نام اصلی آن را *Curcuma longa* ذکر می‌کنند. زردچوبه دارای اسانسی مرکب از اسیدهای والرینیک و کاپروئیک به خصوص فلاندرن (۱ درصد)، سابینن، اینول (۱ درصد)، بورنئول (۱ درصد) و نوعی الکل به نام تورمرول است. به علاوه دارای ستونی به نام کورکومون که یک ماده‌ی رزینی زرد رنگ قابل تبلور و محلول در مواد چرب به نام کورکومین است، می‌باشد (۲۶). از جمله موارد مصرف آن در مصرف موضعی در درمان برخی التهابات پوستی می‌باشد و در گذشته در درمان داءالصف (پسوریازیس) مورد مصرف داشته است (۲۷). از ریزوم این گیاه Curcuminها به دست می‌آید که از مشتقات فنلی مؤثر بر لیشمانیا می‌باشند. فعالیت لیشمانی سیدال این ترکیب در مقابل پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در محیط *in vitro* بررسی شده است (۲۲). در سلول‌های پستانداران این ترکیب، یک سری عوامل بیولوژیکی را مختل می‌کند که از جمله‌ی آن‌ها مهار فعالیت پروتئین کیناز C، EGF-رستپور تیروزین کیناز و I kappa B کیناز و مهار سنتز DNA می‌باشد. این فعالیت‌ها ممکن است در خاصیت لیشمانی سیدال Curcumin مؤثر باشند (۲۲). شیرین بیان، ریشه‌های خشک شده‌ی گیاه *Glycyrrhiza glabra L.* از خانواده‌ی نخود (Leguminosae) است که حداقل واجد ۴ درصد گلیسیریزین می‌باشد. گلیسیریزین از دسته‌ی ترکیبات گلیکوزیدی محسوب می‌شود و در اثر هیدرولیز اسیدی تولید دو مولکول اسید گلوکورونیک و یک مولکول گلیسیره‌ی تینیک اسید می‌نماید. میزان گلیسیریزین در ریشه‌های خشک ۶ الی ۱۲ درصد می‌باشد. همچنین از این گروه تربیات می‌توان به

آن وجود ندارد (۳). در حال حاضر جهت درمان لیشمانیوز ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی موان به کار می‌رود که شامل دو ترکیب مگلو مین آنتی مونیت (گلوکانتیم) و سدیم استیوگلوکونیت (پتتوستام) هستند. استفاده از ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی موان دارای محدودیت‌هایی از قبیل عدم تأثیر به روش خوراکی، طولانی بودن دوره‌ی درمان، عدم پاسخ درمانی در حدود ۱۵-۱۰ درصد موارد و داشتن سمیت شدید روی قلب و کلیه‌ها می‌باشد. از این رو تحقیقات وسیعی بر روی سایر روش‌های درمانی لیشمانیوز در حال انجام است (۴). روش‌های سنتی درمان لیشمانیوز به طور عمیقی با گیاهان بومی منطقه پیوند خورده است. داروهای سنتی مورد استفاده در درمان این بیماری شامل استفاده‌ی خوراکی از گیاه خام و استفاده‌ی موضعی از عصاره‌ی گیاه برای درمان عفونت است (۵). سازمان جهانی بهداشت (WHO) در نظر دارد، تحقیقات بیشتری را در زمینه‌ی استفاده‌ی سنتی از گیاهان برای پیدا کردن فرآورده‌های دارویی جدیدتر و بهتر و کارتر و با سمیت کمتر به کار برد (۶). ارزیابی علمی گیاهان دارویی سبب شده است، مواد دارویی جدید و مؤثر در درمان بیماری‌های انگلی پروتوزوایی یافت شود. برخی از متابولیت‌هایی که در درمان بیماری‌های انگلی استفاده می‌شوند شامل کینون‌ها، آلکالوئیدها و تریپن‌ها می‌باشند. به عنوان مثال می‌توان مواد دارویی اولیه‌ای که در درمان مالاریا و آمیب استفاده شدند را نام برد که آلکالوئیدهای کینین و امتین بودند که از گیاهان دارویی استخراج شدند (۵). تحقیقات بسیاری در زمینه‌ی درمان با عصاره‌های گیاهی در زمینه‌ی لیشمانیوز پوستی انجام گرفته است (۲۵-۵). زردچوبه گیاهی از خانواده‌ی زنجبیل

مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

این مطالعه از نوع بنیادی- کاربردی و تجربی بود. برای تهیه‌ی عصاره‌های گیاهی ریشه‌ی زردچوبه و شیرین بیان مورد استفاده قرار گرفت. ریشه ابتدا از خار و خاشاک جدا گردید و سپس با آسیاب الکتریکی خرد و از الک شماره‌ی ۱۰ عبور داده شد. پودر به دست آمده به نسبت ۱ به ۱۱ الکل اتیلیک ۸۰ درجه مخلوط و سپس به نسبت ۵ به ۱ با حلال ماده‌ی گیاهی به روش پرکولاسیون مطابق دستورالعمل فارماکوپه‌ی ۱۰ آلمان، به مدت ۷۲ ساعت عصاره‌گیری شد. سپس عصاره‌ی به دست آمده تا حد خروج تمام الکل با دستگاه تبخیر در خلأ دوار تقطیر و عصاره‌ی زردچوبه و شیرین بیان به دست آمده آماده‌ی بهره‌برداری در مرحله‌ی بعدی گردید.

برای نگهداری انگل در شرایط آزمایشگاهی، ابتدا پروماستیگوت‌های سوش استاندارد انگل *L. major* (MRHO,IR,75,ER) در محیط NNN کشت داده شدند. انگل‌ها از محیط‌های کشت NNN به محیط RPMI انتقال داده شدند. زمانی که تعداد انگل‌ها زیاد شد و به مرحله‌ی ایستا رسیدند محتویات شیشه به لوله‌های مخصوص انتقال یافت و سانتریفوژ شد و توسط لام نئوبار شمارش گردید. پس از کشت انبوه انگل، کلیه‌ی نمونه‌ها در مرحله‌ی ایستا (Stationary) جمع‌آوری گردید.

برای بررسی اثر ضد لیشمانیایی عصاره‌ها در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰، ابتدا *L. major* در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ با ۲۰-۱۰ درصد FCS برای رسیدن به تعداد کافی انگل کشت داده شد. بررسی اثر ضد

اسیدهای تری‌ترپنی مانند گلابریک اسید و لیکوریک اسید اشاره نمود. فلاونوئیدهای شیرین‌بیان را جفت ایزومرهای شالکونی (ایزولیکوئیرتین) و فلاوانونی (لیکوئیرتین) تشکیل می‌دهند. میزان مجموعه‌ی فلاونوئیدها در ریشه‌ی شیرین بیان حدود ۱ الی ۱/۵ درصد است (۲۶). در طب گذشته شیرین بیان در التیام زخم، تسکین سرفه، تسکین درد و رفع التهاب معده مورد استفاده قرار می‌گرفته است.

Licochalcone A ماده‌ی مؤثر استخراج شده از ریشه‌ی شیرین بیان است. تزریق داخل صفاقی آن از ایجاد زخم در موش‌های Balb/c که به *L. major* آلوده شده‌اند را به طور کامل جلوگیری می‌کند (۱۲). همچنین اضافه کردن این ماده به محیط کشت پروماستیگوت‌های *Leishmania major* (*L. major*) قادر به مهار کامل رشد آن‌ها ظرف ۲۰ ساعت می‌باشد (۱۵). ارگانل هدف، با توجه به مطالعات به عمل آمده میتوکندری پارازیت است (۲۸). ریشه‌ی شیرین بیان که تحت عنوان Licorice root نیز خوانده می‌شود شامل موادی از جمله ساپونین‌های ترپنوییدی (۲۴-۴ درصد) است که اغلب گلیسرئین (نمک‌های سدیم و کلسیم اسید گلیسرئینیک) می‌باشد. ترکیبات فلاونوییدی (۱ درصد)، از جمله مواد دیگر آن است (۲۷). از جمله موارد استعمال آن در درمان زخم و التهاب معده، همچنین به عنوان خلط آور، ضد التهاب، طعم دهنده و شیرین کننده استفاده می‌شود. اثرات ضد التهابی را به گلیسرئین نسبت می‌دهند (۲۶). با توجه به موارد فوق، در سری تحقیقاتی که به منظور غربالگری گیاهان دارویی سنتی کشور در دست انجام است، دو گیاه زردچوبه و شیرین بیان انتخاب شدند و اثر ضد لیشمانیایی عصاره‌ی تام آن‌ها در محیط کشت

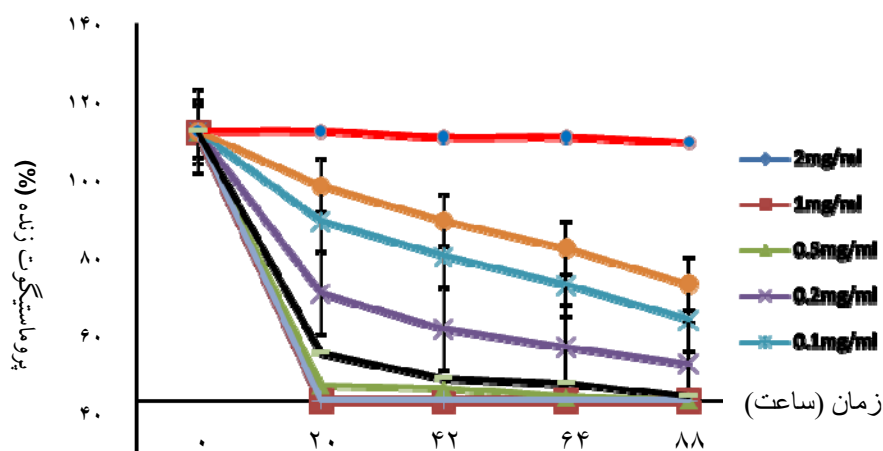
پس از شمارش اولیه ی انگل‌ها، لوله های مورد بررسی داخل انکوباتور با دمای ۲۷ درجه ی سانتی گراد گذاشته شدند و تعداد انگل در هر سی سی به مدت ۴ روز شمارش شد. در نهایت میانگین تعداد پروماستیگوت در هر سه سری لوله برآورد گردید، درصد انگل‌های زنده در هر زمان برای هر غلظت محاسبه و نتایج به صورت IC₅₀ محاسبه شد.

برای بررسی اثر ضد لیشمانیایی عصاره ی شیرین بیان در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰، رقت‌های ۱/۵، ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۶ میلی گرم در میلی لیتر عصاره در محیط کشت حاوی پروماستیگوت‌های انگل، مشابه آن چه در بالا گفته شد، اضافه گردید و به ترتیب بالا شمارش توسط لام نئوبار انجام شد و نتایج به صورت IC₅₀ (Inhibitory concentration) محاسبه گردید. نحوه ی محاسبه ی IC₅₀ با استفاده از منحنی دوز-پاسخ و پیدا کردن دوز مؤثر بر ۵۰ درصد انگل بود.

یافته‌ها

بررسی اثر عصاره‌ی زردچوبه در محیط کشت: میانگین تعداد پروماستیگوت‌های زنده در هر سی سی سوسپانسیون انگلی در ۳ سری، پس از اضافه کردن عصاره‌ها طی زمان در نمودار ۱ نشان داده شده است. همان طور که در نمودار ۱ نشان داده شده است، غلظت‌های ۲ و ۱ میلی گرم در میلی لیتر به سرعت ظرف مدت ۲۰ ساعت، پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور را کشتند و در سایر رقت‌ها با کاهش غلظت، میزان اثر نیز کاسته شد؛ به گونه‌ای که در غلظت ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر پس از گذشت ۸۸ ساعت باعث کشته شدن تمام انگل‌ها شد. گروه شاهد مثبت یعنی گروه دریافت کننده ی ۰/۱ میلی گرم در میلی لیتر

لیشمانیایی عصاره‌ها در فاز ایستای منحنی رشد پروماستیگوت‌ها انجام گردید. پروماستیگوت‌ها پس از گذشت حدود ۷۲ ساعت در محیط کشت RPMI به فاز Stationary وارد شدند (۲۹). پس از گذشت این زمان تعداد انگل در محیط کشت با استفاده از لام نئوبار شمارش شد که به عنوان لود اولیه ی انگل محسوب شد. برای بررسی اثر ضد لیشمانیایی عصاره‌ی زردچوبه در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ از عصاره‌ی خشک شده ی گیاه رقت‌های ۰/۴، ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر تهیه شد. حلال مورد استفاده در تهیه ی عصاره‌ها آب بود. برای مرطوب کردن عصاره‌ی خشک از DMSO (Dimethyl sulfoxide) کمتر از ۰/۵ درصد استفاده شد. DMSO به پخش شدن بهتر عصاره‌ی خشک آب کمک می‌کند و طی مطالعات قبلی تا غلظت ۲ درصد هیچ اثری بر پروماستیگوت‌ها ندارد (۳۰). بررسی اثر ضد لیشمانیایی برای هر رقت، در سه سری اپندروف‌های تست ۱/۵ سی سی انجام شد. ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون انگلی به هر کدام از اپندروف‌ها در هر سه سری اضافه شد و درمورد شاهد منفی که عصاره ای دریافت نمی‌کند فقط ۵۰۰ میکرولیتر (۴۰۰ میکرولیتر محیط کشت به علاوه ی ۱۰۰ میکرولیتر محلول بافر نمکی خنثی) اضافه شد. از آمفوتریسین B با غلظت ۰/۱ میلی گرم در میلی لیتر به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. در نهایت به تمام اپندروف‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از سری رقت‌های تهیه شده اضافه شد. به این ترتیب در محیط کشت، عصاره‌ها به اندازه‌ی ۰/۲ رقیق شدند و رقت‌های ۰/۸، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم عصاره در هر میلی لیتر محیط کشت حاصل شد. در کنار رقت‌های مختلف عصاره، اثر سه رقت ۰/۱، ۰/۲ و ۲ میلی گرم در میلی لیتر کورکومین نیز بررسی شد.



نمودار ۱. درصد پروماستیگوت زنده در محیط کشت پس از اضافه کردن غلظت‌های مختلف زردچوبه در زمان‌های مختلف

آمفوتریسین B با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر نیز باعث از بین رفتن تمام انگل‌ها (IC₅₀ برابر ۰/۱۲۲ میکروگرم در میلی لیتر) شد.

نتایج اثر کورکومین در سه رقت متوالی در جدول ۱ نشان داده شده است.

غلظت ۲ میلی گرم در میلی لیتر نسبت به عصاره‌ی تام زردچوبه با سرعت بیشتری باعث کشته شدن تمام پروماستیگوت‌ها شد. غلظت ۰/۲ میلی گرم در میلی لیتر که در عصاره‌ی تام پس از ۸۸ ساعت انگل‌ها را کشت در این جا سریع تمام پروماستیگوت‌ها را از بین برد. غلظت ۰/۱ میلی گرم در میلی لیتر نیز نسبت به گروه مشابه زردچوبه اثر خیلی بیشتری داشت. نمودار ۲ نشان دهنده‌ی اثر عصاره‌ی آبی

آمفوتریسین B (IC₅₀ برابر ۰/۱۲۲ میکروگرم در میلی لیتر) نیز باعث کشته شدن تمام انگل‌ها در ساعات اولیه شد. در گروه شاهد منفی کاهش تعداد انگل نامحسوس بود.

غلظت $IC_{100} < 5 < IC_{50}$ میلی گرم در میلی لیتر عصاره‌ی زردچوبه پس از اضافه کردن به محیط کشت صد در صد انگل‌ها را از بین می‌برد. در سایر رقت‌ها، با افزایش غلظت تعداد بیشتری از پروماستیگوت‌ها به صورت وابسته به دوز از بین رفتند و کشته شدن وابسته به دوز بود. برای زردچوبه در زمان‌های ۲۰، ۴۲، ۶۴ و ۸۸ ساعت پس از اضافه کردن عصاره به محیط کشت به ترتیب برابر ۰/۱۶، ۰/۱۲، ۰/۰۸۴ و ۰/۰۷ میلی گرم در میلی لیتر بود. اضافه کردن

جدول ۱. اثر غلظت‌های مختلف کورکومین بر روی پروماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور در محیط کشت در زمان‌های مختلف بر حسب درصد انگل زنده

فراوانی پروماستیگوت زنده					زمان (ساعت)	غلظت (میلی گرم در میلی لیتر)
درصد						
زمان ۸۸	زمان ۶۴	زمان ۴۲	زمان ۲۰	زمان ۰		
۰	۰	۰	۰	۱۰۰		۲
۰	۰	۰	۰	۱۰۰		۰/۲
۱/۶	۶/۴	۸/۴	۱۷/۶	۱۰۰		۰/۱

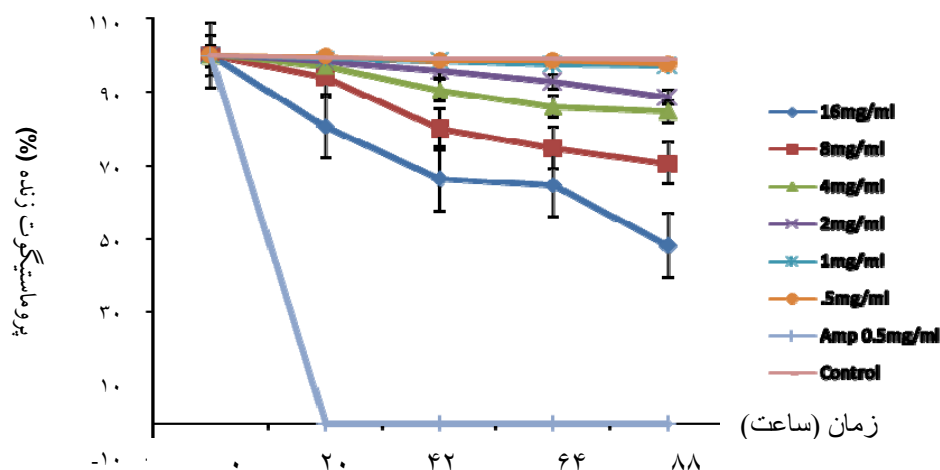
محیط کشت انگل بود. در مطالعه‌ی همزمانی که در سه رقت بر روی کورکومین انجام گردید، دیده شد که اثر آن در مقایسه با عصاره‌ی تام بهتر بود؛ به نحوی که غلظت ۰/۲ میلی گرم در میلی لیتر آن تمام پروماستیگوت‌ها را در همان لحظات اولیه کشت. این در حالی بود که در عصاره‌ی تام غلظت بالاتر از ۱ میلی گرم در میلی لیتر تمام انگل‌ها را از بین برد. غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر آن اثر تا حدودی مشابه با رقت ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر عصاره‌ی تام داشت و این قدرت اثر ۵ برابری کورکومین را نشان می‌دهد. در مطالعه‌ای که توسط Rasmussen و همکاران بر روی اثر سه ترکیب دی‌کتون فنولی یعنی کورکومین (۳۱)، دمتوکسی کورکومین (۲)، بیس دمتوکسی کورکومین (۳) جدا شده از ریزوم زردچوبه انجام دادند، مشاهده گردید که کورکومین‌های ۱ تا ۳ اثر متوسطی بر پلاسمودیوم فالسیپاروم (IC_{50} برابر ۳، ۴/۲ و ۳/۵ میکروگرم در میلی لیتر) و لیشمانیا ماژور (IC_{50} برابر ۲۱/۵، ۱۴/۱ و ۷/۸ میکروگرم در میلی لیتر) داشتند (۳۱).

در مطالعه‌ای که Koide و همکاران بر روی اثر ضد

شیرین بیان در محیط کشت RPMI 1640 بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور می‌باشد. همان طور که در نمودار ۲ مشخص است، غلظت‌های پایین عصاره یعنی ۱ و ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر اثری مشابه شاهد منفی داشتند. با افزایش غلظت عصاره تا ۱۶ میلی گرم در میلی لیتر اثر ضد انگلی زیادتر شد و تعداد پروماستیگوت‌های بیشتری کشته شدند. IC_{50} در زمان ۸۸ ساعت پس از اضافه کردن عصاره‌ی شیرین بیان به محیط کشت برابر ۱۴/۸ میلی گرم در میلی لیتر بود. شیرین بیان در رقت‌های آزمایش شده در زمان قبل از ۸۸ ساعت در هیچ غلظتی سبب کاهش تعداد انگل به زیر ۵۰ درصد نشد بنابراین در این زمان‌ها IC_{50} درستی حاصل نشد. اثر کلی شیرین بیان در مقایسه با زردچوبه خیلی کمتر بود و در دوزهای بالاتری انگل را از بین برد.

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر اثر ضد لیشمانیایی عصاره‌ی تام زردچوبه به صورت وابسته به دوز در



نمودار ۲. درصد پروماستیگوت زنده در محیط کشت پس از اضافه کردن غلظت‌های مختلف شیرین بیان در زمان‌های مختلف

درصد ممکن است در ریزوم گیاه باشند این اختلاف اثر در عصاره‌ی تام قابل تعمیم به این ترکیبات می‌باشد. به دنبال عفونت‌های لیشمانیایی، ماکروفاژها فعال می‌شوند و رادیکال‌های اکسیژن و نیتروژن تولید می‌کنند. این مسأله به خوبی اثبات شده است که سلول‌های میزبان از نیتریک اکسید (NO) به عنوان یک سلاح اصلی در دفاع ضد عفونت‌های انگلی داخل سلولی استفاده می‌کنند. در اوایل ۱۹۹۰ پس از مشاهده‌ی کشته شدن داخل سلولی لیشمانیا با افزایش تولید NO اهمیت NO در بیماری لیشمانیوز، کشف شد (۳۵).

به دنبال مطالعات Chan و همکاران، مشخص شد که کورکومین سبب مهار عمل NO و تولید کننده‌های NO می‌شود و پروماستیگوت‌ها و آماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور و دنوانی را در برابر این ترکیبات محافظت می‌کند. بنابراین مکانیسم ضد لیشمانیایی کورکومین از این طریق نیست (۳۶).

در مطالعه‌ی Nose و همکاران نشان داده شد که کورکومین به خوبی بر روی تروپونوزوم‌ها نیز اثر می‌گذارد (۳۷). این گونه انگل‌ها به شدت به اکسیژن حساس می‌باشند (۳۸). بنابراین حدس زده شد که اثر ضد لیشمانیایی کورکومین به خاطر اثر آنتی‌اکسیدانی آن است. پس از مطالعات بیشتر، آن‌ها دریافتند که ترکیبات آنتی‌اکسیدان قوی چون گالیک اسید در غلظت‌های بیشتر از ۱۰۰۰ میکرومول نیمی از پروماستیگوت‌های لیشمانیا دنوانی را مهار می‌کنند، در حالی که IC_{50} برای کورکومین ۱۲ میکرومول می‌باشد. بنابراین این اثر آنتی‌اکسیدانی کورکومین نیز نمی‌تواند توجیه‌گر شدت اثر آن بر روی پروماستیگوت‌ها باشد (۲۲). در مطالعه‌ی Mittra و همکاران، بر روی اثر ضد لیشمانیایی پروماستیگوت‌های لیشمانیا دنوانی لوتئین و کوئرستین،

لیشمانیایی (پروماستیگوت‌های گونه‌ی ماژور) کورکومین در محیط کشت SDM-۷۹ به مدت ۲۴ ساعت انجام دادند، مهار رشد کامل (Total growth inhibition) یا (TGI)، مهار رشد ۵۰ درصد ($Growth\ inhibition_{50}$) یا (GI_{50}) و دوز کشندگی ۵۰ درصد ($Lethal\ dose_{50}$) یا (LD_{50}) به ترتیب برابر ۲۱ و ۳۸ و ۱۲ میکرومولار ($MW = 368/39$) محاسبه گردید (۲۲). نتایج مطالعه‌ی حاضر مشابه مطالعه‌ی Koide و همکاران (۲۲) نشان داد، کورکومین یک ماده‌ی ضد لیشمانیا با اثر خوب بر پروماستیگوت می‌باشد.

با توجه به اثر خوب کورکومین در مطالعات قبلی، Gomes و همکاران در مطالعه‌ای، ۱۰ ترکیب صنایعی از کورکومین ساختند و اثر آن‌ها را بر پروماستیگوت‌های لیشمانیایی آمازونی بررسی کردند و هیچ ارتباطی بین ساختمان ترکیبات و اثر ضد لیشمانیایی مشاهده نکردند، اگر چه که برخی ترکیبات حتی تا ۱۰ برابر هم قوی‌تر از کورکومین بودند (۳۳-۳۲).

در مطالعه‌ای، Saleheen و همکاران اثر کورکومین را بر پروماستیگوت‌های سه گونه‌ی لیشمانیا ماژور، تروپیکا و اینفانتوم بررسی کردند. IC_{50} به طور میانگین برابر ۵/۳ میکرومولار گزارش شد که در مقایسه با رفرنس پنتامیدین خیلی کمتر بود و نسبت به آن مؤثرتر بود. در بررسی اثر بر آماستیگوت‌ها هم اثر بهتری داشت (۳۴). با توجه به مطالعات فوق اثر ضد لیشمانیایی عصاره‌ی تام را تا حد زیادی به می‌توان به کورکومین نسبت داد. محدوده‌ی IC_{50} زردچوبه در این مطالعه بین ۷۰ تا ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. در مطالعه‌ی Rasmussen و همکاران، IC_{50} برای ترکیبات کورکومینویدی بین ۷/۸ تا ۲۱/۵ میکروگرم در سی‌سی به دست آمد (۳۱). از آن جایی این ترکیبات تا حدود ۵

IC₅₀ آن‌ها به ترتیب ۱۲/۵ و ۴۵/۵ میکرومول گزارش شد (۳۹). این ترکیبات سبب مهار سنتز DNA می‌شوند و باعث آپوپتوزیس پروماستیگوت‌ها می‌شوند. IC₅₀ لوتتین و کورکومین خیلی شبیه به هم می‌باشد و کورکومین ممکن است مکانیسمی شبیه به آن‌ها داشته باشد (۲۲).

غلظت‌های پایین‌تر از ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره‌ی شیرین بیان در عمل اثری بر روی انگل نداشت و حتی پس از گذشت ۸۸ ساعت، حدود ۹۸ درصد پروماستیگوت‌ها زنده ماندند. در مقایسه، IC₅₀ شیرین بیان نسبت به IC₅₀ زردچوبه در زمان مشابه خیلی بزرگ تر بود و یک تفاوت اثر ۲۰۰ برابری بین دو گیاه دیده شد. این نشان دهنده‌ی اثر خیلی کمتر شیرین بیان در محیط کشت بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور نسبت به زردچوبه می‌باشد.

شیرین بیان از گیاهان سنتی است که در ایران به خوبی شناخته شده و تاکنون اثرات متعددی مانند اثرات ضد التهابی، ضد اسپاسمی و حفاظت کننده از زخم معده به آن نسبت داده شده است. آثار فارماکولوژیکی شیرین بیان را به دو دسته‌ی فلاونوئیدها (اثر ضد اسپاسم) و گلیسیریزین که خواص ساپنوزیدی دارد و اثر ضد التهابی به آن نسبت داده می‌شود، مرتبط می‌دانند (۲۶).

در مطالعه‌ی Chen و همکاران، Licochalcone A (یک کالکون اکسیژنه‌ی جدا شده از شیرین بیان) سبب مهار آماستیگوت‌ها و پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور و دنووانی شد. غلظت مهار کننده‌ی رشد ۵۰ درصد از پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در فاز لگاریتمی و فاز Stationary به ترتیب ۴ و ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور پس از ۲۴ ساعت در غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به طور کامل مهار شد (۱۲).

غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از Licochalcone A به طور قابل ملاحظه‌ای سرعت عفونی شدن ماکروفاژهای مشتق شده از سلول‌های انسانی به پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور را کاهش و یک عمل کشنده‌ی داخل سلولی قوی نیز از خود نشان می‌دهد. آماستیگوت‌های داخل سلولی خیلی بیشتر به Licochalcone A حساس می‌باشند (۱۲) و به نظر می‌رسد عمل خود را با مهار میتوکندری و تغییر ساختار و عملکرد آن در انگل اعمال می‌کنند. این مهار میتوکندریایی در غلظتی که بر سلول‌های میزبان توکسیک نیست، اتفاق می‌افتد (۲۸).

آن چه در مورد Licochalcone A به عنوان ماده‌ای که در مجموع ۱ تا ۱/۵ درصد ریشه‌ی شیرین بیان را تشکیل می‌دهد، اثر ضد لیشمانیایی خوب این ترکیبات است و در مقایسه با IC₅₀ محاسبه شده در این آزمایش، تفاوت خیلی زیادی (بیش از هزار برابر) وجود دارد که با درصد این ترکیبات در گیاه قابل توجیه نیست.

مغایرت نتایج به دست آمده در مطالعه‌ی حاضر با نتایج فوق شاید به این علت باشد که این مجموعه ترکیبات در عصاره‌ی آبی شیرین بیان به اندازه‌ی تأثیرگذاری، وارد نشدند. از طرف دیگر، از آن جایی که گلیسیریزین در آب محلول می‌باشد و درصد بیشتری از ریشه‌ی شیرین بیان (۱۰ تا ۱۵ درصد) را شامل می‌شود و به میزان زیادتری در عصاره‌ی آبی موجود می‌باشد اثر کمتری بر پروماستیگوت‌ها دارد و باعث از بین رفتن سریع آن‌ها در مقایسه با Licochalcone A نمی‌شود. در مجموع و با توجه به اثرات ضد لیشمانیایی عصاره‌ی تام هر دو گیاه، بررسی اثر آن‌ها در مدل حیوانی لیشمانیوز جلدی در امتداد مطالعه‌ی حاضر قابل توصیه است. این بررسی نیز توسط محققین انجام شده است که در

مقاله‌ای جداگانه ارائه می‌شود.

دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به تصویب رسید.
بدین‌وسیله از همکاری و مساعدت همکاران دانشکده‌ی
داروسازی و مرکز تحقیقات پوست و سالک صمیمانه
تشکر و تقدیر می‌نماییم.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با شماره‌ی ۳۸۷۴۱۸ در دانشکده‌ی داروسازی

References

1. WHO expertise. Tenth program report of world health organization. 1st ed. Swis: WHO press; 1990.
2. Azmoudeh M. Report on leishmaniasis in Iran. Tehran: Ministry of Health. Treatment and Medication Education; 1989.
3. Nadim A, Javadian E, Seyedi-Rashti MA. Epidemiology of leishmaniasis in Iran. In: Ardehali S, Rezai HR, Nadim A, editors. Leishmania parasite. 2nd ed. Tehran: Iran University Press; 1994. p. 178-80.
4. Saebi A. Parasitic diseases in Iran. Tehran: Rozbahan Publishing; 1996.
5. Chan-Bacab MJ, Pena-Rodriguez LM. Plant natural products with leishmanicidal activity. Nat Prod Rep 2001; 18(6): 674-88.
6. Rates SM. Plants as source of drugs. Toxicon 2001; 39(5): 603-13.
7. Tiunan TS, Ueda-Nakamura T, Garcia Cortez DA, Dias Filho BP, Morgado-Diaz JA, de SW, et al. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from Tanacetum parthenium. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(1): 176-82.
8. Socorro MD, Rosa S, Mendonça-Filho RR, Bizzo HR, Rodrigues IDA, Soares RMA, et al. Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from Croton cajucara. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47(6): 1895-901.
9. Ferreira IC, Lonardon MV, Machado GM, Leon LL, Gobbi FL, Pinto LH, et al. Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99(3): 325-7.
10. Delorenzi JC, Attias M, Gattass CR, Andrade M, Rezende C, da Cunha PA, et al. Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(5): 1349-54.
11. Saleheen D, Ali SA, Yasinzai MM. Antileishmanial activity of aqueous onion extract in vitro. Fitoterapia 2004; 75(1): 9-13.
12. Chen M, Christensen SB, Blom J, Lemmich E, Nadelmann L, Fich K, et al. Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37(12): 2550-6.
13. Ferreira ME, Rojas de Ariasa A, Torres de Ortiza S, Inchaustia A, Nakayama H, Thouvenelb C, et al. Leishmanicidal activity of two canthin-6-one alkaloids, two major constituents of *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*. Journal of Ethnopharmacology 2002; 80(2-3): 199-202.
14. Leon LL, Miranda CC, De Souza AO, Duran N. Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. J Antimicrob Chemother 2001; 48(3): 449-50.
15. Chen M, Christensen SB, Theander TG, Kharazmi A. Antileishmanial activity of licochalcone A in mice infected with *Leishmania major* and in hamsters infected with *Leishmania donovani*. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38(6): 1339-44.
16. Sairafianpour M, Christensen J, Staerk D, Budnik BA, Kharazmi A, Bagherzadeh K, et al. Leishmanicidal, antiplasmodial, and cytotoxic activity of novel diterpenoid 1,2-quinones from *Perovskia abrotanoides*: new source of tanshinones. J Nat Prod 2001; 64(11): 1398-403.
17. Sairafianpour M, Kayser O, Christensen J, Asfa M, Witt M, Staerk D, et al. Leishmanicidal and antiplasmodial activity of constituents of *Smirnowia iranica*. J Nat Prod 2002; 65(12): 1754-8.
18. Moheb Ali M, Chenari A, Nazari M. The efficacy of *Cassia fistula* on Leishmaniasis major ulcer in Balb/c mice. Pajhohandeh 1999; 13: 14-9.
19. Tabatabai F, Ghaffari Far T, Dalimy ASl R, Ebrahimian H. Study the effect of herbal ointment containing alkaloid compounds on wound healing and expansion of leishmaniasis in Balb/c mice infected L.major. Proceedings of the National Congress of New Skin Diseases and Cutaneous Leishmaniasis; 2003 Apr 24-25; Isfahan, Iran
20. Ghazanfari T, Zahair MH, Ebtakar M, Ahmadiani A. Garlic extract and simultaneous use in treating wounds caused Glucantime *Leishmania major* in susceptible mice.

- Proceedings of the National Congress of New Skin Diseases and Cutaneous Leishmaniasis; 2003 Apr 24-25; Isfahan, Iran
21. Kayser O, Kiderlen AF, Croft SL. Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitol Res* 2003; 90(Suppl 2): S55-S62.
 22. Koide T, Nose M, Ogihara Y, Yabu Y, Ohta N. Leishmanicidal effect of curcumin in vitro. *Biol Pharm Bull* 2002; 25(1): 131-3.
 23. Tolouei S, Hejazi S H, Mostaghim M, Sadeghian G, Asilian A, Shatalebi, MA. Therapeutic effect with gentamicin sulfate Paramomaycin films in the treatment of cutaneous lesions of Balb/c mice infected L.major. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2004; 7(1):12-6.
 24. Tahani M. Therapeutic effect of ointment on the lesions of cutaneous leishmaniasis mice [PhD Thesis]. Isfahan: Isfahan University of Medical Sciences; 1999.
 25. Mohebbali M, Yaghoobi P, Houshmand B, Khamesipour A. Effect of ointment prepared in Paramomaycin (Paramou) on cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in mouse models. *Journal of skin diseases* 2003; 7(2): 88-94.
 26. Mir Heidar H. Education plant, plants used in the prevention and treatment of diseases. 3rd ed. Office of Islamic culture; 1997.
 27. Ghasemi-Dehkordi N. Iranian herbal pharmacopoeia. Tehran: Ministry of Health and Medical Education, Food and Drug Administration; 2002.
 28. Zhai L, Blom J, Chen M, Christensen SB, Kharazmi A. The antileishmanial agent licochalcone A interferes with the function of parasite mitochondria. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(12): 2742-8.
 29. Shariatifar N, Chamanzari H, Ghanay SM. The study of flos plant on promastigote in culture. *Ofoh-e-Danesh* 2006; 11(4): 5-9.
 30. Jaafari MR, Behravan J, Abde-Emami J, Saghafi-Khadem F, Ramezani M. Evaluation of Leishmanicidal Effect of *Euphorbia bungei* Boiss Extract by in vitro Leishmanicidal Assay Using Promastigotes of *Leishmania major*. *International Journal of Pharmacology* 2006; 2(5): 571-5.
 31. Rasmussen HB, Christensen SB, Kvist LP, Karazmi A. A simple and efficient separation of the curcumins, the antiprotozoal constituents of *Curcuma longa*. *Planta Med* 2000; 66(4): 396-8.
 32. Gomes DC, Alegrio LV, de Lima ME, Leon LL, Araujo CA. Synthetic derivatives of curcumin and their activity against *Leishmania amazonensis*. *Arzneimittelforschung* 2002; 52(2): 120-4.
 33. Gomes DC, Alegrio LV, Leon LL, de Lima ME. Total synthesis and anti-leishmanial activity of some curcumin analogues. *Arzneimittelforschung* 2002; 52(9): 695-8.
 34. Saleheen D, Ali SA, Ashfaq K, Siddiqui AA, Agha A, Yasinzai MM. Latent activity of curcumin against leishmaniasis in vitro. *Biol Pharm Bull* 2002; 25(3): 386-9.
 35. Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RM, Moncada S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol* 1990; 144(12): 4794-7.
 36. Chan MM, Adapala NS, Fong D. Curcumin overcomes the inhibitory effect of nitric oxide on *Leishmania*. *Parasitol Res* 2005; 96(1): 49-56.
 37. Nose M, Koide T, Ogihara Y, Yabu Y, Ohta N. Trypanocidal effects of curcumin in vitro. *Biol Pharm Bull* 1998; 21(6): 643-5.
 38. Mukhopadhyay R, Madhubala R. Effect of antioxidants on the growth and polyamine levels of *Leishmania donovani*. *Biochem Pharmacol* 1994; 47(4): 611-5.
 39. Mitra B, Saha A, Chowdhury AR, Pal C, Mandal S, Mukhopadhyay S, et al. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. *Mol Med* 2000; 6(6): 527-41.

In Vitro Effects of Turmeric and Licorice Total Extracts on *L. Major* Promastigotes

Ali Hosseini MD¹, Fariba Jaffary MD, PhD², Gholam Reza Asghari PhD³,
Seyed Hossein Hejazi PhD⁴, Leila Shirani Bidabadi MSc⁵

Abstract

Background: Pentavalent antimonial compounds are the main treatment option for cutaneous leishmaniasis. However, their clinical use has limitations such as lack of efficacy by oral route, long-term treatment period, emergence of drug resistance in about 10-15% of cases, cardiac toxicity, and reversible renal insufficiency. Curcumins are phenolic derivatives extracted from turmeric rhizome which have anti-leishmania effects. Intraperitoneal injection of licochalcone A, extracted from licorice root, prevents ulcer in BALB/c mice infected by *L. major*. As a part of screening of Iranian herbs with potential antileishmanial activity, the effects of total extract of turmeric and licorice on *L. major* culture were assessed in this study.

Methods: Serial concentrations of 0.4, 0.5, 1, 2.5, 5 and 10 mg/ml were prepared from the dried plant extract. Moreover, 400 microliters of the parasite suspension was added to all test tubes except for the negative control in which only the culture media was added. Amphotericin B 0.1 mg/ml was used as the positive control. The average numbers of promastigotes of all three series of test tubes were calculated. For each concentration, percent of alive parasites at different times were recorded. The results were expressed as IC₅₀ of each extract.

Findings: The 2 mg/ml concentration of turmeric extracts resulted in rapid death of promastigotes compared to 0.2 mg/ml concentration which killed them after 88 hours of exposure. The effects of licorice total extract were similar to negative control at lower concentrations (0.5 and 1 mg/ml). Increasing the concentration up to 16 mg/ml killed more promastigotes.

Conclusion: The results of this study showed that both turmeric and licorice total extracts have antileishmanial effects in-vitro. However, the overall activity of licorice on promastigotes is much less than turmeric. It also kills parasites at higher doses.

Keywords: Total Extract, Turmeric, Licorice, *L. Major*.

¹ Skin Diseases and Leishmaniasis Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

² Associate Professor, Skin Diseases and Leishmaniasis Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan and Skin and Stem Cell Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Professor, Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Parasitology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

⁵ Researcher, Skin Diseases and Leishmaniasis Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan Iran

Corresponding Author: Fariba Jaffary MD, PhD, Email: jaffary@pharm.mui.ac.ir