مجله دانشکده پزشکی اصفهان **مقاله پژوهشی**
سال بیست و نهم/شماره ۱۶۹/هفته اول اسفند ماه ۱۳۹۰ **تاریخ دریافت:** ۹۰/۲/۷ **تاریخ پذیرش:** ۹۰/۸/۲۵

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 اپندروف‌ها 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 IC_{50} 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

لیشمانیوز جلدی (سالک) دومین بیماری شایع منتقل شده (پس از مالاریا) است که در بسیاری از کشورهای مناطق حاره ی جهان شیوع دارد. در حال حاضر ۸۸ 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

[۱] داروساز، مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و سالک صدیقه‌ی طاهره (س)، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۲] دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و سالک صدیقه‌ی طاهره (س)، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان و مرکز تحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۳] استاد، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۴] دانشیار، گروه قارچ شناسی و انگل شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۵] کارشناسی ارشد حشره شناسی پزشکی، محقق، مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و سالک صدیقه‌ی طاهره (س)، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر فریبا جعفری
Email: jaffary@pharm.mui.ac.ir

آن وجود ندارد (۳). در حال حاضر جهت درمان لیشمانیوز ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی‌موان به کار می‌رود که شامل دو ترکیب مگلومین آنتی مونیت (گلوکانتیم) و سدیم استیبوگلوکونیت (پنتوستام) هستند. استفاده از ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی‌موان دارای محدودیت‌هایی از قبیل عدم تأثیر به روش خوراکی، طولانی بودن دوره ی 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 عصاره ی گیاه برای درمان عفونت است (۵). سازمان جهانی بهداشت (WHO) در نظر دارد، تحقیقات بیشتری را در زمینه ی استفاده ی سنتی از گیاهان برای پیدا کردن فراورده‌های دارویی جدیدتر و بهتر و کاراتر و با سمیت کمتر به کار برد (۶). ارزیابی علمی گیاهان دارویی سبب شده است، مواد دارویی جدید و مؤوثر در درمان بیماری‌های انگلی پروتوزوایی یافت شود. برخی از متابولیت‌هایی که در درمان بیماری‌های انگلی استفاده می‌شوند شامل کینون‌ها، آلکالوییدها و ترپن‌ها می‌باشند. به عنوان مثال می توان مواد دارویی اولیه‌ای که در درمان مالاریا و آمیب استفاده شدند را نام برد که آلکالوییدهای 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 Zingiberaceae و از جنس Curcumin است که اغلب نام اصلی آن را Curcuma longa ذکر می‌کنند. زردچوبه دارای اسانسی مرکب از اسیدهای والرینیک و کاپرووییک به خصوص فلاندرن (۱ درصد)، سابی‌نن، ینئول (۱ درصد)، بورنئول (۱ درصد) و نوعی الکل به نام تورمرول است. به علاوه دارای ستونی به نام کورکومون که یک ماده ی رزینی زرد رنگ قابل تبلور و محلول در مواد چرب به نام کورکومین است، می باشد (۲۶). از جمله موارد مصرف آن در مصرف موضعی در درمان برخی التهابات پوستی می‌باشد و در گذشته در درمان داءالصدف (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 پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور در محیط in vitro بررسی شده است (۲۲). در سلول‌های پستانداران این ترکیب، یک سری عوامل بیولوژیکی را مختل می‌کند که از جمله ی آن ها مهار فعالیت پروتئین کیناز C، EGF-رسپتور تیروزین کیناز و I kappa B کیناز و مهار سنتز DNA می باشد. این فعالیت‌ها ممکن است در خاصیت لیشمانی سیدال Curcumin مؤثر باشند (۲۲). شیرین‌بیان، ریشه‌های خشک شده ی گیاه Glycyrrhiza glabra L. از خانواده‌ی نخود (Leguminosae) است که حداقل واجد ۴ درصد گلیسیریزین می‌باشد. گلیسیریزین از دسته ی 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 تریبات می‌توان به

www.mui.ac.ir

اسیدهای تری‌ترپنی مانند گلابریک اسید و لیکوریک اسید اشاره نمود. فلاونوییدهای شیرین‌بیان را جفت ایزومرهای شالکونی (ایزولیکوییرتین) و فلاوانونی (لیکوییرتین) تشکیل می‌دهند. میزان مجموعه‌ی فلانوییدها در ریشه ی 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 ریشه ی 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 آن ها ظرف ۲۰ ساعت می‌باشد (۱۵). ارگانل هدف، با توجه به مطالعات به عمل آمده میتوکندری پارازیت است (۲۸). ریشه ی شیرین بیان که تحت عنوان Licorice root نیز خوانده می‌شود شامل موادی از جمله ساپونین‌های ترپنوییدی (۲۴-۴ درصد) است که اغلب گلیسریزین (نمک های سدیم و کلسیم اسید گلیسریزیک) 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 می شود. اثرات ضد التهابی را به گلیسریزین 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 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 ۱الکل 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 عصاره گیری 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 مرحله ی 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

www.mui.ac.ir

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 اولیه‌ی انگل محسوب شد.

برای بررسی اثر ضد لیشمانیایی عصاره ی زردچوبه در محیط کشت RPMI 1640 از عصاره‌ی خشک شده‌ی گیاه رقت‌های ۰/۴، ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شد. حلال مورد استفاده در تهیه‌ی 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 پروماستیگوت ها ندارد (۳۰). بررسی اثر ضد لیشمانیایی برای هر رقت، در سه سری اپندروف‌های تست ۱/۵ سی‌سی انجام شد. ۵۰۰ میکرولیتر ازسوسپانسیون 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 ۱۰۰میکرولیتر 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 ۰/۰۸، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم عصاره در هر میلی‌لیتر محیط کشت حاصل شد. در کنار رقت‌های مختلف عصاره، اثر سه رقت ۰/۱، ۰/۲ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کورکومین نیز بررسی شد.

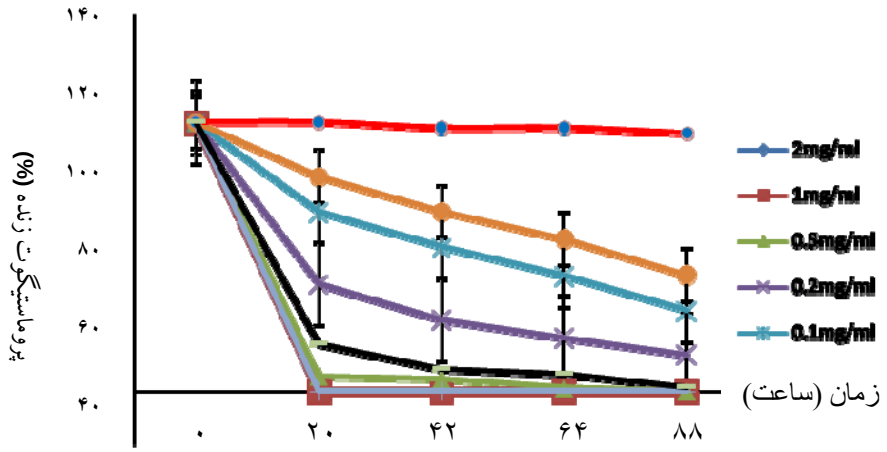
پس از شمارش اولیه ی انگل‌ها، لوله های مورد بررسی داخل انکوباتور با دمای ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد گذاشته شدند و تعداد انگل در هر سی‌سی به مدت ۴ روز شمارش شد. در نهایت میانگین تعداد پروماستیگوت در هر سه سری لوله برآورد گردید، درصد انگل‌های زنده در هر زمان برای هر غلظت محاسبه و نتایج به صورت IC_{50} محاسبه شد.

برای بررسی اثر ضد لیشمانیایی عصاره ی شیرین بیان در محیط کشت RPMI 1640، رقت‌های ۰/۵، 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 IC_{50} (Inhibitory concentration) محاسبه گردید. نحوه‌ی محاسبه ی IC_{50} 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 سی‌سی 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 میلی‌گرم در میلی‌لیتر 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 میلی‌گرم در میلی‌لیتر 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

www.mui.ac.ir



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

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

غلظت ۱ > $IC_{۱۰۰}$ > ۰/۵ میلی گرم در میلی‌لیتر عصاره ی 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. IC_{50} برای زردچوبه در زمان های 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 میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. اضافه کردن آمفوتریسین B با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر نیز باعث از بین رفتن تمام انگل ها (IC_{50} برابر ۰/۱۲۲ میکروگرم در میلی‌لیتر) 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 میلی‌گرم در میلی لیتر که در عصاره ی تام پس از ۸۸ ساعت انگل‌ها را کشت در این جا سریع تمام پروماستیگوت‌ها را از بین برد. غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نیز نسبت به گروه مشابه زردچوبه اثر خیلی بیشتری داشت.

نمودار ۲ نشان دهنده‌ی اثر عصاره‌ی آبی

جدول۱. ا ثر غلظت های مختلف کورکومین بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در محیط کشت در زمان‌های مختلف بر حسب درصد انگل زنده

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

www.mui.ac.ir

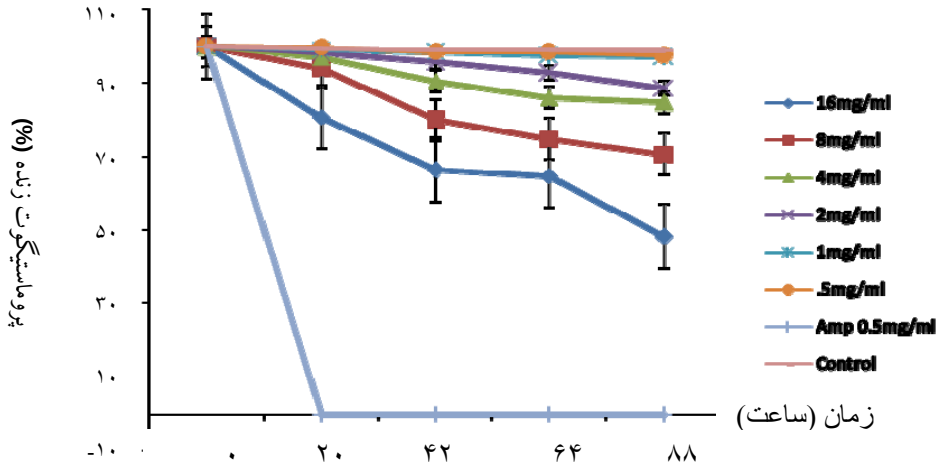
شیرین بیان در محیط کشت RPMI 1640 بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور می‌باشد. همان طور که در نمودار ۲ مشخص است، غلظت های پایین عصاره یعنی ۱ و ۰/۵ میلی گرم در میلی‌لیتر اثری مشابه شاهد منفی داشتند. با افزایش غلظت عصاره تا ۱۶ میلی گرم در میلی لیتر اثر ضد انگلی زیادتر شد و تعداد پروماستیگوت‌های بیشتری کشته شدند. IC_{50} در زمان ۸۸ ساعت پس از اضافه کردن عصاره‌ی شیرین بیان به محیط کشت برابر ۱۴/۸ میلی گرم در میلی‌لیتر بود. شیرین بیان در رقت های آزمایش شده در زمان قبل از ۸۸ ساعت در هیچ غلظتی سبب کاهش تعداد انگل به زیر ۵۰ درصد نشد بنابراین در این زمان ها 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 عصاره ی تام زردچوبه به صورت وابسته به دوز در محیط کشت انگل بود. در مطالعه ی همزمانی که در سه رقت بر روی کورکومین انجام گردید، دیده شد که اثر آن در مقایسه با عصاره ی 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 میلی‌گرم در میلی‌لیتر تمام انگل‌ها را از بین برد. غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر آن اثر تا حدودی مشابه با رقت ۰/۵ میلی گرم در میلی‌لیتر 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 میلی‌لیتر) 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



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

www.mui.ac.ir

لیشمانیایی (پروماستیگوت‌های گونه‌ی ماژور) کورکومین در محیط کشت SDM-۷۹ بـه مـدت ۲۴ سـاعت انجـام دادند، مهـار رشـد کامـل (Total growth inhibition یـا TGI)، مهار رشد ۵۰ درصـد ($Growth\ inhibition_{50}$ یـا GI_{50}) و دوز کشـندگی ۵۰ درصـد ($Lethal\ dose_{50}$ یـا LD_{50}) بـه ترتیـب برابـر ۲۱ و ۳۸ و ۱۲ میکرومـولار (MW = ۳۶۸/۳۹) محاسبه گردید (۲۲). نتایج مطالعـه ی حاضر مشابه مطالعه‌ی Koide و همکاران (۲۲) نشان داد، کورکومین یک ماده ی ضـد لیشـمانیا بـا اثـر خـوب بـر پروماستیگوت می‌باشد.

با توجه به اثر خوب کورکومین در مطالعات قبلـی، Gomes و همکاران در مطالعه‌ای، ۱۰ ترکیب صناعی از کورکومین ساختند و اثر آن‌ها را بر پروماسـتیگوت‌هـای لیشمانیای آمازونی بررسی کردند و هـیچ ارتبـاطی بـین ساختمان ترکیبات و اثر ضد لیشمانیایی مشاهده نکردند، اگر چه که برخی ترکیبات حتی تا ۱۰ برابر هم قـوی‌تـر از کورکومین بودند (۳۳-۳۲).

در مطالعه‌ای، Saleheen و همکاران اثـر کورکـومین را بر پروماستیگوت‌هـای سـه گونـه‌ی لیشـمانیا مـاژور، ترویپکا و اینفانتوم بررسی کردند. IC_{50} به طور میـانگین برابر ۵/۳ میکرومولار گـزارش شـد کـه در مقایسـه بـا رفرنس پنتامیدین خیلی کمتر بود و نسبت به آن مـؤثرتر بود. در بررسی اثر بـر آماسـتیگوت‌هـا هـم اثـر بهتـری داشـت (۳۴). بـا توجـه بـه مطالعـات فـوق اثـر ضـد لیشمانیایی عصاره‌ی تام را تا حد زیادی به می تـوان بـه کورکومین نسبت داد. محدوده‌ی IC_{50} زردچوبه در ایـن مطالعه بین ۷۰ تا ۱۶۰ میکروگرم در میلـی لیتـر بـود. در مطالعه‌ی Rasmussen و همکاران، IC_{50} برای ترکیبـات کورکومینوییدی بین ۷/۸ تا ۲۱/۵ میکروگرم در سی‌سـی به دست آمد (۳۱). از آن جایی این ترکیبات تا حدود ۵ درصد ممکن است در ریزوم گیاه باشند این اختلاف اثر در عصاره‌ی تام قابل تعمیم به این ترکیبات می‌باشد. بـه دنبال عفونت‌های لیشمانیایی، ماکروفاژها فعال می‌شوند و رادیکال‌های اکسیژن و نیتروژن تولیـد مـی‌کننـد. ایـن مسأله به خوبی اثبات شده است که سلول های 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 سـلولی لیشمانیا با افزایش تولیـد NO اهمیـت NO در بیمـاری لیشمانیوز، کشف شد (۳۵).

به دنبال مطالعات Chan و همکاران، مشـخص شـد که کورکومین سبب مهار عملNO و تولیـد کننـده‌هـای NO می‌شـود و پروماسـتیگوت‌هـا و آماسـتیگوت‌هـای لیشـمانیا مـاژور و دنـوانی را در برابـر ایـن ترکیبـات محافظت می‌کنـد. بنـابراین مکانیسـم ضـد لیشـمانیایی کورکومین از این طریق نیست (۳۶).

در مطالعه ی Nose و همکـاران نشـان داده شـد کـه کورکومین بـه خـوبی بـر روی تروپونـوزوم‌هـا نیـز اثـر می‌گذارد (۳۷). این گونه انگل‌ها به شـدت بـه اکسـیژن حساس می‌باشند (۳۸). بنابراین حدس زده شـد کـه اثـر ضد لیشمانیایی کورکومین به خاطر اثر آنتی اکسـیدانی آن است. پس از مطالعات بیشتر، آن ها دریافتند که ترکیبـات آنتی‌اکسیدان قوی چـون گالیـک اسـید در غلظـت هـای بیشتر از ۱۰۰۰ میکرومول نیمـی از پروماسـتیگوت هـای لیشمانیا دنوانی را مهار می‌کنند، در حالی کـه IC_{50} بـرای کورکومین ۱۲ میکرومـول مـی‌باشـد. بنـابراین ایـن اثـر آنتی‌اکسیدانی کورکومین نیز نمی‌تواند توجیه‌گر شدت اثر آن بر روی پروماسـتیگوت‌هـا باشـد (۲۲). در مطالعـه‌ی Mittra و همکـاران، بـر روی اثـر ضـد لیشـمانیایی پروماستیگوت‌های لیشمانیا دنوانی لـوتئین و کوئرسـتین،

www.mui.ac.ir

IC_{50} آن‌ها به ترتیب ۱۲/۵و ۴۵/۵ میکرومول گزارش شد (۳۹). این ترکیبات سبب مهار سنتز DNA می‌شوند و باعث آپوپتوزیس پروماستیگوت‌ها می‌شوند. IC_{50} لوتئین 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، IC_{50} شیرین بیان نسبت به IC_{50} 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 فلاونوییدها (اثر ضد اسپاسم) و گلیسیریزین که خواص ساپونزیدی 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 آماستیگوت ها و پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور و دنووانی شد. غلظت مهار کننده ی 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 کشنده ی 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 IC_{50} 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 شیرین‌بیان (۱۰ تا ۱۵ درصد) را شامل می‌شود و به میزان زیادتری در عصاره ی 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 آن ها در مدل حیوانی لیشمانیوز جلدی در امتداد مطالعه ی حاضر قابل توصیه است. این بررسی نیز توسط محققین انجام شده است که در

www.mui.ac.ir

مقاله‌ای جداگانه ارائه می‌شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با شماره‌ی ۳۸۷۴۱۸ در دانشکده‌ی داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به تصویب رسید. بدین‌وسیله از همکاری و مساعدت همکاران دانشکده ی داروسازی و مرکز تحقیقات پوست و سالک صمیمانه تشکر و تقدیر می‌نماییم.

References

1. WHO expertise. Tenth program report of world health organization. 1st ed. Swisis: 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. Tiuman 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, Lonardoni 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. Ferreiraa ME, Rojas de Ariasa A, Torres de Ortiza S, Inchaustia A, Nakayamaa 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, Ebtekar M, Ahmadiani A. Garlic extract and simultaneous use in treating wounds caused Glucantime Leishmania major in susceptible mice.

www.mui.ac.ir

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. Mohebali 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 progmastigote in culture. Ofogh-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. Mittra 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.

www.mui.ac.ir

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 29, No 169, 1st week, March 2012 Received: 27.4.2011 Accepted: 16.11.2011

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

Ali Hosseini MD[1], Fariba Jaffary MD, PhD[2], Gholam Reza Asghari PhD[3], Seyed Hossein Hejazi PhD[4], Leila Shirani Bidabadi MSc[5]

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 IC_{50} 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