

Evaluation of anti-leishmaniasis activity of curcumin-loaded chitosan nanoparticles on *Leishmania major* and *L. infantum* in vitro

Hadad A¹, Delavari M^{1,2}, Arbabi M^{1,2}, Gardeshmeydani I³, Salmani A³

1- Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.

2- Infectious Diseases Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

3- Department of Laboratory sciences, Faculty of Paramedical, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

Received: 2020/10/2 | Accepted: 2021/08/24

Abstract

Background: First-line drugs in the treatment of leishmaniasis are pentavalent compounds of antimony which are toxic and have side effects. This study aimed to investigate the anti-leishmaniasis effect of curcumin-loaded chitosan nanoparticles on *Leishmania major* and *L. infantum* in vitro.

Materials and Methods: After synthesis of chitosan nanoparticles containing curcumin zeta potential and charge of nanoparticles was determined by zeta analysis (DLS). Also, electron microscope (TEM) was used to prove the shape and size of nanoparticles. In the final stage, the efficacy of chitosan nanoparticles loaded with curcumin on *Leishmania major* and *L. infantum* was determined. For this purpose, the two species of Leishmania were cultured in RPMI 1640 medium containing 15% fetal bovine serum in plates of 48 houses and each wells of different concentrations of chitosan nanoparticles containing curcumin (40, 80, 160, 320 and 680 µg / ml) were added to the well. The number of parasites was counted after 24 and 48 hours.

Results: Transmission electron microscopy (TEM) images showed that the nanoparticle was spherical in size and 125±5 nm. The zeta potential of chitosan nanoparticles containing curcumin was -9.35. Counting the number of parasites showed that the synthesized nanoparticles have a favorable effect on inhibiting the growth of *L. major* and *L. infantum*. The IC₅₀ of the mentioned nanoparticles against the promastigotic stage of *Leishmania major* and *L. infantum* were 131.3 and 36.46, respectively.

Conclusion: Curcumin-loaded chitosan nanoparticles have anti-leishmaniasis effects and according to the obtained results can be studied in vivo condition.

Key words: Chitosan nanoparticle, Curcumin, *L. major*, *L. infantum*, In vitro

***Corresponding Author.**

Email:mdelavari1@gmail.com

Tel: 09123840052

Fax: 03155451112

Conflict of Interests: *No*

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, October, 2021; Vol. 25, No4, Pages 1040-1046

Please cite this article as: Hadad A, Delavari M, Arbabi M, Gardeshmeydani I, Salmani A. Evaluation of anti-leishmaniasis activity of curcumin-loaded chitosan nanoparticles on *Leishmania major* and *L. infantum* in vitro. *Feyz* 2021; 25(4):1040-46.

ارزیابی فعالیت ضدلیشمانیایی نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با کورکومین بر لیشمانیا ماژور و اینفانتوم در شرایط برون تنی

عاطفه حداد^۱، مهدی دلاوری^{۱،۲}، محسن اربابی^{۱،۲}، ایمان گردش میدانی^۳، علی سلمانی^۳

خلاصه

سابقه و هدف: داروهای خط اول در درمان لیشمانیوز، ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتیموان می‌باشند که توکسیک بوده، عوارض جانبی به همراه دارند. هدف از مطالعه حاضر تعیین اثر ضدلیشمانیایی نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با کورکومین بر روی لیشمانیا ماژور و اینفانتوم در شرایط برون تنی بود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق تجربی، پس از سنتز نانوذرات کیتوزان حاوی کورکومین، پتانسیل زتا و همچنین بار نانوذره توسط دستگاه زتا آنالیز (DLS) تعیین و جهت اثبات شکل و اندازه نانوذره از میکروسکوپ الکترونی (TEM) استفاده شد. در مرحله پایانی میزان اثربخشی نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با کورکومین بر دو گونه لیشمانیا ماژور و اینفانتوم تعیین گردید. بدین منظور دو گونه لیشمانیای مورد مطالعه، در محیط کشت RPMI 1640 حاوی سرم جنین گاوی ۱۵٪ در پلیت‌های ۴۸ خانه‌ای کشت داده شد و به هر چاهک پلیت، غلظت‌های مختلف نانوذرات کیتوزان حاوی کورکومین (۸۰، ۴۰، ۳۲۰، ۱۶۰ و ۶۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد. تعداد انگل پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت شمارش شد.

نتایج: تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) نشان داد که نانوذاری تهیه شده کروی شکل و اندازه آن 125 ± 5 نانومتر می‌باشد. میزان پتانسیل زتای نانوذره کیتوزان حاوی کورکومین ۹/۳۵- بود. شمارش تعداد انگل نشان داد که نانوذره سنتز شده اثر مطلوبی در ممانعت از رشد لیشمانیا ماژور و اینفانتوم دارد. IC₅₀ نانوذرات مذکور علیه مرحله پروماستیگوتی لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم به ترتیب ۱۳۱/۳ و ۳۶/۴۶ محاسبه گردید.

نتیجه‌گیری: نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با کورکومین دارای اثرات ضدلیشمانیایی است و می‌تواند به صورت درون تنی مورد بررسی قرار گیرد.

واژگان کلیدی: نانوذرات کیتوزان، کورکومین، لیشمانیا ماژور، لیشمانیا اینفانتوم، برون تنی

دو ماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و پنجم، شماره ۴، مهر - آبان ۱۴۰۰، صفحات ۱۰۴۶-۱۰۴۰

مقدمه

زردچوبه با نام علمی *Curcuma longa* گیاهی است که هزاران سال به‌عنوان ادویه و طب دارویی در هند استفاده شده است. به‌تازگی دانشمندان به این نتیجه رسیده‌اند که زردچوبه حاوی ترکیباتی است که خواص دارویی زیادی دارد [۳]. یکی از این مواد، کورکومین است که یک ماده فنولیک زردرنگ طبیعی است و از ریشه گیاه زردچوبه به‌دست می‌آید [۴]. کورکومین خاصیت قوی ضدالتهابی به‌واسطه بلاک NF-KB (فاکتور هسته‌ای) دارد. این مولکول به هسته سلول رفته، عملکرد سلول را به نفع التهاب تغییر می‌دهد و بدین ترتیب نقش اصلی را در بیماری‌های مزمن به‌عهده دارد [۵،۶]. همچنین این ماده به‌واسطه خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی، بدن را در مقابل رادیکال‌های آزاد حفاظت کرده [۷]، باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌های بدن می‌شود [۸،۹]. کورکومین باعث افزایش سطح (Brain derived neurotrophic factor) BDNF می‌شود که یک هورمون رشد است [۱۰] و کاهش آن باعث افسردگی و آلزایمر می‌گردد [۱۱]. از طرف دیگر کورکومین باعث بهبود عملکرد آندوتلیوم پوششی رگ‌های خونی می‌شود [۱۲] و از این راه باعث کاهش بیماری‌های قلبی می‌گردد [۱۳]. از دیگر عملکردهای کورکومین می‌توان به کاهش آنژیوتنژ و متاستاز و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی و همچنین دخالت در مرگ این سلول‌ها اشاره کرد [۱۴]. کورکومین دارای خواص ضد

لیشمانیازیس به طیفی از بیماری‌های انگلی گفته می‌شود که توسط تک‌یاخته‌هایی از جنس لیشمانیا ایجاد می‌شود. داروهای خط اول در درمان لیشمانیوز، ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتیموان (مثل گلوکانتیم) هستند که توکسیک بوده، عوارض جانبی برای بیماران به همراه دارند. علاوه بر این گزارشاتی از بروز مقاومت دارویی نیز در دسترس است. داروهای خط دوم در درمان لیشمانیوز از جمله آمفوتریسی B و داروی جدید میل‌فوسین است که به‌علت در دسترس نبودن، سمیت و هزینه بالایی که بیمار برای تهیه آن‌ها متحمل می‌شود، مقرون به‌صرفه نیستند. بنابراین نیاز مبرم به کشف یا توسعه داروهای جدید و مناسب برای درمان این بیماری است، به‌نحوی که بدون عوارض سوء، در دسترس، قابل استفاده از راه خوراکی و نیز کم‌هزینه باشند [۲،۱].

۱. گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۲. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۳. گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

نشانی نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

تلفن: ۰۹۱۲۳۸۴۰۰۵۲ | دورنویس: ۰۳۱۵۵۴۵۱۱۱۲

پست الکترونیک: mdelavari1@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۷/۱۱ | تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۰/۶/۲

شد تا محلول حاوی نانوذرات کیتوزان بارگذاری شود و با کورکومین به شکل یکنواخت درآید. جهت حذف ناخالصی‌های بزرگ محلول در محیط تاریک به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای اتاق با ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی جهت تغلیظ و استفاده در مرحله بعدی در محیط تاریک نگهداری گردید.

ارزیابی نانوذره کیتوزان حاوی کورکومین از نظر بار و اندازه:

پس از تهیه نانوذرات در غلظت‌های مختلف، به وسیله دستگاه زتا آنالیز (DLS) پتانسیل زتا و همچنین بار نانوذره مورد بررسی قرار گرفت و پس از آن نانوذره مذکور به آزمایشگاه میکروسکوپ الکترونی (TEM) (مرکز متالوژی رازی) جهت تعیین شکل و اندازه نانوذره منتقل گردید. نوع گرید استفاده شده برای نمونه در میکروسکوپ الکترونی (Zeiss - EM10C - 80 KV) در این مطالعه carbon coated grid Cu Mesh 300 Formvar بود. میزان اثربخشی نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با کورکومین بر اساس شمارش تعداد انگل در شرایط برون‌تنی بررسی شد.

کشت انگل و بررسی اثر نانوذرات:

۱۰۰۰ میکرولیتر از محیط کشت RPMI 1640 و سرم جنین گاوی ۱۰٪ حاوی پروماستیگوت لیشمانیا ماژور (۱×۱۰^۶) انگل در هر میلی‌لیتر) در هر چاهک از پلیت‌های ۴۸ خانه‌ای کشت داده شد. نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با کورکومین در غلظت‌های مختلف (۵۰۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به همان مقدار محیط کشت اضافه گردید. ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اضافه کردن دارو، تعداد انگل در هر چاهک در روزهای اول و دوم با استفاده از لام نتوبار شمارش گردید. لازم به ذکر است که تمام آزمایش‌ها سه بار تکرار شد. در هر پلیت سه چاهک که حاوی فقط پروماستیگوت و محیط کشت فاقد نانوذرات بود، به عنوان کنترل آزمون در نظر گرفته شد. جهت تعیین غلظت‌های مناسب مورد استفاده، نیاز به انجام آزمون‌های مقدماتی بود. بدین منظور با استفاده از نتایج به دست آمده، میزان IC₅₀ نانوذرات محاسبه گردید. لازم به ذکر است که تمامی مراحل بالا برای انگل لیشمانیا اینفانتوم نیز انجام شد.

آنالیز آماری:

میزان IC₅₀ (میزان ۵۰ درصد کشتندگی انگلی) با استفاده از نرم‌افزار Graph Pad محاسبه گردید. یافته‌های حاصل با استفاده از آزمون ANOVA، T-Test و Scheffe Test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

مالاریایی [۱۵، ۱۶] و ضد کریپتوسپوریدیومی [۱۷] و ضدباکتریایی [۱۸] است و باعث تعدیل سیستم ایمنی میزبان می‌شود. از نظر ساختاری کیتوزان زنجیره‌ای خطی از واحدهای تصادفی N-استیل، D-گلوکزآمین است که توسط پیوندهای گلیکوزیدی (β-1,4) به هم متصل شده‌اند. کیتوزان شامل گروه‌های آمین در کربن C2 پس از استیل‌زدایی در ساختار کیتین است. در واقع زمانی که درجه داستیلاسیون در کیتین بیشتر از ۶۰ تا ۷۰ درصد باشد، آن را کیتوزان می‌نامند [۱۹]. مطالعات نشان داده که کیتوزان سبب تقویت دستگاه ایمنی در گیاهان و حیوانات [۲۰]، کاهش‌دهنده کلسترول و ترمیم‌کننده زخم‌ها می‌باشد. کیتوزان به علت دارابودن بار مثبت و قدرت اتصال به سطوح دارای بار منفی و همچنین سادگی در ایجاد تغییرات سطحی جهت انتقال دارو و ژن به سلول‌های هدف به کار می‌رود [۲۱]. باتوجه به این ویژگی‌ها، کیتوزان یک نامزد مناسب جهت ساخت نانو سامانه‌های رهاسازی دارو است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات آنتی‌لیشمانیایی نانوذرات کیتوزان حاوی کورکومین بر لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم است.

مواد و روش‌ها

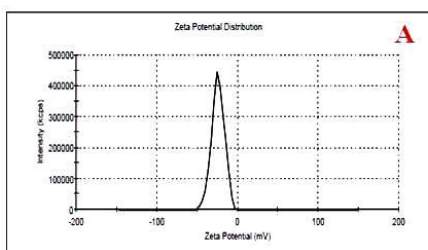
این مطالعه تجربی دارای کد اخلاق (IR.KAUMS.MEDNT.REC.1397.002) از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کاشان می‌باشد. ساخت استوک کیتوزان:

جهت ساخت استوک کیتوزان، یک میلی‌گرم از کیتوزان در یک میلی‌لیتر آب مقطر اسیدی PH=۵ با ورتکس شدید حل شد. همچنین یک میلی‌گرم از نمک تری‌پلی‌فسفات در یک میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر حل گردید. استوک تهیه شده در فویل آلومینیومی پیچیده و تا زمان استفاده در یخچال با دمای ۴- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. ساخت نانوذرات کیتوزان حاوی کورکومین:

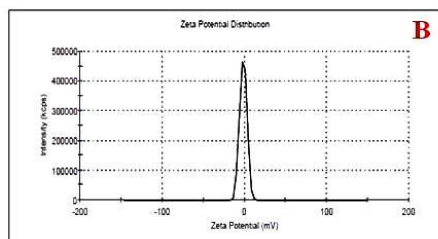
ابتدا استوک کورکومین آب گردید و به دمای محیط رسانده شد. هر میلی‌لیتر محلول کورکومین در دی‌متیل‌سولفوکساید با استفاده از ۵ میکرولیتر توتین ۸۰ به شکل امولسیفیه درمی‌آید و درحالی‌که در محیط تاریک مگنت در یک بشر ۱۰ میلی‌لیتری بر روی همزن برقی ۵۰۰ دور در دقیقه (RPM) در حال هم‌خوردن است، ۱ میلی‌لیتر آب مقطر به بشر اضافه و سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول استوک کیتوزان قطره‌قطره به آن افزوده شد. در مرحله بعد محلول امولسیفیه کورکومین قطره‌قطره به محلول درحال هم‌خوردن کیتوزان اضافه گردید. سپس نمک تری‌پلی‌فسفات به تدریج به محلول شفاف کیتوزان و کورکومین اضافه و ۴۵ دقیقه فرصت داده

مثبت‌تر (۱/۶۱-) از بار سطحی کیتوزان می‌باشد، بر روی سطح نانوذرات کیتوزان متصل می‌گردد. بار سطحی نانوذرات کیتوزان حاوی کورکومین ۹/۳۵- محاسبه شد.

| | Mean (mV) | Area (%) | Width (mV) |
|------------------------------|---------------|----------|------------|
| Zeta Potential (mV): -24.4 | Peak 1: -24.4 | 100.0 | 7.97 |
| Zeta Deviation (mV): 7.97 | Peak 2: 0.00 | 0.0 | 0.00 |
| Conductivity (mS/cm): 0.0508 | Peak 3: 0.00 | 0.0 | 0.00 |

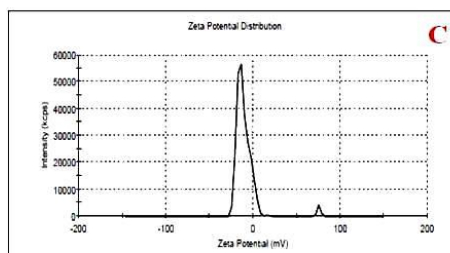


| | Mean (mV) | Area (%) | Width (mV) |
|------------------------------|---------------|----------|------------|
| Zeta Potential (mV): -1.61 | Peak 1: -1.61 | 100.0 | 4.41 |
| Zeta Deviation (mV): 4.41 | Peak 2: 0.00 | 0.0 | 0.00 |
| Conductivity (mS/cm): 0.0313 | Peak 3: 0.00 | 0.0 | 0.00 |



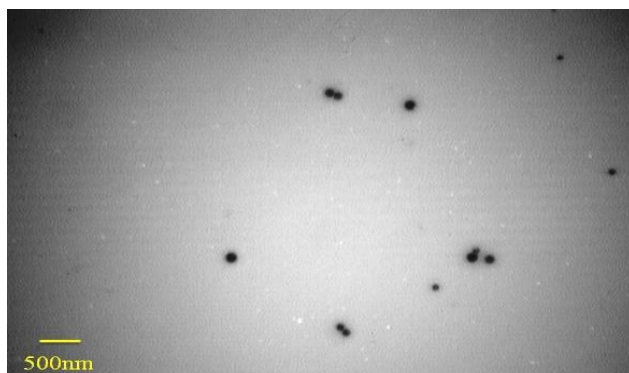
برای ارزیابی اندازه کورکومین بارگذاری شده در نانوذرات کیتوزان، میزان پتانسیل زتای نانوذره تهیه شد و بارگذاری با استفاده از دستگاه زتا آنالایزر مورد سنجش قرار گرفت که نتایج در شکل شماره ۱ ارائه شده است. کیتوزان دارای پتانسیل زتای منفی (۲۴/۴-) است و کورکومین به دلیل این که بار سطحی آن

| | Mean (mV) | Area (%) | Width (mV) |
|-----------------------------|---------------|----------|------------|
| Zeta Potential (mV): -9.35 | Peak 1: -11.4 | 97.7 | 6.93 |
| Zeta Deviation (mV): 14.6 | Peak 2: 75.4 | 2.2 | 1.81 |
| Conductivity (mS/cm): 0.297 | Peak 3: 19.7 | 0.1 | 0.00 |



A: Chitosan
B: Curcumin
C: CC-NPs

شکل شماره ۱- پتانسیل زتا کیتوزان، کورکومین و کورکومین بارگذاری شده در نانوذرات کیتوزان. کیتوزان دارای پتانسیل زتای منفی است و کورکومین با داشتن بار سطحی مثبت‌تر نسبت به کیتوزان بر روی سطح نانوذرات کیتوزان متصل می‌گردد.



شکل شماره ۲- ارزیابی شکل کورکومین بارگذاری شده در نانوذرات کیتوزان. تصویر به خوبی نشان می‌دهد که نانوذرات ساخته شده دارای شکل کروی است.

استفاده از T-Test درصد کشندگی بین زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت تفاوت معنی‌داری وجود ندارد؛ همچنین براساس تست آنالیز واریانس یک‌طرفه میزان کشندگی در غلظت‌های مختلف تفاوت معنی‌داری را با هم داشته‌اند. برای آگاهی از این‌که تفاوت مشخص‌شده مربوط به کدام گروه‌ها است، از تست تعقیب شفه استفاده شد که نتایج گویای آن است در مورد لیشمانیا ماژور غلظت ۴۰ با غلظت ۶۴۰ به‌صورت معنی‌داری متفاوت است و بقیه دوزها با هم تفاوت معنی‌داری نداشته‌اند (جدول شماره ۱). در مورد لیشمانیا اینفانتوم غلظت ۴۰ به‌جز با غلظت ۸۰، با بقیه غلظت‌ها تفاوت معنی‌داری داشته است، همچنین غلظت ۸۰ با غلظت‌های ۳۲۰ و ۶۴۰ و نیز غلظت ۱۶۰ با ۶۴۰ تفاوت معنی‌داری داشته است (جدول شماره ۲).

برای ارزیابی شکل کورکومین بارگذاری‌شده در نانوذرات کیتوزان با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) نشان داده شد که این نانودارو به شکل کروی و اندازه آن 125 ± 5 نانومتر می‌باشد (شکل شماره ۲). برای بررسی زنده‌بودن پروماستیگوت‌های لیشمانیا ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از کشت انگل، تعداد پروماستیگوت‌ها در مقایسه با کنترل منفی شمارش شد. نتایج نشان داد که نانوذرات کیتوزان بارگذاری‌شده با کورکومین اثر کشندگی علیه پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم دارد. بیشترین درصد کشندگی ۲۴ ساعت پس از تیمار انگل در لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم به‌ترتیب با ۸۳/۴۹ درصد و ۹۱/۵ درصد محاسبه شد (جدول شماره ۱). همچنین IC_{50} نانوذرات مذکور علیه مرحله پروماستیگوتی لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم به‌ترتیب ۱۳۱/۳ و ۳۶/۴۶ تعیین گردید. براساس نتایج آنالیز با

جدول شماره ۱- درصد کشندگی نانوذرات کیتوزان بارگذاری‌شده با کورکومین بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور

| درصد کشندگی (میانگین و انحراف معیار) | | نانوذرات کیتوزان بارگذاری‌شده با کورکومین (میکروگرم بر میلی‌لیتر) |
|--------------------------------------|-----------------|--|
| ۴۸ ساعت | ۲۴ ساعت | |
| $32/59 \pm 0/5$ | $16/64 \pm 0/8$ | ۴۰ |
| $59/37 \pm 0/6$ | $38/78 \pm 0/5$ | ۸۰ |
| $82/39 \pm 0/4$ | $53/78 \pm 0/6$ | ۱۶۰ |
| $93/85 \pm 0/6$ | $76/89 \pm 0/7$ | ۳۲۰ |
| $97/37 \pm 0/3$ | $83/49 \pm 0/4$ | ۶۴۰ |

جدول شماره ۲- درصد کشندگی نانوذرات کیتوزان بارگذاری‌شده با کورکومین بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا اینفانتوم

| درصد کشندگی (میانگین و انحراف معیار) | | نانوذرات کیتوزان بارگذاری‌شده با کورکومین (میکروگرم بر میلی‌لیتر) |
|--------------------------------------|-----------------|--|
| ۴۸ ساعت | ۲۴ ساعت | |
| $57/77 \pm 0/7$ | $60/37 \pm 0/6$ | ۴۰ |
| $66/66 \pm 0/2$ | $67/92 \pm 0/7$ | ۸۰ |
| $76/22 \pm 0/4$ | $75/09 \pm 0/7$ | ۱۶۰ |
| $86/22 \pm 0/8$ | $81/88 \pm 0/5$ | ۳۲۰ |
| $95/33 \pm 0/3$ | $91/5 \pm 0/8$ | ۶۴۰ |

علیه لیشمانیا ماژور ۳۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد که در مقایسه با نتایج تحقیق حاضر از عدد بالاتری برخوردار است و نشان می‌دهد که نانوذرات روی اثر کشندگی بیشتری نسبت به نانوذرات کیتوزان حاوی کورکومین علیه لیشمانیا ماژور دارند. این مطالعه نشان داد که نانوذرات روی باعث القای آپوپتوز در لیشمانیا ماژور می‌شود [۲۲]. نتایج مطالعه‌ای دیگر در سال ۱۳۹۰ نشان داد که نانوذرات طلا تعداد آماسیتیگوت لیشمانیا ماژور را در زخم لیشمانیایی کاهش می‌دهند [۲۳]. همچنین یک مطالعه در سال ۱۳۸۸

بحث

با پیشرفت تکنولوژی در سال‌های اخیر، استفاده از علوم نانو در رشته‌های مختلف و به‌ویژه پزشکی گسترش یافته است. نانوذرات کیتوزان بارگذاری‌شده با کورکومین یکی از این مواد است. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذره کیتوزان - کورکومین فعالیت ضدلشمانیایی وابسته‌به‌دوز دارد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده IC_{50} نانوذرات مذکور علیه مرحله پروماستیگوتی لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم به ترتیب ۱۳۱/۳ و ۳۶/۴۶ تعیین شد. در مطالعه مشابهی، در سال ۱۳۹۳ IC_{50} نانوذرات روی (Zn)

به DNA را از طریق فعال کردن عامل رونویسی P53 و بیان ژن‌های پروآپوپتوزی موجب می‌شود [۲۹]. کیتوزان به دلیل وجود گروه‌های آمین آزاد در طول زنجیره پلیمر و توانایی تشکیل کیتین و حلالیت خوب در اسیدهای ضعیفی چون اسیداستیک، جایگاه مناسبی را در بین پلی‌ساکاریدها به خود اختصاص داده است. حلالیت کیتوزان در اسیدهای ضعیف، به دلیل وجود گروه‌های آمین نوع اول، بهترین توجیه برای محبوبیت آن نسبت به کیتین می‌باشد که این توانایی باعث شده است که کیتوزان به عنوان یک حامل مناسب دارویی جهت حمل و تحویل ترکیبات دارویی به سلول‌های هدف شناخته شود [۳۰].

نتیجه‌گیری

نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با کورکومین بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور و اینفانتوم اثر مطلوبی دارد، با توجه به شیوع بیماری لیشمانیازیس انجام مطالعات بیشتر در شناسایی مکانیسم اثر این ترکیب و نیز مطالعات درون‌تنی می‌تواند در معرفی ترکیبی مناسب جهت درمان لیشمانیازیس مفید باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی دانشجویی انجام شده است و نویسندگان از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کاشان به خاطر تأمین منابع مالی طرح (طرح تحقیقاتی شماره 97002) صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

- [1] Moore E M, Lockwood D N. Treatment of Visceral Leishmaniasis. *J Glob Infect Dis* 2010; 2(2):151-8.
- [2] Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother* 2004;10(6):307-15.
- [3] Nagpal M, Sood S. Role of curcumin in systemic and oral health: An overview. *J Nat Sc Biol Med* 2013;4(1):3.
- [4] Said D, Elsamad L, Gohar Y. Validity of silver, chitosan, and curcumin nanoparticles as anti-Giardia agents. *J Parasitol Res* 2012;111(2):545-54.
- [5] Singh S, Aggarwal BB. Activation of transcription factor NF-κB is suppressed by curcumin (diferuloylmethane). *J Biol Chem*. 1995;270(42):24995-5000.
- [6] Marín YE, Wall BA, Wang S, Namkoong J, Martino JJ, Suh J, et al. Curcumin downregulates the constitutive activity of NF-κB and induces

تأثیر نانوذرات نقره بر زخم لیشمانیایی را بررسی کرد و نتایج آن نشان داد که نانوذرات نقره تعداد آماستیگوت لیشمانیا ماژور را در زخم کاهش می‌دهند، اما اختلاف تعداد آماستیگوت و نیز قطر زخم‌ها در گروه‌های آزمایش و کنترل معنی‌دار گزارش نشده است [۲۴]. اثرات نانوذرات سلنیوم بر لیشمانیا اینفانتوم توسط سفلائی و همکاران در سال ۱۳۹۱ مورد بررسی قرار گرفت و میزان IC₅₀ این نانوذرات علیه آماستیگوت و پروماستیگوت لیشمانیا اینفانتوم به ترتیب ۱۰ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد؛ مقایسه نتایج مطالعه سفلائی با مطالعه حاضر نشان داد که اثر ضدلیشمانیایی (علیه لیشمانیا اینفانتوم) نانوذرات سلنیوم نسبت به نانوذرات کیتوزان حاوی کورکومین بیشتر است [۲۵]. در مطالعه‌ای که توسط Koide و همکاران در سال ۱۳۸۱ با هدف بررسی اثرات ضدلیشمانیایی کورکومین بر لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت، LD₅₀ کورکومین علیه لیشمانیا ماژور ۳۷/۶ میکرومولار محاسبه شد [۲۶]. در مطالعه صالحین و همکاران در سال ۱۳۸۱ اثر کورکومین علیه پروماستیگوت‌های سه گونه لیشمانیا ماژور، تروپیکا و اینفانتوم مورد بررسی قرار گرفت و IC₅₀ کورکومین علیه هر سه گونه به‌طور میانگین ۳/۵ میکرومولار تعیین شد [۲۷]. در مطالعه Rasmussen و همکاران در سال ۱۳۸۰ IC₅₀ ترکیبات کورکومینوئیدی علیه لیشمانیا ماژور بین ۷/۸ تا ۲۱/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد [۲۸]. کورکومین با فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی خود موجب مهار سنتز رادیکال‌های آزاد و غیرفعال کردن و پاک‌سازی آن‌ها می‌شود و همچنین در مسیر میتوکندریایی، استرس‌های سلولی مانند آسیب

- apoptosis in novel mouse melanoma cells. *Melanoma Res* 2007;17(5):274-83.
- [7] Menon VP, Sudheer AR. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease: 4th ed *Springer*; 2007. p. 105-25.
 - [8] Bulmuş FG, Sakin F, Türk G, Sönmez M, Servi K. Protective effects of curcumin on antioxidant status, body weight gain, and reproductive parameters in male rats exposed to subchronic 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Environ Chem* 2013;95(6):1019-29.
 - [9] Agarwal R, Goel SK, Behari JR. Detoxification and antioxidant effects of curcumin in rats experimentally exposed to mercury. *J Appl Toxicol* 2010;30(5):457-68.
 - [10] Schaaf C, Shan B, Buchfelder M, Losa M, Kreutzer J, Rachinger W et al. Curcumin acts as anti-tumorigenic and hormone-suppressive agent in murine and human pituitary tumour cells in

- vitro and in vivo. *Endocr Relat Cancer* 2009; 16: 1339–1350.
- [11] Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, Koike K, Komatsu N, Kumakiri C, et al. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol. Psychiatry* 2003;54(1):70-5.
- [12] Akazawa N, Choi Y, Miyaki A, Tanabe Y, Sugawara J, Ajisaka R, et al. Curcumin ingestion and exercise training improve vascular endothelial function in postmenopausal women. *Nutr Res* 2012;32(10):795-9.
- [13] Wongcharoen W, Phrommintikul A. The protective role of curcumin in cardiovascular diseases. *Int J Cardiol* 2009;133(2):145-51.
- [14] Ravindran J, Prasad S, Aggarwal BB. Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively? *AAPS journal* 2009;11(3):495-510.
- [15] Mishra K, Dash AP, Swain BK, Dey N. Antimalarial activities of *Andrographis paniculata* and *Hedyotis corymbosa* extracts and their combination with curcumin. *Malaria Journal* 2009;8(1):26.
- [16] Fouladvand M, Barazesh A, Tahmasebi R. Evaluation of in vitro antileishmanial activity of curcumin and its derivatives "gallium curcumin, indium curcumin and diacetylene curcumin". *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013;17(24):3306-8.
- [17] Shahiduzzaman M, Dyachenko V, Khalafalla R, Desouky A, Dausgchies A. Effects of curcumin on *Cryptosporidium parvum* in vitro. *J Parasitol Res* 2009;105(4):1155-61.
- [18] Ansari E, Issazadeh K, Shoaie HA. A study to investigate antibacterial effect of Nanocurcumin against pre-clinical methicillin resistant staphylococcus aureus infection. *J Microbial World* 2014; 7(1):26-37.
- [19] Sarvaiya J, Agrawal Y. Chitosan as a suitable nanocarrier material for anti-Alzheimer drug delivery. *Int J Biol Macromol* 2015;72:454-65.
- [20] Dang Y, Li S, Wang W, Wang S, Zou M, Guo Y, et al. The effects of chitosan oligosaccharide on the activation of murine spleen CD11c⁺ dendritic cells via Toll-like receptor 4. *Carbohydr Polym* 2011;83(3):1075-81.
- [21] Klippstein R, Pozo D. Nanotechnology-based manipulation of dendritic cells forenhanced immunotherapy strategies. *Nanomedicine* 2010;6(4):523-9.
- [22] Delavari M, Dalimi A, Ghaffarifar F, Sadraei J. In Vitro Study on Cytotoxic Effects of ZnO Nanoparticles on Promastigote and Amastigote Forms of *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER). *Iran J Parasitol* 2014; 9(1): 6–13.
- [23] Torabi N, Mohebbali M, Shahverdi AR, Rezayat SM, Edrissian GH, Esmaeili J, et al. Nanogold for the treatment of zoonotic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER): an animal trial with methanol extract of *Eucalyptus camaldulensis*. *J Pharm Sci* 2011:113–116.
- [24] Mohebbali M, Rezayat MM, Gilani K, Sarkar S, Akhouni B, Esmaeili J, et al. Nanosilver in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER): an in vitro and in vivo study. *Daru* 2009;17(4):285–289
- [25] Soflaei N, Dalimi A, Abdoli A, Kamali M, Nasiri V, Shakibaie M, et al. Anti-leishmanial activities of selenium nanoparticles and selenium dioxide on *Leishmania infantum*. *Comp Clin Pathol* 2012;23(1):15–20.
- [26] Koide T, Nose M, Ogihara Y, Yabu Y, Ohta N. Leishmanicidal effect of curcumin in vitro. *Biol Pharm Bull* 2002; 25(1): 131-3.
- [27] Saleheen D, Ali SA, Ashfaq K, Siddiqui AA, Agha A, Yasinzaï MM. Latent activity of curcumin against leishmaniasis in vitro. *Biol Pharm Bull* 2002; 25(3): 386-9.
- [28] 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.
- [29] Kamali E, Ghaderi K, Karimi P, Kheradmand P, Tavassoli A M. Biological and Anticancer Effects of Curcumin. *J Isfahan Med Sch* 2014;2097-2112.
- [30] Kavaz D, Odabaş S, Güven E, Demirbilek M, Denkbaş EB. Bleomycin loaded magnetic chitosan nanoparticles as multifunctional nanocarriers. *J Bioact Compat Pol* 2010;25(3):305-318.