

فعالیت آنتی‌لیشمانیایی نانولیپوزوم‌های حاوی کورکومین به صورت درون‌تن و برون‌تن

زمینه و هدف: کورکومین، دارای اثرات فارماکولوژیکی مختلفی شامل اثرات ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدان، ضدتکثیر و آنتی‌آنژیوژن می‌باشد. هدف از این مطالعه، تهیه‌ی فرمولاسیون‌های لیپوزومی حاوی کورکومین و بررسی اثرات ضدلیشمانیایی آن در مصرف موضعی در مقابل انگل *L. major* در محیط برون‌تن و درون‌تن می‌باشد.

روش اجرا: نانو لیپوزوم‌های حاوی غلظت‌های مختلف کورکومین (۱، ۲ و ۳ درصد) به روش فیوژن تهیه شدند و اندازه‌ی ذره‌ای، مورفولوژی و پایداری آن‌ها بررسی شد. ابتدا در مطالعات برون‌تنی، اثربخشی دارو بر روی کشت سلولی آماستیگوت و پروماستیگوت‌های انگل *L. major* ارزیابی شد. سپس اثر دارو در مطالعات درون‌تنی روی موش‌های BALB/c آلوده به *L. major* مورد بررسی قرار گرفت. در بخش مطالعات درون‌تن، ۴ هفته پس از تزریق انگل به حیوان، درمان به مدت ۴ هفته به صورت تجویز موضعی روزی ۲ بار بر روی زخم‌ها انجام گرفت. در طول این مدت و ۴ هفته پس از قطع درمان، هر هفته اندازه‌ی زخم‌ها گرفته شد. میزان آلودگی طحال به انگل لیشمانیا هفته ۴ پس از تلقیح انگل بررسی گردید.

یافته‌ها: کورومین اثر لیشمانیاسیدال علیه پروماستیگوت‌های زنده و آماستیگوت‌ها در محیط کشت نداشت. تفاوت قابل توجهی بین حیوانات درمان شده و کنترل در ساینز ضایعه و بار انگلی طحال دیده نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که نانولیپوزوم‌های کورکومین به صورت موضعی اثرات سمی بر روی لیشمانیا به صورت درون‌تن و برون‌تن ندارند.

کلیدواژه‌ها: کورکومین، لیشمانیازیس، *L. major*، لیپوزوم

دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۱۰/۲۳ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۱۱/۰۸

پوست و زیبایی؛ زمستان ۱۳۹۶، دوره ۸ (۴): ۲۱۷-۲۰۴

دکتر مرتضی اکبری^۱

انیس عسکری زاده^۱

دکتر کیوان صدقی^۲

دکتر مهرداد ایرانشاهی^۳

دکتر محمودرضا جعفری^{۱،۳،۴}

دکتر علی خامسی پور^۵

دکتر علی بدیعی^{۱،۴}

۱. مرکز تحقیقات نانوفناوری دارویی، پژوهشکده‌ی فناوری‌های نوین دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۲. مرکز تحقیقات پزشکی هسته‌ای، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۳. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، پژوهشکده‌ی فناوری‌های نوین دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۴. گروه نانوفناوری دارویی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۵. مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جدام، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

نویسنده‌ی مسئول:

دکتر علی بدیعی

مشهد، بلوار وکیل‌آباد، پردیس دانشگاه فردوسی، گروه نانوفناوری دارویی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
پست الکترونیک:
badieea@mums.ac.ir

تعارض منافع: اعلام نشده است.

به‌وسیله‌ی گونه‌های متنوعی از انگل لیشمانیا ایجاد می‌شود. این بیماری در بسیاری از کشورها، یک بیماری اندمیک محسوب می‌شود.^۱ اگرچه لیشمانیوز

مقدمه

بیماری لیشمانیوز تظاهرات بالینی مختلفی دارد و

محیط برون تن نشان داده است^{۱۳،۱۴}. لیپوزوم‌ها سیستم کلوئیدی، متشکل از فسفولیپید و کلسترول هستند^{۱۵}. مولکول‌های فسفولیپیدی، ساختارهای دولایه‌ای را تشکیل می‌دهند که مولکول‌های محلول در آب در بخش داخلی آن و مولکول‌های نامحلول در آب در بخش دو لایه‌ی آن به دام می‌افتند. در فرمولاسیون و اندازه‌ی مناسب، لیپوزوم‌ها دارورسانی به پوست را براساس شباهت ساختار دولایه‌ی وزیکول‌های لیپیدی با غشای طبیعی انجام می‌دهند و این امر منجر به هدف قرار دادن ماکروفاژهای لایه‌ی درم می‌شود^{۱۶-۱۸}. فرمولاسیون‌های لیپوزومی در مقایسه با فرمولاسیون‌های معمولی افزایش نفوذ دارو درون پوست را نشان می‌دهند. علاوه بر این، لیپوزوم‌ها امکان دارورسانی موضعی هدفمند و آهسته رهش را فراهم می‌کنند. چندین فرمولاسیون لیپوزومی نیز برای درمان لیشمانیا گزارش شده است. در مطالعات انجام‌شده، فرمولاسیون لیپوزومی داروهایی مانند پاراموایسین، آمفوتریسین B و آنتیموان بررسی شده‌اند^{۱۹-۲۲}.

در تحقیق حاضر، فرمولاسیون‌های لیپوزومی حاوی غلظت‌های مختلف کورکومین تهیه شدند. کارایی برون تن شکل لیپوزومی کورکومین در مقابل پروماستیگوت و آماستیگوت‌های *L. major* مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس، اثر سمیت فرمولاسیون‌های بهینه، علیه لیشمانیا در موش‌های BALB/c آلوده به انگل لیشمانیا ماژور بررسی شد.

روش اجرا

حیوانات و انگل‌ها

در این مطالعه، موش‌های BALB/c ۴ تا ۸ هفته‌ای از انستیتو پاستور ایران واحد کرج خریداری گردید. موش‌ها در دمای ۲۵-۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند و از نظر آب و غذا محدودیتی نداشتند.

جلدی (Cutaneous Leishmaniasis) یک بیماری خودمحدودشونده است، اما بهبود زخم به زمانی طولانی نیاز دارد و حتی زمان بهبودی گاهی بیش از دو سال نیز گزارش شده است^۲. آنتی‌موان ۵ ظرفیتی، که هنوز خط اول درمان CL می‌باشد، به تزریق‌های مکرر نیاز دارد و دردناک است؛ بنابراین توسط اکثر بیماران قابل تحمل نیست و همیشه مؤثر نمی‌باشد. علاوه بر این، مقاومت به آنتی‌موان ۵ ظرفیتی نیز گزارش شده است^{۳-۵}.

کورکومین به رنگ زرد - نارنجی، کورکومینوئید اصلی گیاه کورکومالانگا است. کورکومین (دی‌فرولوئیل متان)، یک ترکیب پلی‌فنولی و از مشتقات زردچوبه می‌باشد. کورکومین برای اولین بار در سال ۱۸۱۵ جدا شد و شکل کریستاله‌ی آن در سال ۱۸۷۰ به دست آمد^{۶،۷}. در سال ۱۹۱۰ ساختمان شیمیایی کورکومین شناسایی شد^۸. فاز I کارآزمایی بالینی نشان داده است که کورکومین، حتی در دوزهای بالا (۱۲ g/day) در انسان بی‌ضرر است. کورکومین سال‌های زیادی است که در آسیای جنوبی در درمان یکسری از بیماری‌ها به‌کار می‌رود و در حدود دو هزار سال است که این ترکیب در پزشکی استفاده می‌شود. در گذشته، کورکومین برای درمان بیماری‌هایی مانند مشکلات تنفسی، روماتیسم، بیماری‌های کبدی و سرطان به‌کار می‌رفت^۹. این ترکیب به‌عنوان عامل ضدتومور مؤثر که دارای خصوصیات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدان می‌باشد، شناخته شده است و باعث القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود^{۱۰،۱۱}. کورکومین هم‌چنین یک مهارکننده‌ی قوی فاکتورهای رونویسی نظیر AP-1، VSTAT و NF-KB می‌باشد^{۱۱}. کورکومین فعالیت (PKC) TPA-induced Protein kinase C را مهار می‌کند^۴. علاوه بر این، کورکومین، فعالیت آنتی‌باکتریال، ضدقارچی و آنتی‌تریپانوزوما را نشان داده‌است^{۱۲}. دو مطالعه نیز، فعالیت کورکومین را در مقابل پروماستیگوت لیشمانیا ماژور (*L. major*) در

داده شدند و سپس فاز آبی به فاز لیپیدی اضافه گردید و بلافاصله تحت ورتکس شدید قرار گرفت تا لیپوزوم‌های MLV تشکیل شود. سپس به مدت ۱۰ دقیقه مرتب گرم و ورتکس گردید. پس از آن، جهت تهیه‌ی لیپوزوم‌های هموزن و کاهش سایز لیپوزوم‌ها در حدود نانومتر از هموژن‌سایزر (Ultra-Turrax IKA T10, Germany) استفاده شد. بدین ترتیب که هموژنیزاسیون با دور ۳، ۴، ۵، ۶ در دقیقه، هر کدام به ترتیب به مدت ۵، ۲، ۲ دقیقه صورت گرفت. هم‌چنین از روش ذکرشده برای تهیه‌ی لیپوزوم‌های خالی به‌عنوان شاهد، استفاده شد، با این تفاوت که کورکومین از فرمولاسیون حذف گردید. فرمولاسیون غیرلیپوزومی کورکومین از طریق حل کردن کورکومین به مقدار ۳٪ در DMSO و اضافه‌شدن به کلد کرم تهیه گردید.

تعیین خصوصیات فیزیکوشیمیایی لیپوزوم

اندازه‌ی ذره‌ای لیپوزوم‌ها با روش dynamic light scattering و با استفاده از دستگاه (Nanoseries 3000 HS; Particle Size Analyzer (Malvern Instruments Ltd., UK) اندازه‌گیری شد. برای تعیین درصد انکپسولاسیون، مقدار مشخصی از فرم لیپوزومال کورکومین (۱۰۰ mg) با ۱۰ میلی‌لیتر بافر HEPES رقیق شد و در کیسه‌ی دیالیز با cut off 12000 Da ریخته شد. سپس کیسه‌ی دیالیز حاوی نمونه، داخل ۱۰۰ میلی‌لیتر از بافر HEPES قرار گرفته و به مدت ۳۶ ساعت به آرامی تکان داده شد تا عمل دیالیز صورت گیرد. ضمناً طی این مدت، محیط هر ۱۲ ساعت یکبار با بافر تازه جایگزین شد. بعد از طی این مدت زمان، محتویات داخل کیسه‌ی دیالیز استخراج شد و به آن‌ها متانول اضافه شد تا عمل لیز لیپوزوم‌ها صورت گیرد. برای تعیین مقدار کورکومین آزادشده از لیپوزوم پس از تجزیه‌ی لیپوزوم‌ها، جذب نوری محلول لیزشده‌ی حاصل در ۴۲۵ nm خوانده شد و با قراردادن جذب حاصل در معادله‌ی به‌دست‌آمده از

انگل لیشمانیا ماژور سوبه MRHO/IR/75/ER از مرکز تحقیقات و آموزش بیماری‌های پوست و جذام دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شد و تا زمان استفاده در موش BALB/c نگهداری گردید. سپس جهت تکثیر، آماستیگوت‌های گرفته‌شده از طحال موش‌های آلوده، ابتدا در محیط آگار خون دار (N.N.N) کشت داده شد. بعد از رشد انگل و اطمینان از عدم آلودگی کشت‌ها، انگل‌ها به محیط کشت RPMI 1460 حاوی ۱۰ درصد IU/ml 100 و FBS (Fetal Bovine Serum) پنی‌سیلین انتقال داده شدند.

مواد شیمیایی

فسفاتیدیل کولین سویا (Soya Phosphatidyl Choline) و کلسترول از شرکت Avanti polar lipid و کورکومین از شرکت EPO s.r.l (ایتالیا) تهیه شدند. پروپیل پاراپن (PP)، متیل پارابن (MP)، پروپیلن گلیکول (PG) و بافر HEPES از سیگما (آمریکا) خریداری شدند. ویتامین E، Alamar blue، اولئیک اسید (OA)، تری‌تانول آمین (TEA) و دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) از Merck (آلمان) و محیط کشت RPMI-1640 از Himedia (هند) تهیه شدند.

تهیه نانولیپوزوم‌های حاوی کورکومین با استفاده از روش فیوژن

برای تهیه لیپوزوم‌های حاوی کورکومین از روش فیوژن استفاده شد. در این روش، اجزاء لیپیدی شامل فسفاتیدیل کولین سویا (۱۵٪)، کلسترول (۲٪)، ویتامین E (۰٫۳٪)، متیل پاراپن (۰٫۱٪) و پروپیل پارابن (۰٫۰۲٪)، پروپیلن گلیکول (۰٫۷٪)، اولئیک اسید (۰٫۱٪)، دی‌متیل سولفوکسید (۰٫۲٪) و کورکومین (۱، ۲ و ۳ درصد وزنی - وزنی) در درجه‌ی حرارت ۷۰ درجه‌سانتی‌گراد کاملاً ذوب شدند. به‌منظور پراکندگی یکنواخت کورکومین در فرمولاسیون، ابتدا کورکومین در DMSO حل شد. بافر HEPES (10 mM, pH 7.0) و تری‌تانول آمین (۰٫۵٪) به‌صورت جداگانه حرارت

افزوده شد. بدین منظور ابتدا ماکروفاژها به وسیله‌ی لام نئوبار شمارش و در محیط RPMI 1640 طوری پراکنده شدند که ماکروفاژ با غلظت RPMI $50000/400 \mu\text{L}$ به دست آید. سپس اسلایدها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد CO_2 به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند، بدین منظور که ماکروفاژها کاملاً به کف اسلاید بچسبند. سپس، ماکروفاژها به پروماستیگوت‌های *L. major* با نسبت تقریباً ۵ پروماستیگوت به ازای هر ماکروفاژ آلوده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند تا انگل‌ها وارد ماکروفاژها شوند. مقدار اضافی پروماستیگوت‌ها توسط شست‌وشو با PBS (سه مرتبه) از محیط حذف شده و سلول‌های آلوده در محیط کشت تازه RPMI ($400 \mu\text{l}$) به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند تا پروماستیگوت‌های درون ماکروفاژها تبدیل به آماسیتیگوت شوند. سپس، سلول‌ها در معرض غلظت‌های مختلفی (۳، ۱۲، ۲۵، ۵۰ و ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰) میکرومولار برحسب کورکومین) از لیپوزوم‌های حاوی کورکومین قرار گرفتند. از محیط RPMI به‌عنوان بلانک و لیپوزوم خالی به‌عنوان کنترل استفاده شد. از هر نمونه ۳ بار تکرار صورت گرفت. قرارگیری در معرض دارو به مدت ۴۸ ساعت انجام شد. بعد از ۴۸ ساعت ابتدا چاهک‌ها با بافر PBS شست و شو داده شدند سپس با افزودن پنجاه میکرولیتر متانول به هر چاهک، سلول‌ها فیکس شدند. بعد رنگ‌آمیزی به‌وسیله رنگ گیمسا که به نسبت ۱:۱۰ با آب رقیق شده بود، انجام شد. نتیجه با شمارش تعداد آماسیتیگوت‌های هر ماکروفاژ با شمارش تصادفی تعداد ۵۰ ماکروفاژ در هر خانه ارزیابی شد.^{۲۵}

بررسی تأثیر نانولیپوزوم‌های حاوی کورکومین در مدل موشی لیشمانیوز

۴۲ موش BALB/c (سن ۴ تا ۸ هفته)، به‌صورت تصادفی به شش گروه هفت تایی تقسیم شدند.

منحنی استاندارد، غلظت کورکومین در لیپوزوم و در نهایت مقدار کورکومین آزاد شده محاسبه گردید.

بررسی تأثیر نانولیپوزوم‌های حاوی کورکومین بر روی پروماستیگوت‌های *L. major* در کشت سلولی با استفاده از روش آلاماربلو (Alamar blue)

تأثیر فرمولاسیون‌های لیپوزومی بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا، با استفاده از روش alamarBlue® Cell Viability Assay بررسی شد. ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی فرمولاسیون‌های دارویی به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه در غلظت‌های مختلف اضافه شد (۳، ۱۲، ۲۵، ۵۰ و ۱۲۵، ۲۵۰ میکرومولار). سپس، ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی 3×10^6 پروماستیگوت در فاز ساکن، داخل هر چاهک اضافه شد. هر نمونه در پلیت ۹۶ خانه ۳ بار تکرار گذاشته شد. ۲۰ میکرولیتر آلاماربلو (۱۰v/v) به هر چاهک اضافه شد. بعد از اینکه پلیت با فویل آلومینیومی پوشانده شد، پلیت ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، انکوبه شد. سپس پلیت داخل پلاستیک قرار گرفته و به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در انکوباتور ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از طی مدت زمان ذکر شده، ابتدا پلیت به‌صورت چشمی بررسی شد. برای تعیین *Minimum inhibitory concentration (MIC)* بررسی شد و سپس جذب نمونه‌ها توسط دستگاه ELISA (Statfax-2100; Awareness Technology) Reader در طول موج ۶۰۰ nm خوانده شد. همین روش نیز برای فرمولاسیون غیرلیپوزومی کورکومین که از قبل در DMSO حل شده بود، استفاده شد.^{۲۴}

بررسی تأثیر نانولیپوزوم‌های حاوی کورکومین در کشت سلولی با استفاده از ماکروفاژهای آلوده به آماسیتیگوت‌های *L. major*

ماکروفاژهای موشی رده‌ی سلولی J774 A.1 (Pasteur Institute, Iran) با غلظت ۵۰۰۰۰ ماکروفاژ در هر خانه به tissue culture slides هشت خانه‌ای

ترتیب تا ردیف آخر پلیت پاساژ داده شدند. به عبارتی هر بار ۸ مرتبه رقیق شدند. سپس پلیت با چسب مهر و موم شد تا از تبخیر محیط جلوگیری شود. بعد از آن پلیت در انکوباتور ۲۵ درجه ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ روز قرار داده شد. طی مدت انکوباسیون هر ۳ روز پلیت با میکروسکوپ نوری فاز معکوس از نظر وجود انگل‌های متحرک بررسی و چاهک‌های منفی (فاقد انگل متحرک) و چاهک‌های مثبت (دارای انگل متحرک) ثبت گردید. برای محاسبه‌ی تعداد انگل‌ها در هر چاهک، فاکتور رقت آخرین چاهک مثبت (دارای انگل متحرک) برای هر نمونه در نظر گرفته شد. برای نتایج هر حیوان، میانگین و انحراف معیار (SEM) تعیین شد^{۲۶}. برای ارزیابی آماری و تعیین اثر فرآورده‌های لیپوزومی در درمان لیشمانیا پوستی در موش‌های BALB/c آزمون واریانس یک‌طرفه به همراه تست Tukey-kramer انجام شد. $P < 0.05$ به منزله‌ی معنی‌دار بودن اختلاف بین دو گروه در نظر گرفته شد. برای مقایسه‌ی میانگین اندازه‌ی زخم برای هر گروه در هفته‌های مختلف محاسبه و استفاده شد.

یافته‌ها

تعیین خصوصیات فیزیکیوشیمیایی لیپوزوم‌ها

لیپوزوم‌های مورد استفاده در این مطالعه، اندازه‌ی ذره‌ای در حدود ۳۰۰ نانومتر داشتند (جدول ۱). مقدار Z-average و polydispersity مربوط به لیپوزوم‌های گروه شاهد، کمتر از لیپوزوم‌های حاوی ۱، ۲ یا ۳

5×10^6 پروماستیگوت *L. major* به قاعده‌ی دم هر موش، به صورت زیرجلدی تزریق شد^{۲۷، ۲۸}. ۴ هفته پس از تزریق و ایجاد زخم، به مدت ۲۸ روز، به میزان mg ۱۰۰ از فرآورده‌ی دارویی در قاعده‌ی دم، روزی ۲ بار استعمال شد. سپس سایز زخم‌ها در قاعده‌ی دم به طور هفتگی با استفاده از کولیس دیجیتالی به مدت ۸ هفته تعیین شد. گروه‌ها شامل PBS (گروه ۱)، لیپوزوم خالی (گروه ۲)، لیپوزوم حاوی ۱ درصد کورکومین (گروه ۳)، لیپوزوم حاوی ۳ درصد کورکومین (گروه ۴)، لیپوزوم حاوی ۳ درصد کورکومین (گروه ۵) و پماد تهیه‌شده از کورکومین آزاد غیرلیپوزومال در پایه‌ی کلدرم به‌عنوان شاهد (گروه ۶) می‌باشند.

بررسی تعداد انگل‌های موجود در طحال موش‌ها بعد از درمان با فرمولاسیون‌های مختلف

تعداد انگل‌های زنده در طحال موش‌ها با روش limiting dilution assay بررسی شد^{۲۸}. موش‌های هشت هفته‌ای بعد از آلوده‌شدن، کشته شدند. طحال‌ها در محیط استریل جداسازی شدند. طحال‌ها پس از توزین توسط ته‌سنگ استریل در پلیت‌های ۲۴ خانه با ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت RPMI-1640 هموژن گردید. به‌جز ردیف اول در تمام چاهک‌ها ۱۸۰ میکرولیتر از RPMI ریخته، سپس از هر سوسپانسیون طحال هموژن شده در ردیف اول ۲۰۰ میکرولیتر ریخته شد (هر کدام از نمونه‌ها ۳ بار تکرار). سپس از هر کدام از این چاهک‌ها ۲۰ میکرولیتر برداشته و به چاهک زیرین ردیف بعدی اضافه گردید و به همین

جدول ۱: اندازه‌ی ذره‌ای فرمولاسیون‌های لیپوزومی حاوی درصدهای مختلف کورکومین

فرمولاسیون	زتا	اندازه‌ی متوسط a (nm)		شدت	شاخص Polydispersity	پتانسیل زتا (mV)
		تعداد	حجم			
Lip-Cur 1%	۲۵۶/۶±۳۹/۹	۱۱۷/۲۵±۱/۳۵	۲۰۴/۲۵±۴/۶۵	۲۱۱/۹۵±۳/۷۵	۰/۴۷±۰/۰۸	-۳۷/۷±۰/۵۱
Lip-Cur 2%	۳۰۰/۳۵±۲۰/۶۵	۱۰۰/۷۴±۱۰/۴۶	۱۸۲/۶±۷۶/۱	۳۳۱/۱۵±۶۹/۰۵	۰/۴۷±۰/۰۲	-۴۲/۱±۴/۲
Lip-Cur 3%	۳۹۲±۴۶/۳	۹۵/۱۴۵±۲۱/۸	۶۲۱/۹±۲۲۶/۴	۲۶۰/۰۳±۱۱۱/۶	۰/۴۷±۰/۰۲	-۳۴/۱±۰/۱۷
Control Lip	۲۰۳/۷±۹/۵	۹۶/۰۷۵±۶/۲	۲۴۵/۳۵±۱۳/۷۵	۲۲۳/۲۵±۸/۶۵	۰/۳۲±۰/۰۵	-۳۵/۷±۰/۳

a: مقادیر به صورت Mean±SD نشان داده شده‌اند (n=۳).

وارد کردن کورکومین در سیستم مائی، بدون ایجاد رسوب، مطلوب به نظر رسید، قراردادن کورکومین درون سیستم لیپوزومی و سپس وارد کردن آن به محیط آبی است. با وجود اینکه با وارد کردن کورکومین به درون لیپوزوم، امکان افزودن کورکومین به محیط مائی، بدون رسوب کردن، فراهم شد اما در نهایت تأثیری مبنی بر سمیت لیپوزوم‌های حاوی کورکومین بر پروماستیگوت‌های *L. major* مشاهده نشد. طبق نتایج به دست آمده در شکل ۱، هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری در جذب نوری بین غلظت‌های مختلف کورکومین در تست سایتوتوکسیسیتی دیده نمی‌شود. لازم به ذکر است غلظت‌های کورکومین تا ۱۰ برابر غلظت‌های نشان داده شده در شکل ۱ هم افزایش داده شد که باز هم تأثیری مبنی بر عدم رشد انگل مشاهده نشد. به دلیل تداخل جذب نوری کورکومین، میزان جذب در این غلظت‌ها خارج از محدوده‌ی منحنی استاندارد بود، لذا نتایج آن ذکر نشده است اما عدم تأثیر کورکومین با توجه به تغییر رنگ معرف Alamar Blue به رنگ قرمز در فرمولاسیون‌های حاوی کورکومین، کاملاً مشهود بود (شکل ۱).

بررسی تأثیر نانولیپوزوم‌های حاوی کورکومین بر روی آماستیگوت‌های *L. major* در مدل *in vitro*

از PBS به‌عنوان شاهد منفی و از داروی آمفوتریسین B به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد. غلظت‌های ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار برحسب کورکومین از فرمولاسیون لیپوزومی مورد بررسی قرار گرفتند. بیشترین درصد سلول‌های غیرآلوده مربوط به شاهد مثبت و کمترین درصد مربوط به لیپوزوم خالی و شاهد منفی می‌باشد. هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های دریافت‌کننده‌ی غلظت‌های مختلف فرمولاسیون لیپوزومی کورکومین و گروه شاهد، در مقابل آماستیگوت‌های *L. major* مشاهده نشد (شکل ۲).

درصدد کورکومین —————
(Lip-cur 1%, Lip-cur 2% or Lip-cur 3%). هیچ‌گونه تغییر معناداری بین لیپوزوم با درصدهای مختلف کورکومین مشاهده نشد. پتانسیل زتا برای همه‌ی فرمولاسیون‌ها، منفی بود و هیچ‌گونه تغییر معناداری بین لیپوزوم‌ها مشاهده نشد. کارایی محصورسازی کورکومین با استفاده از روش مستقیم، اندازه‌گیری شد. با افزایش غلظت کورکومین در فرمولاسیون، کاهش جزئی در درصد محصورسازی مشاهده شد (جدول ۲).

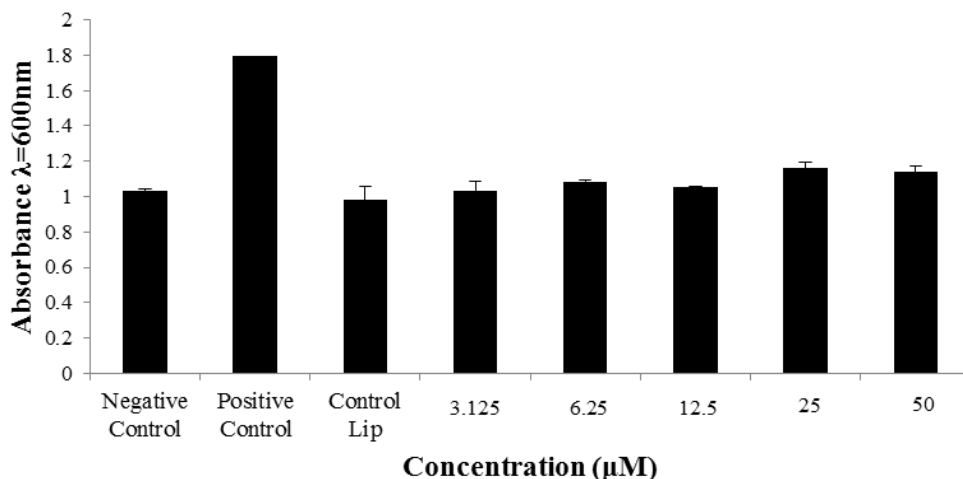
تأثیر فرمولاسیون‌های لیپوزومی و غیرلیپوزومی کورکومین بر روی پروماستیگوت‌های *L. major* در *in vitro*

در ابتدا که آزمایش همانند بعضی مقالات با غلظت نهایی بالای DMSO در محیط کشت به‌منظور انحلال کامل کورکومین انجام شد، مشاهده شد که کورکومین باعث مرگ پروماستیگوت‌های *L. major* می‌شود اما در آزمایشات بعدی که غلظت نهایی DMSO به‌نحوی تنظیم شد که اثرات سلول‌کشی نداشته باشد، مشاهده شد که اگر غلظت DMSO طوری تنظیم شود که در نهایت پایین‌تر از حد سمی برای پروماستیگوت‌های *L. major* باشد، به محض ورود به محیط کشت (که یک سیستم مائی است)، کورکومین (که به‌شدت دارای خاصیت لیپیدی است) رسوب می‌کند؛ بنابراین صحت آزمایشات اولیه که نتایجی مشابه بعضی مقالات داشت زیر سؤال رفت. با توجه به نتیجه‌ی به‌دست‌آمده، تعیین IC50 برای کورکومین آزاد در این مرحله غیرقابل اندازه‌گیری بود. روشی که در این مطالعه جهت

جدول ۲: درصد بارگیری فرمولاسیون‌های لیپوزومی حاوی کورکومین به روش مستقیم.

فرمولاسیون	محصورسازی (درصد)
Lip-Cur 1%	۹۲/۵±۵/۴۱
Lip-Cur 2%	۸۱±۱/۳
Lip-Cur 3%	۷۹±۲/۱۶

مقادیر به‌صورت Mean±SD نشان داده شده‌اند (n=۳).

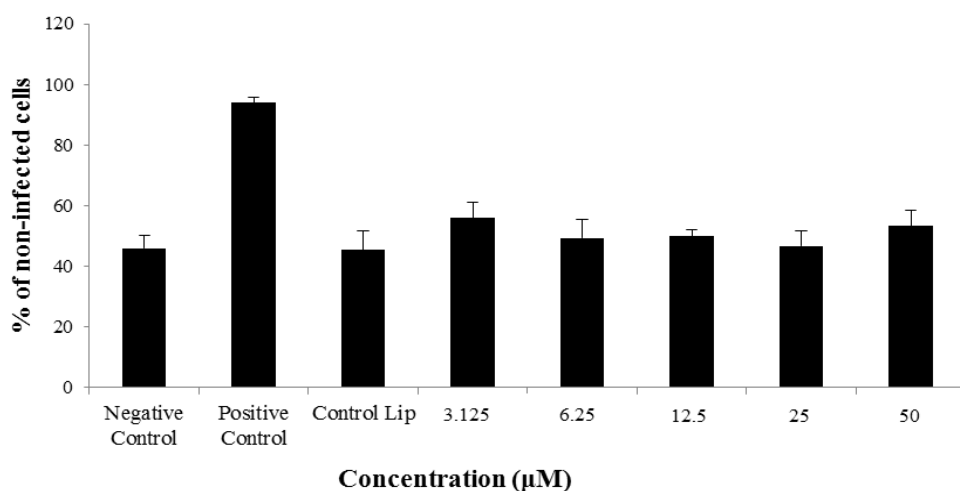


شکل ۱: میانگین جذب نوری تعیین شده برای غلظت‌های مختلف کورکومین لیپوزومی در طول موج ۶۰۰ nm در تست بررسی رشد پروماستیگوت‌ها به روش Alamar Blue.

نتایج مربوط به تعیین اندازه‌ی زخم‌ها طی درمان با فرمولاسیون‌های مختلف پس از آنالیز آماری نشان داد که بعد از درمان ۸ هفته‌ای، تغییر اندازه‌ی زخم‌ها در گروه‌های مختلف درمانی اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد منفی (عدم درمان) نداشت ($P > 0.05$). به عبارت دیگر فرمولاسیون‌های لیپوزومی حاوی کورکومین و هم‌چنین فرم آزاد کورکومین نتوانستند اثر درمانی بر روی زخم ایجاد شده اعمال کنند.

بررسی تأثیر نانولیپوزوم‌های موضعی حاوی کورکومین بر روی اندازه و شدت زخم‌های ایجاد شده در مدل موشی لیشمانیوز

در ابتدای شروع درمان با فرآورده‌های لیپوزومی حاوی کورکومین (۴ هفته پس از تزریق انگل)، زخم حاصل در قاعده‌ی دم موش‌ها، توسط کولیس دیجیتالی اندازه‌گیری شد. نتایج تعیین اندازه‌ی زخم در بین گروه‌های مختلف موشی در ابتدای درمان حاکی از این بود که اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها وجود ندارد.



شکل ۲: میانگین درصد سلول‌های غیرآلوده با آماستیگوت در ۵۰ میکروفاژ برای غلظت‌های مختلف کورکومین در فرمولاسیون لیپوزومی (n=۳).

کاهش یا قطع درمان می‌شود^{۲۹}. اگرچه تزریق داخل ضایعه، روشی مؤثر است ولی به خدمات پزشکی ویژه‌ای نیازمند است که در اکثر مناطقی که لیشمانیازیس پوستی اندمیک است، در دسترس نیست. علاوه بر این، تزریق مکرر اطراف زخم دردناک است و همه‌ی بیماران، تحمل ادامه‌ی درمان را ندارند^۴. از طرفی مقاومت به ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتی‌موان در حال گسترش است^{۳۰}، بنابراین تحقیقاتی برای کشف روش‌های جدید درمان لیشمانیوز پوستی در چند دهه‌ی اخیر آغاز شده است، اما هیچ روش درمانی جدیدی برای درمان موضعی فعلاً یافت نشده است.

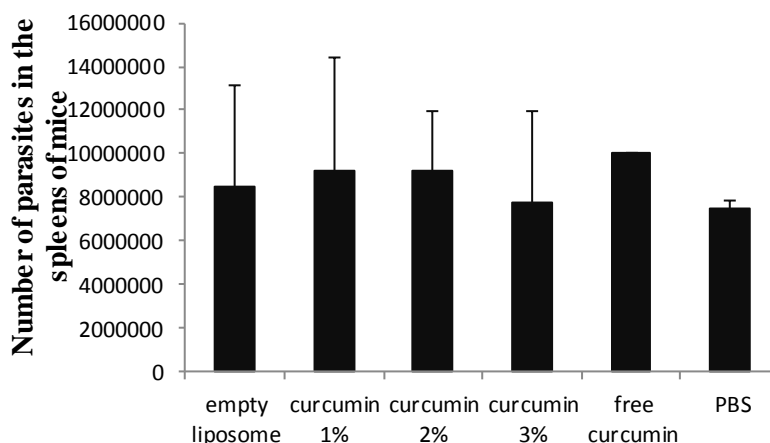
این مطالعه، جهت تهیه و تعیین خصوصیات نانولیپوزوم‌های حاوی کورکومین و بررسی اثرات سایتوتوکسیسیته‌ی آن‌ها علیه *L. major* در محیط برون‌تن و درون‌تن، طراحی شد. لیپوزوم‌ها، در فرمولاسیون و اندازه‌ی مناسب، توانایی عبور از لایه‌ی شاخی و رسیدن به عمق درم و ماکروفاژهای درم را نشان داده‌اند^{۱۷،۱۸}. حضور لیپوزوم‌ها در اپیدرم و درم با استفاده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی اثبات شده است^{۳۰}. میزان نفوذ لیپوزوم‌ها به اپیدرم و درم به نوع و غلظت فسفولیپید به کار رفته در فرمولاسیون آن، اندازه‌ی لیپوزوم‌ها و استفاده از عوامل جذب افزا وابسته است^{۲۳،۳۱}. براساس مطالعات، از میان فسفولیپیدهای

تعداد انگل‌های موجود در طحال موش‌ها بعد از درمان با فرمولاسیون‌های مختلف

بررسی تعداد انگل‌های موجود در طحال موش‌ها، ۴ هفته پس از شروع درمان، انجام شد. نتایج نشان داد که ۴ هفته پس از شروع درمان، استفاده از فرمولاسیون‌های موضعی حاوی کورکومین در مقایسه با گروه شاهد منفی باعث کاهش تعداد انگل‌ها در طحال موش‌ها نشده است و هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های شاهد و گروه‌های دریافت‌کننده‌ی دارو وجود نداشت. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، تعداد انگل‌ها در همه‌ی گروه‌ها، مشابه گروه شاهد منفی (PBS) بود.

بحث

اگرچه لیشمانیازیس پوستی (سالک)، شایع‌ترین شکل لیشمانیازیس می‌باشد که یک بیماری خودمحدودشونده است، اما درمان این بیماری مشکل است، به‌ویژه زمانی که این بیماری با گونه‌های خاصی مانند *L. tropica* به‌وجود آمده باشد^۱. امروزه درمان استاندارد سالک براساس تزریق داخل ضایعه یا عضلانی ترکیبات آنتی‌موان است که نیاز به تزریق مکرر دارد و دارای عوارض جانبی متعدد از جمله درد عضلات، پانکراتیت، آریتمی قلبی و هیپاتیت است که باعث



شکل ۳: تعداد انگل‌های شمارش‌شده در کشت طحال موش‌های تحت درمان با لیپوزوم‌های حاوی کورکومین ۴ هفته بعد از شروع درمان.

و سپس آماستیگوت‌های داخل سلولی مورد مطالعه قرار گرفت. فرمولاسیون‌های لیپوزومی حاوی غلظت‌های مختلف کورکومین اثری علیه پروماستیگوت‌ها و آماستیگوت‌ها در محیط کشت سلولی نشان ندادند. نتایج حاکی از این بود که هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین گروه شاهد (لیپوزوم خالی) و فرمولاسیون‌های حاوی دارو علیه *L. major* وجود ندارد (شکل ۱ و ۲).

نتایج استعمال فرآورده‌های لیپوزومی حاوی کورکومین بر روی زخم ناشی از *L. major* در مدل موشی BALB/C نشانگر عدم کاهش اندازه‌ی زخم‌ها و تعداد انگل‌های موجود در طحال بود، به طوری که اختلاف معنی‌داری بین گروه شاهد (PBS و لیپوزوم‌های خالی) و گروه‌های دریافت‌کننده‌ی فرمولاسیون‌های حاوی دارو وجود نداشت (شکل ۳).

تاکنون تنها چند تحقیق در مورد اثرات آنتی‌لیشمانیایی کورکومین صورت گرفته است. بعضی حاکی از تأثیر مثبت و برخی نشان از عدم تأثیر کورکومین بر انگل لیشمانیا است. حتی برخی تحقیقات نشان داده‌اند که مصرف خوراکی کورکومین در لیشمانیای احشایی به دلیل مهار سیستم التهابی باعث شدیدتر شدن سیر بیماری می‌شود. یکی از مطالعات انجام‌شده نشان داد که کورکومین، از رشد پروماستیگوت‌های *L. major* در غلظت $37.6 \mu\text{M}$ جلوگیری می‌کند^{۳۳}. مطالعه‌ی دیگری نیز با کورکومین به نتایجی مشابه (IC 50 معادل $24 \mu\text{M}$) در مقابل پروماستیگوت‌های *L. amazonensis* دست یافته است. همچنین نشان داده شده است که متیل کورکومین در غلظت‌های پایین‌تر (کمتر از $5 \mu\text{g/mL}$) فعال‌تر است^{۳۴}. تزریق 20 mg/kg از متیل کورکومین به موش‌ها، پس از ۷۵ روز، منجر به کاهش اندازه‌ی زخم‌ها تا ۶۵ درصد اندازه‌ی اولیه شده است.

کورکومین، دمتوکسی کورکومین و بیس‌دمتوکسی کورکومین تاحدی دارای فعالیت انگل‌کشی علیه *L. major* هستند (IC50 معادل با ۲۲ تا ۶۰ میکرومولار) و از بین این ترکیبات، کورکومین

مختلف، فسفولیپیدهای دارای گروه انتهایی کولین در مقایسه با سایر فسفولیپیدها، برهم‌کنش بهتری با پوست دارد و پوست را بیشتر دهیدراته می‌کند. همچنین نفوذ آن به پوست بیشتر است^{۳۱،۳۲}. بنا به دلایل فوق فسفاتیدیل کولین (SPC) برای تهیه‌ی فرآورده‌های لیپوزومی انتخاب شد. همچنین گزارش شده است که برای انتقال دارو به وسیله‌ی فرآورده‌های لیپوزومی، به اپیدرم و درم، غلظت فسفولیپید نباید کمتر از $3-26 \text{ mg/cm}^2$ از سطح پوست باشد^{۳۲}، بنابراین غلظت ۱۵٪ SPC برای استفاده در این مطالعه انتخاب شد. همچنین براساس مطالعات، لیپوزوم‌های با اندازه‌ی کوچکتر، نفوذ بهتری از لایه‌ی شاخی پوست دارند و بیشتر به اپیدرم و درم می‌رسند^{۳۱}. در این مطالعه، لیپوزوم‌های حاوی کورکومین موضعی تهیه‌شده به روش فیوژن، بعد از استفاده از هموژنایزر اندازه‌هایی کوچکتر از میکرون (submicron) داشتند (جدول ۱). آنالیز توزیع اندازه‌ی ذره‌ای نشان داد که میانگین اندازه‌ی ذره‌ای اکثر لیپوزوم‌های حاوی کورکومین کمتر از ۳۰۰ نانومتر می‌باشد. روش فیوژن که برای تهیه‌ی فرآورده‌های لیپوزومی موضعی حاوی کورکومین به کار رفت یکی از روش‌های مناسب، ساده و تکرارپذیر بوده که بدون استفاده از حلال‌های آلی مانند کلروفرم، لیپوزوم‌های هموژن با درصد بارگیری بالا تولید می‌کند^{۳۳}. درصد بارگیری برای فرمولاسیون‌های Lip-curcumin 1%، Lip-curcumin 2% و Lip-curcumin 3% به ترتیب در حدود ۹۲٪، ۸۱٪ و ۷۹٪ بود (جدول ۲) و درحین نگه‌داری، برای هیچ کدام از فرمولاسیون‌ها، کریستالیزاسون (جداشدن کورکومین از فرآورده) مشاهده نشد. لیپوزوم‌های تهیه‌شده با این روش، ویسکوزیته لازم را نشان دادند و آن‌ها می‌توانند به صورت مستقیم، بدون اینکه نیاز به این باشد که فرمولاسیون لیپوزومی با پایه‌ی موضعی دیگر مخلوط شوند، به راحتی بر روی پوست استفاده شوند.

در مرحله‌ی بعد فعالیت آنتی‌لیشمانیایی لیپوزوم‌های حاوی کورکومین علیه پروماستیگوت‌های خارج سلولی

پروماستیگوت‌های *L. major* استفاده شده است.^{۴۱} ایندیوم کورکومین مؤثرترین ترکیب در مقابل پروماستیگوت‌های *L. major* بود. گالیوم کورکومین، کورکومین و دی‌استیل کورکومین به ترتیب بیشترین فعالیت را بعد از ایندیوم کورکومین نشان دادند. در مطالعه‌ی دیگر، فعالیت فوتودینامیک کورکومین علیه پروماستیگوت‌های *L. major* و *L. braziliensis* بررسی شده است.^{۴۲}

نتایج نشان می‌دهد که درمان فوتودینامیک کورکومین تأثیر چشمگیری بر روی بقای پروماستیگوت‌ها داشته است. هم‌چنین مورفولوژی پروماستیگوت‌ها تحت تأثیر درمان فوتودینامیک قرار گرفته است. در یک بررسی دیگر، اثر ترکیبی کورکومین و میلنفوسین بررسی شده است.^{۴۳} در این مطالعه، نانوذرات پلیمری کورکومین تهیه شدند. در مطالعات برون‌تن و درون‌تن، نانوذرات کورکومین فعالیت آنتی‌لیشمانیای مطلوبی در مقابل پروماستیگوت و آماستیگوت‌های *L. donovani* نشان دادند. هم‌چنین در ترکیب با میلنفوسین در محیط برون‌تن اثر سینرژیکی مشاهده شد. نانوکورکومین به‌طور معناداری فعالیت آنتی‌لیشمانیای میلنفوسین را افزایش داده است. ترکیب این دو ماده در محیط درون‌تن از طریق افزایش تولید متابولیت‌های نیتروژن/اکسیژن فعال سمی و افزایش فعالیت فاگوسیتیک، سمیت علیه لیشمانیا را افزایش می‌دهد. هم‌چنین این ترکیب باعث افزایش تکثیر لئفوسیت‌ها می‌شود. در گزارشی دیگر، مشتقاتی جدید از کورکومین از طریق استریفیکیشن یک یا دو گروه فنولی آن تهیه شدند.^{۴۴} فعالیت اسکوالنوئیل کورکومین‌ها و نانو ساختارهای آن‌ها نسبت به کورکومین در برابر پروماستیگوت‌های *L. donovani* معنادار نشان داد اما نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که لیپوزوم‌های حاوی کورکومین در فرم موضعی، تأثیر معناداری در درمان زخم‌های ناشی از لیشمانیوز

مؤثرترین ماده بود.^{۴۵} در مطالعه‌ی دیگر، کورکومینوئیدها به‌وسیله‌ی تراکم 2,4-pentanedione با بنزالدهیدهای استخلاف‌شده‌ی مختلف ساخته شدند.^{۴۶} نتایج نشان داد که 1,7-bis-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione مؤثرترین ترکیب در مقابل پروماستیگوت‌های *L. amazonensis* است (IC₅₀=24 μM). فعالیت کورکومین در مقابل فرم‌های پروماستیگوت *L. major*، *L. tropica* و *L. infantum* نیز بررسی شده است و نتایج حاکی از IC₅₀ معادل با ۵/۳ μM بود.^{۴۷} بنابراین نویسندگان آن مقاله کورکومین را نسبت به پنتامیدین (داروی شاهد) داروی قوی‌تری برای مقابله با آماستیگوت‌های *L. major* معرفی کرده‌اند.

در یک بررسی دیگر، اثر کورکومین بر روی *L. donovani* مطالعه شده و مشاهده گردید که چرخه‌ی سلولی را در فاز G2/M در فرم‌های پروماستیگوت متوقف می‌کند.^{۴۸} در مطالعه‌ی دیگری، فعالیت کورکومینوئیدهای طبیعی (کورکومین، دمتوکسی کورکومین و بیس دمتوکسی کورکومین) در مقابل پروماستیگوت‌های *L. major* و آماستیگوت‌های *L. mexicana* بررسی شد.^{۴۹} این کورکومینوئیدهای طبیعی فعالیت آنتی‌لیشمانیایی کمتری نسبت به داروی رفرنس پنتامیدین داشتند. برخی از آنالوگ‌های ایجادشده، IC₅₀ کمتر از ۵ میکرومولار در مقابل پروماستیگوت‌های *L. major* و آماستیگوت‌های *L. mexicana* نشان دادند. در مقابل، مطالعه‌ی دیگری نشان داد که خصوصیات آنتی‌اکسیدانی کورکومین، پروماستیگوت و آماستیگوت‌های *L. donovani* و پروماستیگوت‌های *L. major* در مقابل اثرات پرواکسیدانته (pro-oxidant) مولکول‌های S-nitroso-DETANONOate و N-acetyl-D,L-penicillamine محافظت می‌کند.^{۴۰} غلظت‌های مختلفی از کورکومین، ایندیوم کورکومین، دی‌استیل کورکومین و گالیوم کورکومین در محیط برون‌تن در مقابل

مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد نهایت قدردانی به‌عمل می‌آید. این مطالعه بخشی از پایان‌نامه م. ا. است که در مرکز تحقیقات نانوفناوری دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شده است.

پوستی در مدل موشی BALB/c ندارند. با توجه به بررسی انجام‌شده در این تحقیق، نظر دوم که حاکی از عدم تأثیر کورکومین بر انگل لیشمانیا است، در مطالعه‌ی ما به‌دست آمد.

تشکر و قدردانی

از حمایت مالی مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی و

References

1. Scientific Working Group on Leishmaniasis. Meeting report. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2004.
2. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *The Lancet* 2005; 366: 1561-77.
3. Croft SL. Monitoring drug resistance in leishmaniasis. *Trop Med Int Health*. 2001; 6: 899-905.
4. Croft SL, Yardley V. Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr Pharm Des*. 2002; 8: 319-42.
5. Markle WH, Makhoul K. Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. *Am Fam Physician*. 2004;69: 1455-60.
6. Aggarwal BB, Surh YJ, Shishodia S. The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease. *Adv Exp Med*. 2007;595.
7. Daybe F. Uber Curcumin. *Den Farbstoff der Curcumawurzzel Ber*. 1870;3:609.
8. Priyadarsini KI. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules*. 2014;19:20091-112.
9. Watson JL, Hill R, Yaffe PB, et al. Curcumin causes superoxide anion production and p53-independent apoptosis in human colon cancer cells. *Cancer Letters* 2010;297:1-8.
10. Cauchetier E, Paul M, Rivollet D, et al. Therapeutic evaluation of free and liposome-encapsulated atovaquone in the treatment of murine leishmaniasis. *Int J Parasitol* 2000;30:777-83.
11. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol* 2008;75:787-809.
12. Dutta A, Bandyopadhyay S, Mandal C, Chatterjee M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *Parasitol Int* 2005;54:119-22.
13. Hsieh CY. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res* 2001;21:2895-900.
14. Shoba G, Joy D, Joseph T, et al. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med* 1998;64:353-6.
15. Gregoriadis G, Large C, Meehan A, Senior J. Targeting of liposomes: study of influence factors. *Targeting of drugs*. Plenum Press, New York, NY. 1981:155-84.
16. Barry BW. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Sci* 2001;14:101-14.

17. Bhatia A, Kumar R, Katare OP. Tamoxifen in topical liposomes: development, characterization and in-vitro evaluation. *J Pharm Pharm Sci*. 2004;7:252-9.
18. Patel HM, Moghimi SM. Liposomes and the skin permeability barrier In: Florance A., Gregoriadis G., Patel H.M, editors. *Liposomes in Drug Delivery*. Harward academic publishers; 1993:137-48.
19. Ferreira LS, Ramaldes GA, Nunan EA, Ferreira LA. In vitro skin permeation and retention of paromomycin from liposomes for topical treatment of the cutaneous leishmaniasis. *Drug Dev Ind Pharm* 2004;30:289-96.
20. Pal S, Ravindran R, Ali N. Combination therapy using sodium antimony gluconate in stearylamine-bearing liposomes against established and chronic *Leishmania donovani* infection in BALB/c mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3591-3.
21. Tempone AG, Perez D, Rath S, et al. Targeting *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:60-8.
22. Guery R, Henry B, Martin-Blondel G, et al. Liposomal amphotericin B in travelers with cutaneous and muco-cutaneous leishmaniasis: Not a panacea. *PLOS Negl Trop Dis* 2017;11.
23. Foldvari M. Biphasic multilamellar lipid vesicles. Google Patents; 1998.
24. Kalat SM, Khamesipour A, Bavarsad N, et al. Use of topical liposomes containing meglumine antimoniate (Glucantime) for the treatment of *L. major* lesion in BALB/c mice. *Exp Parasitol* 2014;143:5-10.
25. Bavarsad N, Bazzaz BSF, Khamesipour A, Jaafari MR. Colloidal, in vitro and in vivo anti-leishmanial properties of transfersomes containing paromomycin sulfate in susceptible BALB/c mice. *Acta Tropica*. 2012;124:33-41.
26. Jaafari M, Arefie A, Sadri K, et al. Vaccination of BALB/C mice against cutaneous leishmaniasis using liposomes incorporated with recombinant major surface protein of leishmania (RGP63) 2004.
27. Padamwar MN, Pokharkar VB. Development of vitamin loaded topical liposomal formulation using factorial design approach: drug deposition and stability. *Int J Pharm* 2006;320:37-44.
28. Titus RG, Marchand M, Boon T, Louis J. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunol* 1985;7:545-55.
29. Neal R, Allen S, McCoy N, et al. The sensitivity of *Leishmania* species to aminosidine. *J Antimicrob Chemother* 1995;35:577-84.
30. Foldvari M, Gesztes A, Mezei M. Dermal drug delivery by liposome encapsulation: clinical and electron microscopic studies. *J Microencapsul* 1990;7:479-89.
31. Touitou E, Junginger H, Weiner N, et al. Liposomes as carriers for topical and transdermal delivery. *J Pharm Sci* 1994;83:1189-203.
32. Ghyczy M, Gareiss J, Kovats T. Liposomes from vegetable phosphatidylcholine: their production and effects on the skin. *Cosmetics and Toiletries* 1994;109:75-80.
33. Koide T, Nose M, Ogihara Y, et al. Leishmanicidal effect of curcumin in vitro. *Biol Pharm Bull* 2002;25:131-3.
34. Araujo CA, Alegrio LV, Gomes DC, et al. Studies on the effectiveness of diarylheptanoids derivatives against *Leishmania amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94:791-4.
35. 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;66:396-8.

36. Gomes DdCF, Alegrioa LV, Leon LL, de Limaa MEF. Total synthesis and anti-leishmanial activity of some curcumin analogues. *Arzneimittel Forschung* 2002;52:695-8.
37. Saleheen D, Ali SA, Ashfaq K, et al. Latent activity of curcumin against leishmaniasis in vitro. *Biol Pharm Bull* 2002;25:386-9.
38. Das R, Roy A, Dutta N, Majumder HK. Reactive oxygen species and imbalance of calcium homeostasis contributes to curcumin induced programmed cell death in *Leishmania donovani*. *Apoptosis* 2008;13:867-82.
39. Changtam C, de Koning HP, Ibrahim H, et al. Curcuminoid analogs with potent activity against *Trypanosoma* and *Leishmania* species. *Eur J Med Chem* 2010;45:941-56.
40. Chan MMY, Adapala NS, Fong D. Curcumin overcomes the inhibitory effect of nitric oxide on *Leishmania*. *Parasitol Res* 2005;96:49-56.
41. Fouladvand M, Barazesh A, Tahmasebi R. Evaluation of in vitro antileishmanial activity of curcumin and its derivatives “gallium curcumin, indium curcumin and diacethyle curcumin”. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013;17:3306-8.
42. Pinto JG, Fontana LC, de Oliveira MA, et al. In vitro evaluation of photodynamic therapy using curcumin on *Leishmania major*. *Lasers Med Sci* 201. 90-31:883;6.
43. Tiwari B, Pahuja R, Kumar P, et al. Nanotized curcumin and miltefosine, a potential combination for treatment of experimental visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61:e01169-16.
44. CheikhAli Z, Caron J, Cojean S, et al. “Squalenoylcurcumin” Nanoassemblies as water-dispersible drug candidates with antileishmanial activity. *Chem Med Chem* 2015;10:411-8.

Antileishmanial activity of nanoliposomes containing curcumin in vitro and in vivo

Morteza Akbari, PhD¹
Anis Askari Zadeh, MSc¹
Kayvan Sadri, PhD²
Mehrdad Iranshahi, PhD³
Mahmoud Reza Jaafari, PhD^{1,3,4}
Ali Khamesipour, PhD⁵
Ali Badiee, PhD^{1,4}

1. Novin Pharmaceutical, Nanotechnology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
2. Nuclear Medicine Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
3. Biotechnology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
4. Nanotechnology Research Center, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
5. Center for Research and Training in Skin Diseases and Leprosy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Background and Aim: Curcumin possesses diverse pharmacologic effects including anti-inflammatory, antioxidant, antiproliferative and antiangiogenic activities. The aim of this study was to develop liposomal formulation of curcumin and evaluate the leishmanial effects of its topical use against *L. major* in vitro and in vivo.

Methods: Nanoliposomes containing 1, 2 or 3% curcumin were prepared by fusion method and characterized for their size, morphology and stability. The in vitro efficacy of liposomal form of Curcumin against promastigotes and amastigotes form of *L. major* was also evaluated. Moreover, the leishmanial effect of formulations was evaluated in infected BALB/c mice. The lesions were treated topically by different formulations twice a day, for 4 weeks. During this time and 4 weeks after treatment, lesions size was measured every week. The level of splenic parasite burdens was investigated in week 4 after parasite inoculation.

Results: Curcumin showed no leishmanicidal effect against live promastigotes and amastigotes in culture media. There was no significant difference between treated and control animals regarding lesion size and splenic parasite burden.

Conclusion: The results of this study showed that nanoliposomes containing curcumin in topical form has no significant leishmanicidal effect in vitro and in vivo against *L. major*.

Keywords: curcumin, leishmaniasis, *L. major*, liposome

Received: Jan 13, 2018 Accepted: Feb 07, 2018

Dermatology and Cosmetic 2017; 8 (4): 204-217

Corresponding Author:
Ali Badiee, PhD

VakilAbad Blvd., Ferdowsi University complex, Nanotechnology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
Email: badieea@mums.ac.ir

Conflict of interest: None to declare