

## فعالیت آنتی‌لیشمانیایی نanolipozom‌های حاوی کورکومین به صورت درون‌تن و برون‌تن

**زمینه و هدف:** کورکومین، دارای اثرات فارماکولوژیکی مختلفی شامل اثرات خدالتهای، آنتی‌اکسیدان، ضدتکثیر و آنتی‌آثربوژن می‌باشد. هدف از این مطالعه، تهییه‌ی فرمولاسیون‌های لیپوزومی حاوی کورکومین و بررسی اثرات ضدلیشممانیای 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 تهییه شدند و اندازه‌ی ذره‌ای، مورفو‌لولوژی و پایداری آن‌ها بررسی شد. ابتدا در مطالعات برون‌تنی، اثربخشی دارو برروی کشت سلولی آماتیگوت 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 لیشممانیا هفته ۴ پس از تلقیح انگل بررسی گردید.

**یافته‌ها:** کورکومین اثر لیشممانیاسیدال علیه پروماستیگوت‌های زنده و آماتیگوت‌ها در محیط کشت نداشت. تفاوت قابل توجهی بین حیوانات درمان شده و کنترل در سایز ضایعه و بار انگلی طحال دیده نشد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که نanolipozom‌های کورکومین به صورت موضعی اثرات سمی بروی لیشممانیا به صورت درون‌تن و برون‌تن ندارند.

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

دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۱۰/۲۳ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۱۱/۰۸  
پوست و زیبایی؛ زمستان ۱۳۹۶، دوره‌ی ۸ (۴): ۲۱۷-۲۰۴

- ۱. دکتر مرتضی اکبری<sup>۱</sup>
- ۲. امیر عسکری‌زاده<sup>۱</sup>
- ۳. دکتر کیوان صدری<sup>۲</sup>
- ۴. دکتر مهرداد ایرانشاهی<sup>۳</sup>
- ۵. دکتر محمود رضا جعفری<sup>۱,۳,۴</sup>
- ۶. دکتر علی خامسی‌پور<sup>۵</sup>
- ۷. دکتر علی بدیعی<sup>۱,۶</sup>

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 جذام، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

نویسنده‌ی مسئول:  
دکتر علی بدیعی

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

تعارض منافع: اعلام نشده است.

به وسیله‌ی گونه‌های متنوعی از انگل لیشممانی ایجاد می‌شود. این بیماری در بسیاری از کشورها، یک بیماری اندمیک محسوب می‌شود.<sup>۱</sup> اگرچه لیشممانیوز

مقدمه

بیماری لیشممانیوز تظاهرات بالینی مختلفی دارد و

محیط برون تن نشان داده است<sup>۱۳۶۱۴</sup>.

لیپوزوم‌ها سیستم کلوئیدی، متشکل از فسفولیپید و کلسیترول هستند<sup>۱۵</sup>. 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 می‌افتد. 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 قراردادن ماکروفاژهای لایه‌ی درم می‌شود<sup>۱۶-۱۸</sup>. فرمولاسیون‌های لیپوزومی در مقایسه با فرمولاسیون‌های معمولی افزایش نفوذ دارو درون پوست را نشان می‌دهند. علاوه‌بر 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 پارامومایسین، آمفوتیریسین و آنتیموان بررسی شده‌اند<sup>۱۹-۲۲</sup>.

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 آلوود به انگل لیشمانیا مازور 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 ۲۲-۲۵ 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 رخم به زمانی طولانی نیاز دارد و حتی زمان بهبودی گاهی بیش از دو سال نیز گزارش شده است<sup>۲</sup>. 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. علاوه‌بر این، مقاومت به آنتیموان ۵ ظرفیتی نیز گزارش شده است<sup>۳-۵</sup>.

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 کریستالهای آن در سال ۱۸۷۰ به دست آمد<sup>۶</sup>. در سال ۱۹۱۰ ساختمان شیمیایی کورکومین شناسایی شد<sup>۷</sup>. 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 به کار 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 به کار می‌رفت<sup>۹</sup>. این ترکیب به عنوان عامل ضدتومور مؤثر که دارای خصوصیات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدان می‌باشد، شناخته شده است و باعث القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود<sup>۱۰</sup>. کورکومین هم‌چنین یک مهارکننده قوی فاکتورهای رونویسی نظیر AP-1، NF-KB و VSTAT می‌باشد<sup>۱۱</sup>. کورکومین فعالیت TPA-induced Protein kinase C (PKC) را مهار می‌کند<sup>۱۲</sup>. علاوه‌بر این، کورکومین، فعالیت آنتی‌باکتریال، ضدقارچی و آنتی‌تریپانوزوما را نشان داده است<sup>۱۳</sup>. دو مطالعه نیز، فعالیت کورکومین را در مقابل پروماستیگوت لشمانیا مازور (*L. major*) در

داده شدند و سپس فاز آبی به فاز لیپیدی اضافه گردید و بلافاصله تحت ورتكس شدید قرار گرفت تا لیپوزوم های MLV تشکیل شود. سپس به مدت ۱۰ دقیقه مرتب گرم و ورتكس گردید. پس از آن، جهت تهیه لیپوزوم های هموژن و کاهش سایز لیپوزوم ها در حدمد نانومتر از هموژن سایزر (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، ۵، ۲، ۵ دقیقه صورت گرفت. همچنین از روش ذکر شده برای تهیه لیپوزوم های خالی به عنوان 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 اضافه شدن به کلد کرم تهیه گردید.

### تعیین خصوصیات فیزیکو شیمیایی لیپوزوم

اندازه های ذره ای لیپوزوم ها با روش dynamic light scattering و با استفاده از دستگاه Nanoseries 3000 HS; Particle Size Analyzer Malvern Instruments Ltd., UK برای تعیین درصد انکپسولا سیون، مقدار مشخصی از فرم لیپوزومال کورکومین (۱۰۰ mg) با ۱۰ میلی لیتر بافر HEPES رقیق شد و در کیسه هی دیالیز با cut off 12000 Da ریخته شد. سپس کیسه هی دیالیز حاوی نمونه، داخل ۱۰۰ میلی لیتر 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، محتويات داخل کیسه هی دیالیز استخراج شد و به آن ها متابول اضافه شد تا عمل لیز لیپوزوم ها صورت گیرد. برای تعیین مقدار کورکومین آزاد شده از لیپوزوم پس از تجزیه لیپوزوم ها، جذب نوری محلول لیز شده حاصل در ۴۲۵ nm (10 mM, pH 7.0) HEPES حل شد. بافر DMSO در درجه حرارت ۷۰ ۳ درصد وزنی - وزنی در درجه حرارت ۲۰ درجه سانتی گراد کاملاً ذوب شدند. به منظور پراکندگی یکنواخت کورکومین در فرمولاسیون، ابتدا کورکومین در تری اتانول آمین (۰.۵٪) به صورت جداگانه حرارت

انگل لیشمایی ماژور سویه MRHO/IR/75/ER از مرکز تحقیقات و آموزش بیماری های پوست و جذام دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شد و تا زمان استفاده در موش c BALB نگهداری گردید. سپس جهت تکثیر، آمستیگوت های گرفته شده از طحال موش های آلوده، ابتدا در محیط آگار خون دار (N.N.N) کشت داده شد. بعد از رشد انگل و اطمینان از عدم آلودگی کشت ها، انگل ها به محیط کشت RPMI 1460 حاوی ۱۰ درصد IU/ml FBS (Fetal Bovine Serum) و ۱۰۰ پنی سیلین انتقال داده شدند.

### مواد شیمیایی

فسفاتیدیل کولین سویا (Soya Phosphatidyl Choline) و کلسترون 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، اولئیک اسید (OA)، Alamar blue، TEA و دی متیل سولفوکسید (DMSO) از Merck (آلمان) و محیط کشت RPMI-1640 از Himedia (هند) تهیه شدند.

### تهیه نanoliposomes های حاوی کورکومین با استفاده از روش فیوژن

برای تهیه لیپوزوم های حاوی کورکومین از روش فیوژن استفاده شد. در این روش، اجزاء لیپیدی شامل فسفاتیدیل کولین سویا (۰.۱۵٪)، کلسترون (۰.۲٪)، ویتامین E (۰.۳٪)، متیل پاراپن (۰.۱٪) و پروپیل پارابن (۰.۰۲٪)، پروپیلن گلایکول (۰.۷٪)، اولئیک اسید (۰.۱٪)، دی متیل سولفوکسید (۰.۲٪) و کورکومین (۱، ۲ و ۳٪) در درجه حرارت ۷۰ درصد وزنی - وزنی در درجه حرارت ۲۰ درجه سانتی گراد کاملاً ذوب شدند. به منظور پراکندگی یکنواخت کورکومین در فرمولاسیون، ابتدا کورکومین در HEPES pH 7.0 حل شد. بافر DMSO در درجه حرارت ۷۰ ۳ درصد وزنی در درجه حرارت ۲۰ درجه سانتی گراد کاملاً ذوب شدند. به منظور پراکندگی یکنواخت کورکومین در فرمولاسیون، ابتدا کورکومین در تری اتانول آمین (۰.۵٪) به صورت جداگانه حرارت

افزوده شد. بدین منظور ابتدا ماکروفازها به وسیله‌ی لام نئوبار شمارش و در محیط RPMI 1640 طوری RPMI پراکنده شدند که ماکروفاز با غلظت  $5 \times 10^6$   $\mu\text{L}$  به دست آید. سپس اسلایدها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد حاوی  $5\% \text{CO}_2$  به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند، بدین منظور که ماکروفازها کاملاً به کف اسلايد بچسبند. سپس، ماکروفازها به پروماستیگوتهاي *L. major* با نسبت تقریباً ۵ پروماستیگوت به‌ازای هر ماکروفاز آلوده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد حاوی  $5\% \text{CO}_2$  انکوبه شدند تا انگل‌ها وارد ماکروفازها 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 پروماستیگوتهاي درون ماکروفازها تبدیل به آماتیگوت شوند. سپس، سلول‌ها در معرض غلظت‌های مختلفی ( $3, 5, 12.5, 25, 50, 125$  میکرومولاير بر حسب کورکومین) از لیپوزوم‌های حاوی کورکومین قرار گرفتند. از محیط RPMI به عنوان بلانک و لیپوزوم خالی به عنوان 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 شست‌وشو داده شدند سپس با افزودن پنجاه میکرولیتر متانول به هر چاهک، سلول‌ها فیکس شدند. بعد رنگ‌آمیزی به وسیله رنگ گیمسا که به نسبت ۱:۱۰ با آب رقیق شده بود، انجام شد. نتیجه با شمارش تعداد آماتیگوتهاي هر ماکروفاز با شمارش تصادفي تعداد ۵۰ ماکروفاز در هر خانه ارزیابی شد.<sup>۲۵</sup>

**بررسی تأثیر نanoliposomes‌های حاوی کورکومین در مدل موشی لیشمانيوز**  
۴۲ موش c BALB (سن ۴ تا ۸ هفته)، به صورت تصادفي به شش گروه هفت تایی تقسیم شدند.

منحنی استاندارد، غلظت کورکومین در لیپوزوم و درنهایت مقدار کورکومین آزادشده محاسبه گردید.

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

تأثیر فرمولاسیون‌های لیپوزومی بر روی پروماستیگوتهاي لیشماني، با استفاده از روش alamarBlue® Cell Viability Assay ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی فرمولاسیون‌های دارویی به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه در غلظت‌های مختلف اضافه شد ( $3, 12.5, 25, 50, 125$  میکرومولاير). سپس، ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی  $3 \times 10^6$  پروماستیگوت در فاز ساکن، داخل هر چاهک اضافه شد. هر نمونه در پلیت ۹۶ خانه ۳ بار تکرار گذاشته شد. ۲۰ میکرولیتر آلاماربلو ( $10.7 \mu\text{l}$ ) به هر چاهک اضافه شد. بعد از اینکه پلیت با فویل آلومینیومی پوشانده شد، پلیت ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۶ درجه‌ی سانتی‌گراد، انکوبه شد. سپس پلیت داخل پلاستیک قرار گرفته و به مدت ۴۸-۷۲ ساعت در انکوباتور ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از طی مدت زمان ذکرشده، ابتدا پلیت به صورت چشمگیری می‌بینیم. 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.<sup>۲۶</sup>

**بررسی تأثیر نanoliposomes‌های حاوی کورکومین در کشت سلولی با استفاده از ماکروفازهاي آلوده به آماتیگوتهاي *L. major***

ماکروفازهاي موشی رده‌ی سلولی A.1 J774 با غلظت ۵۰,۰۰۰ ماکروفاز (Pasteur Institute, Iran) در هر خانه به tissue culture slides هشت خانه‌ای

ترتیب تا ردیف آخر پلیت پاساز 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 درجه‌ی 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.<sup>۲۶</sup>.

برای ارزیابی آماری و تعیین اثر فرآورده‌های لیپوزومی در درمان لیشمانیا پوستی در موش‌های BALB/c آزمون واریانس یک‌طرفه به همراه تست Tukey-kramer معنی‌دار بودن اختلاف بین دو گروه در نظر گرفته شد. برای مقایسه‌ی میانگین اندازه‌ی زخم برای هر گروه در هفت‌های مختلف محاسبه و استفاده شد.

## یافته‌ها

**تعیین خصوصیات فیزیکوشیمیایی لیپوزوم‌ها**  
لیپوزوم‌های مورداستفاده در این مطالعه، اندازه‌ی ذره‌ای در حدود ۳۰۰ نانومتر داشتند (جدول ۱). مقدار polydispersity و Z-average گرددید. به جز ردیف اول در تمام چاهک‌ها ۱۸۰ میکرولیتر از RPMI-1640 هموژن 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 گروه شاهد، کمتر از لیپوزوم‌های حاوی ۱، ۲ یا ۳ گروه شاهد، کمتر از لیپوزوم‌های حاوی ۱، ۲ یا

۵ پروماستیگوت *L. major* به قاعده‌ی دم هر پس از تزریق و ایجاد زخم، به مدت ۲۸ روز، به میزان ۱۰۰ mg 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 کلدکرم به عنوان شاهد (گروه ۶) می‌باشد.

## 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.<sup>۲۸</sup> موش‌های هشت هفته‌ای بعد از آلوده شدن، کشته شدند. طحال‌ها در محیط استریل جداسازی شدند. طحال‌ها پس از توزین توسط تهسرنگ استریل در پلیت‌های ۲۴ خانه با ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت RPMI-1640 هموژن گردید. به جز 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	اندازه‌ی متوسط a (nm)	زتا	تعداد	حجم	شدت	Polydispersity	پتانسیل زتا (mV)
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	-۳۷/۷±۰,۵۱
Lip-Cur 2%	۳۰۰,۳۵±۲۰,۶۵	۱۰۰/۷۴±۱,۰۴۶	۱۸۲,۶±۷۶,۱	۳۳۱/۱۵±۶۹,۰۵	۰/۴۷±۰,۰۲	-۴۲/۱±۴,۲	-۴۲/۱±۴,۲
Lip-Cur 3%	۳۹۲±۴۶,۳	۹۵/۱۴۵±۲۱,۸	۶۲۱,۹±۲۲۶,۴	۲۶۰/۰۳±۱۱,۶	۰/۴۷±۰,۰۲	-۳۴/۱±۰,۱۷	-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	-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 درنهایت 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 سایتو توکسیسیتی 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 محدوده 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 نanolipozom‌های حاوی کورکومین بر روی آماتیگوت‌های *L. major* در مدل *in vitro***

از PBS به عنوان شاهد منفی و از داروی آمفوتیریسین B به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. غلظت‌های ۳، ۱۲۵، ۶، ۲۵، ۱۲۵ و ۵۰ میکرومولار بر حسب 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 آماتیگوت‌های *L. major* مشاهده نشد (شکل ۲).

در صدد کورکومین به ورد گونه تغییر معناداری بین لیپوزوم با درصد های مختلف کورکومین مشاهده نشد. پتانسیل زتا برای همه 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).

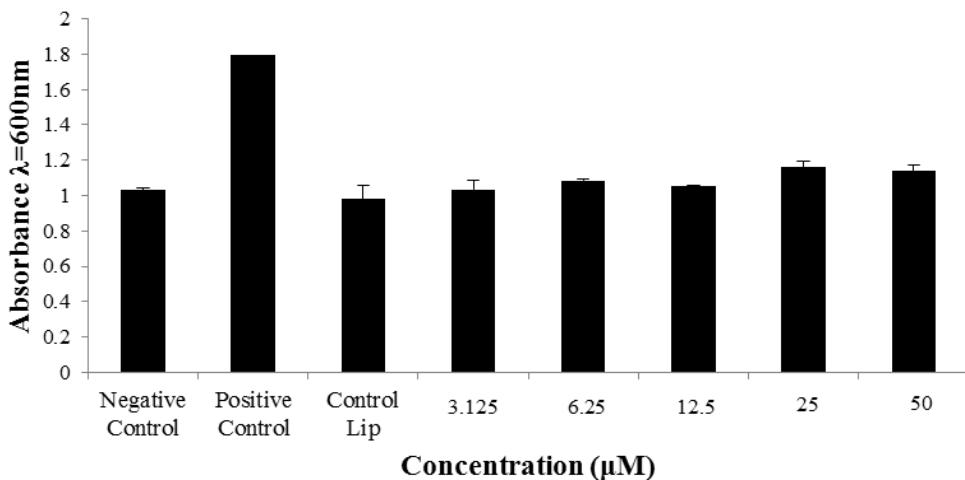
### تأثیر فرمولاسیون‌های لیپوزومی و غیرلیپوزومی کورکومین بر روی پروماستیگوت‌های *L. major* در *in vitro*

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

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

فرمولاسیون	محصورسازی (درصد)
۹۲,۵±۵,۴	Lip-Cur 1%
۸۱±۱,۳	Lip-Cur 2%
۷۹±۲,۱۶	Lip-Cur 3%

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

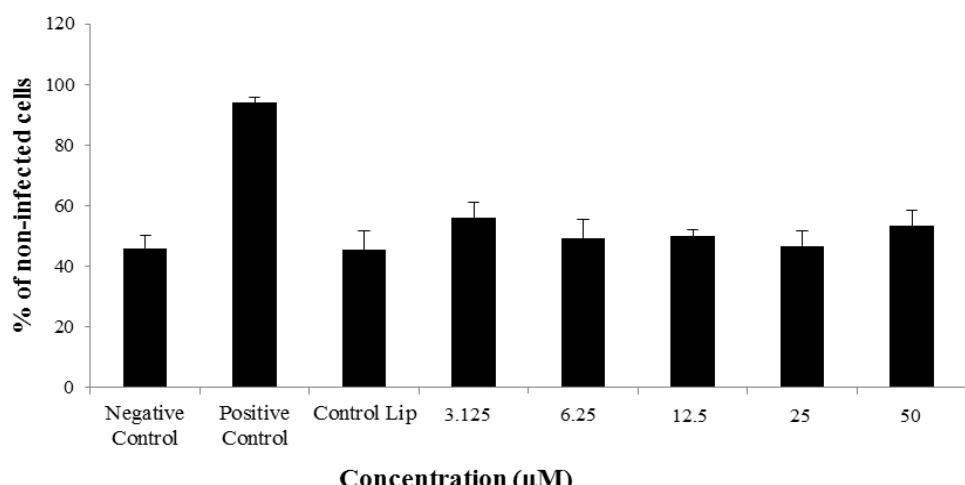


شکل ۱: میانگین جذب نوری تعیین شده برای غلظت های مختلف کورکومین لیپوزومی در طول موج ۶۰۰ nm در تست  
بررسی رشد پروماستیگوت ها به روش Alamar Blue

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

#### بررسی تأثیر نanolipozomهای موضعی حاوی کورکومین بر روی اندازه و شدت زخم های ایجاد شده در مدل موشی لیشماییوز

در ابتدای شروع درمان با فرآورده های لیپوزومی حاوی کورکومین (۴ هفته پس از تزریق انگل)، زخم حاصل در قاعده دم موش ها، توسط کولیس دیجیتالی اندازه گیری شد. نتایج تعیین اندازه زخم در بین گروه های مختلف موشی در ابتدای درمان حاکی از این بود که اختلاف معنی داری بین گروه ها وجود ندارد.



شکل ۲: میانگین درصد سلول های غیر آلوده با آماتیگوت در ۵۰ ماکروفاز برای غلظت های مختلف کورکومین در فرمولاسیون لیپوزومی ( $n=3$ ).

کاهش یا قطع درمان می‌شود<sup>۲۹</sup>. اگرچه تزریق داخل ضایعه، روشی مؤثر است ولی به خدمات پزشکی ویژه‌ای نیازمند است که در اکثر مناطقی که لیشمانيازیس پوستی اندمیک است، در دسترس نیست. علاوه‌بر این، تزریق مکرر اطراف زخم دردناک است و همه‌ی بیماران، تحمل ادامه‌ی درمان را ندارند<sup>۳۰</sup>. از طرفی مقاومت به ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتیموان در حال گسترش است<sup>۳۱</sup>، بنابراین تحقیقاتی برای کشف روش‌های جدید درمان لیشمانيوز پوستی در چند دهه‌ی اخیر آغاز شده است، اما هیچ روش درمانی جدیدی برای درمان موضعی فعلاً یافت نشده است.

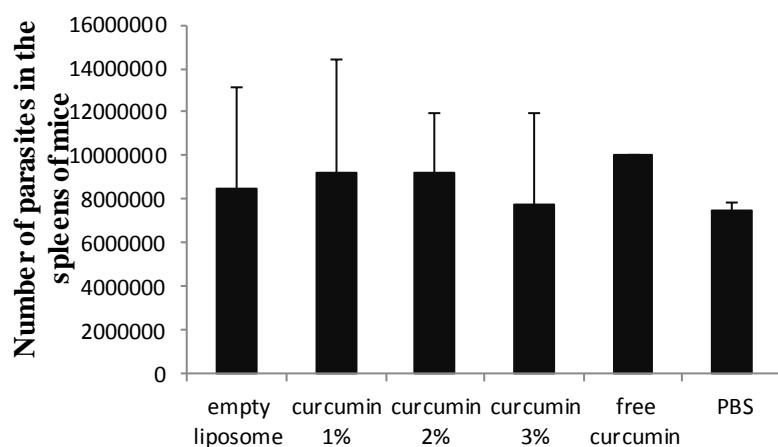
این مطالعه، جهت تهیه و تعیین خصوصیات نانولیپوزوم‌های حاوی کورکومین و بررسی اثرات سایوتوتوكسیسیته‌ی آن‌ها علیه *L. major* در محیط برون‌تن و درون‌تن، طراحی شد. لیپوزوم‌ها، در فرمولاسیون و اندازه‌ی مناسب، توانایی عبور از لایه‌ی شاخی و رسیدن به عمق درم و ماکروفائزهای درم را نشان داده‌اند<sup>۱۷ و ۱۸</sup>. حضور لیپوزوم‌ها در اپیدرم و درم با استفاده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی اثبات شده است<sup>۳۰</sup>. 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 افزای وابسته است<sup>۳۱</sup>. 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 لیشمانيازیس پوستی (سالک)، شایع‌ترین شکل لیشمانيازیس می‌باشد که یک بیماری خودمحدودشونده است، اما درمان این بیماری مشکل است، به‌ویژه زمانی که این بیماری با گونه‌های خاصی مانند *L. tropica* بوجود آمده باشد<sup>۱</sup>. 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 هپاتیت است که باعث



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

و سپس آماتستیگوت‌های داخل سلولی مورد مطالعه قرار گرفت. فرمولاسیون‌های لیپوزومی حاوی غلظت‌های مختلف کورکومین اثری علیه پروماستیگوت‌ها و آماتستیگوت‌ها 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 زخمه‌ها و تعداد انگل‌های موجود در طحال بود، به‌طوری 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 به‌دلیل مهار سیستم التهابی باعث شدیدتر شدن سیر بیماری می‌شود. یکی از مطالعات انجام‌شده نشان داد که کورکومین، از رشد ۳۷۶  $\mu\text{M}$  در غلظت *L. major* پروماستیگوت‌های جلوگیری می‌کند.<sup>۳۳</sup> مطالعه‌ی دیگری نیز با کورکومین به نتایجی مشابه (IC<sub>50</sub> معادل با ۲۴  $\mu\text{M}$ ) در مقابل پروماستیگوت‌های *L. amazonensis* دست یافته است. هم‌چنین نشان داده شده است که متیل کورکومین در غلظت‌های پایین‌تر (کمتر از ۵  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )<sup>۵</sup> فعال‌تر است.<sup>۳۴</sup> تزریق ۲۰ mg/kg از متیل کورکومین به موش‌ها، پس از ۷۵ روز، منجر به کاهش اندازه‌ی زخمه‌ها تا ۶۵ درصد اندازه‌ی اولیه شده است.

کورکومین، دمتوكسی کورکومین و بیس‌دمتوكسی کورکومین تاحدی دارای فعالیت انگل‌کشی علیه *L. major* هستند (IC<sub>50</sub> 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<sup>۱۷,۳۱,۳۳</sup>. بنا به دلایل فوق فسفاتیدیل کولین (SPC) برای تهیه‌ی فرآورده‌های لیپوزومی انتخاب شد. هم‌چنین گزارش شده است که برای انتقال دارو به‌وسیله‌ی فرآورده‌های لیپوزومی، به اپیدرم و درم، غلظت فسفولیپید نباید کمتر از ۳-۲۶ mg/cm<sup>۲</sup> از سطح پوست باشد<sup>۳۳</sup>، 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.<sup>۳۱</sup> 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 حللاهای آلی مانند کلروفرم، لیپوزوم‌های هموژن با درصد بارگیری بالا تولید می‌کند.<sup>۳۳</sup> درصد بارگیری برای Lip-curcumin 1٪ Lip-curcumin 3٪ و 2٪ به ترتیب در حدود ۹۲٪، ۸۱٪ و ۷۹٪ بود (جدول ۲) و در حین نگهداری، برای هیچ کدام از فرمولاسیون‌ها، کریستالیزاسون (جادشدن کورکومین از فراورده) 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.<sup>۴۱</sup>. 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. braziliensis* و *L. major* بررسی شده است.<sup>۴۲</sup>

نتایج نشان می‌دهد که درمان فوتودینامیک کورکومین تأثیر چشمگیری بر روی بقای پروماستیگوتهای داشته است. همچنین مورفولوژی پروماستیگوتهای تحت تأثیر درمان فوتودینامیک قرار گرفته است. در یک بررسی دیگر، اثر ترکیبی کورکومین و میلتفسین بررسی شده است.<sup>۴۳</sup> 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 میلتفسین در محیط برون‌تن اثر سینئریکی مشاهده شد. نانوکورکومین به‌طور معناداری فعالیت آنتی‌لیشمانیای میلتفسین را افزایش داده است. ترکیب این دو ماده در محیط درون‌تن از طریق افزایش تولید متابولیت‌های نیتروژن‌اکسیژن فعال سمی و افزایش فعالیت فاگوسیتیک، سمیت علیه لیشمانیا را افزایش می‌دهد. همچنین این ترکیب باعث افزایش تکثیر لنفوسیت‌ها می‌شود. در گزارشی دیگر، مشتقاتی جدید از کورکومین از طریق استریفیکیشن یک یا دو گروه فنولی آن تهیه شدند.<sup>۴۴</sup> فعالیت اسکوالنوثیل کورکومین‌ها و نانوساختارهای آن‌ها نسبت به کورکومین در برابر پروماستیگوتهای *L. donovani* افزایش معنادار نشان داد اما نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که لیپوزوم‌های حاوی کورکومین در فرم موضعی، تأثیر معناداری در درمان زخم‌های ناشی از لیشمانیوز

مؤثرترین ماده بود.<sup>۴۵</sup> در مطالعه‌ی دیگر، کورکومینوئیدهای سیله‌ی تراکم 2,4-pentanedione با بنزالدهیدهای استخلاف‌شده مختلف ساخته شدند.<sup>۴۶</sup> نتایج نشان داد که 1,7-bis-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) موثرترین ترکیب در مقابل پروماستیگوتهای *L. amazonensis* است ( $IC_{50}=24 \mu M$ ). فعالیت کورکومین در مقابل فرم‌های *L. infantum* و *L. tropica* *L. major* نیز بررسی شده است و نتایج حاکی از  $IC_{50}$  معادل با  $5,3 \mu M$  بود.<sup>۴۷</sup> بنابراین نویسندهان آن مقاله کورکومین را نسبت به پنتامیدین (داروی شاهد) داروی قوی‌تری برای مقابله با آماستیگوتهای *L. major* معرفی کردند.

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.<sup>۴۸</sup> در مطالعه‌ی دیگری، فعالیت کورکومینوئیدهای طبیعی (کورکومین، دمتوكسی کورکومین و بیس دمتوكسی کورکومین) در مقابل پروماستیگوتهای *L. major* و آماستیگوتهای *L. mexicana* بررسی شد.<sup>۴۹</sup> این کورکومینوئیدهای طبیعی فعالیت آنتی‌لیشمانیایی کمتری نسبت به داروی رفرنس پنتامیدین داشتند. برخی از آنالوگ‌های ایجادشده،  $IC_{50}$  کمتر از ۵ میکرومولار در مقابل پروماستیگوتهای *L. major* و آماستیگوتهای *L. mexicana* نشان دادند. در مقابل، مطالعه‌ی دیگری نشان داد که خصوصیات آنتی‌اسیدانی کورکومین، پروماستیگوت و آماستیگوتهای *L. donovani* و پروماستیگوتهای *L. major* در مقابل اثرات S-nitroso-پرواسیداناتی (pro-oxidant) مولکول‌های DETANONOate و N-acetyl-D,L-penicillamine محافظت می‌کند.<sup>۵۰</sup> 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 به عمل 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 انجام شده در این تحقیق، نظر دوم که حاکی از عدم تأثیر کورکومین بر انگل لیشمایی است، در مطالعه‌ی ما به دست 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. Über Curcumin. Den Farbstoff der Curcumawurzel 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, Alegria 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. “Squalenoylcucumin” 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, PhD<sup>1</sup>  
Anis Askari Zadeh, MSc<sup>1</sup>  
Kayvan Sadri, PhD<sup>2</sup>  
Mehrdad Iranshahi, PhD<sup>3</sup>  
Mahmoud Reza Jaafari, PhD<sup>1,3,4</sup>  
Ali Khamesipour, PhD<sup>5</sup>  
Ali Badiee, PhD<sup>1,4</sup>

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