دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیست و سوم، شماره ۲، صفحه ۱۶۴ - ۱۵۳ (خرداد و تیر ۱۳۹۹)

Iran South Med J 2020; 23(2): 153-164

ارزیابی اثر کشنده کورکومین و مشتقات آن بر علیه *لیشمانیا ماژور* در شرایط آزمایشگاهی

مرادعلی فولادوند (PhD)[۱]، سلیمان خرمی (MSc)، بهروز نعیمی (PhD)[۲]، سهیلا فتوحی (PhD)[۳]، خسرو محمدی (PhD)[۴]

[۱] گروه میکروب و انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران
[۲] گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران
[۳] گروه انگل‌شناسی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه باهنر کرمان، کرمان، ایران
[۴] گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه خلیج‌فارس بوشهر، بوشهر، ایران

(دریافت مقاله: ۹۷/۱۱/۲۴- پذیرش مقاله: ۹۹/۲/۲۶)

چکیده

زمینه: *لیشمانیا ماژور* توسط پشه خاکی‌هایی از جنس فبوموتوموس منتقل شده و در انسان باعث زخم‌های جلدی می‌شود.کورکومین از زردچوبه به دست آمده و مشتقات مختلفی از آن تهیه می‌شود. در پژوهش حاضر اثر کورکومین و مشتقات کورکومین بر *لیشمانیا ماژور* در محیط برون تنی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: کورکومین با خلوص ۷۰ و ۹۰ درصد و مشتقات آن یعنی بیس دی متوکسی کورکومین BDMC، دی استیل کورکومینDAC، وانادیل کورکومین ۲ VO (CUR)، وانادیل دی استیل کورکومین ۲ VO(DAC)، ایندیوم کورکومین ۳ In(CUR) و گالیوم کورکومین ۳ Ga(CUR) سنتز و غلظت‌های ۵۰ تا ۸۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر آن‌ها در گلیسیرین تهیه گردید. ۱۰۶ پروماستیگوت *لیشمانیا ماژور* به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه اضافه و ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از مشتقات کورکومین به آن افزوده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سنجش میزان کشندگی ترکیبات بر علیه *لیشمانیا ماژور* و همچنین بررسی اثر سمی آن‌ها بر روی سلول های (vero) با استفاده از تست MTT ارزیابی گردید.

یافته‌ها: اثر کشنده کورکومین و مشتقات آن بر علیه لیشمانیا با افزایش غلظت دارای سیر افزاینده‌ای بود. شاخص IC_{50} ضد لیشمانیایی کورکومین ۷۰ و ۹۰ درصد، بیس دی متوکسی کورکومین BDMC، دی استیل کورکومین DAC، وانادیل کورکومین ۲ VO(CUR)، وانادیل دی استیل کورکومین ۲ VO(DAC)، ایندیوم کورکومین ۳ In(CUR) و گالیوم کورکومین ۳ Ga(CUR) به‌ترتیب عبارت بودند از ، ۱۱۰، ۹۳، ۱۰۱، ۱۰۳، ۹۸، ۱۰۳، ۵۱ و ۵۸ میکروگرم/ میلی‌لیتر و اثر کشنده این ترکیبات بر علیه سلول‌های (vero) نیز به‌ترتیب عبارت بودند از ۳۳/۱، ۱۹، ۲۱، ۲۰/۳، ۱۷، ۲۱، ۲۵/۳، ۱۶ درصد.

نتیجه‌گیری: گالیوم کورکومین و ایندیوم کورکومین نسبت به کورکومین و سایر مشتقات، بیشترین اثر ضد لیشمانیایی را از خود نشان داده و در عین حال ایمن‌ترین مشتقات کورکومین برای سلول‌های پستاندار بودند.

واژگان کلیدی: *لیشمانیا ماژور*، کورکومین، MTT، Vero

* بوشهر، خیابان ریشهر جنب بیمارستان سلمان فارسی دانشگاه علوم پزشکی دانشکده پیراپزشکی

Email: mfooladvand39@yahoo.com
***ORCID: 0000-0001-7302-6840**

مقدمه

لیشمانیازیس بیماری انگلی است که عامل آن تک یاخته‌ای از خانواده تریپانوزوماتیده و از جنس لیشمانیا می‌باشد. پشه خاکی از جنس فلبوتوموس و لوتزومیا ناقل این بیماری بوده و این عفونت را در اکثر نقاط جهان انتشار می‌دهند. تظاهرات بالینی این عفونت از زخم پوستی تا فرم احشائی کشنده را در بر می‌گیرد. انتشار این بیماری از مناطق گرمسیر تا نیمه گرمسیر، بیابانی تا جنگل‌های بارانی گسترده است (۱ و ۲).

مهم‌ترین ترکیبات داروئی که در حال حاضر برای درمان اشکال بالینی مختلف لیشمانیازیس مورد استفاده قرار می‌گیرند عبارتند از ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتیموان، که از جمله این داروها می‌توان به گلوکانتیم و پنتوستام اشاره نمود، که عوارض جانبی مهمی بدنبال تجویز این داروها گزارش شده است (۳). البته برای درمان اشکال پوستی لیشمانیوز از درمان‌های موضعی و حتی درمان هایی مثل گرما درمانی و سرما درمانی نیز استفاده می شود. امروزه به دلیل مقاومت تک یاخته‌های جنس لیشمانیا به آنتی‌بیوتیک‌های معمول، گرایش به جایگزینی آن‌ها با آنتی‌بیوتیک‌های نوین وجود دارد (۴ و ۵). گرایش به استفاده از ترکیبات داروئی با منشأ گیاهی چنان در حال گسترش است که ۲۵ درصد از داروهای مورد استفاده فعلی از منابع گیاهی تهیه می شوند (۶ و ۷). کورکومین (دی فرول متان یا بیس (۴- هیدروکسی- ۳- متوکس فنیل) ۱و ۶- هپتادی ان – ۳و۵- دی ان) رنگدانه زرد رنگی است که از ریشه‌های گیاه *Curcuma longa* که از خانواده زنجبیل می‌باشد تولید می‌شود. ریزوم زرد چوبه به‌طور وسیع برای رنگ و طعم دادن به غذا استفاده می‌شود. به صورت پودر به آن تورمریک می‌گویند و قدمت طولانی برای استفاده در پزشکی دارد (۸). از اثرات ضد انگلی کورکومین می‌توان به اثر کشندگی آن بر علیه *ژیاردیا لامبلیا* و همچنین بر علیه اسپروزویت‌های ایمریا تنلا، پلاسمودیوم‌های مالاریا و *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* (۱۲-۹) اشاره کرد، کورکومین همچنین بر روی *لیشمانیا آمازوننسیس، لیشمانیا مکزیکانا، تریپانوزوم بروسه‌ای، شیستوزوما مانسونی* و ویروس نقص ایمنی اکتسابی (ایدز) نیز مؤثر می‌باشد (۱۵-۱۳). از دیگر خواص کورکومین همچنین می‌توان به اثرات ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی و ضددیابت آن اشاره کرد سنتز ترکیبات جدید از کورکومین می‌تواند به تولید داروهای گیاهی با کارایی بیشتر منجر شود که از جمله این ترکیبات می‌توان به سنتز ایندیوم کورکومین (مشتق فلزی کورکومین) که دارای اثر ضدسرطانی می‌باشد، اشاره کرد (۱۶ و ۱۷).

گوانگ و همکاران (Guang & et al)، آنالوگ‌های مختلف کورکومین را سنتز و اثر کشنده آن‌ها را بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارای مقاومت داروئی بررسی و مشاهده کردند که به‌طور معنی‌داری نسبت به داروهای رفرانس اثر بخشی قابل توجهی دارند. دابی و همکاران (Dubey & et al)، با سنتز کنژوگه‌های دی استر کورکومین و ارزیابی اثر آن‌ها بر روی باکتری‌ها و سلول‌های سرطانی دریافتند که این مشتقات بدلیل حلالیت بیشتر، متابولیسم آرام و دریافت سلولی بالا از کورکومین مؤثرتر هستند. در این مطالعه، کورکومین با خلوص ۷۰ و ۹۰ درصد و مشتقات آن یعنی بیس دی متوکسی کورکومین، دی استیل کورکومین، وانادیل کورکومین، وانادیل دی استیل کورکومین، ایندیوم کورکومین و گالیوم کورکومین تهیه و اثرات ضد لیشمانیائی آن‌ها در محیط برون تنی مورد بررسی قرار گرفت (۲۱-۸).

مواد و روش‌ها

کشت انگل

ابتدا سویه استاندارد *لیشمانیا ماژور* از دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه و در محیط N.N.N حاوی (۵۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) جنتامایسین کشت داده شد تا به بتدریج با محیط کشت آداپته شده و پایدار گردد، سپس مقداری از پروماستیگوت‌های موجود به محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FCS انتقال داده شدند. پس از اینکه کشت به حداکثر رشد لگاریتمی خود رسید مقدار۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت (RPMI-1640) حاوی یک میلیون پروماستیگوت *لیشمانیا ماژور* پس از شمارش با لام نئوبار) به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه انتقال و به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید.

ترکیبات مورد استفاده

کورکومین و دیگر مشتقات مورد استفاده در این مطالعه از دانشگاه خلیج‌فارس بوشهر تهیه شدند. مشتقات کورکومین (کورکومین، دی متوکسی کورکومین و بیس دی متوکسی کورکومین) توسط تکنیک کروماتوگرافی ستونی و با استفاده از سیلیکاژل و شوینده کلروفرم: متانول: اسید استیک به نسبت (۲:۵:۹۸) جداسازی شدند. دی استیل کورکومین دی استیل بیس دی متوکسی کورکومین نیز از برهمکنش کورکومین و بیس دی متوکسی کرکومین با استیک انیدرید در حلال پیریدین خشک به‌دست آمده‌اند. کمپلکس‌های فلزی مشتقات کرکومین از برهمکنش محلول متانولی مشتقات کورکومین با محلول متانولی یون‌های فلزی در شرایط رفلاکس حاصل شده‌اند. نحوه مشخص کردن ساختمان آن‌ها با استفاده از مس اسپکترومتری، اسپکتروسکوپی جذبی فرو سرخ، و آنالیز عناصر انجام شد (۱۷). گلوکانتیم ساخت شرکت سانوفی فرانسه (که توسط وزارت بهداشت وارد می‌شود) تهیه و در آزمایشگاه با استفاده از پی بی اس (PBS) رقت‌های مختلف از ۵۰ تا ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آن تهیه گردید

آزمایشات

از کورکومین با خلوص ۷۰ و ۹۰ درصد و همچنین مشتقات کورکومین شامل، بیس دی متوکسی کورکومین، دی استیل کورکومین، وانادیل کورکومین، وانادیل دی استیل کورکومین، ایندیوم کورکومین و گالیوم کورکومین با استفاده از گلیسیرین و به کمک شیکر غلظت‌های مختلف ۵۰ تا ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به صورت جداگانه تهیه گردید. سپس مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از هر یک از غلظت‌های تهیه شده از این ترکیبات به چاهک‌های حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت و دارای ۱×۱۰۶ پروماستیگوت لیشمانیا ماژور اضافه گردید و پلیت به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. تمام آزمایشات به‌صورت سه بار تکرار انجام شدند. کنترل منفی ما در این مطالعه شامل محیط کشت RPMI-1640 و لیشمانیا ماژور و بدون ترکیبات کورکومین بوده، و کنترل مثبت حاوی محیط RPMI-1640، لیشمانیا ماژور و همچنین داروی گلوکانتیم با غلظت‌های مشابه ترکیبات کورکومین بود. گلوکانتیم مورد استفاده در این مطالعه از شرکت تهیه و در آزمایشگاه با استفاده از پی بی اس (PBS) رقت‌های مختلف از ۵۰ تا ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آن تهیه و به‌عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت.

برای سنجش میزان اثر کشنده ترکیبات کرکومین بر *لیشمانیا ماژور* و همچنین بر روی سلول‌های VERO از تست MTT استفاده گردید. محلول MTT (Methylthiazolyldiphenyl- tetrazolium

bromide) با غلظت ۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر تهیه و پس از فیلتر شدن، به مقدار ۲۰ میکرولیتر به هریک از چاهک اضافه و میکروپلیت مجدداً به مدت ۴ ساعت دیگر انکوبه شد. برای حل شدن کریستال‌های فورمازان تشکیل شده در چاهک‌ها مقدار ۱۵۰ میکرولیتر از محلول دی متیل سولفوکساید به هر یک از چاهک‌ها اضافه گردید، با بررسی چاهک‌ها مشخص شده که ۲۰ دقیقه پس از افزودن دی متیل سولفوکساید کریستال‌های تشکیل شده به‌طور کامل حل شده بودند برای محاسبه درصد کشندگی ترکیبات کورکومین بر علیه پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* جذب نوری پلیت با استفاده از دستگاه الایزا مدل (USA، VT، Winooski، Highland Park، Biotech) و در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت و درصد کشندگی ترکیبات مورد مطالعه با استفاده از نتایج بدست آمده از مقادیر جذب نوری محاسبه گردید (۲۲ و ۲۳).

ارزیابی توکسی‌سیته عصاره‌ها

الف: کشت سلولی ورو

سلولهای vero (سلول‌های اپیتلیال کلیه) از انستیتو پاستور ایران تهیه و به‌وسیله کپسول ازت مایع به بوشهر منتقل و در محیط کشت (RPMI-1640) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گوساله، ۱۰۰ واحد پنی سیلین، ۱۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر استرپتومایسین و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و حاوی ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۹۵ درصد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند (۲۳).

ب: آزمایش سایتوتوکسی سیته سلولی

فلاسک حاوی کشت سلول‌های vero با استفاده از سرم فیزیولوژی شستشو و سپس به کمک تریپسین سلول‌ها از جدار فلاسک جداسازی و با استفاده از تریپان بلو رنگ‌آمیزی و به‌وسیله لام نئوبار شمارش شدند، تعداد یکصد هزار سلول به هر یک از چاهک ها اضافه و پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، حاوی ۵ درصد CO_2 و رطوبت نسبی ۹۵ درصد، به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید، از هر کدام از رقت‌های تهیه شده از ترکیبات کورکومین مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه و به مدت ۴۸ ساعت انکوباسیون ادامه یافت، در پایان این مدت انکوباسیون برای اندازه گیری درصد کشندگی ترکیبات مختلف بر علیه سلول های ورو از تست MTT به همان روش اشاره شده در مورد کشندگی بر علیه لیشمانیا *ماژور* استفاده گردید (۲۳).

یافته‌ها

اثر کشنده غلظت‌های مختلف مشتقات کورکومین بر علیه پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* در جدول ۱ آورده شده است. همان‌طور که در این جدول مشاهده می‌شود مشتقات کورکومین با افزایش غلظت کشندگی بیشتری بر ضد پروماستیگوت‌های لیشمانیا از خود نشان داده و حداکثر این کشندگی غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است، به‌نحوی که ایندیوم کورکومین و گالیوم کورکومین با این غلظت موجب کشندگی صد درصدی پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* شده‌اند.

جدول ۱) درصد کشندگی غلظت‌های مختلف مشتقات کورکومین بر علیه *لیشمانیا ماژور*						
مشتقات کورکومین	غلظت‌های مشتقات کورکومین (میکروگرم/میلی‌لیتر) درصد کشندگی					
	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰	۶۰۰	۸۰۰
کورکومین ٪۷۰	۲۰/۸	۳۶/۵۱	۷۰	۷۵/۷	۷۹/۳۶	۸۴
کورکومین ٪۹۰	۲۳/۲	۵۴	۶۹	۷۱	۷۹/۵	۹۴
بیس دی متوکسی کورکومین	۲۱/۱	۴۹/۷	۵۷/۳۲	۶۶	۷۱/۲۸	۸۹
دی استیل کورکومین	۱۶/۴	۴۹/۴	۵۷	۶۹/۲	۷۷/۳۹	۸۷
وانادیل کورکومین	۱۸/۸	۵۰/۵	۶۳/۴۷	۷۱/۶۸	۷۵/۲	۹۱
وانادیل دی استیل کورکومین	۳۰	۴۹/۴	۵۷/۹	۶۹/۲	۷۷	۸۷
ایندیوم کورکومین	۴۹/۷	۷۱	۷۷	۸۱	۹۰	۱۰۰
گالیوم کورکومین	۴۶	۶۷	۶۶/۰۴	۷۵/۹۷	۹۳/۹۴	۱۰۰
گلوکانتیم	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

یکی از شاخص‌های ارزشمندی که در مطالعات بیواسی می‌بایست مورد توجه قرار گیرد بررسی اثر ترکیبات مورد مطالعه بر روی سلول‌های پستانداران است که از آن به شاخص CC_{50} یا سایتوتوکسی سیته سلولی یاد می‌شود، برای این منظور ما از کشت سلول‌های ورو استفاده و اثر مشتقات مختلف کورکومین را بر روی آن ها بررسی کردیم که نتایج حاصله در جدول ۲ آورده شده است. همان‌طوری که در این جدول مشاهده می شود شاخص CC_{50} یا ۵۰ درصد توکسی‌سیته مشتقات کورکومین بر علیه سلول‌های ورو بالاتر از ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است.

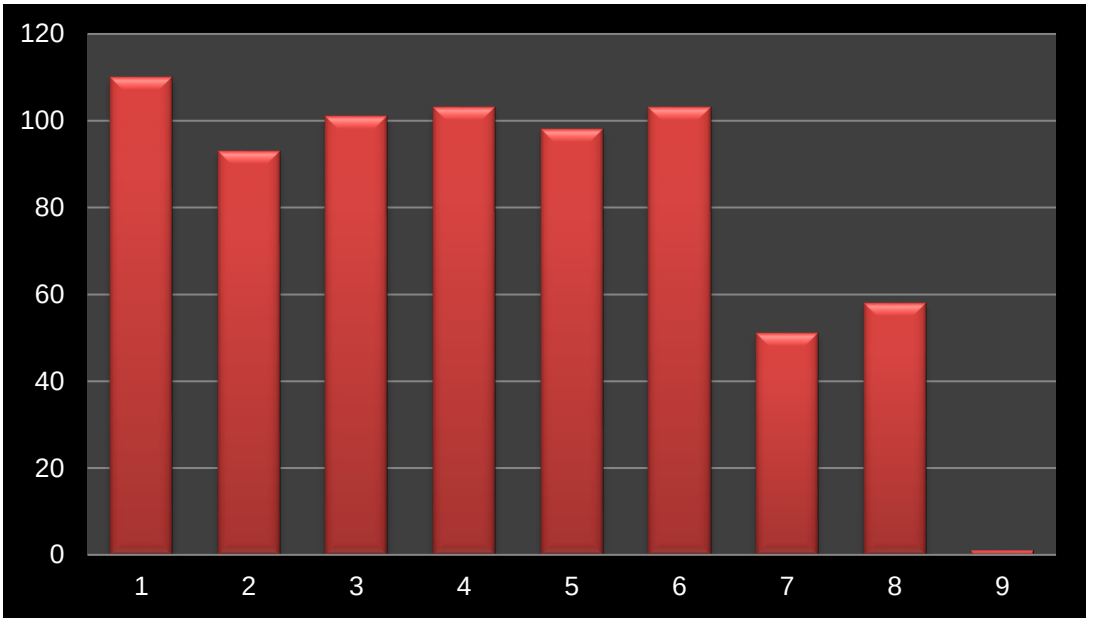
جدول ۲) درصد کشندگی مشتقات مختلف کورکومین بر علیه سلول‌های ورو (Vero Cells)						
مشتقات کورکومین	غلظت‌های مشتقات کورکومین (میکروگرم/ میلی لیتر) درصد کشندگی					
	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰	۶۰۰	۸۰۰
کورکومین ٪۷۰	۲/۶	۸	۱۴/۵	۱۷/۳۶	۲۴/۱۵	۳۳/۱
کورکومین ٪۹۰	۵/۱	۸	۱۲	۱۴/۲	۱۸/۴۰	۱۹
بیس دی متوکسی کورکومین	۲/۲	۵	۱۱/۲	۱۳/۴۱	۱۶/۴۰	۲۱
دی استیل کورکومین	۳/۵	۷	۸/۵	۱۲/۵۲	۱۷/۱۵	۲۰/۳
وانادیل دی کورکومین	۴/۷	۵/۲	۱۳/۳	۱۴/۲۹	۱۶/۴۰	۱۷
وانادیل دی استیل کورکومین	۹/۳	۹/۴	۱۸	۱۸/۶	۱۹/۴۰	۲۱
ایندیوم کورکومین	۳/۹	۹	۱۵/۵	۱۲/۳۶	۲۴/۱۵	۲۵/۳
گالیوم کورکومین	۱/۸	۱۰	۱۲/۷	۱۳/۶	۱۵/۴۰	۱۶

شاخص دیگری که برای نشان دادن اثر کشنده یا مهار کننده رشد میکروارگانیسم‌ها محاسبه می‌شود شاخص IC_{50} یا ۵۰ درصد کشندگی است. در این مطالعه مقادیر محاسبه شده IC_{50} برای ترکیبات کورکومین بر علیه *لیشمانیا ماژور* در جدول ۳ و نمودار ۱ آورده شده است. مقادیر IC_{50} برای ترکیبات کورکومین ۷۰ و ۹۰ درصد، بیس دی متوکسی کورکومین، استیل کورکومین، دی استیل کورکومین، وانادیل کورکومین، وانادیل دی استیل کورکومین، ایندیوم کورکومین و گالیوم کورکومین به ترتیب عبارتند از: ۱۱۰، ۹۳، ۱۰۱، ۱۰۳، ۹۸، ۱۰۳، ۵۱

و ۵۸ میکروگرم/ میلی‌لیتر (جدول ۳ و نمودار ۱).

جدول ۳) محاسبه شاخص‌های IC_{50}، CC_{50} و SI برای مشتقات کورکومین

مشتقات کورکومین	۵۰ درصد کشندگی بر علیه لیشمانیا (IC_{50}) (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	۵۰ درصد کشندگی بر علیه سلول ورو (CC_{50}) (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	شاخص انتخاب (SI)
کورکومین ٪۷۰	۱۱۰	>۸۰۰	>۷/۳
کورکومین ٪۹۰	۹۳	>۸۰۰	>۸/۶
بیس دی متوکسی کورکومین	۱۰۱	>۸۰۰	>۷/۹
دی استیل کورکومین	۱۰۳	>۸۰۰	>۷/۸
وانادیل دی کورکومین	۹۸	>۸۰۰	>۸/۲
وانادیل دی استیل کورکومین	۱۰۳	>۸۰۰	>۷/۸
ایندیوم کورکومین	۵۱	>۸۰۰	>۱۵/۷
گالیوم کورکومین	۵۸	>۸۰۰	>۱۳/۸



نمودار ۱) مقادیر IC_{50} (۵۰ درصد کشندگی) کورکومین و مشتقات کورکومین بر علیه لیشمانیا ماژور

Fig 1) IC50 values (50% lethality) of curcumin and curcumin derivatives against *leishmaniasis major*

۱-کورکومین ۷۰ درصد، **۲**_کورکومین **۹۰**درصد، **۳**_ بیس دی متوکسی کورکومین، **۴**_دی استیل کورکومین، **۵**_ وانادیل کورکومین، **۶**_ وانادیل دی استیل **۷**_ ایندیوم کورکومین، **۸**_گالیوم کورکومین، **۹**_ گلوکانتیم

بحث

مطالعات مختلف نشان می‌دهند که داروهای گیاهی به دلیل عوارض کم، قیمت ناچیز و دسترسی بالا می‌توانند در کنترل بسیاری از عفونت‌ها مورد استفاده قرار گیرند (۹). در سایه مطالعات سال‌های اخیر کورکومین توجه زیادی را بخاطر خواص فارماکولوژیکی و اثر ضدمیکروبی به خود جلب کرده است. گیاه تورمریک با نام علمی *Curcuma longa*، از دیرباز در طب سنتی چین و مطالعات انجام شده در اواخر قرن بیستم برای ارزیابی و تعیین مکانیسم اثر کورکومین بر روی

لیشمانیا، این فرضیه را که کورکومین اثر آپوپتوتیک و تخریب کننده DNA بر علیه لیشمانیا دارد تا حدودی تأیید کرد (۲۴).

نتایج مطالعه ما نشان داد که مشتقات کورکومین مورد بررسی با افزایش غلظت، کشندگی بیشتری بر ضدپروماستیگوت‌های لیشمانیا از خود نشان می‌دهند. این مشتقات از غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به بالا بتدریج و با شیب ملایمی کشندگی قابل توجه و افزاینده ای از خود نشان دادند، به نحوی که این کشندگی در غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به بالاترین حد خود رسید. اگر چه همه این مشتقات اثر کشنده قابل توجهی بر علیه لیشمانیا داشتند اما بر اساس یافته‌های ما مشتقات ایندیوم کورکومین و گالیوم کورکومین اثر کشنده‌تری داشته و با غلظت حداکثری یعنی ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر موجب مرگ ۱۰۰ درصدی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در محیط کشت شدند. نتایج حاصل از بررسی سمیت مشتقات کورکومین بر روی سلول‌های ورو یعنی شاخص CC_{50} یا ۵۰ درصد توکسی‌سیته سلولی نشان داد که این مشتقات حتی با حداکثر غلظت بکار رفته در این مطالعه، یعنی ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نیز موجب مرگ ۵۰ درصدی سلول‌ها نشدند که این خود بیانگر ایمن و بی‌خطر بودن مشتقات مذکور برای انسان است.

در این مطالعه مقادیر محاسبه شده IC_{50} برای ترکیبات، کورکومین ۷۰ درصد، کورکومین۹۰ درصد، بیس دی متوکسی کورکومین، استیل کورکومین، دی استیل کورکومین، وانادیل کورکومین، وانادیل دی استیل کورکومین، ایندیوم کورکومین و گالیوم کورکومین به ترتیب عبارتند از: ۱۱۰، ۹۳، ۱۰۱، ۱۰۳، ۹۸، ۱۰۳، ۵۱ و ۵۸ میکروگرم/ میلی‌لیتر بودند. مقادیر این مشتقات که موجب مرگ ۵۰ درصد از پروماستیگوت‌های لیشمانیا در محیط کشت شده‌اند با مقادیری آن‌ها که موجب ۵۰ درصد کشندگی بر علیه سلول‌های ورو باشد فاصله زیادی داشته به نحوی که در مورد ایندیوم کورکومین و گالیوم کورکومین این فاصله به‌ترتیب به ۱۳ و ۱۵ برابر هم می‌رسد.

نتایج نشان می‌دهند که اثر کشنده تمام مشتقات کورکومین بر علیه سلول‌های ورو ناچیز بوده و فاصله دوز کشنده آن‌ها بر علیه لیشمانیا با دوز کشنده بر علیه سلول ورو قابل توجه بوده و این خود بیانگر بی‌خطر بودن این ترکیبات برای سلول‌های پستاندار است. حداکثر کشندگی این مشتقات با بالاترین غلظت یعنی ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عدد ۳۳ درصد است، لذا هیچکدام از این مشتقات حتی با حداکثر غلظت نیز ۵۰ درصد کشندگی بر علیه سلول ورو از خود نشان ندادند. در اینگونه مطالعات که ترکیبات مورد مطالعه با حداکثر غلظت نیز ۵۰ درصد کشندگی ندارند، درصدهای کشندگی یا سمیت سلولی یا (CC_{50}) را به‌صورت اعداد دامنه‌دار مثل نشان می‌دهند. چون حداکثر غلظت مورد استفاده ما در این مطالعه ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده و با این غلظت هیچکدام از ترکیبات ۵۰ درصد کشندگی بر علیه سلول‌های ورو نداشته‌اند، لذا شاخص CC_{50} به‌صورت ۸۰۰< میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه می‌شود. شاخص اطمینان بخش SI یا شاخص انتخاب، میزان ایمن بودن ترکیبات مورد مطالعه برای سلول پستاندار و انسان را مشخص می‌کند که از تقسیم CC_{50} بر IC_{50} به‌دست می‌آید. خوشبختانه مقادیر شاخص SI برای همه ترکیبات بین "بزرگ‌تر از ۷ تا بزرگ‌تر از ۱۵ است"، یعنی فاصله بین دوز کشنده این ترکیبات برای لیشمانیا و دوز کشنده برای سلول پستاندار بیش از ۱۵ برابر است، البته همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می شود ایندیوم کورکومین با SI معادل ۱۵/۷< و گالیوم

کورکومین با SI معادل ۱۳/۸< کشنده‌ترین ترکیبات بر علیه *لیشمانیا ماژور* و در عین حال ایمن‌ترین این ترکیبات برای سلول‌های پستاندار هستند.

مطالعات سایر محققان در سال‌های اخیر نیز نشان می دهد که مشتقات و آنالوگ‌های مختلف تهیه شده از کورکومین بر علیه میکروارگانیسم‌ها و سلول‌های سرطانی معمولاً دارای طیفی از اثرات مختلف بوده که در اکثر این مطالعات معمولاً مشتقات کورکومین مؤثرتر از خود کورکومین دیده شده‌اند.

راسموسن و همکاران (Rasmussen & et al)، اثر کورکومین، دمتوکسی کورکومین و بیس دمتوکسی کورکومین را بر روی پلاسمودیوم فالسیپاروم و لیشمانیا ماژور بررسی نموده و مقادیر مورد نیاز از این ترکیبات برای ۵۰ درصد کشندگی (IC_{50}) بر علیه *پلاسمودیوم فالسیپاروم* را به‌ترتیب ۳، ۴/۲ و ۳/۵ میکروگرم در میلی لیتر و بر علیه *لیشمانیا ماژور* به‌ترتیب ۲۱/۵، ۱۴/۱ و ۷/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر برآورد کرده‌اند که بیانگر تأثیر قابل توجه این ترکیبات است (۲۵). گومس و همکاران (Gomes & et al)، و همکاران، در مطالعه‌ای برای ساخت ترکیب ضد لیشمانیا و با سمیت پایین، ۱۰ مشتق مختلف از کورکومین را سنتز و بر روی پروماستیگوت‌های *لیشمانیا آمازوننسیس* بررسی کردند، نتایج نشان داد که ترکیب 1,7-bis-(4-propargyl-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione ده برابر مؤثرتر و در عین حال دارای سمیت کمتری نسبت به کورکومین خالص بوده است (۲۶). در مطالعه سالیهین و همکاران (Saleheen & et al)، نیز اثر کورکومین بر علیه *لیشمانیا اینفانتوم* و *لیشمانیا تروپیکا* را بررسی و نشان داد ند که مقدار لازم از کورکومین برای ۵۰ درصد کشندگی (IC_{50}) بر علیه پروماستیگوت‌های هر دو گونه لیشمانیا معادل ۳/۵ میکرومول بوده است، هر چند مقادیر و غلظت‌های مؤثر مشتقات کورکومین برای ۵۰ درصد کشندگی بر علیه گونه‌های مختلف *لیشمانیا* در مطالعات محققان فوق با مقادیر به‌دست آمده در مطالعه ما متفاوت و اغلب پائین‌ترند، ولی مقادیر IC_{50} محاسبه شده در مطالعه ما نیز قابل توجه بوده و مثلاً مقدار ایندیوم کورکومین لازم برای حذف ۵۰ درصدی *لیشمانیا ماژور* اگر چه ۵۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر است ولی فاصله دوز کشنده آن بر علیه لیشمانیا با دوز کشنده برای سلول‌های پستاندار قابل توجه بوده به نحوی که SI محاسبه شده ۱۵/۷ است، یعنی چند برابر این دوز کشنده بر علیه لیشمانیا برای سلول پستاندار بی‌خطر و فاقد توکسی‌سیته است (۲۷ و ۲۸).

در مطالعه چانگتام و همکاران (Changtam & et al)، اثر ۳ ترکیب کورکومین، دی متوکسی کورکومین و بیس دی متوکسی کورکومین بر روی گونه‌های مختلف لیشمانیا و *تریپانوزوما بروسه‌ای* بررسی و دریافتند که مقادیر لازم از این ترکیبات برای کشندگی ۵۰ درصدی این تک یاخته‌ها به‌ترتیب عبارت بودند از ۲/۵، ۴/۶ و ۷/۷ میکرومول، ضمناً بررسی اثر سمی این ترکیبات بر روی سلول‌های کلیه جنین انسان (HEK) نیز نشان داد که ترکیبات مذکور برای سلول‌های پستاندار بی‌خطر و ایمن هستند (۲۹).

در مطالعه جهانگشایی و همکاران (Jahangoshaei & et al)، به بررسی اثر گالیوم کورکومین و گالیوم دی استیل کورکومین بر روی سلول های سرطانی طحال، سرطان سینه و سرطان پروستات پرداخته‌اند، دریافتند که این ترکیبات از طریق باند شدن با آنزیم HRP (horseradish peroxidase) باعث افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی و پراکسیدازی آن شده و از این طریق موجب اثر کشنده بر روی این سلول‌های سرطانی می‌شوند، در این مطالعه همچنین اثر ترکیبات

فوق بر روی اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس ارئوس نیز بررسی و مشخص شد که فعالیت ضدباکتریایی آن‌ها نیز قابل توجه است (۳۰). نتایج این مطالعات بیانگر این واقعیت است که مشتقات کورکومین بخصوص مشتقاتی که با یون‌های فلزی سنتز می‌شوند، در مقابله با میکروارگانیسم‌های مختلف و سلول‌های سرطانی مؤثر و امیدبخش بوده و از ترکیب اصلی کورکومین نیز مؤثرتر عمل می‌کنند، این یافته‌ها هر کدام به نحوی در راستای یافته‌های مطالعه حاضر بوده و مؤید نتایج ما هستند.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان داد که همه ترکیبات ۸ گانه کورکومین دارای اثر کشنده قابل توجهی بر علیه *لیشمانیا ماژور* هستند، اما مشتقات فلزی کورکومین یعنی ایندیوم کورکومین و گالیوم کورکومین با IC50 به‌ترتیب معادل ۵۱ و ۵۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و اثر سمی بسیار ناچیز بر علیه سلول‌های ورو و شاخص انتخاب (SI) به‌ترتیب معادل ۱۵/۷< و ۱۳/۸< مؤثرترین مشتقات کورکومین بر علیه *لیشمانیا ماژور* هستند و این اثر کشنده بالا در کنار ایمن و بی‌خطر بودن آن‌ها برای سلول‌های پستاندار می‌طلبد که در مطالعات بعدی مکانیسم اثر مشتقات مذکور مورد بررسی قرار گیرد.

سپاس و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بوشهر انجام شده است، لذا از مسئولین محترم این معاونت و کارکنان مرکز تحقیقات طب گرمسیری و عفونی خلیج‌فارس تقدیر و تشکر می‌شود.
از آقای دکتر خسرو محمدی استاد دانشگاه خلیج‌فارس بوشهر بخاطر مساعدت علمی تقدیر و تشکر می‌شود.
این پژوهش با حمایت‌های مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بوشهر انجام شده است.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1.Singh N, Kumar M, Singh RK. Leishmaniasis: Current Status Of Available Drugs And New Potential Drug Targets. Asian Pac J Trop Med 2012; 5(6): 485-97.
2.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(24): 3306-8.
3.Pinto JG, Fontana LC, De Oliveira MA, et al. In Vitro Evaluation Of Photodynamic Therapy Using Curcumin On Leishmania Major And Leishmania Braziliensis. Lasers Med Sci 2016; 31(5): 883-90.
4.Alvar J, Vélez ID, Bern C, et al. Leishmaniasis Worldwide And Global Estimates Of Its Incidence. PloS One 2012; 7(5): e35671.
5.Aguilar-Torrentera F, Carlier Y. Immunological Factors Governing Resistance And Susceptibility Of Mice To Leishmania Major Infection. Rev Latinoam Microbiol 2001; 43(3): 135-42.
6.Rojas R, Valderrama L, Valderrama M, et al. Resistance To Antimony And Treatment Failure In Human Leishmania (Viannia) Infection. J Infect Dis 2006; 193(10): 1375-83.
7.Ahmad Emami S, Sahebkar A, Javadi B. Paresthesia: A Review Of Its Definition, Etiology And Treatments In View Of The

Traditional Medicine. Curr Pharm Des 2016; 22(3): 321-7.
8.Al-Haj NA, Mashan NI, Shamsudin MN, et al. Antibacterial Activity In Marine Algae Eucheuma Denticulatum Against Staphylococcus Aureus And Streptococcus Pyogenes. Res J Biol Sci 2009; 4(4): 519-24.
9.Fouladvand M, Barazesh A, Tahmasebi R, et al. Lethal Effect Of Various Derivatives Of Curcumin On Trichomonas Vaginalis In Vitro. Iran South Med J 2018; 21(2): 116-24. (Persian)
10.Perez-Arriaga L, Mendoza-Magana ML, Cortes-Zarate R, et al. Cytotoxic Effect Of Curcumin On Giardia Lamblia Trophozoites. Acta Trop 2006; 98(2): 152-61.
11.Khalafalla RE, Müller U, Shahiduzzaman MD, et al. Effects Of Curcumin (Diferuloylmethane) On Eimeria Tenella Sporozoites In Vitro. Parasitol Res 2011; 108(4): 879-86.
12.Mimche PN, Taramelli D, Vivas L. The Plant-Based Immunomodulator Curcumin As A Potential Candidate For The Development Of An Adjunctive Therapy For Cerebral Malaria. Malar J 2011; 10(Suppl 1): S10.
13.Shahiduzzaman M, Dyachenko V, Khalafalla RE, et al. Effects Of Curcumin On Cryptosporidium Parvum In Vitro. Parasitol Res 2009; 105(4): 1155-61.
14.Koide T, Nose M, Ogihara Y, et al. Leishmanicidal Effect Of Curcumin In Vitro. Biol Pharm Bull 2002; 25(1): 131-3.
15.Allam G. Immunomodulatory Effects Of Curcumin Treatment On Murine Schistosomiasis Mansoni. Immunobiology 2009; 214(8): 712-27.
16.Barthelemy S, Vergnes L, Moynier M, et al. Curcumin And Curcumin Derivatives Inhibit Tat-Mediated Transactivation Of Type 1 Human Immunodeficiency Virus Long Terminal Repeat. Res Virol 1998; 149(1): 43-52.
17.Chainani-Wu N. Safety And Anti-Inflammatory Activity Of Curcumin: A Component Of Tumeric (Curcuma Longa). J Altern Complement Med 2003; 9(1): 161-8.
18.Wei QY, Chen WF, Zhou B, et al. Inhibition Of Lipid Peroxidation And Protein Oxidation In Rat Liver Mitochondria By Curcumin And Its Analogues. Biochim Biophys Acta 2006; 1760(1): 70-7.
19.Mohammadi K, Thompson KH, Patrick BO, et al. Synthesis And Characterization Of Dual Function Vanadyl, Gallium And Indium Curcumin Complexes For Medicinal Applications. J Inorg Biochem 2005; 99(11): 2217-25.
20.Liang G, Yang S, Jiang L, et al. Synthesis And Anti-Bacterial Properties Of Mono-Carbonyl Analogues Of Curcumin. Chem Pharm Bull 2008; 56(2): 162-7.
21.Dubey SK, Sharma AK, Narain U, et al. Design, Synthesis And Characterization Of Some Bioactive Conjugates Of Curcumin With Glycine, Glutamic Acid, Valine And Demethylenated Piperic Acid And Study Of Their Antimicrobial And Antiproliferative Properties. Eur J Med Chem 2008; 43(9): 1837-46.
22.Mwololo SW, Mutiso JM, Macharia JC, et al. In Vitro Activity And In Vivo Efficacy Of A Combination Therapy Of Diminazene And Chloroquine Against Murine Visceral Leishmaniasis. J Biomed Res 2015; 29(3): 214-23.
23.Mahmoudvand H, Sepahvand P, Jahanbakhsh S, et al. Evaluation of the Antileishmanial and Cytotoxic Effects of Various Extracts of Garlic (Allium Sativum) on Leishmania Tropica. J Parasit Dis 2016; 40(2): 423-6.
24.Chan MM, Adapala NS, Fong D. Curcumin Overcomes The Inhibitory Effect Of Nitric Oxide On Leishmania. Parasitol Res 2005; 96(1): 49-56.
25.Rasmussen HB, Christensen SB, Kvist LP, et al. A Simple And Efficient Separation Of The Curcumins, The Antiprotozoal Constituents Of Curcuma Longa. Planta Med 2000; 66(4): 396-8.
26.Gomes DC, Alegrio LV, De Lima ME, et al. Synthetic Derivatives Of Curcumin And Their Activity Against Leishmania Amazonensis. Arzneimittelforschung 2002; 52(2): 120-4.

27.Saleheen D, Ali SA, Ashfaq K, et al. Latent Activity Of Curcumin Against Leishmaniasis In Vitro. Biol Pharm Bull 2002; 25(3): 386-9.
28.Chauhan IS, Rao GS, Shankar J, et al. Chemoprevention Of Leishmaniasis: In-Vitro Antiparasitic Activity Of Dibenzalacetone, A Synthetic Curcumin Analog Leads To Apoptotic Cell Death In Leishmania Donovani. Parasitol Int 2018; 67(5): 627-36.
29.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(3): 941-56.
30.Jahangoshaei P, Hassani L, Mohammadi F, et al. Investigating The Effect Of Gallium Curcumin And Gallium Diacetylcurcumin Complexes On The Structure, Function And Oxidative Stability Of The Peroxidase Enzyme And Their Anticancer And Antibacterial Activities. J Biol Inorg Chem 2015; 20(7): 1135-46.

Original Article

Evaluation of Lethal Effect of Curcumin and its Derivatives Against Leishmania Major In Vitro

MA. Fouladvand (PhD)[1*], S. Khorami (MSc)[2], B. Naeimi (PhD)[2], S. Fotouhi (PhD)[3], Kh. Mohammadi (PhD)[4]

[1] Department of Microbiology and Parasitology, School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran
[2] Department of Laboratory Sciences, School of Paramedicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran
[3] Department of Veterinary Parasitology, School of Veterinary, Bahonar University, Kerman, Iran
[4] Department of Chemistry, School of Sciences, Persian Gulf University, Bushehr, Iran

(Received 13 Feb, 2019 Accepted 15 May, 2020)

Abstract

Background: Leishmania major is transmitted by sandflies of the genus Phobotomus and causes cutaneous lesions in humans. Curcumin is made from turmeric and various derivatives is derived from it. In the present study the effect of curcumin and it's derivatives on Leishmania major in vitro was investigated.

Materials and Methods: Curcumin 70% and 90% purity and it' derivatives such as s , BDMC base methoxy curcumin, diacetyl curcumin DAC, vanadyl curcumin VO (CUR) 2, vanadyl diacetyl curcumin VO (DAC) 2, indium curcumin In(CUR)3 and Ga (CUR) 3 preparation. Curcumin derivatives were synthesized and different concentrations of 500 to 800 µg/ ml were prepared in glycerin. 106 Leishmania major promastigotes added to each well of 96 well plate and 100 µL of each curcumin derivative added and stored at 25 ° C for 24 hours. Assay of the lethality of the compounds against Leishmania major and evaluation of their toxic effects on (vero) cells were evaluated using MTT assay.

Results: Lethal effect of curcumin and it's derivatives against Leishmania, increased with increasing concentration. Anti-leishmanial index (IC_{50}) of 70% and 90% curcumin compounds, (BDMC) bis methoxy curcumin, Diacetyl curcumin (DAC), vanadyl curcumin VO (CUR)2, vanadyl diacetyl curcumin VO (DAC)2, indium curcumin In (CUR)3, Gallium Curcumin Ga (CUR)3 compounds were 110, 93, 101, 103, 98, 103, 51 and 58 µg / ml and the lethal effect of these compounds against (vero) cells were 33.1%, 19%, 21%, 20.3%, 17%, 21%, 25.3%, 16%, respectively.

Conclusion: Gallium curcumin and indium curcumin, compared to curcumin and other derivatives, exhibited the highest anti-leishmanial effect and were the safest derivatives of curcumin for mammalian cells.

Keywords: *Leishmania major*, Curcumin, MTT, Vero.

©Iran South Med J.All right sreserved

Cite this article as: Fouladvand MA, Khorami S, Naeimi B, Fotouhi S, Mohammadi Kh. Evaluation of Lethal Effect of Curcumin and its Derivatives Against Leishmania Major In Vitro. Iran South Med J 2020; 23(2): 153-164

Copyright © 2020 Fouladvand, et al This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

[*]*Address for correspondence:* Department of Microbiology and Parasitology, School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran. Email: mfooladvand39@yahoo.com
*ORCID: 0000-0001-7302-6840