مهار پلیمریزاسیون ماده هِم (Heme)، مکانیسم اثر ضد مالاریایی اختصاصی *Phlomis caucasica* Rech.f.

سمیه اسماعیلی[۱]، محبوبه ایرانی[۲*]، حمید موذنی[۳]، محمود مصدق[۴]

۱- گروه داروسازی سنتی، دانشکده طب سنتی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲- مرکز تحقیقات طب سنتی و مفردات پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳- گروه گیاهشناسی، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
۴- گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
*آدرس مکاتبه: تهران، خیابان ولیعصر، خیابان شهید عباسپور، پلاک ۱۹، کد پستی ۱۴۳۴۸-۷۵۴۵۱
تلفن و نمابر: ۸۸۷۷۶۱۶۸ (۰۲۱)
پست الکترونیک: m.irani@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۶/۲۷ **تاریخ پذیرش:** ۹۷/۹/۱۲ doi: 10.29252/jmp.4.72.S12.103

چکیده

مقدمه: مالاریا یکی از مهم‌ترین بیماری‌های انگلی در انسان است که روزانه منجر به مرگ ۱۲۰۰ نفر می‌شود. این بیماری توسط پلاسمودیوم ایجاد می‌شود. انگل پلاسمودیوم، هموگلوبین موجود در گلبول قرمز را به هِم (Heme) آزاد و اسیدهای آمینه، هیدرولیز می‌کند. این انگل برای سمیت‌زدایی هِم آزاد تولید شده، مجهز به سیستم اختصاصی دفع سمیت هِم می‌باشد که مهم‌ترین مکانیسم، پلیمریزه شدن هِم می‌باشد. لذا پی بردن به ترکیبات مهارکننده‌ی پلیمریزاسیون هِم، دارای اهمیت بسزایی در کشف ترکیبات ضد مالاریا می‌باشد.

هدف: بررسی مکانیسم مهار پلیمریزاسیون هِم برخی از گیاهان خانواده نعناییان با پتانسیل اثر ضدمالاریایی هدف کلی این تحقیق می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه، هفت گیاه از خانواده نعناییان با متانول بوسیله روش ماسراسیون عصاره‌گیری شدند. برای بررسی فعالیت مهار پلیمریزاسیون هِم عصاره‌های گیاهی از روش ITHD (Inhibition Test of Heme Detoxification) استفاده شد. هِمین کلراید: تویین ۲۰ و نمونه‌ها با نسبت ۹:۹:۲ در پلیت ۹۶ چاهکی مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۰ °C انکوبه شدند. جذب محلول‌ها با دستگاه الایزاریدر در طول موج ۴۰۵ nm بررسی و درصد مهار پلیمریزاسیون هِم آنها محاسبه شد. از کلروکین دی فسفات به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. گیاهان مؤثر با روش ماسراسیون توسط حلال‌های اتردوپترول، کلروفرم، متانول، متانول ۷۰: آب ۳۰ (هیدروالکلی ۷۰٪) و آب فرکشنه و اثر مهار هم‌زدایی آنها نیز مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: عصاره متانولی *Marrubium astracanicum* Jacq. و *Phlomis caucasica* Rech.f. قادر به مهار پلیمریزاسیون هِم به ترتیب ۴۰ و ۳۵٪ می‌باشند. بررسی فرکشن‌ها نشان داد فرکشن آبی *P. caucasica* به طور کامل (۱۰۰٪) پلیمریزاسیون هِم را مهار می‌کند.

نتیجه‌گیری: فرکشن آبی گیاه گوش بره قفقازی (*P. caucasica*) با مکانیسم اختصاصی مهار هم‌زدایی، برای رسیدن به ترکیبات مهارکننده‌ی پلیمریزاسیون ماده هم در روند کشف داروی ضدمالاریا معرفی می‌شود.

گل‌واژگان: *Phlomis caucasica*، گوش بره قفقازی، مالاریا، نعناییان، هِم زدایی

مقدمه

بیماری مالاریا یکی از قدیمی‌ترین بیماری‌های شناخته شده انسانی بوده که توسط انگل پلاسمودیوم ایجاد می‌شود. از میان گونه‌های بیماری‌زای انسانی ابتلا به گونه فالسیپاروم نسبت به سایرین با خطر مرگ و میر بالاتری همراه است. علائم این بیماری شامل تب و لرز، سردرد، درد عضلانی، خستگی، تهوع و استفراغ می‌باشد که در موارد شدید منجر به مرگ بیمار می شود [۱]. به طوری که یکی از علت‌های عمده مرگ ناشی از عفونت در جهان، مالاریا می‌باشد. طبق آخرین گزارش منتشر شده از سازمان بهداشت جهانی (WHO)، ۲۱۶ میلیون موارد ابتلا به مالاریا (۵ میلیون مورد بیشتر از سال قبل) و ۴۴۵ هزار مرگ و میر ناشی از بیماری مالاریا در سال ۲۰۱۶ در ۹۱ کشور گزارش شده است [۲].

ایران نیز یکی از مناطق مالاریاخیز در جهان به شمار می رود و علی‌رغم کنترل‌های انجام شده، هنوز هم به عنوان مشکل حاد سلامتی در نواحی جنوب و جنوب شرقی ایران مطرح می‌باشد [۳].

برای درمان مالاریا، داروهایی برگرفته از منابع گیاهی از قبیل کلروکین، کینین، و آرتمیزینین استفاده می‌شود. لیکن ایجاد مقاومت دارویی منجر به ایجاد چالش‌هایی در مبارزه با این بیماری شده است. در کشور اتیوپی به دنبال پیدایش مقاومت نسبت به کلروکین، درمان به سولفادوکسین-پریمتامین تغییر یافت ولی در مدت کوتاهی، مقاومت انگل به این دارو نیز گزارش شد؛ بررسی‌های انجام گرفته شکست درمانی مالاریای فالسیپاروم با این دارو را تا ۳۲٪ گزارش نمودند [۴]. در کشور ایران نیز گزارش‌هایی از افزایش مقاومت پلاسمودیوم فالسیپاروم به کلروکین ارائه شده است. ادریسیان و همکاران در مطالعات خود موارد متعددی از مالاریای فالسیپاروم مقاوم به کلروکین را در ایران گزارش کردند [۶، ۵]. ناطق‌پور و همکاران نیز در سال ۲۰۰۹، حساسیت پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم فالسیپاروم را به داروی کلروکین در مبتلایان شهرستان بندرعباس بررسی کردند [۷]. این مقاومت‌ها سبب بروز مشکلاتی در درمان و کنترل بیماری شده لذا تحقیقات جهت دستیابی به داروی مؤثر جدید برای این بیماری به طور گسترده‌ای ادامه دارد.

انگل مالاریا، هموگلوبین موجود در گلبول قرمز را به هِم (Heme) آزاد و گلوبین دناتوره، هیدرولیز می‌کند. گلوبین دناتوره توسط آنزیم‌های متعددی به اسیدهای امینه آزاد هیدرولیز شده و درنهایت این اسید امینه‌های آزاد شده توسط انگل برای سنتز پروتئین موردنیاز، مصرف می‌شوند [۸]. هِم آزاد برای انگل بسیار سمی است و ممکن است به علت ایجاد واکنش اکسیداتیوی به مرگ انگل منتهی شود [۱۰، ۹]. انگل مالاریا برای سمیت‌زدایی هِم آزاد، مجهز به سیستم اختصاصی دفع سمیت هِم می‌باشد. مهمترین مکانیسم سم‌زدایی، پلیمریزه شدن هِم به کریستال نامحلول در آب هموزوئین است که رنگدانه مالاریا نیز نامیده می‌شود [۱۲، ۱۱].

ترکیبات مهارکننده‌ی تشکیل هموزوئین، با افزایش مقدار هِم سبب مرگ انگل مالاریا می‌شوند. امروزه مشخص شده است که انواع مختلفی از گروه‌های دارویی از جمله کینولین‌ها و آزول‌ها هستند که مکانیسم فعالیت ضد مالاریایی آنها از طریق مهار تولید هموزوئین می‌باشد [۱۳]. لذا برای پی بردن به ترکیبات ضد مالاریا که دارای چنین مکانیسمی می‌باشند می‌توان از روش بررسی مهار پلیمریزاسیون هِم استفاده نمود. در روش ITHD (Inhibition Test of Heme Detoxification) ماده همین کلراید به عنوان ماده اولیه تحت شرایط خاص آزمایشگاهی تبدیل به ماده پلیمری بتاهماتین می‌شود که از لحاظ ساختاری مشابه هموزوئین تشکیل شده در انگل می‌باشد.

با توجه به این که گیاهان دارویی از مهم‌ترین منابع طبیعی تأمین داروی بشر در طول نسل‌ها بوده‌اند و همچنین سابقه استفاده از گیاهان دارویی در بیماری مالاریا، ضروری به نظر می‌رسد از این منابع ارزشمند در جهت کشف داروهای جدید ضد مالاریا سود ببریم. خانواده نعناییان (Lamiaceae) به عنوان یکی از خانواده‌های گیاهی بزرگ دنیا از دیرباز به علت داشتن جنس‌ها و گونه‌های دارویی و خوراکی از اهمیت و جایگاه ویژه‌ای برخوردار بوده است. پژوهش‌های چندی بر روی بعضی گونه‌های خانواده نعناییان از لحاظ اثر

ضدمالاریایی صورت گرفته است، اما گزارش بررسی مکانیسم اثر آنها به ندرت انجام شده است.

در این تحقیق بعضی از گیاهان خانواده نعناییان انتخاب و مکانیسم اثر ضد مالاریایی آنها با استفاده از روش ITHD که روشی غیر آنزیمی می‌باشد، بررسی شد.

مواد و روش‌ها

با توجه به امکان جمع آوری و در دسترس بودن گیاهان خانواده نعناییان، هفت گیاه شامل:

Lamium album L.
Marrubium astracanicum Jacq.
Nepeta transcaucasica Grossh.
Phlomis caucasica Rech.f.
Salvia grossheimi Sosn.
Salvia sahendica Boiss. & Buhse
Scutellaria virens Boiss. & Kotschy

توسط کارشناسان بخش هرباریوم مرکز تحقیقات طب سنتی و مفردات پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی جمع‌آوری و شناسایی شدند. گیاهان در دمای محیط و سایه خشک و سپس آسیاب شدند. ۱۰ گرم از پودر خشک هر گیاه با استفاده از ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول با روش ماسراسیون عصاره‌گیری شدند. عصاره های به دست آمده با استفاده از کاغذ صافی از پودر گیاهان جدا شده و پس از تغلیظ با دستگاه تقطیر در خلا، در زیر هود خشک شدند [۱۴].

برای بررسی فعالیت مهار پلیمریزاسیون هِم عصاره‌های گیاهی از روش ITHD استفاده شد [۱۵]. ابتدا استوک هِمین کلراید (Alfa Aesar) به عنوان سوبسترا تهیه و با افزودن بافر سدیم استات یک مولار (pH=۴/۸) به غلظت ۶۰ µg/mL رسید. جهت تهیه بافر سدیم استات از استیک اسید و سدیم استات خریداری شده از شرکت Merck استفاده شد. ۹۰ میکرولیتر استوک هِمین کلراید با ۹۰ میکرولیتر محلول توین ۲۰ (Merck) با غلظت ۰/۰۱۲ g/L و ۲۰ میکرولیتر از نمونه موردنظر (با غلظت نهایی ۲۰۰ µg/mL) در پلیت ۹۶ چاهکی با ۳ تکرار مخلوط شدند. از حلال به عنوان کنترل منفی و از کلروکین دی فسفات (Sigma- Aldrich) با غلظت ۱۰ µg/mL به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور (Incucell) با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت، جذب محلول‌ها با دستگاه الایزاریدر (Epoch- Biotek) در طول موج ۴۰۵ nm بررسی شدند. سپس درصد مهار پلیمریزاسیون هِم با فرمول زیر محاسبه شد:

$$\frac{(A_S-A_{SC}) - (A_B- A_{BC})}{(A_B- A_{BC})} \times ۱۰۰$$

A_S: میانگین جذب چاهک‌های نمونه دارای هِمین کلراید
A_{SC}: میانگین جذب چاهک‌های نمونه فاقد هِمین کلراید
A_B: میانگین جذب چاهک‌های حلال دارای هِمین کلراید
A_{BC}: میانگین جذب چاهک‌های حلال فاقد هِمین کلراید

گیاهان مؤثر در مهار هم زدایی به روش ماسراسیون به ترتیب با استفاده از حلال‌های اتردوپترول، کلروفرم، متانول، ۷۰ متانول: ۳۰ آب (هیدروالکلی) و آب فرکشنه شدند. برای این منظور به ۳۰ گرم از پودر خشک شده گیاهان دارای اثر مهار پلیمریزاسیون هِم، ۳۰۰ میلی‌لیتر اتردوپترول افزوده شد، مخلوط حاصل پس از ۲۴ ساعت صاف و حلال کلروفرم به باقیمانده خشک گیاه اضافه شد. این مراحل برای سایر حلال‌ها نیز به ترتیب قطبیت حلال انجام شد. فرکشن‌های اتردوپترول، کلروفرم و متانول پس از صاف شدن، توسط روتاری در دمای کمتر از ۴۰ °C تغلیظ و در زیر هود خشک شدند. فرکشن‌های هیدروالکلی و آبی، پس از جداسازی از باقیمانده گیاه و تغلیظ با روتاری، در فریزر منجمد و با استفاده از دستگاه فریز درایر خشک شدند [۱۶].

نتایج

درصد مهار پلیمریزاسیون هِم هشت نمونه مربوط به هفت گیاه منتخب از شش جنس خانواده نعناییان به همراه کلرکین دی فسفات به عنوان کنترل مثبت مورد بررسی قرار گرفتند (جدول شماره ۱).

از آنجا که درصد مهار هم زدایی اندام هوایی *M. astracanicum* و *P. caucasica* بیشتر از سایر نمونه‌ها بود، دو گیاه فوق برای فرکشنه کردن انتخاب شدند.

نتایج بررسی ۵ فرکشن اتردوپترول، کلروفرم، متانول، هیدروالکلی ۷۰ درصد و آب که در جدول شماره ۲ آورده شده است نشان داد، فرکشن‌های آبی هر دو گیاه *M. astracanicum* و *P. caucasica* به ترتیب با درصد مهار ۸۳ و ۱۰۰ فرکشن‌های مؤثر دو گیاه می‌باشند.

جدول شماره ۱ – نتایج مهار پلیمریزاسیون هم عصاره های گیاهان منتخب از خانواده نعناییان

ردیف	نام علمی	نام فارسی [۱۷]	اندام مورد استفاده	شماره هرباریومی	محل جمع‌آوری	درصد مهار پلیمریزاسیون هم
۱	*Lamium album* L.	گزنه سفید	گیاه کامل	3864-TMRC	آذربایجان شرقی	۱۴
۲	*Marrubium astracanicum* Jacq.	فراسیون کوهستانی	اندام هوایی	2300-TMRC	کهگلویه و بویر احمد	۴۰
۳	*Marrubium astracanicum* Jacq.	فراسیون کوهستانی	گیاه کامل	3839-TMRC	آذربایجان شرقی	۰
۴	*Nepeta transcaucasica* Grossh.	–	گیاه کامل	3837-TMRC	آذربایجان شرقی	۱۸
۵	*Phlomis caucasica* Rech.f.	گوش بره قفقازی	اندام هوایی	1123-TMRC	آذربایجان غربی	۳۵
۶	*Salvia grossheimi* Sosn.	مریم گلی نخجوانی	گیاه کامل	3838-TMRC	آذربایجان شرقی	۱۲
۷	*Salvia sahendica* Boiss. & Buhse	مریم گلی سهندی	گیاه کامل	3827-TMRC	آذربایجان شرقی	۲۵
۸	*Scutellaria virens* Boiss. & Kotschy	–	اندام هوایی	3849-TMRC	آذربایجان شرقی	۱۳
۹	کلروکین دی فسفات					۱۰۰

جدول شماره ۲– نتایج مهار هم زدایی فرکشن‌های اندام هوایی *Marrubium astracanicum* و *Phlomis caucasica*

ردیف	نام علمی گیاه	اندام مورد استفاده	نام فرکشن	درصد مهار پلیمریزاسیون هم
۱	*Marrubium astracanicum* Jacq.	اندام هوایی	اتردوپترول	۱۸
			کلروفرم	۳۱
			متانول	۸
			هیدروالکلی ۷۰٪	۳۴
			آب	۸۳
۲	*Phlomis caucasica* Rech.f.	اندام هوایی	اتردوپترول	۳۰
			کلروفرم	۳۹
			متانول	۴
			هیدروالکلی ۷۰٪	۲۱
			آب	۱۰۰

بحث

در این پژوهش، فعالیت مهار پلیمریزاسیون هِم ۱۸ عصاره و فرکشن گیاهی حاصل از ۷ گیاه منتخب از خانواده نعناییان مورد ارزیابی قرار گرفت. اندام هوایی دو گیاه *M. astracanicum* و *P. caucasica* بیشتر از سایر گیاهان، قادر به مهار پلیمریزاسیون هِم بودند. بررسی‌های بیشتر نشان داد که فرکشن آبی این گیاهان می‌توانند با غلظت ۲۰۰ µg/mL هِم زدایی را مهار کنند، که با مقایسه با غلظت کلروکین دی فسفات ۱۰ µg/mL با مهار ۱۰۰ درصد، گیاه *P. caucasica* برای ادامه مطالعه کاندید مناسبی خواهد بود.

در مقایسه با سایر تحقیقات، تاکنون گزارشی از بررسی مکانیسم اثر ضدمالاریایی گیاهان منتخب وجود نداشت و فقط به بررسی اثر ضدمالاریایی گزارش شده است. Kirmizibekmez فعالیت آنتی مالاریایی و آنتی پروتوزوایی ۵ گیاه از خانواده نعناییان (*S. tomentosa*, *S. sclarea, S. dichroantha*, *N. nuda* subsp. nuda , *M. astracanicum* subsp. macrodon) را بر علیه ۴ پروتوزوآی انگلی شامل *Trypanosoma brucei rhodesiense, T. cruzi*, *Leishmania donovani, Plasmodium falciparum.* بررسی کردند. آنها نشان دادند تمامی عصاره‌های تام متانولی حداقل بر روی ۳ انگل، اثر داشتند. عصاره متانولی *M. astracanicum* یکی از دو گیاهی است که بیشترین فعالیت آنتی پلاسمودیالی را نشان داد [۱۷].

جنس *Marrubium* در طب سنتی، برای درمان تب مورد استفاده قرار گرفته است و در مطالعات مختلف اثر ضدپلاسمودیالی آن بررسی شده است [۱۹-۱۷]. این در حالی است که عصاره متانولی گونه *M. vulgare* با روش pLDH اثر قابل توجهی نشان نداده است [۱۹] و در مطالعه حاضر اثر اختصاصی گونه *M. astracanicum* با روش ITHD به اثبات رسید.

گیاه دیگری که در این مطالعه اثر قابل توجهی نشان داد و تاکنون گزارشی از آن یافت نشده است *P. caucasica* می باشد. اثر ضد پلاسمودیومی گونه‌های دیگری از این جنس شامل *P. brachyodon* [۲۰]، *P. kurdica* [۲۱]، *P. leucophracta* [۲۱]، *P. brunneogaleata* [۲۲]، *P. nissolii* [۲۳] گزارش شده است.

همان‌طور که در این تحقیق مشاهده شد، فرکشن آبی *P. caucasica* بالاترین درصد مهار را نشان داد که نتایج آن با اثر ضدمالاریایی عصاره آبی *P. nissolii* که توسط Ozbilgin و همکاران انجام شده است [۲۳] در یک راستا قرار دارد. استفاده از یک مرحله مقدماتی فرکشنه کردن می‌تواند ترکیبات مداخله‌گر در عصاره تام را حذف کند و منجر به نتایج دقیق‌تری شود. همان‌طور که Vargas و همکاران نیز گزارش کردند تهیه فرکشن با استفاده از یک مرحله خالص‌سازی (SPE= Solid Phase Extraction) عصاره‌ها می‌تواند منجر به افزایش اختصاصیت بیشتر روش بررسی مهار هم زدایی شود [۲۴].

با توجه به نتایج اولیه بررسی مکانیسم اثر ضد مالاریایی، به نظر می‌رسد سایر گیاهان مورد بررسی با این روش اثر قابل توجهی ندارند. این در حالی است که اثر ضد پلاسمودیومی جنس *Nepeta* [۲۵]، *Salvia* [۲۶] و *Scutellaria* [۲۷] گزارش شده است و بررسی سایر مکانیسم‌های اثر آنتی پلاسمودیالی آنها پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

طبق نتایج این تحقیق، اثر مهار هم زدایی اندام هوایی *P. caucasica* برای اولین بار گزارش شده و فرکشن آبی آن به عنوان فرکشن مؤثر معرفی می‌شود. بنابراین می‌توان از این فرکشن در تحقیقات آتی برای رسیدن به ترکیب یا ترکیبات مهارکننده‌ی هِم زدایی استفاده نمود. می‌توان پیش بینی نمود ترکیبات قطبی که در فرکشن آبی این گیاه وجود دارند از قبیل دو ترکیب استخراج شده گلیکوزید فلاوونی Luteolin 7-O-β-D-glucopyranoside, chrysoeriol 7-O-β-D-glucopyranoside با اثر ضد پلاسمودیومی [۲۸]، می‌توانند ترکیبات مؤثر با مکانیسم اختصاصی مهار پلیمریزاسیون هم باشند که نیاز به تحقیقات بیشتر دارد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که با حمایت‌های مالی خود (شماره

طرح ۱۶۳) ما را یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از زحمات سرکار خانم دکتر پیرانی که ما را در انجام این تحقیق یاری رساندند، قدردانی می‌شود.

منابع

1. Macdonald G. Harrison's Internal Medicine, 17th edition. - by A. S. Fauci, D. L. Kasper, D. L. Longo, E. Braunwald, S. L. Hauser, J. L. Jameson and J. Loscalzo. *Internal Medicine Journal.* 2008; 38 (12): 932-932.

2. WHO. Fact Sheet: World Malaria Report. World Health Organization; 2017 [cited 2018 Jun 13]. Available from: http://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2016/en/

3. Norouzinejad F, Ghaffari F, Raeisi A and norouzinejad A. Epidemiological status of malaria in Iran, 2011–2014. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2016; 9 (11): 1055-1061.

4. Kassa M, Sileshi M, Mohammed H, Taye G and Asfaw M. Development of resistance by *Plasmodium falciparum* to sulfadoxine/ pyrimethamine in Amhara Region, Northwestern Ethiopia. *Ethiop. Med. J.* 2005; 43 (3): 181-187.

5. Edrissian G, Afshar A, Kanani A, Satvatand M and Ghorbani M. Resistance of Plasmodium falciparum to chloroquine in south eastern Iran. *Medical J. the Islamic Republic of Iran.* 1987; 1 (1): 46-49.

6. Edrissian GH, Shahabi S, Pishva E, Hajseyed-Javadi J, Khaleghian B, Ghorbani M, Emadi A M, Afshar A and Saghari H. Imported cases of chloroquine-resistant falciparum malaria in Iran. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1986; 79 (2): 217-221.

7. Nateghpour MM, Edrissian Gh, Torabi A, Raesi A, Motevalli-Haghi H, Abed-Khojasteh N and Ghobakhlo N. Monitoring of Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum response to chloroquine in Bandar-Abbas district, Hormozgan province, Iran. *Tehran University Medical J.* 2009; 67 (3): 178-183.

8. Sherman IW. Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection. 1998, ASM Press.

9. Ryter SW and Tyrrell R M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 28 (2): 289-309.

10. Kumar S and Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicology Letters* 2005; 157 (3): 175-188.

11. Sullivan DJ, Gluzman IY and Goldberg DE. Plasmodium hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. *Science* 1996; 271 (5246): 219-222.

12. Francis SE, Sullivan DJ, and Goldberg DE. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Annu. Rev. Microbiol.* 1997; 51: 97-123.

13. Kumar S, Guha M, Choubey V, Maity P and Bandyopadhyay U. Antimalarial drugs inhibiting hemozoin (β-hematin) formation: A mechanistic update. *Life Sciences* 2007; 80 (9): 813-828.

14. Hajimehdipoor H, Esmaeili S, Shekarchi M, Emrarian T and Naghibi F. Investigation of some biologic activities of Swertia longifolia Boiss. *Res. Pharm. Sci.* 2013; 8 (4): 253-259.

15. Mosaddegh M, Irani M and Esmaeili S. Inhibition test of heme detoxification (ITHD) as an approach for detecting antimalarial agents in medicinal plants. *Research J. Pharmacognosy* 2018; 5 (1): 5-11.

16. Mosaddegh M, Esmaeili S, Naghibi F, Hamzeloo Moghadam M, Haeri A, Pirani A and Moazzeni H. Ethnomedical Survey and Cytotoxic

Activity of Medicinal Plant Extracts Used in Kohgiluyeh and Boyerahmad Province in Iran. *J. Herbs, Spices & Medicinal Plants* 2012; 18 (3): 211-221.

17. Kirmizibekmez H, Atay I, Kaiser M, Yesilada E and Tasdemir D. In vitro antiprotozoal activity of extracts of five Turkish Lamiaceae species. *Nat Prod. Commun.* 2011; 6 (11): 1697-1700.

18. Leporatti M and Ghedira K. Comparative analysis of medicinal plants used in traditional medicine in Italy and Tunisia. *J. Ethnobiology and Ethnomedicine.* 2009; 5 (1): 31.

19. Esmaeili S, Naghibi F, Mosaddegh M, Sahranavard S, Ghafari S and Abdullah N R. Screening of antiplasmodial properties among some traditionally used Iranian plants. *J. Ethnopharmacol*. 2009; 121 (3): 400-404.

20. Sathiyamoorthy P, Lugasi-Evgi H, Schlesinger P, Kedar I, Gopas J, Pollack Y and Golan-Goldhirsh A. Screening for Cytotoxic and Antimalarial Activities in Desert Plants of the Negev and Bedouin Market Plant Products. *Pharmaceutical Biol.* 2008; 37 (3): 188-195.

21. Tasdemir D, Brun R, Perozzo R and Donmez A. Evaluation of antiprotozoal and plasmodial enoyl-ACP reductase inhibition potential of turkish medicinal plants. *Phytother. Res.* 2005; 19 (2): 162-166.

22. Tripathi A K, Khan S I, Walker L A and Tekwani B L. Spectrophotometric determination of de novo hemozoin/β-hematin formation in an in vitro assay. *Analytical Biochem.* 2004; 325 (1): 85-91.

23. Ozbilgin A, Durmuskahya C, Kayalar H and Ostan I. Assessment of in vivo antimalarial activities of some selected medicinal plants from Turkey. *Parasitol. Res.* 2014; 113 (1): 165-173.

24. Vargas S, Ndjoko Ioset K, Hay A E, Ioset J R, Wittlin S and Hostettmann K. Screening medicinal plants for the detection of novel antimalarial products applying the inhibition of β-hematin formation. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2011; 56 (5): 880-886.

25. Dua V K, Verma G, Agarwal D D, Kaiser M and Brun R. Antiprotozoal activities of traditional medicinal plants from the Garhwal region of North West Himalaya, *India*. *J. Ethnopharmacol.* 2011; 136 (1): 123-128.

26. Ebrahimi S N, Zimmermann S, Zaugg J, Smiesko M, Brun R and Hamburger M. Abietane diterpenoids from Salvia sahendica--antiprotozoal activity and determination of their absolute configurations. *Planta Med.* 2013; 79 (2): 150-156.

27. Madani Mousavi S N, Delazar A, Nazemiyeh H and Khodaie L. Biological Activity and Phytochemical Study of Scutellaria platystegia. *Iran. J. Pharm. Res.* 2015; 14 (1): 215-223.

28. Kirmizibekmez H, Calis I, Perozzo R, Brun R, Donmez AA, Linden A, et al. Inhibiting activities of the secondary metabolites of Phlomis brunneogaleata against parasitic protozoa and plasmodial enoyl-ACP Reductase, a crucial enzyme in fatty acid biosynthesis. *Planta Med*. 2004;70 (8): 711–717.