

فصلنامه گیاهان دارویی

Journal homepage: www.jmp.irپژوهشکده گیاهان دارویی
جهاد دانشگاهی

مقاله تحقیقاتی

بررسی اثر عصاره هیدروالکلی ریشه‌ی شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) و گلیسیریزیک اسید بر پروماستیگوت و آماستیگوت لیثمانیا ماژور سویه ایران (MRHO/IR/75/ER) در شرایط *In vitro*

شیمای شیخی^۱، علی خامسی پور^۲، طیبه رجیبیان^۳، زهرا مجلل طباطبایی^۴، طوبی غضنفری^{۵*}

^۱ گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی شاهد، تهران، ایران

^۲ مرکز آموزش و پژوهش پوست و جذام دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

^۳ گروه زیست‌شناسی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

^۴ گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۵ مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی دانشگاه شاهد، تهران، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
گل‌واژگان:	مقدمه: لیثمانیوز جلدی (سالک) توسط گونه‌های مختلف لیثمانیا ایجاد می‌شود. ترکیبات پنج ظرفیتی آنتیموان به عنوان خط اول درمان سالک، همراه با محدودیت‌ها و عوارض جانبی می‌باشند. استفاده از داروهای گیاهی به دلیل سمیت و هزینه کمتر-کارایی و دسترسی بیشتر مورد توجه قرار دارند. هدف: هدف از این مطالعه بررسی اثر عصاره هیدروالکلی ریشه شیرین بیان و گلیسیریزیک اسید بر پروماستیگوت‌ها و آماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور می‌باشد. روش بررسی: عصاره هیدروالکلی ریشه شیرین بیان، گلیسیریزیک اسید یا گلوکانتیم در دوزهای مختلف همراه با پروماستیگوت لیثمانیا ماژور در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد در پلیت کشت سلول به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه و درصد بقا پروماستیگوت‌ها به روش MTT بررسی شد. سپس دوزهای مشخص از عصاره هیدروالکلی ریشه شیرین بیان، گلیسیریزیک اسید یا گلوکانتیم به کشت ماکروفاژهای آلوده به انگل لیثمانیا ماژور اضافه و بعد از ۲۴ ساعت میانگین تعداد آماستیگوت‌ها در ماکروفاژها محاسبه شد. نتایج: نتایج حاصل از درصد بقا پروماستیگوت و آماستیگوت لیثمانیا ماژور نشان داد که IC ₅₀ عصاره هیدروالکلی ریشه شیرین بیان، گلیسیریزیک اسید و گلوکانتیم بر پروماستیگوت به ترتیب ۰/۰۱۸ ± ۱۲۵۰، ۰/۰۱۷ ± ۳۰۰۰ و ۰/۰۴۳ ± ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بعد از ۲۴ ساعت و ۰/۰۱۶ ± ۱۷۰۰، ۰/۰۱۷ ± ۳۰۰۰ و ۰/۰۰۹ ± ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بعد از ۴۸ ساعت می‌باشد. همچنین IC ₅₀ عصاره ریشه، گلیسیریزیک اسید و گلوکانتیم بر آماستیگوت لیثمانیا ماژور به ترتیب ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر برآورد شد. نتیجه‌گیری: عصاره هیدروالکلی ریشه شیرین بیان و گلیسیریزیک اسید دارای اثر کشندگی بر پروماستیگوت و آماستیگوت لیثمانیا ماژور در شرایط برون‌تنی است.

مخفف‌ها: IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration)؛ MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

* نویسنده مسؤول: Tghazanfari@shahed.ac.ir

تاریخ دریافت: ۲۰ مرداد ۱۳۹۷؛ تاریخ دریافت اصلاحات: ۳۰ مهر ۱۳۹۷؛ تاریخ پذیرش: ۵ آذر ۱۳۹۷

doi: 10.29252/jmp.19.74.73

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

۱. مقدمه

لیشمانیوز بیماری عفونی است که تظاهرات بالینی مختلفی دارد و توسط گونه‌های مختلف جنس لیشمانیا ایجاد می‌شود و یک مشکل بهداشتی در مناطق اندمیک مثل ایران می‌باشد [۱]. فراوانی بروز بیماری حدود یک و نیم تا دو میلیون نفر سالیانه در جهان می‌باشد [۲].

اگرچه لیشمانیوز جلدی یک بیماری خود محدود شونده است، اما بهبودی ضایعه به زمان طولانی نیاز دارد [۳]. در حال حاضر درمان لیشمانیوز وابسته به ترکیبات پنج ظرفیتی آنتیموان که شامل دو ترکیب مگلو مین آنتیمونیات (گلوکانتیم) و سدیم‌استیوگلوکونیت (پتوستام) است، می‌باشد. استفاده از این داروها به دلیل کارایی کم، عوارض جانبی، القا مقاومت انگلی و هزینه بالا محدود شده است [۴-۶]. بنابراین تلاش برای یافتن داروهای جدید با کارایی بیشتر و سمیت کمتر لازم است. استفاده از محصولات گیاهی و فرآورده‌های مستخرج از آن به دلیل منابع متنوع، سمیت و هزینه کمتر، کارایی و دسترسی بیشتر، مورد توجه قرار دارند [۷].

در مطالعات گذشته اثرات ضدلیشمانیایی گیاهانی از جمله سیر (*Allium sativum*)، چای سبز (*Camellia sinensis*)، سیاهدانه (*Nigella sativa*)، آلوئه‌ورا (*Aloe vera*)، حنا (*Lawsonia inermis*)، درمنه (*Artemisia sieberi*)، آویشن (*Thymus vulgaris*) و سایر گیاهان بررسی شده است [۸] و نتایج آنها نشان داد که عصاره آبی سیر منجر به مرگ و آلکسین مستخرج از آن منجر به مهار رشد پروماستیگوت لیشمانیا ماژور [۹]، عصاره متانولی چای سبز منجر به مهار پروماستیگوت لیشمانیا ماژور در مقایسه با گلوکانتیم [۱۰]، اسانس و عصاره متانولی سیاهدانه منجر به کاهش آماستیگوت لیشمانیا تروپیکا و اینفتموم [۱۱]، ماده آلوئه-امودین آلوئه‌ورا منجر به مهار پروماستیگوت و آماستیگوت لیشمانیا ماژور [۱۲]، حنا منجر به مهار رشد پروماستیگوت لیشمانیا ماژور [۱۳]، اسانس آویشن منجر به آپیتوز

پروماستیگوت [۱۴] و عصاره ۱۰ درصد اتانولی گیاه تشنه‌داری منجر کاهش آماستیگوت لیشمانیا ماژور شدند [۱۵]. شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) از گیاهان گلدار است که بواسطه دارا بودن ترکیبات دارویی و غذایی مهم در ریشه وریزوم آن در دنیا حائز اهمیت بوده و مورد توجه صنایع دارویی، غذایی قرار گرفته است. ریشه‌ی شیرین‌بیان حاوی ترکیبات مهمی که محلول در آب هستند و ۴۰ تا ۵۰ درصد وزن ماده خشک آنرا شامل می‌شوند، می‌باشد. این مواد شامل: تری‌ترین‌ها، فلاونوئیدها، پلی‌ساکاریدها، آمینواسیدها و نمک‌های معدنی و مواد دیگر می‌باشد. عمده‌ترین ترکیب آن گلیسرین یا گلیسیریزیک اسید است که مقدار این ماده در ریشه به رقم نوع زراعی گیاه و شرایط اقلیمی محل رویش بستگی دارد و بین ۵ تا ۲۰ درصد تغییر می‌کند و مقدار آن نشان‌دهنده کیفیت ریشه گیاه است [۱۷، ۱۶]. از ریشه شیرین‌بیان در اکثر فارماکوپه‌ها به عنوان دارو یاد شده است. ریشه و ریزوم این گیاه حدود ۴۰۰۰ سال است که استفاده دارویی دارند و در فارماکوپه کشورهای نظیر آمریکا، چین و سایر کشورها ثبت شده است. از شیرین‌بیان در طب سنتی آسیا و اروپا برای درمان گاستریت، عفونت‌های تنفسی و زخم‌های پپتیک استفاده می‌شود. ریشه شیرین‌بیان به عنوان یک عامل پیشگیری از زخم معده و دئودنوم پیشنهاد شده است. همچنین در سوء هاضمه و به عنوان یک ماده ضدالتهابی در واکنش‌های آلرژیک به کار رفته است [۲۰-۱۸]. در مطالعات تجربی و بالینی مشخص شده است که این گیاه به دلیل دارا بودن مواد بیولوژیکی فعال مانند: تری‌ترین‌ها (مثل گلیسیریزیک اسید)، فلاونوئیدها، اولیگوساکاریدها دارای اثرات فامارکولوژیکی مختلف از جمله: خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدویروس، ضدقارچ، ضدباکتری، ضدانگل، ضدتومور، ایمونومدولاتوری، حفاظت‌کننده کبد، معده، نورون می‌باشد [۲۵-۲۱].

آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتومایسین در انکوباتور ۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا انگل تکثیر شود.

۳.۲. بررسی اثر عصاره‌ی هیدروالکلی ریشه شیرین‌بیان و گلیسیریزیک/اسید بر پروماستیگوت لیشمانیا ماژور

برای بررسی اثر عصاره و گلیسیریزیک/اسید بر فرم پروماستیگوت لیشمانیا ماژور از روش MTT استفاده شد. ابتدا تعداد 5×10^5 پروماستیگوت لیشمانیا ماژور در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای استریل با سه تکرار برای هر دوز دارو ریخته شد، سپس محیط کشت RPMI1640 غنی شده با سرم جنین گاوی حاوی دوزهای مختلف عصاره ریشه شیرین‌بیان (۵۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۲۵۰۰، ۵۰۰۰ و ۷۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، گلیسیریزیک/اسید (۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و گلوکانتیم (۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در انکوباتور ۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پروماستیگوت‌ها بدون دارو به عنوان کنترل و محیط RPMI1640 غنی شده با سرم جنین گاوی به عنوان بلانک استفاده شد. بعد از انکوباسیون ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکسید به چاهک‌ها اضافه و مقدار جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر با الیزاریدر (Bio-Tek-Instrument, NC-USA) قرائت شد.

۴.۲. بررسی اثر عصاره‌ی هیدروالکلی ریشه شیرین‌بیان و گلیسیریزیک/اسید بر ماکروفاژهای صفاقی

ماکروفاژهای صفاقی با تزریق بافر فسفات سالین سرد به صفاق، از موش‌های BALB/c جداسازی شدند. سپس تعداد 4×10^5 ماکروفاژ در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای

مطالعات مبنی بر اثر ضدانگلی عصاره و ترکیبات موجود در ریشه شیرین‌بیان از جمله گلیسیریزیک/اسید نشان می‌دهند که این مواد می‌توانند رشد انگل‌ها از جمله لیشمانیا دونوانی (*Leishmania donovani*)، لیشمانیا ماژور (*Leishmania major*) و پلاسمودیوم فالسیپاروم (*Plasmodium falciparum*) را مهار کنند [۲۹-۲۶]. مرور نتایج نشان داد که گزارشی بر روی اثر عصاره هیدروالکلی و گلیسیریزیک/اسید ریشه شیرین‌بیان بر گونه لیشمانیا ماژور وجود ندارد، لذا با توجه به موارد فوق در پژوهش حاضر اثر عصاره هیدروالکلی ریشه شیرین‌بیان و گلیسیریزیک/اسید بر پروماستیگوت و آماستیگوت لیشمانیا ماژور در شرایط برون‌تنی مورد بررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. تهیه عصاره

ریشه‌ی شیرین‌بیان از شرکت شیرین داروی شیراز خریداری و با آسیاب برقی پودر شد. پودر ریشه با حلال آب و متانول به نسبت برابر به روش سونیکاسیون با دستگاه سونیکاتور (BANDELIN SONOREX DIGITEC) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد عصاره‌گیری شد. سپس حلال عصاره با دستگاه روتاری (HEIDOLPH-Germany) تبخیر شده و با قرار دادن در آون عصاره خشک شد. در نهایت پودر عصاره وزن شده و در یخچال تا زمان مصرف نگهداری شد. پودر گلیسیریزیک/اسید از شرکت سیگما آلدردیج (آمریکا) تهیه شد.

۲.۲. کشت و نگهداری انگل

انگل لیشمانیا ماژور سویه MRHO/IR/75/ER در مرکز پوست و جذام دانشگاه تهران از موش‌های BALB/c آلوده جدا و در محیط کشت RPMI1640 غنی شده با ۱۵ درصد سرم جنین گاوی غیرفعال همراه با یک درصد

متانول فیکس شدند. سپس رنگ آمیزی بوسیله رنگ گمیسا که به نسبت ۱:۱۰ با آب رقیق شده بود، انجام شد. نتیجه با شمارش تعداد آماستیگوت‌های درون ۱۰۰ عدد ماکروفاژ و تعداد ماکروفاژهای آلوده در هر خانه ارزیابی شد.

۶.۲. آنالیز آماری

تمامی داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. توزیع نرمال داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنف بررسی شد و سپس داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. $P < 0.05$ به منزله معنی دار بودن اختلاف بین دو گروه در نظر گرفته شد.

۳. نتایج

۱.۳. اثر عصاره‌ی هیدروالکلی ریشه شیرین بیان و گلیسیریزیک اسید بر پروماستیگوت لیشمانیا مازور
اثر دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی و گلیسیریزیک اسید ریشه شیرین بیان و گلوکانتیم بر پروماستیگوت لیشمانیا مازور در جدول ۱ نشان داده شده است. از دوزهای مختلف عصاره، ماده مؤثره گلیسیریزیک اسید و گلوکانتیم استفاده و میزان زنده بودن پروماستیگوت با آزمون MTT بررسی شد و IC_{50} (غلظتی از عصاره که باعث مهار رشد ۵۰ درصد از پروماستیگوت‌ها می‌شود) به دست آمد. IC_{50} عصاره بر پروماستیگوت لیشمانیا مازور 0.016 ± 0.001 میکروگرم در میلی لیتر بعد از ۴۸ ساعت و 0.018 ± 0.001 میکروگرم بر میلی لیتر بعد از ۲۴ ساعت به دست آمد، اما دوز ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر و دوزهای بیشتر از آن منجر به کاهش معنی دار ($P < 0.05$) پروماستیگوت‌ها شدند. IC_{50} گلیسیریزیک اسید بر پروماستیگوت 0.017 ± 0.001 میکروگرم بر میلی لیتر بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت برآورد و دوز ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و دوزهای بیشتر آن منجر به کاهش معنی دار ($P < 0.05$)

استریل با سه تکرار برای هر دوز دارو ریخته و به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد همراه با ۵ درصد CO_2 برای چسبیدن ماکروفاژها قرارداده شد. پس از ۲ ساعت پلیت‌ها از انکوباتور خارج شده و با بافر فسفات سالین گرم استریل شستشو داده شدند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI1640 غنی شده حاوی دوزهای مختلف عصاره شیرین بیان و گلیسیریزیک اسید به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند، سپس میزان سمیت دارو با آزمون MTT بررسی شد.

۵.۲. بررسی اثر عصاره‌ی هیدروالکلی ریشه شیرین بیان و گلیسیریزیک اسید بر آماستیگوت لیشمانیا مازور

برای تعیین اثر عصاره شیرین بیان بر فرم آماستیگوت، تعداد 5×10^5 ماکروفاژهای صفای جداسازی شده از موش را در پلیت‌های ۶ خانه‌ای استریل که در کف آنها لامل قرار داده شده بود، ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد همراه با ۵ درصد CO_2 برای چسبیدن ماکروفاژها قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت، پلیت‌ها از انکوباتور خارج شده و با بافر فسفات سالین گرم استریل شستشو داده شدند. سپس ۱ میلی لیتر محیط کشت RPMI1640 غنی شده حاوی 5×10^6 پروماستیگوت لیشمانیا مازور را در پلیت‌ها ریخته و ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند، سپس چاهک‌ها را با محیط کشت RPMI1640 شسته تا پروماستیگوت‌های آزاد خارج شوند، در نهایت ۱ میلی لیتر محیط کشت RPMI1640 غنی شده حاوی غلظت‌های مختلف داروها (۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره)، (۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر گلیسیریزیک اسید) و (۵۰، ۲۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر گلوکانتیم) به چاهک‌ها اضافه و بعد از ۲۴ ساعت، لامل‌ها با

پروماستیگوت‌ها شدند. IC_{50} گلوکانتیم $0/009 \pm 25$ میکروگرم در میلی‌لیتر بعد از ۴۸ ساعت و $0/042 \pm 50$ میکروگرم در میلی‌لیتر بعد از ۲۴ ساعت برآورد شد.

۳.۳. اثر عصاره‌ی هیدروالکلی ریشه شیرین‌بیان و

گلیسیریزیک اسید بر آماستیگوت لیثمانیا مازور تعداد آماستیگوت‌ها و درصد آلودگی ماکروفاژها در چاهک‌های حاوی دارو با ماکروفاژهای آلوده بدون دارو مقایسه شد (جدول ۲). IC_{50} عصاره هیدروالکلی ریشه شیرین‌بیان بر آماستیگوت 500 میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. همچنین این دوز منجر به کاهش ماکروفاژهای آلوده نسبت به گروه کنترل شد به طوری که در این دوز ۶۰ درصد ماکروفاژها آلوده بودند، در حالی که در ماکروفاژهای بدون دارو ۸۹ درصد ماکروفاژها آلوده بودند. همچنین IC_{50} گلوکانتیم و گلیسیریزیک اسید بر آماستیگوت به ترتیب ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برآورد شد.

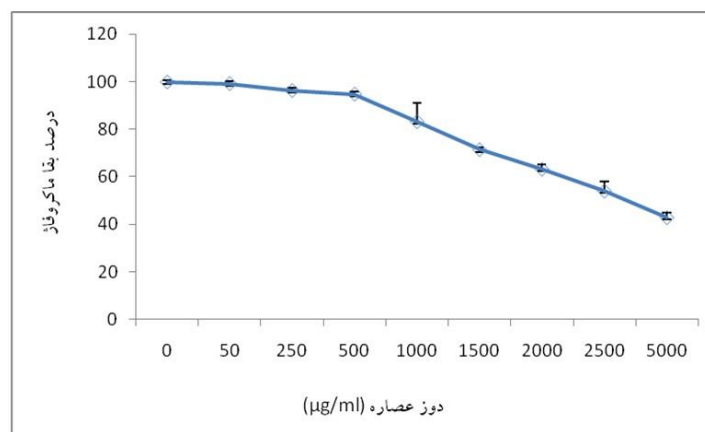
۲.۳. اثر عصاره‌ی هیدروالکلی ریشه شیرین‌بیان و

گلیسیریزیک اسید بر ماکروفاژهای صفافی

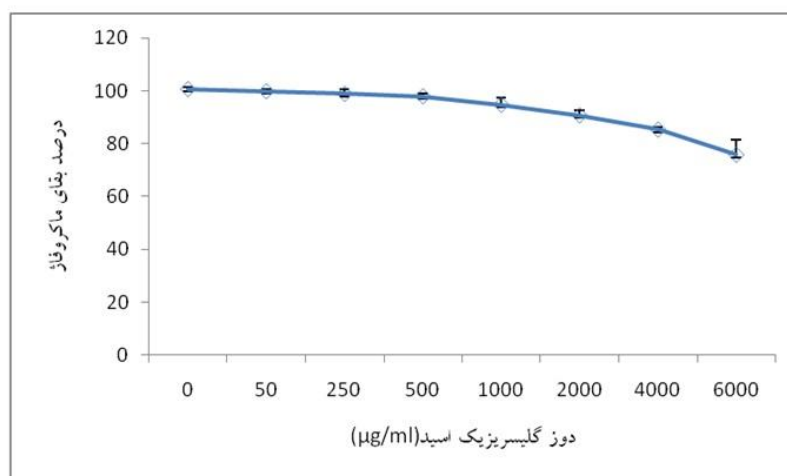
بررسی اثر عصاره هیدروالکلی ریشه شیرین‌بیان و گلیسیریزیک اسید بر ماکروفاژهای صفافی در شکل‌های شماره ۱ و ۲ نشان داده شده است. نتایج در شکل ۱ نشان می‌دهد که IC_{50} عصاره هیدروالکلی ریشه‌ی شیرین‌بیان $0/018 \pm 2500$ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد. همچنین دوز ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و دوزهای بیشتر عصاره منجر به کاهش معنی‌دار ($P < 0/05$) ماکروفاژها شدند. درصد بقا ماکروفاژهای صفافی بعد از تیمار با دوزهای مختلف گلیسیریزیک اسید در شکل ۲ نشان می‌دهد که دوزهای کمتر از

جدول ۱. مقادیر IC_{50} عصاره هیدروالکلی ریشه شیرین‌بیان، گلیسیریزیک اسید و گلوکانتیم بر پروماستیگوت لیثمانیا مازور

نوع دارو	$IC_{50} 24h$ $\mu g/ml$	$IC_{50} 48h$ $\mu g/ml$
عصاره هیدروالکلی ریشه شیرین‌بیان	$1250 \pm 0/018$	$1000 \pm 0/016$
گلیسیریزیک اسید	$3000 \pm 0/017$	$3000 \pm 0/017$
گلوکانتیم	$50 \pm 0/043$	$25 \pm 0/009$



شکل ۱. درصد بقا ماکروفاژهای صفافی بعد از تیمار با دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی ریشه شیرین‌بیان. عصاره هیدروالکلی ریشه شیرین‌بیان در دوز $2500 \pm 0/018 \mu g/ml$ منجر به بقای ۵۰ درصد از ماکروفاژها شد. همچنین دوز $1000 \mu g/ml$ و دوزهای بیشتر از آن منجر به کاهش معنی‌دار ($P < 0/05$) ماکروفاژها شدند.



شکل ۲. درصد بقای ماکروفاژهای صفافی بعد از تیمار با دوزهای مختلف گلیسیریزیک اسید. دوزهای کمتر از ۲۰۰۰ µg/ml گلیسیریزیک اسید منجر به کاهش معنی داری ($P\text{-value} < 0.05$) درصد ماکروفاژها نشدند.

جدول ۲. درصد آلودگی ماکروفاژ و درصد بقا آماسیگوت‌ها در ماکروفاژها

گروه‌ها												
کنترل	گلوکانتیم			گلیسریریزیک اسید			عصاره ریشه شیرین بیان					
بدون دارو	۲۵	۵۰	۱۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۲۰۰۰	۳۰۰۰	۵۰۰	۷۵۰	۱۰۰۰	۲۰۰۰	دوز دارو (میکروگرم بر میلی لیتر)
۸۹	۶۷	۶۳	۵۰	۶۸	۶۵	۵۳	۴۶	۶۰	۵۷	۴۶	۵۲	درصد آلودگی ماکروفاژ
۱۰۰	۴۷	۳۷	۳۱	۶۴	۴۷	۴۳	۳۸	۴۹	۳۵	۳۰	۲۲	درصد بقا آماسیگوت

۴. بحث

بررسی اثر عصاره هیدروالکلی و گلیسیریزیک اسید ریشه شیرین بیان بر ماکروفاژهای صفافی و دو فرم پروماستیگوت و آماسیگوت لیشمانیا مازور در برون تنی طراحی شد. نتایج به دست آمده از این بررسی نشان داد که عصاره هیدروالکلی ریشه شیرین بیان در دوز ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر و دوزهای بیشتر از آن منجر به کاهش معنی دار ($P < 0.05$) پروماستیگوت لیشمانیا مازور شد، به طوری که مقدار IC_{50} آن بعد از ۴۸ ساعت 0.16 ± 1000 میکروگرم بر میلی لیتر بود، در حالی که گلیسیریزیک اسید در دوز ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به بالا منجر به کاهش معنی دار ($P < 0.05$) پروماستیگوت شد و IC_{50} آن 0.17 ± 3000 میکروگرم بر میلی لیتر برآورد شد. همچنین مقدار IC_{50}

لیشمانیوز پوستی شایع ترین فرم لیشمانیوز می باشد که یک بیماری خود محدودشونده است، اما بهبود زخم به زمان طولانی نیاز دارد. در حال حاضر برای درمان سالک از آنتیموان های پنج ظرفیتی مثل گلوکانتیم استفاده می شود که نیاز به تزریق مکرر دارد و دارای عوارض جانبی متعدد از جمله درد عضلات، پانکراتیت، آریتمی قلبی و هپاتیت است که باعث محدودیت در درمان می شود [۷-۳]. بنابراین تلاش برای یافتن داروهای جدید لازم است. گیاهان از آنجا که منبع غنی از ترکیبات ضدلیشمانیایی نظیر آلکالوئیدها، کوئینون ها، فلاونوئیدها، استروئیدها، ترپن ها، مشتقات فنلی و دیگر متابولیت ها هستند، مورد توجه قراردارند. لذا این مطالعه جهت

گلوکانتیم بر پروماستیگوت 0.009 ± 25 میکروگرم بر میلی لیتر بود. علاوه بر این در بررسی اثر ضدآماستیگوتی، IC₅₀ عصاره هیدروالکلی ریشه شیرین بیان، گلیسیریزیک اسید و گلوکانتیم به ترتیب ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. عصاره هیدروالکلی ریشه شیرین بیان نسبت به گلیسیریزیک اسید سمیت بیشتری بر پروماستیگوت و آماستیگوت لیشمانیا ماژور داشت، ممکن است ترکیبات دیگر موجود در عصاره هیدروالکلی ریشه شیرین بیان خاصیت ضدلیشمانیایی داشته باشند.

در مطالعات گذشته مبنی بر تأثیر عصاره ریشه شیرین بیان بر لیشمانیا ماژور اثر عصاره آبی شیرین بیان در مقایسه با آمفوتریسین را بر پروماستیگوت لیشمانیا ماژور بررسی کردند. در این بررسی پروماستیگوت لیشمانیا ماژور با دوزهای متفاوت از عصاره آبی شیرین بیان (۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶ میلی گرم در میلی لیتر) به مدت ۴ روز انکوبه شده و دوز ۱۴/۸ میلی گرم در میلی لیتر به عنوان IC₅₀ بعد از ۸۸ ساعت مشخص شد [۳۰]. در این مطالعه از عصاره آبی ریشه شیرین بیان استفاده شده و نتایج بررسی با شمارش میکروسکوپی انگل انجام شد، لذا تفاوت در مقدار IC₅₀ می تواند ناشی از تفاوت در نوع عصاره گیری که در نوع مواد به دست آمده از ریشه مؤثر است، باشد. علاوه بر این در پژوهش ما اثر عصاره بر پروماستیگوت با روش MTT ارزیابی شد که روش دقیق تری نسبت به شمارش مستقیم انگل می باشد. همچنین در مطالعه فوق اثر عصاره آبی بر فرم آماستیگوت لیشمانیا ماژور ارزیابی نشده است و بیشتر مطالعات انجام شده به منظور بررسی فعالیت ضدلیشمانیایی گیاهان بر روی شکل پروماستیگوت آن انجام شده است. از آنجایی که پروماستیگوت شکل عفونت زای انگل در مهره داران نیست، تنها ارزش مطالعات انجام شده بر روی شکل پروماستیگوت مشخص کردن فعالیت لیشمانیا کشی احتمالی ترکیبات آزمایش شده می باشد. در نتیجه ارزیابی

مقدماتی با استفاده از پروماستیگوت ها باید با انجام آزمایشات بر روی شکل آماستیگوت داخل ماکروفاژی تأیید شود. بنابراین در پژوهش حاضر اثر عصاره هیدروالکلی ریشه شیرین بیان و گلیسیریزیک اسید بر فرم آماستیگوت نیز ارزیابی شد. در مطالعه دیگری لیکوشالکون A به دست آمده از شیرین بیان سبب مهار پروماستیگوت و آماستیگوت لیشمانیا دونوانی و لیشمانیا ماژور شد به طوری که در غلظت ۵ میکروگرم بر میلی لیتر منجر به مهار کامل پروماستیگوت لیشمانیا ماژور شد و در غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر به طور قابل ملاحظه ای سرعت عفونی شدن ماکروفاژهای مشتق شده از سلول های انسانی به پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور را کاهش داد [۳۱]. تزریق داخل ضایعه ای دوزهای ۲/۵ و ۵ میلی گرم بر کیلوگرم لیکوشالکون A به موش های آلوده به لیشمانیا ماژور و هامسترهای آلوده به لیشمانیا دونوانی منجر به جلوگیری از ایجاد ضایعه شد [۳۲]. تفاوت در نتیجه بررسی حاضر با مطالعه فوق به این دلیل است که در بررسی آنها از ماده مؤثره لیکوشالکون A استفاده شده است، در حالی که در پژوهش ما از عصاره هیدروالکلی استفاده و وجود این ترکیب در عصاره بررسی نشده است. لذا ممکن است، لیکوشالکون A در عصاره ی هیدروالکلی ریشه شیرین بیان تهیه شده به اندازه ی تأثیرگذاری، وجود نداشته است. همچنین ممکن است لیکوشالکون A در مقایسه با گلیسیریزیک اسید سمیت بیشتری بر لیشمانیا ماژور داشته باشد.

در مطالعه دیگری IC₅₀ گلیسیریزیک اسید بر ماکروفاژهای صفاقی ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود. همچنین دوز ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر گلیسیریزیک اسید منجر به کاهش معنی دار ($P < 0.05$) آماستیگوت های لیشمانیا دونوانی شد. تفاوت IC₅₀ گلیسیریزیک اسید بر ماکروفاژ در بررسی حاضر نسبت به پژوهش فوق می تواند به دلیل تفاوت در شکل مورد استفاده گلیسیریزیک اسید، باشد. به طوری که در مطالعه ما از نمک گلیسیریزیک اسید

متابولیت‌های ثانوی مانند: ساپونین‌ها، آلکالوئیدها و فلاونوئیدها خاصیت ضدباکتریایی داشته است [۱۴]. همچنین مشخص شده است که گلیسیریزیک اسید منجر به مهار تکثیر RNA و DNA تعدادی از ویروس‌ها از جمله ویروس هپاتیت A، هپاتیت C، هرپس (HERPES)، نقص ایمنی اکتسابی (HIV)، سایتومگالوویروس (CMV) شده است [۳۶-۳۸]

۵. نتیجه‌گیری

عصاره‌ی هیدروالکلی ریشه شیرین‌بیان و گلیسیریزیک اسید اثرکشدگی بر پروماستیگوت و آماستیگوت لیشمانیا ماژور در شرایط برون‌تنی داشتند. در واقع عصاره هیدروالکلی ریشه‌ی شیرین‌بیان و گلیسیریزیک اسید نسبت به گلوکانتیم در دوزهای بالاتری دارای اثر کشندگی بر لیشمانیا ماژور بودند، ولی با توجه به اینکه این گیاه اثرات سمی و عوارض جانبی چشمگیری ندارد ضرورت انجام آزمایشات بیشتری جهت ارزیابی اثر عصاره ریشه شیرین‌بیان و گلیسیریزیک اسید بر روی انگل لیشمانیا در مدل حیوانی وجود دارد. همچنین می‌توان اثر ضدلیشمانیایی سایر ترکیبات مستخرج از ریشه‌ی شیرین‌بیان و ماده‌ی خالص گلیسیریزیک اسید به دست آمده از آن را بررسی کرد.

مشارکت نویسندگان

شیما شیخی دانشجو در انجام مطالعه و نوشتن مقاله، دکتر طوبی غضنفری و دکتر علی خامسی‌پور در انتخاب موضوع و راهنمایی انجام مطالعه، دکتر طیه رجبان در انجام مطالعات فیتوشیمی و تهیه عصاره گیاهی و زهرا مجلل طباطبایی در مراحل عملی انجام آزمایش مشارکت داشتند.

تضاد منافع

برای نویسندگان مقاله هیچ گونه تضاد منافی وجود ندارد.

۷۰ درصد اما در بررسی فوق از ماده خالص استفاده شد. همچنین گلیسیریزیک اسید در دوز ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر منجر به کاهش آماستیگوت لیشمانیا دونوانی نسبت به گروه کنترل شده است، اما برای آماستیگوت لیشمانیا ماژور به دوز بیشتری (۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نیاز بود، این تفاوت می‌تواند ناشی از حساسیت متفاوت گونه‌های مختلف لیشمانیا به گلیسیریزیک اسید باشد [۳۳].

نتایج بررسی اثر عصاره سیر، پیاز و ریشه‌ی شیرین‌بیان را بر پروماستیگوت دو گونه لیشمانیا مکزیکانا (*L. mexicana*)، لیشمانیا شاگاسی (*L. chagasi*) و رده‌ی سلولی Hela بعد از ۷۲ ساعت نشان داد که عصاره‌ی شیرین‌بیان دارای اثر مهاری بر پروماستیگوت دو گونه لیشمانیا می‌باشد، اما برای سلول Hela سمیت ندارد. همچنین عصاره‌ی سیر دارای اثر کشندگی بر دو گونه لیشمانیا و سلول‌های Hela بود، اما عصاره‌ی پیاز بر هیچ‌یک از دو گونه‌ی لیشمانیا و رده سلولی Hela اثرکشدگی نداشت [۳۴]. در مطالعه حاضر نیز عصاره هیدروالکلی ریشه‌ی شیرین‌بیان دارای اثرکشدگی بر لیشمانیا ماژور بود، لذا با بررسی فوق مطابقت دارد.

دوز ۱۳/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ی شیرین‌بیان منجر به مهار ۵۰ درصد انگل مالاریا شد و دوز ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم منجر به کاهش معنی‌دار ($P < ۰/۰۵$) تعداد انگل در خون در موش‌های سوری شد [۳۵]. بنابراین عصاره‌ی ریشه‌ی شیرین‌بیان اثر مهاری بر انگل مالاریا داشت. در پژوهش حاضر نیز اثر مهاری عصاره‌ی ریشه شیرین‌بیان بر انگل لیشمانیا ماژور مشاهده شد، با توجه به این بررسی‌ها، عصاره‌ی ریشه‌ی شیرین‌بیان می‌تواند خاصیت ضدانگلی داشته باشد.

در بررسی‌های انجام شده بر روی اثر عصاره‌ی ریشه‌ی شیرین‌بیان بر مهار رشد سایر پاتوژن‌ها مشخص شده است که عصاره هیدرومتانولی ریشه شیرین‌بیان به دلیل داشتن

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی دانشگاه شاهد برای تامین هزینه مطالعه، مرکز آموزش و

پژوهش پوست و جدام و مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران برای فراهم کردن امکانات جهت انجام آزمایش‌های مطالعه سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1. Desjeux P. Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clinics in Dermatol.* 1996;14 (5): 417-23.
2. Ashford R and Desjeux P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. *Parasitology Today* 1992 ;8 (3): 104-5.
3. Murray HW, Berman JD, Davies CR and Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *The Lancet* 2005; 366 (9496): 1561-77.
4. Saha P, Mukhopadhyay D and Chatterjee M. Immunomodulation by chemotherapeutic agents against leishmaniasis. *International Immunopharmacol.* 2011; 11 (11): 1668-79.
5. Croft SL and Yardley V. Chemotherapy of leishmaniasis. *Current Pharmaceutical Design.* 2002; 8 (4): 319-42.
6. Croft SL, Sundar S and Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical Microbiol. Reviews* 2006; 19 (1): 111-26.
7. Oryan A. Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. *IJVR.* 2015; 16 (1): 1.
8. Moghaddas E, Khamesipour A, Mohebbi M and Fata A. Iranian Native Plants on Treatment of Cutaneous Leishmaniasis: A Narrative Review. *Iranian Journal of Parasitology* 2017; 12(3): 312.
9. Metwally DM, Al-Olayan EM, El-Khadragy MF and Alkathiri B. Anti-leishmanial activity (*in vitro* and *in vivo*) of allicin and allicin cream using *Leishmania major* (Sub-strain Zymowme LON4) and BALB/c mice. *PloS One.* 2016; 11(8): e0161296.
10. Feily A, Saki J, Maraghi S, Moosavi Z, Khademvatan S and Siahpoosh A. In vitro activity of green tea extract against *Leishmania major* promastigotes. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2012; 50(3): 233-6.
11. Mahmoudvand H, Tavakoli R, Sharififar F, Minaie K, Ezatpour B, Jahanbakhsh S and et al. Leishmanicidal and cytotoxic activities of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *Pharmaceutical Biology* 2015; 53(7): 1052-7.
12. Dalimi A, Delavari M, Ghaffarifar F and Sadraei J. In vitro and in vivo antileishmanial effects of aloe-emodin on *Leishmania major*. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 2015; 5(2): 96-9.
13. Fatahi Bafghi A, Fallahzadeh H and Mosadegh MH. Effectiveness of Lawsonia inermis Extract on Cutaneous Leishmaniasis Lesion in BALB/c Mice. *Journal of Kerman University of Medical Sciences* 2008; 15(4): 329-335.
14. Mikus J, Harkenthal M, Steverding D and Reichling J. In vitro effect of essential oils and isolated mono- and sesquiterpenes on

- Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. *Planta Medica*. 2000; 66(4): 366-368.
15. Zahiri M, Mohebbali M, Khanavi M, Sahebgharani M, Saghaipour A, Esmaeili J and et al. Therapeutic effect of *Scrophularia striata* ethanolic extract against localized cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER). *Iranian Journal of Public Health*. 2016; 45(10): 1340.
 16. Nezamabadi N, Rahimian MH, Zand E and Alizadeh H. Investigation of some ecophysiological aspects of licorice (*Glycyrrhiza glabra*) rhizomes. *JAEP*. 2007; 74 (2): 45-61.
 17. Khanahmadi M and et al. A review on medicinal plant of *Glycyrrhiza glabra* L. *J. Med. Plants* 2013; 2 (46): 1-12.
 18. Damle M. *Glycyrrhiza glabra* (Liquorice)- a potent medicinal herb. *International Journal of Herbal Medicine* 2014; 2 (2): 132-6.
 19. Kaur R, Kaur H and Dhindsa AS. *Glycyrrhiza glabra*: a phytopharmacological review. *IJPSR*. 2013; 4 (7): 2470.
 20. Bahmani M, Rafieian-Kopaei M, Jeloudari M, Eftekhari Z, Delfan B, Zargaran A, et al. A review of the health effects and uses of drugs of plant licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) in Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2014; 4 (2): 847-9.
 21. Asl MN and Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds. *Phytotherapy Res*. 2008; 22 (6): 709-24.
 22. Varsha S, Agrawal R and Sonam P. Phytochemical screening and determination of anti-bacterial and anti-oxidant potential of *Glycyrrhiza glabra* root extracts. *JERAD*. 2013; 7 (4A): 1552.
 23. Pompei R, Flore O, Marccialis MA, Pani A and Loddo B. Glycyrrhizic acid inhibits virus growth and inactivates virus particles. *Nature* 1979; 281 (5733): 689.
 24. Sheela M, Ramakrishna M and Salimath BP. Angiogenic and proliferative effects of the cytokine vegf in ehrlich ascites tumor cells is inhibited by *Glycyrrhiza glabra*. *International Immunopharmacol*. 2006; 6 (3): 494-8.
 25. Bordbar N, Karimi MH and Amirghofran Z. The effect of glycyrrhizin on maturation and t cell stimulating activity of dendritic cells. *Cellular Immunol*. 2012; 280 (1): 44-9.
 26. Chen M, Zhai L, Christensen SB, Theander TG and Kharazmi A. Inhibition of fumarate reductase in *Leishmania major* and *L. donovani* by chalcones. *AAC*. 2001; 45 (7): 2023.
 27. Chen M, Theander TG, Christensen SB, Hviid L, Zhai L and Kharazmi A. Licochalcone a, a new antimalarial agent, inhibits in vitro growth of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and protects mice from p. yoelii infection. *AAC*. 1994; 38 (7): 1470-5.
 28. Christensen SB, Ming C, Andersen L, Hjørne U, Olsen CE, Cornett C and et al. An antileishmanial chalcone from chinese licorice roots. *Planta Medica* 1994; 60 (02): 121-3.
 29. Bhattacharjee S, Bhattacharjee A, Majumder S, Majumdar SB and Majumdar S. Glycyrrhizic acid suppresses cox-2-mediated anti-inflammatory responses during *Leishmania donovani* infection. *J. Antimicrobial Chemotherapy* 2012; 67 (8): 1905-14.

30. Hosseini A, Jaffary F, Asghari GR, Hejazi SH and Bidabadi LS. *In vitro* effects of turmeric and licorice total extracts on *L. major* promastigotes. *I.U.M.S.* 2012; 29 (169): 2541-51.
31. Chen M, Christensen SB, Blom J, Lemmich E, Nadelmann L, Fich K and et al. Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. *AAC*. 1993; 37 (12): 2550-6.
32. Chen M, Christensen S, Theander TG and Kharazmi A. Antileishmanial activity of licochalcone A in mice infected with *Leishmania major* and in hamsters infected with *Leishmania donovani*. *AAC*. 1994; 38 (6): 1339-44.
33. Bhattacharjee A, Majumder S, Majumdar SB, Choudhuri SK, Roy S and Majumdar S. Co-administration of glycyrrhizic acid with the antileishmanial drug sodium antimony gluconate (SAG) cures SAG-resistant visceral leishmaniasis. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2015; 45 (3): 268-77.
34. McClure CD, Nolan LL and et al. Herb extracts as potential antiprotozoal agents. *International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants* 1995; 426 (10): 91-104.
35. Sangian H, Faramarzi H, Yazdinezhad A, Mousavi SJ, Zamani Z, Noubarani M and et al. Antiplasmodial activity of ethanolic extracts of some selected medicinal plants from the northwest of Iran. *Parasitology Res.* 2013; 112 (11): 3697-701.
36. Kumada H. Long-term treatment of chronic hepatitis C with glycyrrhizin [stronger neominophagen C (SNMC)] for preventing liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Oncol.* 2002; 62 (1): 94-100.
37. Hirabayashi K, Iwata S, Matsumoto H, Mori T, Shibata S, Baba M and et al. Antiviral activities of glycyrrhizin and its modified compounds against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and herpes simplex virus type 1 (HSV-1) in vitro. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1991; 39 (1): 112-5.
38. Su X, Chen H and Wang L. Clinical and laboratory observation on the effect of glycyrrhizin in acute and chronic viral hepatitis. *J. Traditional Chinese Medicine* 1984; 4 (2): 127-32.

How to cite this article: Sheikhi Sh, Khamesipour A, Radjabian T, Mojallal Tabatabaei Z, Ghazanfari T. Effects of hydroalcoholic extract of *Glycyrrhiza glabra* and glycyrrhizic acid on promastigote and amastigote of *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER). *Journal of Medicinal Plants* 2020; 19(74): 73-83.
doi: 10.29252/jmp.19.74.73



Institute of
Medicinal Plants

Journal of Medicinal Plants

Journal homepage: www.jmp.ir



Research Article

Effects of hydroalcoholic extract of *Glycyrrhiza glabra* and glycyrrhizic acid on promastigote and amastigote of *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER)

Shima Sheikhi¹, Ali Khamesipour², Tayebah Radjabian³, Zahra Mojallal Tabatabaei⁴, Tooba Ghazanfari^{5,*}

¹ Department of Immunology, Shahed University, Tehran, Iran

² Center for Research and Training in Skin Diseases and Leprosy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran

⁴ Institute of Biochemistry and Biophysics, Department of Biochemistry, Tehran University, Tehran, Iran

⁵ Immunoregulation Research Center, Shahed University, Tehran, Iran

ARTICLE INFO

Keywords:

Glycyrrhiza glabra

Glycyrrhizic acid

In vitro

Leishmania major

Promastigote

Amastigote

ABSTRACT

Background: Cutaneous leishmaniasis by different species of *Leishmania*. *Pentavalent* antimonials as a first line drug for treatment of cutaneous leishmaniasis have several limitations and side effects. Natural products are more considered due to their less toxicity and cost, more efficient, safety and readily available antileishmania agents. **Objective:** The aim of this study was to explore the effect of hydroalcoholic extract of *Glycyrrhiza glabra* (licorice) roots and its main component glycyrrhizic acid on promastigote and amastigote of *L. major*. **Methods:** Different dosages of hydroalcoholic extract of licorice root, glycyrrhizic acid and Glucantime with promastigote of *L. major* were incubated at 26 °C for 24 and 48 hours then the percentages of alive promastigotes were measured by MTT assay. The anti-amastigote effects of these drugs was examined by microscopic counting of the number of amastigotes in macrophages 24 hours after treating the parasite infected macrophages with them. Promastigote and infected macrophages without any treatment was used as negative controls. **Results:** The IC₅₀ values of hydroalcoholic extracts of licorice root, glycyrrhizic acid and Glucantime on promastigote of *L. major* was 1250 ± 0.018, 3000 ± 0.017 and 50 ± 0.043 µg/ml after 24 hours, and 1000 ± 0.016, 3000 ± 0.017 and 25 ± 0.009 µg/ml after 48 hours, respectively. The IC₅₀ values of the licorice root extract, glycyrrhizic acid and Glucantime on amastigote was 500, 1000 and 25 µg/ml, respectively. **Conclusion:** Hydroalcoholic extract of licorice root and glycyrrhizic acid had cytotoxic effects on promastigotes and amastigotes of *L. major*.

Abbreviations: MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide); IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration).

* Corresponding author: Tghazanfari@shahed.ac.ir

doi: [10.29252/jmp.19.74.73](https://doi.org/10.29252/jmp.19.74.73)

Received 11 August 2018; Received in revised form 22 October 2018; Accepted 26 November 2018

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)