Özgün Çalışma/Original Article *Mikrobiyol Bul 2024;58(2):182-195*/doi: 10.5578/mb.202498184

Geliş Tarihi (Received): 08.11.2023 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 22.01.2024

Hibrit Gümüş Nanoparçacık Komplekslerinin Sitotoksik ve Antilayşmanyal Aktivitesinin Araştırılması: *Leishmania* Türlerine Karşı Potansiyel İlaç Adayları

Investigation of Cytotoxic and Antileishmanial Activity of Hybrid Silver Nanoparticle Complexes: Potential Drug Candidates against *Leishmania* Species

Yener ÖZEL[1](ID), İbrahim ÇAVUŞ[2](ID), Umut YILMAZ[1](ID), Feyzullah TOKAY[3](ID), Sema BAĞDAT[3](ID), Ahmet ÖZBİLGİN[2](ID), Mehmet ÜNLÜ[1](ID), Gülhan VARDAR ÜNLÜ[1](ID)

[1] Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir.
[1] *Balıkesir University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Balıkesir, Türkiye.*

[2] Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa.
[2] *Manisa Celal Bayar University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, Manisa, Türkiye.*

[3] Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir.
[3] *Balıkesir University Faculty of Arts and Science, Department of Analytical Chemistry, Balıkesir, Türkiye.*

**Bu çalışma, Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından BAP 2020-055 numaralı proje ile desteklenmiştir.*

***Çalışmaya ait veriler XL. Uluslararası Türk Mikrobiyoloji Kongresi (16-20 Kasım 2022, Belek/Antalya)'nde poster bildiri olarak sunulmuştur.*

Makale Atıfı: *Özel Y, Çavuş İ, Yılmaz U, Tokay F, Bağdat S, Özbilgin A ve ark. Hibrit gümüş nanoparçacık komplekslerinin sitotoksik ve antilayşmanyal aktivitesinin araştırılması: Leishmania türlerine karşı potansiyel ilaç adayları. Mikrobiyol Bul 2024;58(2):182-195.*

ÖZ

Son yıllarda mevcut ilaçlara dirençli *Leishmania* türlerinin izole edilmesi, ilaç adayı olabilecek alternatif moleküllerin araştırılmasını zorunlu hale getirmiştir. Bu çalışmada, hibrit gümüş nanoparçacık (AgNP) komplekslerinin sitotoksik ve in vitro antilayşmanyal aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada, oksitlenmiş amiloz-gümüş (OA-Ag) NP'ler, oksitlenmiş amiloz-kurkumin (OA-Cur) NP'ler ve hibrit oksitlenmiş amiloz-kurkumin-gümüş (OA-CurAgNP) nanoparçacıklar olmak üzere üç tip nanoparçacık (NP) sentezlenmiştir. Sentezlenen nanoparçacıkların sitotoksik aktivitesi L929 fare fibroblastlarına karşı, in vitro antilayşmanyal aktivitesi ise *Leishmania tropica*, *Leishmania infantum* ve *Leishmania donovani* izolatlarına karşı sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. Kurkumin ve gümüş nanoparçacıkların birleştirilmesiyle elde edilen hibrit OA-CurAgNP kompleksinin L929 fare fibroblastlarına karşı 1074 µg/mL ve üzeri konsantrasyonlarda sitotoksik etkiler gösterdiği görülmüştür. Hibrit OA-CurAgNP kompleksinin *L.tropica*, *L.infantum* ve *L.donovani* izolatlarına karşı antilayşmanyal etkinliğini ifade eden IC_{50} değerlerinin sırasıyla 95-121 µg/mL, 202-330 µg/mL ve 210-254 µg/mL arasında değiştiği saptanmıştır. Son yıllarda dirençli izolatların sıklıkla görülmesi layşmanyaz tedavisinde önemli bir sorun olmaya başlamıştır. Metalik nanoparçacıklar, kimyasal ve fiziksel özelliklerinin yanı sıra vücutta uzun süreli dolaşımlarından dolayı tıbbi

İletişim (Correspondence): *Dr. Yener Özel, Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, Türkiye.* ***Tel (Phone):*** *+90 544 325 73 52,* ***E-posta (E-mail):*** *yener_ozel@hotmail.com*

uygulamalar için mükemmel adaylar olarak kabul edilmektedir. Layşmanyaz tedavisinde kullanılan mevcut ilaçlar oldukça toksik olmakla birlikte nanoparçacıklar, nano ölçekli boyutları nedeniyle düşük toksisite ve kolay hücresel alım gibi avantajlar sunmaktadır. Söz konusu hibrit nanoparçacıkların güçlü antilayşmanyal etkinlik ve düşük sitotoksisite göstermesi, layşmanyaz tedavisinde potansiyel kullanımlarına ilişkin bilimsel kanıtlara katkıda bulunabilir. Bu nedenle, OA-CurAgNP kompleksinin tek başına veya mevcut ilaçlarla kombinasyon halinde terapötik değeri incelenmelidir.

Anahtar kelimeler: *Gümüş nanoparçacık; in vitro; kurkumin; layşmanyaz; ilaç direnci.*

ABSTRACT

In recent years, isolation of resistant *Leishmania* species to drugs in use has made it necessary to search alternative molecules that may be drug candidates. In this study, it was aimed to investigate the cytotoxic and in vitro antileishmanial activity of hybrid silver nanoparticle (AgNP) complexes. In this study, three types of nanoparticles (NPs), oxidized amylose-silver (OA-Ag) NPs, oxidized amylose-curcumin (OA-Cur) NPs and oxidized amylose-curcumin-silver (OA-CurAgNP) nanoparticles were synthesized. The cytotoxic activity of the synthesized nanoparticles was determined against L929 mouse fibroblasts and the in vitro antileishmanial activity was determined against *Leishmania tropica*, *Leishmania infantum* and *Leishmania donovani* isolates by the broth microdilution method. It was observed that the hybrid OA-CurAgNP complex obtained by combining curcumin and silver nanoparticles showed cytotoxic effects against L929 mouse fibroblasts at concentrations of 1074 µg/mL and above. IC_{50} values expressing the antileishmanial activity of the hybrid OA-CurAgNP complex against *L.tropica*, *L.infantum* and *L.donovani* isolates, were found to vary between 95-121 µg/mL, 202-330 µg/mL and 210-254 µg/mL, respectively. Resistance development has emerged as a major challenge in the treatment of leishmaniasis in recent times. Metallic nanoparticles are considered excellent candidates for medical applications due to their chemical and physical properties, as well as their prolonged circulation in the body. The current drugs used for leishmaniasis treatment are highly toxic, while nanoparticles offer advantages such as low toxicity and easy cellular uptake due to their nanoscale dimensions. The identification of strong efficacy in these particles may contribute scientific evidence for their potential use in leishmaniasis treatment. Therefore, the therapeutical value of OA-CurAgNP complex alone in combination with existing drugs should be examined.

Keywords: *Silver nanoparticle; in vitro; curcumin; leishmaniasis; drug resistance.*

GİRİŞ

Layşmanyaz, dünyada görülen ciddi enfeksiyon hastalıklarından biridir. Dünya Sağlık Örgütünün 2020 yılı raporuna göre, 200 ülke ve bölgeden 98'i layşmanyaz için endemiktir. Hastalığın yıllık prevalansının yaklaşık 12 milyon kişi ve risk altındaki nüfusun büyüklüğünün yaklaşık 350 milyon olduğu bildirilmiştir. Her yıl dünya çapında yaklaşık iki milyon yeni kutanöz layşmanyaz ve 500 000 viseral layşmanyaz olgusunun meydana geldiği tahmin edilmektedir[1]. Ayrıca, küresel ısınmaya bağlı olarak vektör sayısındaki artış nedeniyle layşmanyaz olgularının da arttığı bildirilmiştir[2].

Layşmanyaz tedavisinde kullanılan ve altın standart olarak kabul edilen beş değerlikli antimon bileşiklerinin toksik olduğu bilinmektedir[3]. Ayrıca son yıllarda, *Leishmania* türlerinde antilayşmanyal ilaçlara karşı direnç gözlenmektedir. Bu nedenlerle layşmanyaz tedavisinde yeni yaklaşımlara acilen ihtiyaç duyulmaktadır[4].

Günümüzde nanoteknolojik yaklaşımlara ilgi hızla artmaktadır[5]. Bu nedenle, nanoparçacıkların çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği öngörülmektedir[6]. Gümüş nanoparçacıkların yüksek biyouyumluluk ve işlevselleştirilmiş potansiyelleri, tıp alanında

kullanımları açısından ilgi çekmektedir[7]. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda gümüş nanoparçacıklarının benzersiz özellikleri ve geniş yüzey alanları sayesinde etkili antimikrobiyal aktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir[8].

Halk dilinde "zerdeçal" olarak bilinen Kurkumin, *Curcuma longa* bitkisinin rizomundan elde edilen doğal aktif bir maddedir ve ilk olarak 1815'te Vogel ve Pelletier tarafından izole edilmiş, 1842'de ise Vogel tarafından saflaştırılmıştır[9]. İlaç, baharat, gıda koruyucu ve renklendirici olarak yaygın şekilde kullanılmakta olan kurkumin, Asya toplumlarında önemli bir yere sahiptir[10]. Araştırmalar, kurkuminin güçlü antioksidan, antienflamatuvar, antikanser, antifungal, antiviral ve antibakteriyel özellikler sergilediğini kanıtlamaktadır[11].

Bu çalışmada, hibrit kurkumin/gümüş nanoparçacık kompleksinin sitotoksik aktivitesini ve in vitro antilayşmanyal etkinliğini araştırmak amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, insana ve hayvana ait materyal kullanılmamış olup sıvı azotta muhafaza edilen parazit suşları ile deneyler yürütülmüştür. Bu nedenle etik kurul onayı gerekli değildir.

Leishmania İzolatları

Bu çalışmada beşer adet *Leishmania tropica*, *Leishmania infantum* ve *Leishmania donovani* ile her bir türe ait birer adet referans suş olmak üzere toplam 18 adet *Leishmania* izolatı kullanıldı. İzolatlar, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankasından temin edildi. Parazit bankasından alınan izolatlar ITS1 ve hsp70 bölgesine özgü primer ve problar ile genotiplendirildi.

Nanoparçaçık Komplekslerinin Sentezi

Okside amiloz

60 g amiloz, 15 mL %30'luk H_2O_2 ve 2 mL %0.05 $CuSO_4$ manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Reaksiyonda, katalizör olarak $CuSO_4$, oksidan olarak ise H_2O_2 kullanıldı. Karışım ilk etapta 40 °C'de 15 dakika tutuldu, sonrasında karışıma 400 mL kaynar su eklenerek 75 °C'de 15 dakika boyunca karıştırıldı. Süre dolduğunda, aynı karışıma 400 mL daha kaynar su eklenerek 100 ºC'de 30 dakika boyunca reaksiyona sokuldu. Karışım oda sıcaklığına kadar soğutulup, 20 dakika 3000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant alındı ve dört farklı behere eşit hacimde bölündü. Birinci kısım, fazla bakır iyonlarının ortamdan alınması için karanlık ortamda oda ısısında iki gün boyunca tutularak diyalize edildi[12].

Okside amilozlu gümüş nanoparçacık kompleksi

Okside amiloz çözeltisinin ikinci kısmına 100 mL kaynar su ve 75 mL 0.02 mol/L $AgNO_3$ ilave edilerek karanlık ortamda 100 °C'de 120 dakika karıştırıldı. Çözelti soğutularak yapıya bağlanmayan $AgNO_3$'ün uzaklaştırılması için yukarıda tarif edildiği şekilde diyalize edildi[13,14].

Okside amilozlu kurkumin nanoparçacık kompleksi

Okside amiloz çözeltisinin üçüncü kısmına 100 mL kaynar su eklendi ve 55 °C'ye soğuması beklenildi. Çözeltiye 1 g kurkumin ilave edilerek oda sıcaklığına gelene kadar karıştırıldı. Yapıya bağlanmayan kurkumin yukarıda tarif edildiği şekilde diyalize edilerek ortamdan uzaklaştırıldı[13,14].

Okside amilozlu kurkumin-gümüş nanoparçacık hibrit kompleksi

Okside amiloz çözeltisinin dördüncü kısmına sırasıyla, 100 mL kaynar su, 75 mL 0.02 mol/L $AgNO_3$ eklendi ve karanlıkta 100 °C'de 120 dakika süresince karıştırıldı. Daha sonra çözeltiye 1 g kurkumin eklenerek oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Çözelti, yapıya bağlanmayan kurkumin ve $AgNO_3$'ü uzaklaştırmak için önce 15 dakika 12 000 rpm'de santrifüj edildi ve sonra yukarıda tarif edildiği gibi diyalize edildi[13,14].

Nanoparçacık Komplekslerinin Liyofilizasyonu

Hazırlanan tüm nanoparçacık kompleksleri steril falkon tüpler içerisine alınarak Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deneysel Fen Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEFAM)'nde bulunan, Christ, alpha 1-4 LD Plus marka liyofilizasyon cihazı ile liyofilize edildi.

Nanoparçaçık Komplekslerinin Karakterizasyonu

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi karakterizasyonu

Nanoparçacık komplekslerinin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) spektrumları, Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Araştırma Laboratuvarında bulunan ve dalga sayısı aralığı 4000 cm^{-1} ile 400 cm^{-1} aralığında çözünürlüğe sahip Perkin Elmer marka Spektrum 65 model cihaz (Attenuated Total Reflection-ATR) ile saptandı[14].

Geçirimli elektron mikroskobu karakterizasyonu

OA-AgNP nanoparçacık kompleksinin boyutları, Ortadoğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı AR-GE Eğitim ve Ölçme Merkezinde bulunan FEI marka Tecnai G2 Spirit Biotwin Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile belirlendi.

Nanoparçacık Süspansiyonlarının Hazırlanması

Liyofilize hale getirilen nanoparçacık kompleksleri, steril distile su ile çözdürülerek son konsantrasyon aralığı 42500-21 µg/mL olacak şekilde hazırlandı.

Nanoparçacıkların Sitotoksik Aktivitesinin Saptanması

Hücre hattı

Nanoparçacık kompleksinin sitotoksik aktivitesi L929 fare fibroblast hücre hattına (American Type Culture Collection, ABD) karşı saptandı. Sıvı azotta saklanan hücreler RPMI-1640 besiyeriyle yıkanarak %10 FBS [(steril ve inaktive), (fetal bovine serum)], %1 penisilin-streptomisin ve %1 gentamisin solüsyonu eklenmiş RPMI-1640 besiyeri içeren

hücre flaskına ekildi ve 37 ºC'de %5 CO_2'li etüvde 48 saat inkübasyona alındı. Hücre sayısı ve canlılığı tripan mavisi boyası kullanılarak thoma lamı ile belirlendi.

Sitotoksik Aktivitenin Saptanması

Bu çalışmada, alternatif ilaç adayı molekül olarak hibrit OA-CurAgNP kompleksi hedeflendi. Steril, düz tabanlı ve 96 kuyucuklu mikroplakların her bir kuyucuğunda 100 µL besiyeri içinde yaklaşık 10^4 hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı. OA-CurAgNP çözeltisinin 42500 - 21 µg/mL aralığında seri dilüsyonları ayrı bir mikroplakta yapılıp, 100 µL alınarak hücrelerin çoğaltıldığı mikroplakaya aktarıldı. Mikroplaklar, 37 ºC'de %5 CO_2'li etüvde 48 saat inkübasyona alındı. Hücre canlılığı, MTT (3-(4.5-dimetiltiyazol-2-yl)-2.5-difeniltetrazolyum bromit) yöntemiyle belirlendi[15]. Absorbans ölçümleri 570 nm'de Biotek marka 800TS model (ABD) spektrofotometre ile yapıldı. Sitotoksik aktiviteyi ifade eden IC_{50} değerleri Graphpad Prism 8.4.2 programıyla belirlendi. Sitotoksik aktivite deneyleri farklı günlerde üç kez tekrar edildi.

Nanoparçacık Komplekslerinin Antilayşmanyal Aktivitesinin Belirlenmesi

Leishmania suşları, %10 fetal sığır serumu, 4.5 mg/mL glikoz ve 292 µg/mL L-glutamin içeren RPMI 1640 besiyerinde çoğaltıldı. Antilayşmanyal etkinliğin belirlenmesi için 96 kuyucuklu mikroplakların her bir kuyucuğuna 100 µL RPMI 1640 (%10 fetal sığır serumu, 4.5 mg/mL glikoz ve 292 µg/mL L-glutamin) besiyeri konuldu. Nanoparçacık komplekslerinin son konsantrasyonları 42500-21 µg/mL aralığında olacak şekilde seri dilüsyon yapıldı. Konsantrasyonu 1×10^5 promastigot/mL olarak ayarlanan promastigot süspansiyonu, 100 µL olarak negatif kontrol hariç tüm kuyucuklara dağıtıldı ve 48 saat 25 ± 1 °C'de inkübe edildi. Nanoparçacık komplekslerinin antilayşmanyal etkinliği CellTiter-Glo marka (Promega, ABD) hücre canlılık kiti kullanılarak in vitro olarak değerlendirildi. *Leishmania* izolatlarına karşı, Lumuniskan marka (Thermo Labsystem, Franklin, MA) lüminesans okuyucudan elde edilen % canlılık değerleri Graphpad Prism 8.4.2 programıyla analiz edilerek IC_{50} değerleri belirlendi. Deneyler iki kez tekrarlandı.

İstatistiksel Analiz

Veriler IBM SPSS 25.0 istatistik yazılımı (IBM SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) kullanılarak analiz edildi. Gruplar arasındaki önemli farklılıklar tek yönlü ANOVA ve ardından çoklu karşılaştırmalar için Tukey testi kullanılarak belirlendi. Farklılıklar $p< 0.05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

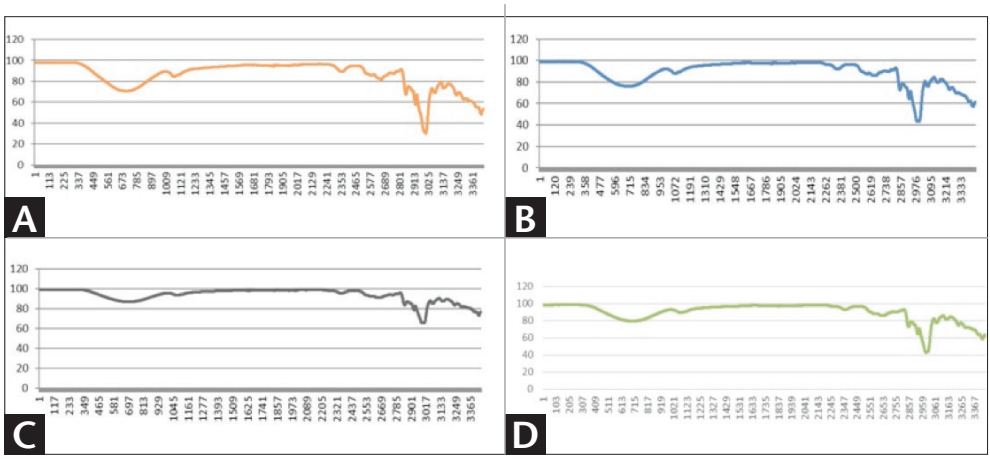
BULGULAR

Komplekslerin temel yapısını oluşturan saf amilozun FT-IR spektrum incelemesinde 1335 cm^{-1} ve 2928 cm^{-1}'de –C-H (metilen) fonksiyonel grubunda eğilme ve gerilme titreşimleri saptanmıştır. Okside amilozlu gümüş nanoparçacık (OA-AgNP), okside amilozlu kurkumin (OA-CurNP) ve okside amilozlu kurkumin-gümüş nanoparçacık (OA-CurAgNP) komplekslerine ait spektrum verileri incelendiğinde tespit edilen piklerin saf amiloz ile aynı dalga sayılarında yer aldığı ancak pik merkezlerinin daralmış ve şiddetlerinin azalmış olduğu görülmüştür. Yapının temelini oluşturan saf amilozun spektrum verilerinde,

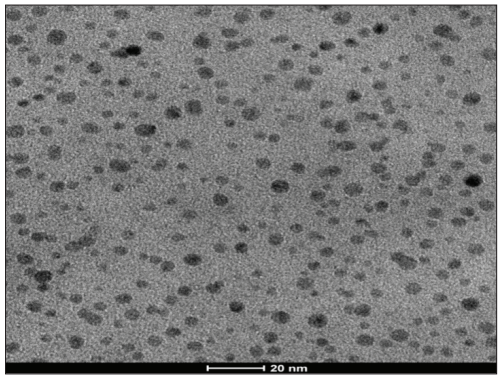
997 cm^{-1}'de aromatik yapıya bağlı –OH gruplarına ait olan keskin bir pikin oluştuğu görülmekle birlikte, OA-CurAgNP, OA-CurNP ve OA-AgNP komplekslerine ait spektrumlarda şiddetinin azaldığı ve 997 cm^{-1} ve 1016 cm^{-1} bölgesinde iki ayrı pikin meydana geldiği tespit edilmiştir. Aynı şekilde, saf amiloz spektrumunda 857 cm^{-1}'de saptanan aromatik C-H düzlem içi eğilme pikinin, OA-AgNP, OA-CurNP ve OA-CurAgNP komplekslerinde 847 cm^{-1} frekansına kaydığı görülmüştür (Şekil 1).

Komplekslerin temel yapısını oluşturan OA-AgNP'nin, TEM karakterizasyonu ile boyutlarının 5 nm ile 10 nm arasında değiştiği ve yaklaşık 8.8 nm olduğu belirlenmiştir (Şekil 2).

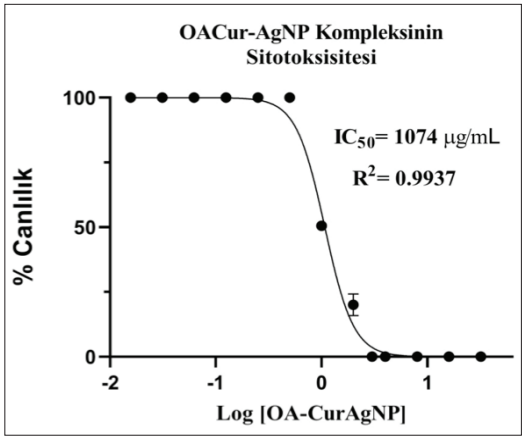
OA-CurAgNP kompleksiyle muamele edilen L929 fare fibroblastlarının % canlılık oranları, Graphpad Prism 8.4.2 programıyla analiz edilmiş ve hibrit nanoparçağın 1074 µg/mL ve üzeri konsantrasyonlarda fibroblastlara karşı toksik etki gösterdiği saptanmıştır (Şekil 3).



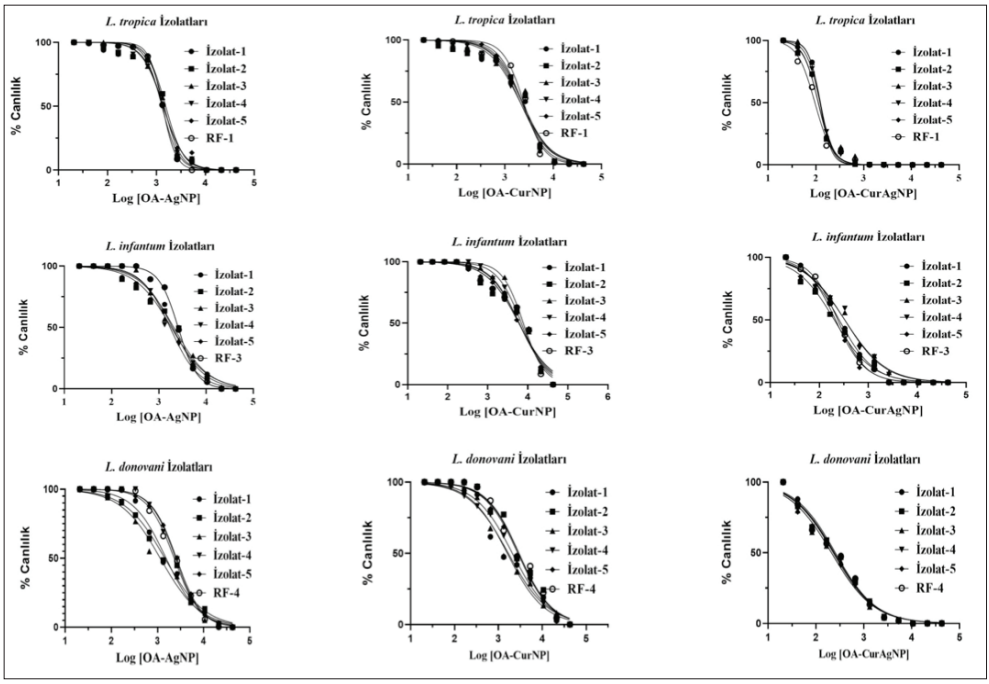
Şekil 1. *Nanoparçacık komplekslerinin FT-IR karakterizasyonu,* ***(A).*** *OA,* ***(B).*** *OA-AgNP,* ***(C).*** *OA-CurNP,* ***(D).*** *OA-CurAgNP.*



Şekil 2. *AgNP'lerin TEM karakterizasyonu.*



Şekil 3. *OA-CurAgNP'nin L929 fibroblast hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi.*



Şekil 4. *AgNP'lerin Leishmania türlerine karşı antilayşmanyal aktivitesi.*

Hücre canlılık kitiyle elde edilen absorbans değerleri GraphPad 8.4.2 programıyla analiz edilmiş ve nanoparçacık komplekslerinin *Leishmania* izolatlarına karşı IC_{50} ve LC değerleri belirlenmiştir (Şekil 4). Buna göre OA-AgNP, OA-CurNP ve OA-Cur-AgNP komplekslerinin *L.tropica*, *L.infantum* ve *L.donovani* izolatlarına karşı IC_{50} ve LC değerleri Tablo I, II ve III'te sunulmuştur.

Tablo I. *L.tropica İzolatlarına Karşı Nanoparçacık Komplekslerinin IC_{50} ve LC Değerleri (µg/mL)*

	OA-AgNP		OA-CurNP		OA-CurAgNP		
İzolatlar	**IC_{50}**	**LC**	**IC_{50}**	**LC**	**IC_{50}**	**LC**	**p**
İzolat-1	1292	10625	2071	21250	121	5313	p< 0.05
İzolat-2	1432	10625	2318	21250	111	5313	p< 0.05
İzolat-3	1366	10625	2275	21250	124	5313	p< 0.05
İzolat-4	1381	10625	2089	21250	122	5313	p< 0.05
İzolat-5	1541	10625	2251	21250	112	5313	p< 0.05
RF-1	1327	10625	2443	21250	95	5313	p< 0.05

IC_{50}: Ortalama inhibitör konsantrasyonu; LC: Letal konsantrasyon, RF-1: Referans *L.tropica* suşu.

Tablo II. *L.infantum İzolatlarına Karşı Nanoparçacık Komplekslerinin IC_{50} ve LC Değerleri (µg/mL)*

	OA-AgNP		OA-CurNP		OA-CurAgNP		
İzolatlar	**IC_{50}**	**LC**	**IC_{50}**	**LC**	**IC_{50}**	**LC**	**p değeri**
İzolat-1	2076	42500	5990	>42500	254	5313	p< 0.05
İzolat-2	1842	42500	6021	>42500	202	5313	p< 0.05
İzolat-3	1947	42500	7758	>42500	330	5313	p< 0.05
İzolat-4	1728	21250	6970	>42500	329	5313	p< 0.05
İzolat-5	2567	21250	6086	>42500	214	2656	p< 0.05
RF-3	2570	21250	6181	>42500	238	2656	p< 0.05

IC_{50}: Ortalama inhibitör konsantrasyonu; LC: Letal konsantrasyon, RF-3: Referans *L.infantum* suşu.

Tablo III. *L.donovani İzolatlarına Karşı Nanoparçacık Komplekslerinin IC_{50} ve LC Değerleri (µg/mL)*

	OA-AgNP		OA-CurNP		OA-CurAgNP		
İzolatlar	**IC_{50}**	**LC**	**IC_{50}**	**LC**	**IC_{50}**	**LC**	**p değeri**
İzolat-1	1531	>42500	1692	>42500	254	10625	p< 0.05
İzolat-2	1438	42500	2956	>42500	242	10625	p< 0.05
İzolat-3	1144	42500	1606	>42500	210	10625	p< 0.05
İzolat-4	2463	42500	2097	>42500	229	10625	p< 0.05
İzolat-5	2577	42500	2791	>42500	211	10625	p< 0.05
RF-4	2291	42500	2938	>42500	238	10625	p< 0.05

IC_{50}: Ortalama inhibitör konsantrasyonu, LC: Letal konsantrasyon, RF-4: Referans *L.donovani* suşu.

Nanoparçacık komplekslerinin *L.tropica* izolatlarına karşı IC_{50} değer aralığı OA-AgNP için 1292-1541 µg/mL, OA-CurNP için 2071-2443 µg/mL ve hibrit OA-CurAgNP için 95-124 µg/mL olarak belirlenmiştir (Tablo I).

Nanoparçacık komplekslerinin *L.infantum* izolatlarına karşı IC_{50} değer aralığı OA-AgNP için 1728-2570 µg/mL, OA-CurNP için 5990-7758 µg/mL ve hibrit OA-CurAgNP için 202-330 µg/mL olarak belirlenmiştir (Tablo II).

Nanoparçacık komplekslerinin *L.donovani* izolatlarına karşı IC_{50} değer aralığı OA-AgNP için 1144-2577 µg/mL, OA-CurNP için 1606-2956 µg/mL ve hibrit OA-CurAgNP için 210-254 µg/mL olarak belirlenmiştir (Tablo III).

TARTIŞMA

Layşmanyaz, *Leishmania* cinsi parazitlerin neden olduğu önemli bir halk sağlığı problemidir. Layşmanyaz, viseral ve kutanöz bulguları olan karmaşık bir hastalık olup hastalığın tedavisi için kullanılan beş değerlikli antimon bileşikleri yeterince güvenli ve etkili değildir[16]. Ayrıca bu ilaçlar toksisite, maliyet ve ilaç direnci gibi çeşitli nedenler ile hastalığın tedavisi için yetersiz kalmaktadır[17]. Bu durum mevcut ajanların yeniden değerlendirilmesiyle birlikte yeni ilaçlara ve moleküler hedeflere gereksinimi arttırmaktadır[18]. Son dönemde çevresel güvenlik, uygulanabilirlik ve düşük maliyet gibi avantajlarından dolayı gümüş nanoparçacık gibi yeni aday moleküller geliştirilmeye başlanmıştır[16].

Literatürde kutanöz layşmanyaz etkeni olan türler üzerinde yapılan çalışmalara bakıldığında Ahmad ve arkadaşları, *Isatis tinctoria*'nın sulu ekstraktından elde edilen ve amfoterisin B ile kombine edilerek sentezlenen AmB-AgNP kompleksinin antilayşmanyal aktivitesini *L.tropica*'ya karşı mikrodilüsyon yöntemiyle belirlemiştir. Araştırmacılar, sentezledikleri parçacıkların karakterizasyon analizlerinde UV-vis, XRD, FT-IR ve TEM kullanmış olup partikül boyutlarını ortalama 10-20 nm arasında saptamıştır. *L.tropica*'ya karşı elde edilen IC_{50} değerleri AgNP ve AmB-AgNP kompleksi için sırasıyla 4.2 ve 2.43 µg/mL olarak bildirilmiştir. Yazarlar antilayşmanyal bir ilaç olan amfoterisin b'nin biyojenik gümüş nanoparçacık kombinasyonlarının, mevcut antilayşmanyal stratejilere göre daha güvenli, daha etkili ve ekonomik bir alternatif olabileceğini vurgulamıştır[19]. Aynı suşun kullanıldığı diğer bir çalışmada Allahverdiyev ve arkadaşları, kimyasal olarak sentezledikleri ve boyutları 10-40 nm arasında değişen AgNP'lerin karakterizasyon analizini TEM kullanarak yapmıştır. AgNP'lerin farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 100, 150 ve 200 µg/mL) *L.tropica* promastigotlarına karşı antilayşmanyal etkinliği, karanlıkta ve UV ışığı altında belirlenmiştir. UV ışığı altında AgNP konsantrasyonlarının artmasıyla hücre canlılık değerlerinin de kademeli olarak azaldığı bildirilmiştir. Canlılığın en fazla UV ışık altında 200 µg/mL AgNP konsantrasyonunda azaldığı saptanmıştır[20]. Benzer bir çalışmada ise Mohammadi ve arkadaşları, zencefil kökü kullanarak elde ettikleri AgNP'lerin antilayşmanyal etkinliğini *L.major* promastigot ve amastigotlarına karşı araştırmış ve IC_{50} değerini 2350 µg/mL olarak bildirmiştir[21].

Viseral layşmanyaz etkeni türler ile yapılan çalışmalar incelendiğinde Ullah ve arkadaşları, hem yeşil hem de kimyasal olarak sentezledikleri AgNP'leri, UV-vis ve XRD ile analiz etmiş ve AgNP'lerin ortalama boyutlarının 13.12-14.13 nm arasında değiştiğini bildirmiştir. Sentezlenen AgNP'lerin antilayşmanyal etkinliği *Leishmania infantum* promastigotlarına karşı farklı konsantrasyonlarda (6, 12, 25, 50, 100, 200, 300, 400 µg/mL) çalışılmıştır. *L.infantum* promastigotları için IC_{50} değerleri bitkinin yaprağından sentezlenen AgNP'ler için 19.42 ± 2.76 µg/mL, gövdesinden sentezlenenler için 30.71 ± 1.91 µg/mL ve kimyasal olarak sentezlenen AgNP'ler için ise 51.23 ± 2.20 µg/mL olarak

saptanmıştır. Yeşil sentez yöntemiyle elde edilen AgNP'lerin, *L.infantum* promastigotlarına karşı kimyasal olarak sentezlenen AgNP'lerden daha etkili olduğu bildirilmiştir[22]. Zahir ve arkadaşları, *Euphorbia prostrata* özütü kullanarak yeşil sentez ile elde ettikleri AgNP'lerin karakterizasyon analizinde TEM kullanmış ve ortalama parçacık boyutunun 12.82-2.50 nm arasında değiştiğini bildirmiştir. Antilayşmanyal etkinlik ise *L.donovani*'ye karşı denenmiş ve AgNP'lerin IC_{50} değeri 14.94 µg/mL olarak saptanmıştır. Araştırmacılar yeşil sentez ile elde edilen AgNP'lerin, viseral layşmanyaza karşı uygun maliyetli ve daha güvenli alternatif tedavinin geliştirilmesi için umut verici olabileceğini bildirmiştir[23]. Yine *L.donovani*'nin kullanıldığı bir çalışmada Baranwal ve arkadaşları tarafından *Sechium edule* bitkisinden sentezlenen AgNP'lerin karakterizasyonunda UV-Vis, XRD, FTIR, HR-TEM ve TGA kullanılmış ve AgNP'lerin antilayşmanyal etkinliğini gösteren IC_{50} değerinin 51.88 ± 3.51 µg/mL olduğu saptanmıştır[24]. Ülkemizde görülmeyen bir tür olan *Leishmania amazonensis*'in kullanıldığı, Viana ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada stabilize edici ve indirgeyici ajan olarak mısır koçanından elde edilen ksilan kullanılmış ve yeşil sentez yöntemi ile gümüş nanoparçacık elde edilmiştir. Sentezlenen AgNP'lerin karakterizasyon analizleri AFM, SEM, XRD ile yapılmış olup ortalama boyutlarının 60.6 ± 27 nm olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar *Leishmania amazonensis* suşlarına karşı AgNP'lerin IC_{50} değerinin 25 µg/mL olduğunu bildirmiştir[25].

Bu çalışmada AgNP yeşil sentez yoluyla sentezlenmiş ve stabilleştirici olarak okside amiloz kullanılmıştır. Sentezlenen OA-AgNP kompleksi diğer çalışmalarda olduğu gibi FT-IR ve TEM ile karakterize edilmiş ve nanoparçacık boyutlarının 5 nm ile 10 nm arasında değiştiği saptanmıştır. Bu kompleksin antilayşmanyal etkinliği ise *L.tropica*, *L.infantum* ve *L.donovani* suşlarına karşı araştırılmış ve IC_{50} değerleri sırasıyla 1292-1541 µg/mL, 1728-2570 µg/mL ve 1144-2577 µg/mL aralığında bulunmuştur. OA-AgNP için elde ettiğimiz IC_{50} değerleri diğer çalışmalara kıyasla yüksek saptanmıştır. Bunun nedenleri arasında nanoparçacık sentez yöntemindeki farklılıklar, etkinliğin değerlendirildiği yöntem farklılıkları ve *Leishmania* suşlarından kaynaklanan farklılıklar olabilir.

Geleneksel Hint tıbbında sıklıkla kullanılan kurkumin (diferuloilmetan), zerdeçalın majör biyoaktif bileşenidir. Ayrıca in vitro antilayşmanyal aktivite de dahil olmak üzere geniş bir biyolojik etki spektrumuna sahip olduğu gösterilmiştir, bu da onu antilayşmanyal ajan olarak çalışılmaya değer bir aday yapmaktadır[26]. Bununla birlikte kurkuminin, suda zayıf çözünürlük, sınırlı absorpsiyon, zayıf biyoyararlanım ve kimyasal kararsızlık gibi özellikleri, in vivo koşullar altında etkinliğini azaltmaktadır[27]. Bu nedenle lipid maddelerle kapsülleme, biyouyumlu polimerlere yükleme ve diğer maddelerle kombine etme gibi stratejilerle bu maddenin etkinliğinin artırılabileceği ifade edilmektedir[28].

Literatürden elde edilen verilere göre 2020 yılına kadar yapılan 5492 bildiriden 20'si in vitro (%69.0), biri in vivo (%3.4) ve sekizi in vitro/in vivo (%27.6) olmak üzere 29 yayının incelendiği bir çalışmada, kurkuminin en çok araştırılan doğal aktif bileşen olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmalarda, denenen kurkumin ve türevlerinin çeşitli *Leishmania* spp. türlerine karşı 0.13-52 µg/mL arasında değişen IC_{50} değerleri ve 5-37.6

uM arasında değişen LD_{50} değerleri ile düşük konsantrasyonlarda yüksek etkinlik gösterdiği bildirilmiştir[29]. Pinto ve arkadaşları, sentetik kurkumin analoğu olan dibenzalaseton (DBA) ve beta-siklodekstrin (β-CD) komplekslerini sentezleyerek, bu maddelerin *L.major* suşuna karşı in vitro antilayşmanyal aktivitesini değerlendirmiştir. Sentezlenen kompleksler 10, 20, 40, 80, 160 ve 320 µg/mL aralığında değişen konsantrasyonlarda parazitin promastigot formlarına karşı çalışılmış ve DBA ve β-CD'nin IC_{50} değerleri sırasıyla < 10 µg/mL ve > 320 µg/mL olarak saptanmıştır[30]. Tiwari ve arkadaşları, kurkumin nanoparçacığını (CurNP), emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemiyle sentezlemiş ve parçacık boyutlarını TEM kullanarak 25.52 ± 5.21 nm olarak belirlemiştir. CurNP'lerin *L.donovani* promastigotlarına karşı antilayşmanyal etkinliği farklı konsantrasyon aralığında (10ng-10µg) canlı hücrelerin lusiferaz aktivitesi izlenerek değerlendirilmiş ve CurNP'nin, IC_{50} değerinin 1.34 ± 0.045 µg/mL arasında olduğu bildirilmiştir[31]. Bafgi ve arkadaşları tarafından ince film hidrasyon yöntemi kullanılarak nanolipozomal kurkumin hazırlanmıştır. Bu partikülün karakterizasyonu SEM kullanılarak yapılmış olup boyutu 176.5 nm olarak bildirilmiştir. Nanolipozomal kurkumin *L.major* suşuna karşı 24, 48 ve 72. saatlerde çalışmış ve IC_{50} değerleri sırasıyla 6.41, 3.8 ve 2.33 µg/mL olarak saptanmıştır[32].

Bu çalışmada OA-CurNP yeşil sentez yoluyla sentezlenmiş ve stabilleştirici olarak okside amiloz kullanılmıştır. Sentezlenen OA-CurNP kompleksi FT-IR ile karakterize edilmiştir. Bu kompleksin antilayşmanyal etkinliği ise *L.tropica*, *L.infantum* ve *L.donovani* izolatlarına karşı araştırılmış ve IC_{50} değerleri sırasıyla, 2071-2443 µg/mL, 5990-7758 µg/mL ve 1606-2956 µg/mL aralığında bulunmuştur. Okside amiloz kullanılarak sentezlenen kurkumin nanoparçacıklarının antilayşmanyal etkinliğine yönelik literatürde benzer bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada üç nanoparçacık kompleksi yeşil sentez yöntemiyle sentezlenmiş ve stabilleştirici olarak okside amiloz kullanılmıştır. Bu kompleksler OA-AgNP, OA-CurNP ve bu iki kompleksin birleştirilmesiyle oluşturulan hibrit OA-CurAgNP kompleksidir. Her bir kompleks üç farklı *Leishmania* türüne karşı antilayşmanyal etkinlik açısından araştırılmıştır. Çalışmanın esas amacı kurkumin ve gümüş nanoparçacıklarının birleştirildiği hibrit kompleks olan OA-CurAgNP'nin antilayşmanyal etkinliğinin OA-AgNP ve OA-CurNP'lerinin tek başlarına göre olan etkinliğiyle kıyaslanması ve sinerjik bir etkileşimin varlığının araştırılmasıdır. Tablo I'de *L.tropica* için elde ettiğimiz veriler incelendiğinde, OA-AgNP ve OA-CurNP'nin IC_{50} değerlerinin 1292-1541 µg/mL ve 2071-2443 µg/mL arasında değiştiği görülmektedir. Ancak bu iki kompleksin birleştirilmesiyle oluşturulan hibrit OA-CurAgNP kompleksinin *L.tropica* için IC_{50} değerleri 95-124 µg/mL olarak saptanmış ve çok daha düşük dozlarda antilayşmanyal etkinlik tespit edilmiştir. Benzer sonuçlar bu çalışmada kullanılan diğer iki tür için de elde edilmiştir (Tablo II ve Tablo III). Hibrit nanoparçacık kompleksinin hem fibroblast hem de *Leishmania* türlerine karşı etkinlik değerleri baz alındığında selektif indeks (SI) değerinin > 3 olduğu ve seçici bir etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Bu sonuçlara göre kurkumin ve gümüş nanoparçacıklarının birleştirilmesiyle oluşturulan OA-CurAgNP kompleksinin çok daha düşük dozlarda aynı etkiyi gösterdiği ve toksisiteyi de önemli ölçüde düşürebildiği görülmüştür. Verilerimiz OA-CurAgNP kompleksinin antilayşmanyal etkinliğine yönelik elde edilen ilk veriler olma niteliğindedir. Sonuç olarak gümüş nanoparçacıklarının potansiyel antilayşmanyal etken maddelerle kombine edilerek sentezlenmesi, çok daha düşük dozlarda aynı etkinin elde edilmesi, toksisitenin azaltılması, yan etkilerin hafifletilmesi ve antilayşmanyal direncin önlenmesinde faydalı olabilir.

ETİK KURUL ONAYI

Çalışmada, insana ve hayvana ait materyal kullanılmamış olup sıvı azotta muhafaza edilen parazit suşları ile deneyler yürütülmüştür. Bu nedenle etik kurul onayı gerekli değildir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada kullanılan *Leishmania* suşlarının temin edildiği Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankasına teşekkür ederiz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization (WHO). Leishmaniasis. Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis. (Accessed date: 20.10.2023).
2. Daoudi M, Outammassine A, Amane M, Hafidi M, Boussaa S, Boumezzough A. Climate change influences on the potential distribution of the sand fly phlebotomus sergenti, vector of *Leishmania tropica* in Morocco. Acta Parasitol 2022; 67(2): 858-66. https://doi.org/10.1007/s11686-022-00533-5
3. Aronson NE, Joya CA. Cutaneous Leishmaniasis: Updates in diagnosis and management. Infect Dis Clin North Am 2019; 33(1): 101-17. https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.004
4. Olías-Molero AI, de la Fuente C, Cuquerella M, Torrado JJ, Alunda JM. Antileishmanial drug discovery and development: Time to reset the model?. Microorganisms 2021; 9(12): 2500. https://doi.org/10.3390/microorganisms9122500
5. Curtis A, Wilkinson C. Nantotechniques and approaches in biotechnology. Trends Biotechnol 2001; 19: 97-101. https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01536-5
6. Hofer S, Hofstätter N, Punz B, Hasenkopf I, Johnson L, Himly M. Immunotoxicity of nanomaterials in health and disease: Current challenges and emerging approaches for identifying immune modifiers in susceptible populations. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol 2022; 14(6): e1804. https://doi.org/10.1002/wnan.1804
7. Baranwal A, Srivastava A, Kumar P, Bajpai VK, Maurya PK, Chandra P. Prospects of nanostructure materials and their composites as antimicrobial agents. Front Microbiol 2018a; 9: 422. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00422
8. Bruna T, Maldonado-Bravo F, Jara P, Caro N. Silver nanoparticles and their antibacterial applications. Int J Mol Sci 2021; 22(13): 7202. https://doi.org/10.3390/ijms22137202
9. Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK, Aggarwal BB. Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back. Biotech Adv 2014; 32: 1053-64. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.004
10. Anderson AM, Mitchell MS, Mohan RS. Isolation of curcumin from turmeric. J Chem Educ 2000; 77: 359-60. https://doi.org/10.1021/ed077p359

11. Kotha RR, Luthria DL. Curcumin: Biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical aspects. Molecules 2019; 24(16): 2930. https://doi.org/10.3390/molecules24162930
12. Lyu Y, Ren H, Yu M, Li X, Li D, Mu C. Using oxidized amylose as carrier of linalool for the development of antibacterial wound dressing. Carbohydr Polym 2017; 174: 1095-105. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.033
13. Kharat M, Du Z, Zhang G. Physical and chemical stability of curcumin in aqueous solutions and emulsions: Impact of pH, temperature, and molecular environment. J Agric Food Chem 2017; 65: 1525-32. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04815
14. Lyu Y, Yu M, Liu Q, Zhang Q, Liu Z, Tian Y, et al. Synthesis of silver nanoparticles using oxidized amylose and combination with curcumin for enhanced antibacterial activity. Carbohydr Polym 2019; 115573. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115573
15. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983; 6: 55-63. https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4
16. Siritapetawee J, Limphirat W, Nantapong N, Songthamwat D. Fabrication of silver chloride nanoparticles using a plant serine protease in combination with photoactivation and investigation of their biological activities. Biotechnol Appl Biochem 2018; 65: 572-9. https://doi.org/10.1002/bab.1638
17. Allahverdiyev AM, Abamor ES, Bagirova M, Baydar SY, Ates SC, Kaya F, et al. Investigation of antileishmanial activities of Tio2@Ag nanoparticles on biological properties of *L.tropica* and *L.infantum* parasites, in vitro. Exp Parasitol 2013; 135: 55-63. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.06.001
18. Singh G, Jayanarayan KG, Dey CS. Arsenite resistance in *Leishmania* and possible drug targets. Adv Exp Med Biol 2008; 625: 1-8. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77570-8_1
19. Ahmad A, Wei Y, Syed F, Khan S, Khan GM, Tahir K, et al. *Isatis tinctoria* mediated synthesis of amphotericin B-bound silver nanoparticles with enhanced photoinduced antileishmanial activity: A novel green approach. J Photochem Photobiol 2016; 161: 17-24. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.05.003
20. Allahverdiyev AM, Abamor ES, Bagirova M, Ustundag CB, Kaya C, Kaya F, et al. Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. Int J Nanomedicine 2011; 6: 2705-14. https://doi.org/10.2147/IJN.S23883
21. Mohammadi M, Zaki L, Karimi Pour Saryazdi A, Tavakoli P, Tavajjohi A, Poursalehi R, et al. Efficacy of green synthesized silver nanoparticles via ginger rhizome extract against *Leishmania major* in vitro. PloS One 2021; 16: e0255571. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255571
22. Ullah I, Cosar G, Abamor ES, Bagirova M, Shinwari ZK, Allahverdiyev AM. Comparative study on the antileishmanial activities of chemically and biologically synthesized silver nanoparticles (AgNPs). 3 Biotech 2018; 8: 1-8. https://doi.org/10.1007/s13205-018-1121-6
23. Zahir AA, Chauhan IS, Bagavan A, Kamaraj C, Elango G, Shankar J, et al. Green synthesis of silver and titanium dioxide nanoparticles using *Euphorbia prostrata* extract shows shift from apoptosis to G0/G1 arrest followed by necrotic cell death in *Leishmania donovani*. Antimicrob Agents Chemother 2015; 59: 4782-99. https://doi.org/10.1128/AAC.00098-15
24. Baranwal A, Chiranjivi AK, Kumar A, Dubey VK, Chandra P. Design of commercially comparable nanotherapeutic agent against human disease-causing parasite, Leishmania. Scientific Reports 2018b; 8: 1-10. https://doi.org/10.1038/s41598-018-27170-1
25. Silva Viana RL, Pereira Fidelis G, Jane Campos Medeiros M, Antonio Morgano M, Gabriela Chagas Faustino Alves M, Domingues Passero LF, et al. Green synthesis of antileishmanial and antifungal silver nanoparticles using Corn Cob Xylan as a reducing and stabilizing agent. Biomolecules 2020; 10: 1235. https://doi.org/10.3390/biom10091235
26. 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; 24: 3306-8.
27. Ghosh A, Banerjee T, Bhandary S, Surolia A. Formulation of nanotized curcumin and demonstration of its antimalarial efficacy. Int J Nanomedicine 2014; 9: 5373-87. https://doi.org/10.2147/IJN.S62756
28. Nafari A, Cheraghipour K, Sepahvand M, Shahrokhi G, Gabal E, Mahmoudvand H. Nanoparticles: New agents toward treatment of leishmaniasis. Parasite Epidemiol Control 2020; 10: e00156. https://doi.org/10.1016/j.parepi.2020.e00156

29. Albalawi AE, Alanazi AD, Sharifi I, Ezzatkhah F. A systematic review of curcumin and its derivatives as valuable sources of antileishmanial agents. Acta Parasitol 2021; 66: 797-811. https://doi.org/10.1007/s11686-021-00351-1

30. Pinto LMA, Adeoye O, Thomasi SS, Francisco AP, Carvalheiro MC, Cabral-Marques H. Preparation and characterization of a synthetic curcumin analog inclusion complex and preliminary evaluation of in vitro antileishmanial activity. Int J Pharm 2020; 15: 589: 119764. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119764

31. Tiwari B, Pahuja R, Kumar P, Rath SK, Gupta KC, Goyal N. Nanotized curcumin and miltefosine, a potential combination for treatment of experimental visceral Leishmaniasis. Antimicrob Agents Chemother 2016; 61. https://doi.org/10.1128/AAC.01169-16

32. Bafghi FA, Haghirosadat BF, Yazdian F, Mirzaei F, Pourmadadi M, Pournasir F, et al. A novel delivery of curcumin by the efficient nanoliposomal approach against *Leishmania major*. Prep Biochem Biotechnol 2021; 51: 990-7. https://doi.org/10.1080/10826068.2021.1885045