مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۳۵/هفته اول تیر ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۲/۵

بررسی اثر لیشمانیسیدال کومارین‌های اکسی‌پئوسدانین و ایزوایمپراتورین بر روی فرم پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور

دکتر سید ابراهیم سجادی[۱]، دکتر عباسعلی اسکندریان[۲]، حسینعلی یوسفی[۳]، دکتر مرجان منصوریان[۴]، محمد طاهری[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: لیشمانیوز به صورت طیف وسیعی از علایم بالینی شامل لیشمانیوز پوستی، پوستی- مخاطی و احشایی ظاهر می‌شود. به‌تازگی پیشرفت‌های زیادی در زمینه‌ی استفاده از داروهای گیاهی جهت درمان لیشمانیوز حاصل شده است. هدف از این مطالعه، تعیین اثر لیشمانیسیدال دو کومارین خالص سازی شده از ریشه‌ی گیاه Prangos ferulaceae (L.) Lindl به نام‌های اکسی‌پئوسدانین و ایزوایمپراتورین در مقایسه با شاهد مثبت (آمفوتریسین B) و شاهد منفی بر روی فرم پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی بود.

روش‌ها: ابتدا، فرم پروماستیگوت انگل در محیط‌های کشت NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) و (Roswell Park Memorial Institute 1640) RPMI-1640 در دمای ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده شد تا به فاز ایستا از منحنی رشد خود برسد. سپس، میزان مشخصی از محیط کشت، که حاوی حدود یک میلیون انگل بود، در مجاورت غلظت‌های نهایی ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از اکسی پئوسدانین و ایزوایمپراتورین قرار گرفت و اثار آن‌ها در زمان‌های ۳، ۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بررسی شد.

یافته‌ها: از هیچ یک از غلظت‌های مورد بررسی کومارین‌های اکسی‌پئوسدانین و ایزوایمپراتورین، نسبت به شاهد مثبت، اثر لیشمانیسیدال مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: اکسی‌پئوسدانین و ایزوایمپراتورین هیچ گونه اثر لیشمانیسیدالی نشان ندادند.

واژگان کلیدی: لیشمانیا ماژور، کومارین، اکسی‌پئوسدانین، ایزوایمپراتورین، Prangos ferulaceae (L.) Lindl

ارجاع: سجادی سید ابراهیم، اسکندریان عباسعلی، یوسفی حسینعلی، منصوریان مرجان، طاهری محمد. **بررسی اثر لیشمانیسیدال کومارین‌های اکسی‌پئوسدانین و ایزوایمپراتورین بر روی فرم پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۳۵): ۵۸۱-۵۹۰

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای حرفه‌ای داروسازی به شماره‌ی ۳۹۰۶۳۸ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- استاد، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- مربی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- استادیار، گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۵- دانشجوی داروسازی، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی و مرکز تحقیقات علوم دارویی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر عباسعلی اسکندریان
Email: aeskandarian@med.mui.ac.ir

مقدمه

لیشمانیوزها از جمله‌ی بیماری‌های انگلی مشترک بین انسان و حیوانات است. لیشمانیوز جلدی با تظاهرات کلینیکی گوناگون، جزء بیماری‌های انگلی اندمیک و شایع در ایران به شمار می‌رود؛ این بیماری یکی از معضلات مهم بهداشتی در بسیاری از مناطق کشور ما می‌باشد که شیوع آن در دهه‌ی گذشته دو برابر شده است. در ایران حدود پانزده هزار نفر سالانه به سالک مبتلا می‌شوند که بر اساس تحقیقات موجود، میزان واقعی موارد آن، ۴ تا ۵ برابر میزان گزارش شده است (۲-۱).

در حال حاضر، جهت درمان لیشمانیوز ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی‌موان به کار می‌رود که شامل دو ترکیب مگلومین آنتی‌مونیت (گلوکانتیم) و سدیم استیبوگلوکونیت (پنتوستام) است. استفاده از ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی‌موان دارای محدودیت‌هایی نظیر عدم تأثیر به روش خوراکی، طولانی بودن دوره‌ی درمان، عدم پاسخ درمانی در حدود ۱۵ درصد موارد و داشتن اثر سمیت شدید روی قلب و کلیه‌ها می‌باشد. از این رو، تحقیقات وسیعی بر روی سایر روش‌های درمانی لیشمانیوز در حال انجام است (۳).

امروزه به دلیل خطرات استفاده از داروهای شیمیایی و بروز مقاومت نسبت به این داروها در بسیاری از میکروارگانیسم‌ها، از جمله لیشمانیا، گرایش به استفاده از گیاهان و مشتقات حاصل از آن‌ها رو به افزایش است. روش‌های سنتی درمان لیشمانیوز به طور عمیقی با گیاهان بومی منطقه پیوند خورده است. عصاره‌های گیاهی و ترکیبات مشتق شده از گیاهان، منبع غنی عوامل دارویی جدید را فراهم می‌کنند و در کشورهای آندمیک، از گیاهان بومی جهت درمان بسیاری از عوامل عفونی استفاده می‌شود.

گیاه جاشیر با نام علمی Prangos ferulaceae (L.) Lindl، گیاهی پایا و ایستاده به ارتفاع ۲۰۰-۸۰ سانتی‌متر است که دارای برگ‌های سبز، فاقد کرک، پهن، تخم مرغی، بریده و منقسم می‌باشد و گل‌های زرد رنگ و مجتمع در گل آذین‌های چتری دارد. میوه‌ی آن تخم مرغی دم‌دار و دارای بال ایستاده است. زمان گل دهی این گیاه از اردیبهشت تا تیرماه می‌باشد؛ این گیاه در دامنه‌های البرز، مناطق شرقی و غرب ایران می‌روید (۴). از جمله موارد استفاده و خواص درمانی گونه‌های مختلف جنس Prangos در پزشکی می‌توان به اثرات بادشکن، مقوی معده، نیرو دهنده، ضد نفخ، ضد انگل، ضد قارچ و ضد باکتری Gram منفی و مثبت اشاره کرد (۸-۵).

بررسی‌های فیتوشیمیایی انجام شده منجر به جداسازی و شناسایی انواعی از کومارین‌ها، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها و ترپنوئیدها در گونه‌های مختلف جنس Prangos شده است (۹). مطالعات سجادی و همکاران بر روی ریشه‌ی گیاه جاشیر دامی نشان دهنده‌ی ترکیبات کومارینی استول، ایزوایمپراتورین، اکسی‌پئوسدانین، پسورالن، اکسی‌پئوسدانین هیدرات، اکسی‌پئوسدانین منتولات و گوسفرول در ریشه‌ی این گیاه می‌باشد (۱۰).

کومارین‌ها دسته‌ای از ترکیبات ثانویه‌ی گیاهی هستند که از مشتقات بنزوپیرن بوده، در طبیعت به دو فرم گلیکوزیدی و آزاد وجود دارند (۱۱). در گزارش‌های متعددی کاربردهای درمانی مختلفی از مشتقات کومارینی گزارش شده است که اثرات ضد انعقادی، ضد التهابی، آنتی اکسیدانی، آنتی HIV و ضد سرطانی از جمله‌ی این موارد می‌باشد (۱۴-۱۲).

تعدادی از کومارین‌ها نقش حفاظتی بر روی سیستم عصبی داشته (۱۵) و تعدادی از آن‌ها اثر ضد لیشمانیایی علیه گونه‌های مختلف لیشمانیا از خود نشان داده‌اندغ در این بین، سه کومارین پرنیله اوراپتن (Auraptene)، اومبلیپرنین (Umbelliprenin) و استول (Osthol) آثار ضدلیشمانیایی قابل توجهی داشته‌اند (۱۶، ۱۲، ۳). طبق مطالعات انجام شده، اکسی‌پئوسدانین و ایزوایمپراتورین اثرات ضد التهابی (۱۸، ۱۷)، ضد سرطانی (۲۰، ۱۹) و ضد توموری (۲۰) نیز دارند.

در این تحقیق، هدف ما بررسی اثر لیشمانیسیدال کومارین‌های پرنیله ایزوایمپراتورین و اکسی‌پئوسدانین بر روی فرم پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور سویه‌ی استاندارد، در شرایط آزمایشگاهی بود.

روش‌ها

پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور سویه‌ی MRHO/IR/75/ER از دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به عنوان سویه‌ی مرجع تهیه گردید.

محیط کشت (Roswell Park Memorial Institute 1640) RPMI-1640 حاوی L-Glutamine از شرکت PAA (استرالیا) خریداری شد. سرم جنین گوساله (FCS یا Fetal calf serum) از شرکت سیگما (آمریکا)، آمفوتریسین B از شرکت سیپلا (هندوستان) و استرپتومایسین ۱ گرمی و پنی‌سیلین G ۱۰۰۰۰۰۰ واحد کریستال از شرکت جابر بن حیان (ایران) تهیه شد. سدیم بی‌کربنات، گلوکز، NaCl، Agar-Agar، BHI (Brain Heart Infusion) و DMSO (Dimethyl sulfoxide) از شرکت Merck (آلمان) و دو ترکیب خالص سازی شده‌ی ایزوایمپراتورین و اکسی‌پئوسدانین از طرح تحقیقاتی به شماره ۳۸۹۱۷۰ از دانشکده‌ی داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تهیه گردید.

کشت انگل

برای کشت انگل‌ها، ابتدا محیط‌های کشت NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) و RPMI1640 و محلول BHI طبق دستور شرکت سازنده تهیه شد. سپس، پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) از دمای ۹۶- درجه سانتی‌گراد خارج و به صورت پلکانی، دمای آن به دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد رسانده شد. آن گاه، انگل به محیط کشت NNN انتقال داده و یک میلی‌لیتر BHI استریل به آن اضافه شد.

برای جلوگیری از آلودگی‌های احتمالی، از آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین به میزان ۱۰۰ تا ۱۵۰ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر و پنی‌سیلین G به مقدار ۱۰۰ تا ۱۵۰ واحد به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت استفاده گردید (۱۶). محیط‌های کشت در انکوباتور با دمای ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد گذاشته شد و هر ۲ تا ۳ روز یک بار، مورد بررسی قرار گرفت.

بنا بر تجربه‌ی به دست آمده، بعد از ۴ تا ۵ روز تعداد انگل‌ها تا حد قابل قبولی در محیط کشت زیاد شد؛ در این حالت، برای جلوگیری از رشد بیشتر پروماستیگوت‌ها، محیط‌های کشت به یخچال انتقال داده می‌شد.

انتقال انگل به محیط کشت RPMI1640

جهت مجاور نمودن پروماستیگوت‌ها با غلظت‌های مختلف اکسی‌پئوسدانین و ایزو ایمپراتورین لازم بود

تا از محیط کشت فاقد Agar و گلبول قرمز جهت کشت پروماستیگوت ها استفاده شود. به همین دلیل، از مایع رویی محیط کشت NNN مقداری برداشته و تحت شرایط استریل، به شیشه‌های استریل حاوی ۷ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI1640 افزوده شد. برای جلوگیری از آلودگی‌های احتمالی، به محیط کشت، آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین به میزان ۱۰۰ تا ۱۵۰ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر و پنی‌سیلین G به مقدار ۱۰۰ تا ۱۵۰ واحد به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت استفاده گردید.

بنا بر تجربه‌ی به دست آمده، بعد از ۵ تا ۶ روز نگهداری در دمای ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، انگل‌ها در محیط کشت RPMI1640 به فاز ایستا رسیدند و کمتر به شکل Rosette موجود بودند؛ در این شرایط، شمارش انگل‌ها راحت‌تر امکان پذیر بود.

تهیه‌ی غلظت‌های مختلف از کومارین‌ها و تأثیر دادن آن‌ها روی انگل

در این مطالعه به بررسی اثر غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دو نوع کومارین مورد بررسی پرداخته شد. ابتدا، کومارین‌ها که پیشتر از گیاه Prangos ferulaceae خالص سازی شده بود (۲۱)، به وسیله‌ی ترازوی آنالیتیکال توزین و به منظور تهیه‌ی محلولی کاملاً شفاف، در DMSO خالص حل شد. سپس، از غلظت‌های ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کومارین در DMSO خالص به عنوان منشأ، برای تهیه غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده گردید.

برای تهیه غلظت‌ها، بعد از شمارش انگل روی لام نئوبار، مقدار مشخصی از محیط کشت که دارای یک میلیون انگل بود، برداشته و با حجم مشخصی از PBS (Phosphate buffered saline) و غلظت مورد نظر از کومارین و ۷ درصد DMSO (غلظت نهایی) در لوله‌ی اپندرف ۱/۵ میلی‌لیتر مخلوط شد تا به حجم یک میلی‌لیتر برسد؛ سپس محلول حاصل در انکوباتور در دمای ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. بعد از سپری شدن زمان‌های ۳، ۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، ابتدا اپندرف حاوی غلظت مورد بررسی خوب تکان داده شد؛ سپس، مقداری از آن در شرایط استریل در کنار شعله، روی لام نئوبار قرار گرفت و در زیر میکروسکوپ نوری تعداد انگل‌های مرده و زنده شمارش شد. انگل‌های زنده از طریق حرکت‌های وضعی، انتقالی و حرکت تاژک از انگل‌های مرده تشخیص داده می‌شدند.

در این مطالعه، از آمفوتریسین B با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به عنوان شاهد مثبت استفاده شد که در عمل، در همان ساعت اول تمام انگل‌ها را می‌کشت؛ شاهد منفی نیز حاوی حجمی از محیط کشت با تعداد یک میلیون انگل، همراه با مقدار مشخصی PBS و میزان ۷ درصد DMSO (غلظت نهایی) بود.

پس از مجاور نمودن کومارین‌ها با پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در محیط کشت RPMI1640، درصد مرگ و میر انگل در هر یک از نمونه‌ها، از حاصل تقسیم تعداد پروماستیگوت‌های مرده به تعداد کل (زنده + مرده) ضرب در ۱۰۰ محاسبه شد. بررسی اثر لیشمانیسیدال هر یک از غلظت‌ها بر روی پروماستیگوت‌ها ۳ بار و در ۳ روز مختلف تکرار شد و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار در هر بار گزارش شد.

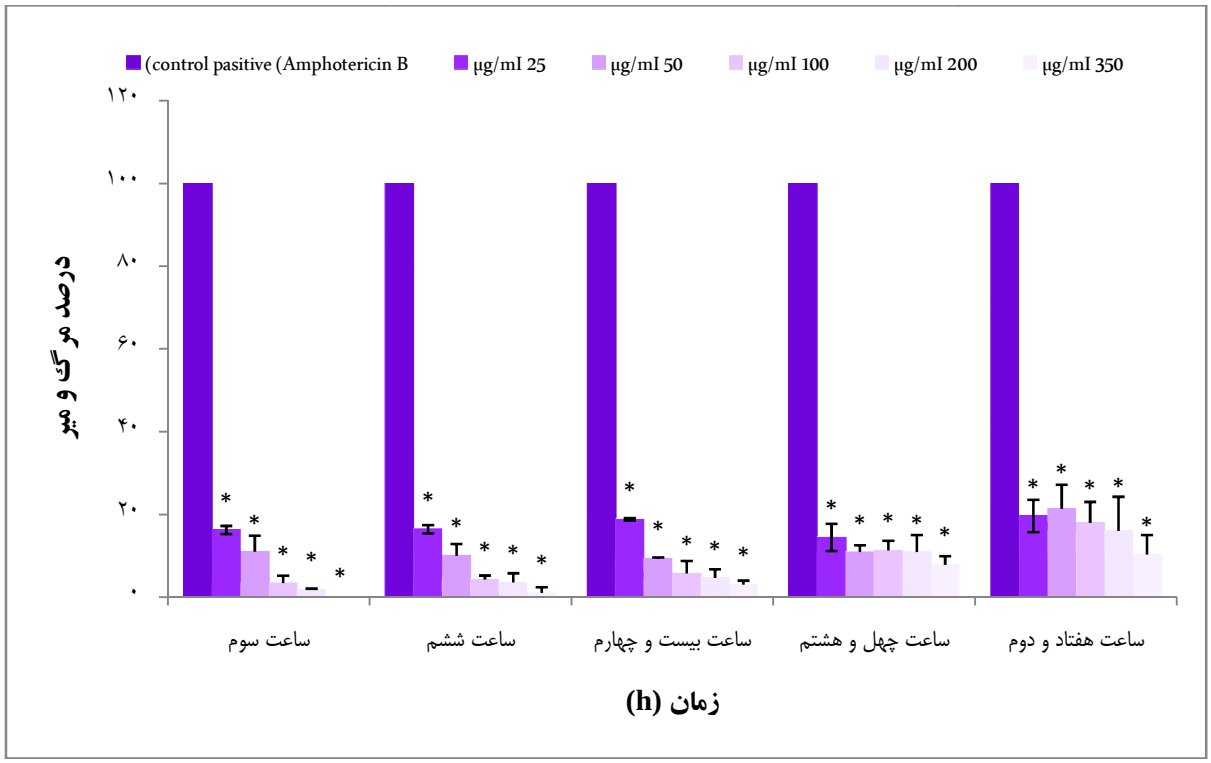
آنالیز آماری

داده‌های به دست آمده در زمان‌های مختلف، ابتدا از لحاظ نرمال بودن به وسیله‌ی آزمون ناپارامتری Kolmogorov-Smirnov مورد بررسی قرار گرفت. در صورت وجود اختلاف معنی‌دار ($P < ۰/۰۵$)، جهت نشان دادن اختلاف‌های دقیق‌تر از پس‌آزمون‌های متناسب (LSD) برای مقایسات دوتایی استفاده شد. کلیه‌ی تحلیل‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۷ (version 17, SPSS Inc., Chicago, IL) انجام پذیرفت.

یافته‌ها

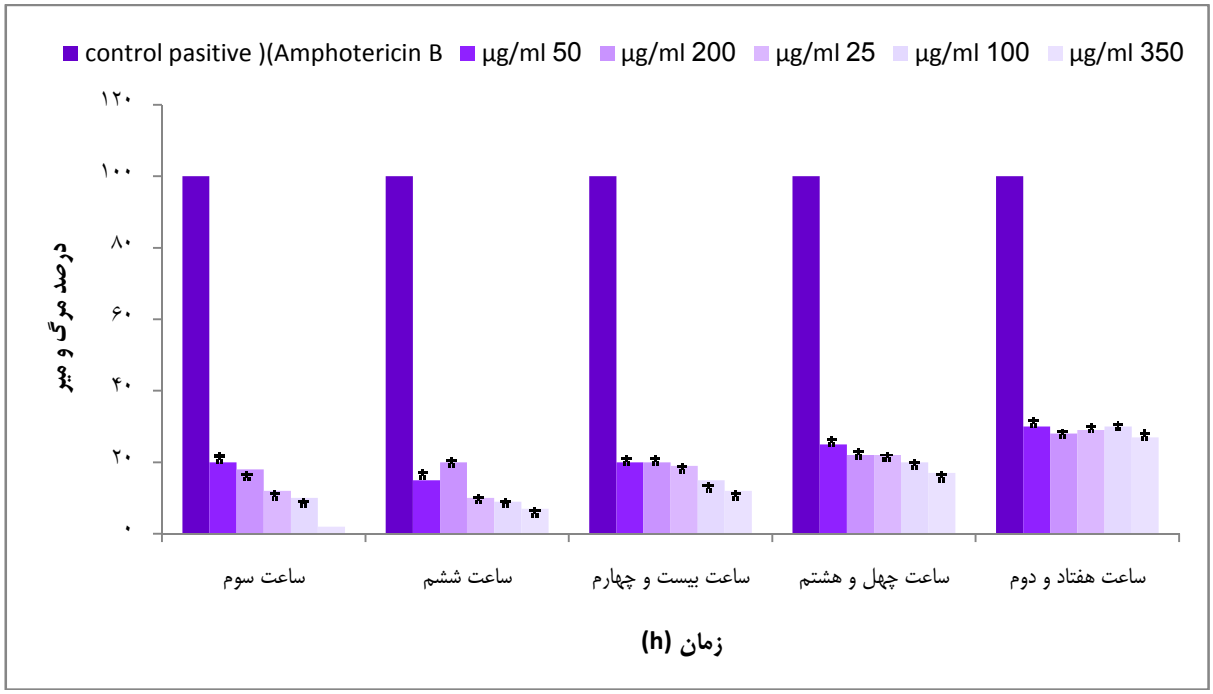
پس از مجاور نمودن کومارین‌ها با پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در محیط کشت RPMI1640 و محاسبه‌ی درصد مرگ و میر انگل در هر یک از نمونه‌ها، درصدهای به دست آمده به صورت نمودار گزارش شد و با شاهدهای منفی و مثبت مقایسه گردید. نتایج حاکی از آن بود که همه‌ی غلظت‌های اکسی‌پئوسدانین و ایزوایمپراتورین، نسبت به شاهد مثبت که ۱۰۰ درصد پروماستیگوت‌ها را در زمان اول می‌کشد، اختلاف معنی‌داری داشتند ($P < ۰/۰۵$) و اثر قابل مقایسه‌ای با شاهد منفی ایجاد نکردند (نمودار ۱).

بررسی‌های آماری نشان داد که میزان مرگ و میر انگل‌ها در همه‌ی غلظت‌های اکسی‌پئوسدانین و ایزوایمپراتورین با گروه کنترل مثبت در همه‌ی زمان‌ها اختلاف معنی‌دار دارد ($P < ۰/۰۵$) (نمودار ۲).



شکل ۱. تأثیر غلظت‌های مختلف اکسی‌پئوسدانین در زمان‌های مختلف روی درصد مرگ و میر پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور در مقایسه با شاهد مثبت

***: اختلاف معنی‌دار با شاهد مثبت ($P < ۰/۰۵$)**



شکل ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف ایزوایمپراتورین در زمان‌های مختلف روی درصد مرگ و میر پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور در مقایسه با شاهد مثبت

***: اختلاف معنی‌دار با شاهد مثبت (P < ۰/۰۵)**

بحث

لیشمانیوزها از جمله‌ی بیماری‌های انگلی مشترک بین انسان و حیوانات می‌باشند که همواره به وجود آورنده‌ی مسایل مهم بهداشتی در جوامع بشری در بسیاری از مناطق دنیا بوده‌اند. در حال حاضر، جهت درمان لیشمانیوز ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی‌موان به کار می‌روند که شامل دو ترکیب مگلومین آنتی‌مونیت (گلوکانتیم) و سدیم استیبوگلوکونیت (پنتوستام) هستند (۳).

درمان لیشمانیوز پوستی در طب سنتی به شکل‌های گوناگون خوراکی، مالیدنی و ضماد بوده است (۱۶). تحقیقات و مطالعات اخیر بر روی ترکیبات طبیعی، اثرات ضد لیشمانیایی آلکالوئیدها، ترپن‌ها، کینون‌ها، لاکتون‌ها، کومارین‌ها، استوجنین‌ها، چالکون‌ها، تترالن‌ها، لیگنان‌ها و ساپونین‌ها را روی برخی از گونه‌های لیشمانیا نشان داده است (۲۲). در بین ترکیبات کومارینی، کومارین‌های پرنیله به دلیل اثرات ضد لیشمانیایی، بیشتر مورد توجه هستند (۱۶، ۱۲).

در مطالعه‌ی Napolitano و همکاران، از کومارین پرنیله اوراپتن با Lethal concentration for 50% (LC_{50}) معادل ۱/۵ µg/ml اثر ضد لیشمانیایی قابل توجهی گزارش شده است (۳). ایرانشاهی و همکاران نیز در مطالعه‌ای بر روی کومارین پرنیله خالص سازی شده از گیاه Ferula szowitsiana، اثر ضد لیشمانیایی قابل توجهی با LC_{50} معادل ۴/۹ µg/ml از اومبلیپرنین گزارش کردند (۱۶).

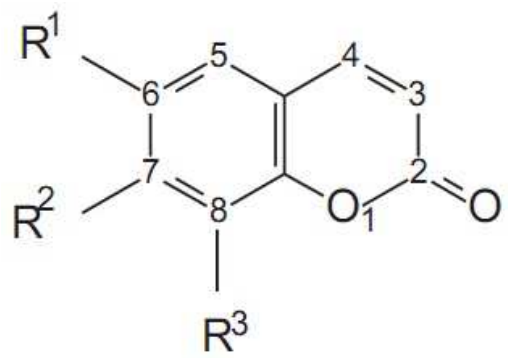
در تحقیقی دیگر، محسنی و همکاران به بررسی اثرات استول روی لیشمانیا پرداختند؛ در این تحقیق نیز استول اثرات ضد لیشمانیایی قابل توجهی با LC_{50} معادل ۷/۷ µg/ml از خود نشان داد (۱۲).

از آن جایی که در تحقیقات گذشته اثرات ضد لیشمانیایی قابل توجهی از کومارین‌های پرنیله، دیده شده بود (۱۶، ۱۲، ۳)، در این مطالعه اثر دو کومارین پرنیله‌ی دیگر به نام‌های اکسی‌پئوسدانین و ایزوایمپراتورین برای اولین بار روی فرم پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور سویه‌ی MRHO/IR/75/ER مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق، نشان دهنده‌ی این است که اکسی‌پئوسدانین و ایزوایمپراتورین بر خلاف کومارین‌های پرنیله اومبلیپرنین، استول و اوراپتن (که در مطالعات دیگر مورد تحقیق واقع شدند)، اثر کشندگی روی فرم پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور ندارند.

کومارین‌های پرنیله دارای خاصیت ضد میکروبی نیز می‌باشند. Stavri و Gibbons در پژوهش بر روی اثرات آنتی‌باکتریال اکسی‌پئوسدانین، اثرات ضد مایکوباکتریال قابل توجهی مشاهده کردند (۲۳).

در پژوهش Tada و همکاران، اکسی‌پئوسدانین و ایمپراتورین اثرات آنتی‌باکتریال ضعیفی از خود نشان دادند (۲۴).

Kim و همکاران مشاهده کردند که اکسی‌پئوسدانین و ایزوایمپراتورین در شرایط In vitro با القای آپوپتوز در سلول‌های ملانوما و در سرطان‌های ریه، تخمدان، (Central nervous system) CNS و کولون سبب القای اثر ضد توموری قابل توجهی شدند (۲۰). در شکل شماره‌ی ۳، ساختار اصلی مشتقات کومارین آورده شده است. از لحاظ ساختاری، دو کومارین اکسی‌پئوسدانین و ایزوایمپراتورین مشابه یکدیگرند و حاوی یک گروه اکسی پرنیل روی کربن شماره ۵ می‌باشند؛ تنها تفاوت آن‌ها، وجود گروه اپوکساید روی گروه پرنیل است که در ایزوایمپراتورین وجود ندارد (۲۰).



شکل ۳. ساختار اصلی مشتقات کومارینی (۲۰)

بررسی تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد که محل قرار گرفتن گروه پرنیل می‌تواند بر روی اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی این دسته از ترکیبات تأثیرگذار باشد. به عنوان مثال، de Souza و همکاران بیان کردند که وجود گروه اکسیطپرنیل روی کربن شماره ی۸ در ایمپراتورین، باعث کاهش اثر آنتی‌باکتریال می‌شود؛ در حالی که از کومارین پرنیله Heraclenol، که تنها تفاوت آن با ایمپراتورین هیدروکسیله شدن گروه پرنیل است، اثرات آنتی باکتریال قابل توجهی مشاهده شده است (۲۵).

همان گونه که ذکر شد، اثرات ضد لیشمانیایی سه کومارین پرنیله‌ی اوراپتن، اومبلیپرنین و استول در مطالعات قبلی مشاهده شده است (۱۶، ۱۲، ۳). اومبلیپرنین دارای یک گروه Farnesyl متشکل از ۳ واحد پرنیل، و اوراپتن دارای یک گروه Geranyl متشکل از ۲ واحد پرنیل است که محل قرار گیری گروه‌های پرنیل در این دو ترکیب بر روی کربن شماره‌ی ۷ و به واسطه‌ی پیوند اتری می‌باشد (۱۶). استول دارای یک گروه پرنیل روی کربن شماره‌ی ۸

است (۱۲). این احتمال وجود دارد که محل قرار گرفتن گروه پرنیل بر روی کومارین‌ها سبب لیپوفیل‌تر شدن ترکیب و تسهیل نفوذ آن از غشای سلول گردد. چنان که در تحقیق Yokoyama و همکاران، یکی از عوامل اتصال مولکول به غشای سلول، گروه پرنیل ذکر شده است (۲۶).

بنا بر مطالعات انجام شده این احتمال وجود دارد که اثر دو ماده‌ی اکسی‌پئوسدانین و ایزوایمپراتورین به خاطر وجود گروه اکسی‌پرنیل و همچنین محل قرار گیری گروه پرنیل در این دو ترکیب باشد.

پیشنهاد می‌شود که کومارین‌های پرنیله‌ی اکسی‌پئوسدانین و ایزوایمپراتورین به عنوان ترکیب ضد لیشمانیا استفاده نشوند.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل انجام طرح تحقیقاتی در معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد؛ نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از پشتیبانی مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشکده‌ی داروسازی و همچنین همکاری گروه انگل‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی و تمام کسانی که در پیشبرد این طرح دخیل بوده‌اند، تقدیر و تشکر به عمل آورند.

References

1. Nilforoushzadeh MA, Shirani Bidabadi L, Jafary R, Zolfaghari Baghbaderani A, Ghahraman Tabrizi M, Moradi Sh, et al. Topical effectiveness of different concentrations of nanosilver solution on leishmania major lesions in mice (Balb/c). J Isfahan Med Sch 2011; 29(158): 1575-82. [In Persian].
2. Azmuudeh M. Report on leishmaniasis in Iran (Tehran). Tehran, Iran: Ministry of Health and Medical Education; 1989. [In Persian].
3. Napolitano HB, Silva M, Ellena J, Rodrigues BD, Almeida AL, Vieira PC, et al. Aurapten, a coumarin with growth inhibition against Leishmania major promastigotes. Braz J Med Biol Res 2004; 37(12): 1847-52.
4. Ghahreman A. Iran colorful flora. Tehran, Iran: Research Institute of Forests and Rangelands; 2003. p. 114. [In Persian].
5. Ulubelen A, Topcu G, Tan N, Olcal S, Johansson C, Ucer M, et al. Biological activities of a Turkish medicinal plant, Prangos platychlaena. J Ethnopharmacol 1995; 45(3): 193-7.
6. Zargari A. Medicinal plants. Tehran, Iran: Tehran University Publications, 2001. p. 976. [In Persian].
7. Amiri H. Essential oil variation of Prangos ferulacea Lindl. in different stage of plant growth. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 2007; 23(1): 121-7. [Persian].
8. Baser KH, Demirci B, Demirci F, Bedir E, Weyerstahl P, Marschall H, et al. A new bisabolene derivative from the essential oil of Prangos uechtritzii fruits. Planta Med 2000; 66(7): 674-7.
9. Buckingham JB. Dictionary of natural products. London, UK: Chapman and Hall; 1998. p. 831.
10. Sajjadi SE, Shokoohinia Y, Gholamzadeh S. Phytochemical study of Prangos ferulacea (L.) Lindl [Thesis]. Isfahan, Iran: Isfahan University of Medical Sciences; 2011. p. 77-88. [In Persian].
11. Evans WCh. Trease and Evans' pharmacognosy. 14th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 1996. p. 230.
12. Mohseni N. Extraction, purification and evaluation of antileishmanicidal effect of prenylated coumarin from *ferulago angulata* in vitro [Thesis]. Isfahan, Iran: Isfahan University of Medical Sciences; 2012. p. 25-75. [In Persian].
13. Fylaktakidou KC, Hadjipavlou-Litina DJ, Litinas KE, Nicolaides DN. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/ antioxidant activities. Curr Pharm Des 2004; 10(30): 3813-33.
14. Iranshahi M, Sahebkar A, Hosseini ST, Takasaki M, Konoshima T, Tokuda H. Cancer chemopreventive activity of diversin from Ferula diversivittata in vitro and in vivo. Phytomedicine 2010; 17(3-4): 269-73.
15. Kang SY, Lee KY, Sung SH, Kim YC. Four new neuroprotective dihydropyranocoumarins from Angelica gigas. J Nat Prod 2005; 68(1): 56-9.
16. Iranshahi M, Arfa P, Ramezani M, Jaafari MR,

Sadeghian H, Bassarello C, et al. Sesquiterpene coumarins from Ferula szowitsiana and in vitro antileishmanial activity of 7-prenyloxycoumarins against promastigotes. Phytochemistry 2007; 68(4): 554-61.

17. Mingfa Z, Yaqin S. Antidiarrheal and anti-inflammatory effects or oxypeucedanin. Chinese Traditional and Herbal Drugs 1996; 12: 110-8.
18. Moon TC, Jin M, Son JK, Chang HW. The effects of isoimperatorin isolated from Angelicae dahuricae on cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase in mouse bone marrow-derived mast cells. Arch Pharm Res 2008; 31(2): 210-5.
19. Kang TJ, Lee SY, Singh RP, Agarwal R, Yim DS. Anti-tumor activity of oxypeucedanin from Ostericum koreanum against human prostate carcinoma DU145 cells. Acta Oncol 2009; 48(6): 895-900.
20. Kim YK, Kim YS, Ryu SY. Antiproliferative effect of furanocoumarins from the root of Angelica dahurica on cultured human tumor cell lines. Phytother Res 2007; 21(3): 288-90.
21. Sajjadi SE, Shokoohinia Y, Gholamzadeh S. Behbahani M, Fattahi A. Antiviral evaluation of coumarins from Prangos ferulacea L.(Lindl). Research in Pharmaceutical Sciences 2012; 7(5): S783.
22. Mendonca-Filho RR, Rodrigues IA, Alviano DS, Santos AL, Soares RM, Alviano CS, et al. Leishmanicidal activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of Cocos nucifera Linn. (Palmae). Res Microbiol 2004; 155(3): 136-43.
23. Stavri M, Gibbons S. The antimycobacterial constituents of dill (Anethum graveolens). Phytother Res 2005; 19(11): 938-41.
24. Tada Y, Shikishima Y, Takaishi Y, Shibata H, Higuti T, Honda G, et al. Coumarins and gamma-pyrone derivatives from Prangos pabularia: antibacterial activity and inhibition of cytokine release. Phytochemistry 2002; 59(6): 649-54.
25. de Souza SM, Delle MF, Smania A, Jr. Antibacterial activity of coumarins. Z Naturforsch C 2005; 60(9-10): 693-700.
26. Yokoyama K, Goodwin GW, Ghomashchi F, Glomset JA, Gelb MH. A protein geranylgeranyltransferase from bovine brain: implications for protein prenylation specificity. Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88(12): 5302-6.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 20.02.2013
Vol. 31, No. 235, 1st Week, July 2013
Accepted: 25.04.2013

Evaluation of Leishmanicidal Activity of Oxypeucedanin and Isoimperatorin on *Leishmania major* Promastigotes

Seyed Ebrahim Sajjadi PhD[1], Abbas-Ali Eskandarian PhD[2], Hossein-Ali Yousefi MSc[3], Marjan Mansourian PhD[4], Mohammad Taheri[5]

Original Article

Abstract

Background: Leishmaniasis has a wide range of clinical symptoms including cutaneous, mucocutaneous, and visceral leishmaniasis. Recently, advances have been observed in the field of using herbal medicines for the treatment of leishmaniasis. The study aimed to determine the in-vitro effect of two prenylated coumarins (oxypeucedanin and isoimperatorin) of Prangos ferulaceae (L.) Lindl with positive and negative controls on *Leishmania major*.

Methods: To have stationary phase of the growth curve, the parasites were cultured in NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) and RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) medias in the incubator. Then a certain amount of culture, containing approximately one million parasites, were exposed to oxypeucedanin and isoimperatorin and their effects were investigated after 3, 6, 24, 48, and 72 hours.

Findings: Non of the concentrations of oxypeucedanin and isoimperatorin had leishmanicidal effect compared to the positive control ($P < 0.05$).

Conclusion: Oxypeucedanin and isoimperatorin do not have leishmanicidal effect on *Leishmania major* promastigotes.

Keywords: *Leishmania major*, Coumarin, Oxypeucedanin, isoimperatorin, Prangos ferulaceae (L.) Lindl

Citation: Sajjadi SE, Eskandarian AA, Yousefi HA, Mansourian M, Taheri M. **Evaluation of Leishmanicidal Activity of Oxypeucedanin and Isoimperatorin on *Leishmania major* Promastigotes.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(235): 581-90

* This paper is derived from a Pharm D doctorate thesis No. 690638 in Isfahan University of Medical Sciences.

1- Professor, Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Lecturer, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Assistant Professor, Department of Biostatistics, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
5- Student of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences AND Isfahan Pharmaceutical Sciences Research Center AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Abbas-Ali Eskandarian PhD, Email: aeskandarian@med.mui.ac.ir