JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره دهم، شماره اول، ۱۳۹۳، پیاپی ۲۸: ۳۵-۲۷

بررسی اثر ضد لیشمانیایی عصاره متانلی گیاهان (*Ferula szowitziana,* *Ferula rigidula*) بومی آذربایجان شرقی بر روی پروماستیگوت انگل *لیشمانیا اینفانتوم*

اسماعیل فلاح[1*]، شهربانو نادری[2]، حسین ناظمیه[3]، احد بازمانی[4]، ژاله برار[5]، مجید خانمحمدی[6]

۱- مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران واستاد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۲- کارشناس ارشد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی،دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز،شیراز

۳- استاد مرکز تحقیقات فارماکولوژی و نانو تکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۴- کارشناس ارشد مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۵- دانشیار مرکز تحقیقات فارماکولوژی و نانوتکنولوژی داروئی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۶- دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد مرند، گروه علوم آزمایشگاهی، مرند ، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴ اردیبهشت ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: ۲۹ آبان ۱۳۹۲

چکیده

لیشمانیا اینفانتوم مسئول ایجاد لیشمانیازیس احشایی می‌باشد، این بیماری مشکل بهداشتی بیش از ۸۸ کشور جهان می‌باشد. داروهایی که برای درمان لیشمانیازیس استفاده می‌شود، یا دارای عوارض جانبی نامطلوب می باشند و یا اینکه مؤثر نیستند. بنابراین با توجه به شیوع این بیماری در اغلب مناطق جهان، تولید دارویی موثر، بی خطر و ارزان قیمت احساس می گردد. گونه‌های مختلف گیاه کما خاصیت آنتی باکتریال، ضدقارچ وضدلیشمانیایی دارند. اما تاکنون مطالعه ای در مورد تاثیرعصاره‌های گیاهان کمای خویی و کمای دشتی (Ferula rigidula و F. szowitsiana) روی پروماستیگوت انگل لیشمانیا اینفانتوم صورت نگرفته است. دو گونه گیاه فرولا بومی استان آذربایجان شرقی جمع آوری و عصاره‌های دی کلرومتانی و متانولی آنها تهیه گردید. پروماستیگوت های لیشمانیا اینفانتوم در محیط کشت 1640- RPMIدر شرایط In vitro کشت داده شدند و تأثیر عصاره‌های ذکر شده روی رشد و بقای پروماستیگوت‌های لیشمانیا اینفانتوم با لام نئوبار اندازه گیری شد. عصاره متانولی هر دو گونه گیاه فرولا در غلظت‌های مختلف، رشد پروماستیگوت‌های لیشمانیا اینفانتوم را وابسته به دوز مهار کرد. براساس نتایج حاصل از این مطالعه، گونه‌های F.rigidulal و F. szowitsiana بومی کشور نشان داد که گیاهان مناسبی برای بررسی خاصیت ضدلیشمانیایی در شرایط آزمایشگاهی هستند. لذا بررسی بیشتر و شناسایی ترکیبات موثر موجود در عصاره متانولی دو گونه بررسی شده لازم می‌باشد.

کلمات کلیدی: *گیاه کما، لیشمانیا اینفانتوم، پروماستیگوت*

* نویسنده مسئول: اسماعیل فلاح

آدرس: مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری تبریز و گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. تلفن:

پست الکترونیک: Fallahe@tbzmed.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

لیشمانیوز احشایی توسط گونه‌های مختلفی از جمله *لیشمانیا اینفانتوم* ایجاد می‌شود. سازمان بهداشت جهانی لیشمانیوز را جزو شش بیماری مهم مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا قرار داده است (۳۹). لیشمانیوز احشائی از مشکلات بهداشتی بیش از ۸۸ کشور جهان می‌باشد که بروز سالیانه آن به ۵۰۰ هزار مورد در سال می‌رسد (۳۹). *لیشمانیا* یکی از پاتوژن های مهم و متعلق به گروه تاژکداران خونی می‌باشد. جوندگان، سگ‌ها و در برخی مناطق اسب سانان به عنوان مخزن بیماری محسوب می‌شوند. انتقال بیماری به وسیله پشه خاکی‌هایی از جنس *لوتزومیا* و *فلبوتوموس* صورت می‌گیرد (۶، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۲۲ و ۳۰). درمان لیشمانیوز مشکل بوده و داروهایی که برای درمان لیشمانیوز بکار می‌روند، داروهای محدودی همچون آنتیموان‌های پنج ظرفیتی، آمفوتریسین B و پنتامیدین در سری دوم از داروهای مورد مصرف برای درمان *لیشمانیا* قرار می‌گیرند، ولی هردو این داروها حالت توکسیک دارند (۴، ۲۸ و ۳۳). با توجه به اهمیت بیماری و مشکلات کنترل و گسترش گزارشات مقاومت‌های داروئی به ترکیبات آنتیموانی در نقاط مختلف دنیا و عدم وجود واکسن، فقر و ناتوانی بیماران در اکثر مناطق آندمیک و عدم پاسخ به درمان در بیمارانی که همزمان به ویروس ایدز نیز مبتلا هستند، نیاز به شیوه‌های درمانی مناسب، کم خطرو ارزان قیمت احساس می‌شود (۳۴ و ۴۰). از طرفی سمّیت و عوارض جانبی داروهای شیمیایی موجود، دانشمندان را بر آن داشته تا ضمن مطالعه روی درمان‌های متنوع شیمیایی به داروهای گیاهی نیز توجه نمایند که با توجه به تاکید فراوان مکاتب مختلف طب مکمل و بویژه طب سنتی بر استفاده از گیاهان داروئی در درمان *لیشمانیا*، بررسی‌های بسیار جامعی در سالیان اخیر بر روی گیاهان مناطق مختلف جهان صورت گرفته است (۲، ۲۳، ۳۱، ۳۴ و ۴۰). گونه‌های مختلف کما (*Ferula*) از جمله گیاهان توصیه شده به این منظور هستند که خاصیت آنتی باکتریال و ضدقارچ و*ضدلیشمانیایی* آن به اثبات رسیده است. جنس کما متعلق به خانواده چتریان بوده و دارای بیش از ۱۳۰ گونه می‌باشد (۳۲). این گونه‌ها عمدتا در آسیای میانه، شوروی سابق، ایران، افغانستان، ترکیه و چین وجود داشته و ۳۰ گونه این جنس از ایران گزارش شده است (۲۵). این جنس به عنوان یک منبع خوب از ترکیبات بیولوژیکی فعال مثل مشتقات سزکوئی‌ترپن‌ها (۱۵، ۱۷، ۲۴ و ۳۸) و کومارین‌ها (۱۸، ۱۹، ۲۶ و ۲۷)، ترکیبات گوگردی (۱ و ۱۶) و کومارین گلیکوزیدها (۲۰) می‌باشد. در تحقیقات انجام گرفته بر روی ترکیبات و مواد بیولوژیک به دست آمده از این گیاهان، اثرات مختلف از جمله مهار تشکیل رنگدانه‌های میکروبی (۲۱)، ضدویروس (۴۱)، ضدمایکوباکتریوم (۳)، القاء کننده آپوپتوز سلول‌های سرطانی ملانوما (۵)، مهارکننده‌ی ماتریکس متالوپروتئیناز و پیشگیری کننده از سرطان و همچنین ضدسالک (۱۹) شناسایی شده است (۲۷). براساس تحقیقات صورت گرفته خاصیت آنتی باکتریال و ضدقارچ و*ضدلیشمانیایی* ترکیبات بیولوژیک موجود در این گیاه به اثبات رسیده است، اما مطالعه یی در مورد تاثیرعصاره‌های گیاهان *F.rigidula* و *F.szowitziana* روی پروماستیگوت انگل *لیشمانیا اینفانتوم* صورت نگرفته است. لذا در پژوهش حاضر بررسی تاثیرات *ضدلیشمانیای* دو گونه از کماهای آذربایجان (*F.rigidula* و *F.szowitsiana*) مورد توجه قرار گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

در بررسی حاضر، ریشه‌های دو گونه *F. rigidula* و *F. szowitsiana* در مرداد ۱۳۸۸ (انتهای فصل رویشی) از اراضی اطراف منطقه‌خواجه تبریز جمع‌آوری گردید.

عصاره گیری

گیاهان مورد نظر در سایه خشک و سپس ساقه و ریشه گیاهان خشک شده پودر شدند. عصاره متانولی با استفاده از حلال متانول در دمای اتاق و با روش سوکسوله تهیه گردید. بدین منظور به ازای هر ۱۰۰ گرم از گیاه، ۵۰۰ سی سی متانول اضافه شد و مخلوط مورد نظر هر چند ساعت یکبار و هر بار به مدت ۱۵-۳۰ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد تا مواد موثره گیاه بهتر خارج شود و پس از ۴۸ ساعت با استفاده از کاغذ صافی واتمن دو بار صاف گردید.عصاره‌های تهیه شده در دمای ۴۰-۵۰ درجه سانتیگراد با استفاده از دستگاه تقطیر در خلا خشک شدند.

کشت پروماستیگوت‌های *لیشمانیا اینفانتوم*

در این تحقیق از سویه استاندارد *لیشمانیا اینفانتوم* با کُد (MCAN/IR/97/LON 49) استفاده شد، ابتدا پروماستیگوت‌ها در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰٪FBS و ۲ میلی مولار ال-گلوتامین و جنتامایسین در دمای ۲۰-۲۵ درجه سانتیگراد کشت داده شدو غلظتی از انگل که به میزان ۵×۱۰^{۵} پروماستیگوت در هر میلی-لیتر می‌باشد، تهیه گردید.

تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانولی (*Ferula szowitsiana and Ferula rigidula*) روی پروماستیگوت *لیشمانیا اینفانتوم*

از پروماستیگوت‌های *لیشمانیا اینفانتوم* موجود در محیط کشت که در فاز (Stationary phase) هستند به میزان ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای به صورت تری پلیکیت (Triplicate) اضافه شد، به نحوی که در هر چاهک ۵×۱۰^{۵} پروماستیگوت قرار گرفت. سپس از عصاره‌های مختلف و داروی کنترل به ترتیب غلظت‌های (۰/۲۵، ۰/۳۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ mg/ml) تهیه شد و به میزان ۱۰ میکرولیتر به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه به صورت تری پلیکیت اضافه شد. گلوکانتیم و آمفوتریسین B به عنوان گروه کنترل مثبت و DMSO به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. پلیت به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۲۴ درجه سانتیگراد و فشار CO_2 ۵٪ قرار داده شد. پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون بقای پروماستیگوت‌ها با لام هموسیتومتر بررسی شد. این آزمایشات ۳ بار جداگانه تکرار گردید.

آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار Excel و آزمون One way ANOVA و Post hot dunnett تجزیه و تحلیل شد و $P<۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

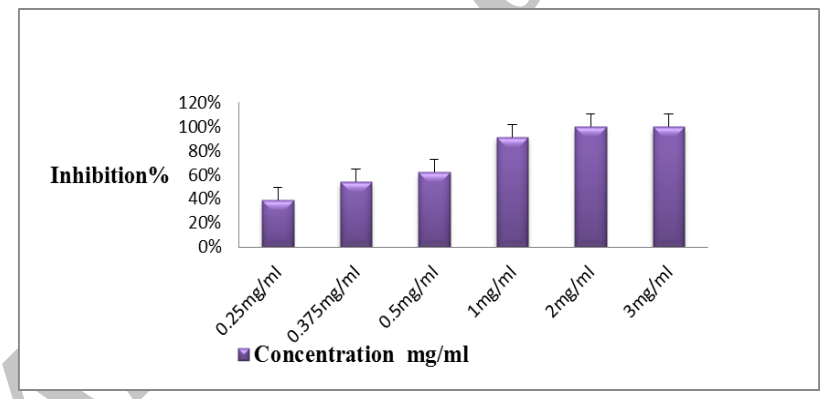
نتایج

در بررسی تاثیر عصاره متانلی *F. rigidula* و *F. szowitziana* بر روی انگل *لیشمانیا اینفانتوم در مقایسه با گروه‌های کنترل مشخص گردید که تمامی غلظت‌های مختلف عصاره متانلی F. rigidula و F. szowitziana* رشد و تکثیر پروماستیگوت *لیشمانیا اینفانتوم را به صورت* وابسته به دوز مهار کردند، این تاثیرات از لحاظ آماری معنی دار بود($P<0.05$). غلظت‌های ۲و۳ میلی گرم در میلی لیتر عصاره متانلی *F. rigidula* و *F. szowitziana* بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون ۱۰۰ درصد رشد پروماستیگوت‌های *لیشمانیا اینفانتوم* را مهار کردند که کاهش تعداد انگل‌ها در ۴۸ ساعت بعد از انکوباسیون نیز قابل مشاهده بود که

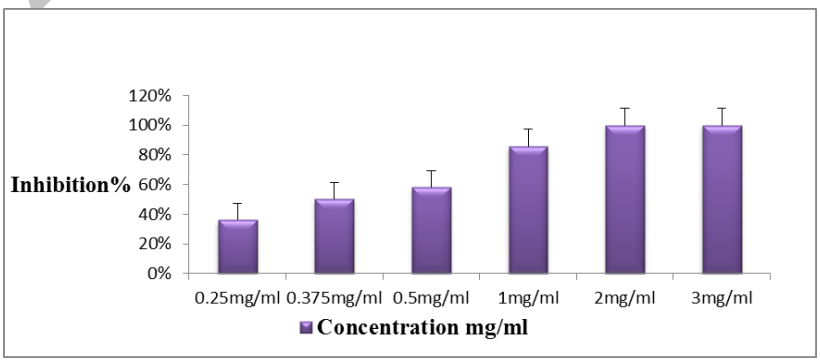
Archive of SID

www.SID.ir

این کاهش از لحاظ آماری می‌باشد (P<0.05). در غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر عصاره متانلی *F. rigidula*، ۸۶ درصد اثر مهار مشاهده شد که این میزان از لحاظ آماری معنی‌دار بود. غلظت‌های ۰.۲۵ و ۰.۳۷۵ و ۰.۵ میلی گرم در میلی لیتر عصاره متانلی *F. rigidula* به ترتیب ۳۶ و ۵۴ و ۵۸ درصد رشد پروماستیگوت *لیشمانیا اینفانتوم* را مهار کردند (نمودار۱). غلظت های ۰.۲۵ و ۰.۳۷۵ و ۰.۵ میلی گرم در میلی لیتر عصاره متانلی *F.szwitsiana* نیز به ترتیب ۳۹ و۵۶و۶۲ درصد رشد پروماستیگوت *لیشمانیا اینفانتوم* را مهار کردند *(نمودار۲)*، کاهش تعداد انگل‌ها در ۴۸ ساعت بعد از انکوباسیون نیز قابل مشاهده بود که این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار بود(P<0.05). همچنین در گروه شاهد (بدون حضور عصاره متانلی *F. rigidula* و *F. szwitsiana*) در تعداد انگل‌ها افزایش مشاهده گردید که این افزایش معنی‌دار بود و امفوتریسین B نیز ۱۰۰ درصد رشد انگل‌ها را مهار کرد. میزان LD50 (غلظتی که سبب کشته شدن نیمی از پروماستیگوت‌های لیشمانیا شود) عصاره متانلی هر دو گیاه با استفاده از نرم‌افزار اکسل محاسبه گردید. برای عصاره متانلی *F. rigidula* دوز 0.360 میلی گرم در میلی‌لیتر (نمودار۱) و برای عصاره متانلی *F. szwitsiana* دوز 0.352 میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد (نمودار ۲). جهت مقایسه میانگین گروه‌های مختلف تحت درمان و همچنین گروه Blank از روش‌های تجزیه و تحلیل آماری one way Anova و Post hot dunnett استفاده شد (P<0.05).



نمودار۱- فعالیت *ضدلیشمانیایی* عصاره متانولی *Ferula rigidula* بر حسب میلیگرم بر میلی لیتر



نمودار۲- فعالیت *ضدلیشمانیایی* عصاره متانولی *Ferula szowitsiana* بر حسب میلیگرم بر میلی لیتر

Archive of SID
www.SID.ir

بحث و نتیجه گیری

با انجام این مطالعه مشخص شد که عصاره‌های دو گیاه (*Ferula szowitsiana and Ferula rigidula*) بر روی پروماستیگوت *لیشمانیا اینفانتوم* در شرایط محیط کشت موثر بوده که جهت تایید موثر بودن این عصاره‌ها انجام آزمایشات در حیوانات آزمایشگاهی (*In vivo*) لازم می‌باشد که بدلیل وجود محدودیت‌هایی در این مطالعه انجام آن امکان پذیر نشد. مطالعات در مورد تاثیر گیاه *فرولا* بر روی انگل و جنس *لیشمانیا* به صورت محدود و انگشت شمار می‌باشد، در بیشتر مطالعاتی که صورت گرفته است از انواع مختلف گیاهان دیگر و گونه‌های مختلف *لیشمانیا*، مخصوصا *لیشمانیا ماژور* استفاده شده است (۲، ۲۹، ۳۱ و ۳۵). در مطالعه ایرانشاهی و همکاران، ترکیبات موجود در ریشه گیاه *F. szowitsiana* بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون اثر قابل توجهی بر روی رشد پروماستیگوت انگل *لیشمانیا ماژور* در دوز ۴/۹ µg/ml و ۵/۱ µg/ml داشت، در حالی که در مطالعه حاضر، دوز ۰/۳۵۲mg/ml، ۵۰ درصد اثر مهاری بر روی رشد و تکثیر پروماستیگوت *لیشمانیا اینفانتوم* را نشان داد که بالاتر بودن میزان دوز موثر در مطالعه حاضر نسبت به مطالعه فوق به دلیل صورت نگرفتن کروماتوگرافی عصاره متانولی است. در حالی که در مطالعه ایرانشاهی عمل کروماتوگرافی سزکویی ترپن کومارین صورت گرفت و اثر ۷- پرنی لوکزیکومارین۱ بر روی پروماستیگوت *لیشمانیا ماژور* با استفاده از لام نئوبار بررسی شد، با اینکه در مطالعه حاضر کروماتوگرافی صورت نگرفت اما از ترکیبات موجود در ریشه گیاه *F.szowitsiana* استفاده شد و نتیجه نیز پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون با لام نئوبار بررسی شد، مطالعه حاضر نیز، نشان داد که گونه *اینفانتوم* نیز همانند گونه *ماژور* نسبت به این فراکسیون دارو حساس می‌باشد (۱۹).در مطالعات صورت گرفته در مورد اثرات ضدمیکروبی *فرولا*، نقش گالبانیک اسید به عنوان یک ماده موثر و فعال در ریشه *F. szowitsiana* به اثبات رسیده است (۱۲، ۱۳ و ۳۶)، همچنین در مطالعه ایرانشاهی و همکاران گالبانیک اسید موجود در ریشه *F. szowitsiana* بر علیه پروماستیگوت *لیشمانیا ماژور* استفاده شد و موثر بودن ان به اثبات رسید (۱۹). موثر بودن گالبانیک اسید در بررسی‌های فوق الذکر از دلایل انتخاب این گیاهان در این پژوهش بوده است. در مجموع با توجه به نتایج ایرانشاهی و همکاران، فضلی بزاز و همکاران، چنین به نظر می‌رسد که گالبانیک اسید یکی از ترکیبات فعال موجود در عصاره ریشه گیاه *F. szowitsiana* است و در نتیجه عامل ضد*لیشمانیای* این گیاه نیز می‌تواند باشد. با اینحال اثبات این امر نیاز به مطالعات بیشتری دارد. همچنین در مطالعه شریعتی فر و همکاران روی اثر ضد*لیشمانیایی* میوه فلوس روی پروماستیگوت *لیشمانیا* نشان دادند که در غلظت‌های ۳٪ تا ۹٪ هیچگونه رشد انگلی مشاهده نشد. همچنین در مطالعه شریعتی فر و همکاران روی اثر ضدلیشمانیایی میوه فلوس روی پروماستیگوت لیشمانیا نشان دادند که در غلظت های ۳٪ تا ۹٪ هیچگونه رشد انگلی مشاهده نشد.

همانطور که در قسمت نتایج اشاره شد، هر دو گونه بررسی شده فعالیت ضد*لیشمانیایی* داشتند که دوز ۰/۳۷۵mg/ml عصاره متانولی *F. szowitsiana* و دوز ۰/۳۶۸mg/ml عصاره متانولی *F. rigidula*، مهار ۵۰ درصد را باعث شدند. همچنین طبق آنالیز آماری بین غلظت‌های مختلف عصاره‌ها و میزان مهار

Archive of SID

www.SID.ir

پروماستیگوت‌ها اختلاف معنی داری مشاهده شد که با افزایش غلظت عصاره میزان مهار پروماستیگوت‌ها نیز افزایش یافت. بنابراین امید است بتوان تا با بررسی بیشتر و شناسایی ترکیبات موثر در عصاره متانولی دو گونه بررسی شده و بررسی تاثیر آنها در بدن موجود زنده بتوان داروی مناسبی جهت درمان و یا بهبود ضایعات حاصل از *لیشمانیا* در بیماران یافت.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با حمایت مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی تبریز و بعنوان طرح شماره " ۲۰-۸۹ " آن مرکز اجرا گردیده است. و این مقاله منتج از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد خانم شهربانو نادری می باشد.

منابع

1. Abdel Sattar, E., El-Feraly, F., Nahrstedt, A., Coen, M. (1996). New sulphides from *Ferula rutabensis*. *Natural Product Research* **43:** 189-93.
2. Ahua, K.M., Ioset, J.R., Ioset, K.N., Diallo, D., Mauel, J., Hostettmann, K. (2007). Antileishmanial activities associated with plants used in the Malian traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* **110:** 99-104.
3. Appendino, G., Mercalli, E., Fuzzati, N., Arnoldi, L., Stavri, M., Gibbons, S., Ballero, M., Maxia, A. (2004). Antimycobacterial coumarins from the Sardinian giant fennel (*Ferula communis*). *Journal of Natural Product* **67:** 2108-10.
4. Armijos, R.X., Weigel, M.M., Calvopiña, M., Mancheno, M. (2004). Comparison of the effectiveness of two topical paromomycin treatments versus meglumine antimoniate for new world cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica* **91**: 153-60.
5. Barthomeuf, C., Lim, S., Iranshahi, M., Chollet, P. (2008). Umbelliprenin from *Ferula szowitsiana* inhibits the growth of human M4Beu metastatic pigmented melanoma cells through cell-cycle arrest in G1 and induction of caspase-dependent apoptosis. *Phytomedicine* **15:** 103-11.
6. Davies, C.R., Mazloumi Gavgani, A.S. (1999). Age, acquired immunity and the risk of visceral leishmaniasis: a prospective study in Iran. *Parasitology* **119**: 247-57.
7. El-Razek, M.H.A., Ohta, S., Hirata, T. (2003). Terpenoid coumarins of the genus *Ferula*. *Heterocycles* **60:** 689-716.
8. Fakhar, M., Mikhaeli, F., Hatam, G., Motazedian, M.H., Habibi, P., Fallah, E. (2008). Application of superior enzymatic systems for characterization of causative agents of visceral leishmaniasis (Kala-azar) in Iran using isoenzyme electrophoresis. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* **18**: 753.
9. Fallah, M., Bazmani, A. (2008). Association between endothelial selectin (E-Selectin) gene polymorphisms and E-Selectin level with visceral leishmaniais, in an ARMS-PCR based study. *Iranian Journal of Parasitology* **3**: 23-31.
10. Fallah, E., Farshchian, M., Mazlomi, A.S., Majidi, J., Kusha, A. (2006). Study on the prevalence of visceral leishmaniasis in rodents of Azarshahr district (New focus), northwest of Iran. *Archives of Razi Institute* **61**: 33-40.
11. Fallah, E., Khanmohammadi, M., Rahbari, S., Farshchian, M., Farajnia, S. (2011). Serological survey and comparison of two polymerase chain reaction (PCR) assays with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs. *African Jornal of Biotechnology* **10**: 648-56.
12. Fazly Bazzaz, B.S., Du, A.R., Iranshahi, M., Naderinasab M., Khajeh Karamodin, M. (2009). Evaluating the

Archive of SID

www.SID.ir

21. Iranshahi, M., Shahverdi, A.R., Mirjani, R., Amin, G.R., Shafiee, A. (2004). Umbelliprenin from *Ferula persica* roots inhibits the red pigment production in *Serratia marcescens*. *Zeitschrift Naturforsch* **59**: 506-8.
22. Khanmohamadi, M., Fallah, E., Rahbari S., Sohrabi, I., Farshchian, M. (2010). Study on seroprevalence of canine visceral leishmaniasis (CVL) in ownership dogs of Sarab, East Azerbaijan province, northwest of Iran with indirect immune fluorescence antibody test and its health importance in 2008-2009. *Journal of Animal and Veterinary Advances* **9**: 139-43.
23. Kolodziej, H., Albrecht F. Kiderlen. (2005). Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasitised RAW 264. 7 cells. *Phytochemistry* **66**: 2056-71.
24. Miski, M., Jakupovic, J. (1990). Daucane esters from *Ferula rigidula*. *Phytochemistry* **29**: 173-8.
25. Mozaffarian, V. (2003). *Dictionary of Iranian Plant Names*. 3th Edition. Farhang Moaser. Tehran: 228-9.
26. Nabiev, A.A., Khasanov, T.K., Malikov, V.M. (1982). A new terpenoid coumarin from *Ferula kopetdaghensis*. *Institute of the Chemistry of Plant Substances* **1:** 48-51.
27. Nabiev, A.A., Malikov, V.M. (1983). Microlobin- a new coumarin from *Ferula microloba*. *Institute of the Chemistry of Plant Substances* **19:** 700-4.
28. Navin, K.V., Chinmoy, S.D. (2004). Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* **48**: 3010-5.
29. Oshaghi, M.A., Ravasan, N.M., Javadian, E.A., Mohebali, M., Hajjaran, H., Zare, Z., Mohtarami, F., Rassi, Y. (2009). Vector incrimination of sand flies in the most important visceral leishmaniasis focus in Iran. *American* potentiating effect of galbanic acid from *Ferula szowitsiana* on three common antibiotics against resistant hospital isolates of *Staphylococcus aureus*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* **8:** 217-21.
13. Fazly Bazzaz, B.S., Iranshahi, M., Naderinasab, M., Hajian, S., Sabeti, Z., Masumi, E. (2010). Evaluation of the effects of galbanic acid from *Ferula szowitsiana* and conferol from *F. badrakema*, as modulators of multi-drug resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Research in Pharmaceutical Sciences* **5:** 25-32.
14. Freile-Pelegriin, Y., Robledo, D., Chan-Bacab, M.J., Ortega-Morales, B, O. (2008). Antileishmanial properties of tropical marine algae extracts. *Fitoterapia* **79:** 374-7.
15. Garg, S.N., Agarwal, S.K. (1987). New sesquiterpenes from *Ferula jaeschkeana*. *Planta Medical* **53**: 341 - 2.
16. Iranshahi, M., Amin, G., Amini, M., Shafiee, A. (2003). Sulfur containing derivatives from *Ferula persica* var. *latisecta*. *Phytochemistry* **63:** 965-6.
17. Iranshahi, M., Amin, G., Jalalizadeh, H., Shafiee, A. (2003). New germacrane derivative from *Ferula persica*. *Pharmaceutical Biology* **41:** 431-3.
18. Iranshahi, M., Amin, G., Shafiee, A. (2004). A new coumarin from *Ferula persica*. *Pharmaceutical Biology* **l42**: 440-2.
19. Iranshahi, M., Arfa, P., Ramezani, M., Jaafari, M.R., Sadeghian, H., Bassarello, C., Piacente, S., Pizza C. (2007). Sesquiterpene coumarins from *Ferula szowitsiana* and *in vitro* antileishmanial activity of 7-prenyloxycoumarins against promastigotes. *Phytochemistry* **68:** 554-61.
20. Iranshahi, M., Mojarab, M., Sadeghian, H., Hanafi-Bojd, M.Y. (2008). Schneider B. Polar secondary metabolites of *Ferula persica* roots. *Phytochemistry* **69:** 473-8.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Tropical Medicine and Hygiene **81:**572-7.

30. Parvizi, P., Mazloumi-Gavgani A.S. (2008). Two *Leishmania* species circulating in the Kaleybar focus of infantile visceral leishmaniasis, northwest. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **102**: 891-7.
31. Peraza-Sánchez, S.R., Cen-Pacheco, F., Noh-Chimal, A., May-Pat, F., Simá-Polanco, P., Dumonteil, E., García-Miss, M.R., Mut-Martín, M. (2007). Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. *Fitoterapia* **78**: 315-8.
32. Pimenov, M.G., Leonov M.V. (2005). The asian umbelliferae biodiversity database (ASIVM) with particular reference to south- west asian taxa. *Turkish Journal of Botany* **28:** 139-45.
33. Ponte-sucre, A. (2003). Physiological consequences of drug resistance in leishmania and their relevance for chemotherapy. *Kinetoplastid Biology and Disease BioMed Central* **2**:14.
34. Rocha, L.G., Almeida, J.R.G.S., Macedo, R.O., Barbosa-Filho, J.M.A. (2003). Review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine* **12**: 514-35.
35. Santos, A.O., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., Veiga Junior, V.F., Pinto, A.C., Nakamura, C.V. (2008). Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. *Journal of Ethnopharmacology* **120:** 204-8.
36. Shahverdi, A., Fakhimia, A., Zarrini, G., Dehghan, G., Iranshahi, M. (2007). Galbanic acid from *Ferula szowitsiana* enhanced the antibacterial activity of Penicillin G and Cephalexin against *Staphylococcus aureus*. *Biology and Pharmaceutical Bulletin* **30**: 1805-7.
37. Shariatifar, N., Chamanzari, H., Ghanay, M.S. (2006). The study of flos plant on progmastigote in culture. *Ofogh-e-Danesh Journal* **11:** 5-9.
38. Shikishima, Y., Takaisha, Y., Honda, G., Ito, M., Takeda, Y., Tori, M., Takaoda, S., Kodzhimatov, O.K., Ashurmetov, O. (2002). Sesquiterpenes from *Ferula penninervis*. *Journal of Natural Products* **65:** 1897-903.
39. World Health Organization (2010). Information on the epidemiology and control of the leishmaniasis by country or territory, Aviailable from: http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/.
40. Zauli-Nascimento, R.C., Miguel, D.C., Yokoyama-Yasunaka, J.K., Pereira, L.I., Pelli de Oliveira, M.A., Ribeiro-Dias, F., Dorta, M.L., Uliana, S.R. (2009). *In vitro* sensitivity of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis brazilian* isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Tropical Medicine and International Health* **5**: 68-76.
41. Zhou, P., Takaishi, Y., Duan, H., Chen, B., Honda, G., Itoh, M., Takeda, Y., Kodzhimatov, O.K., Lee, K.H. (2000). Coumarins and bicoumarin from *Ferula sumbul*: Anti-HIV activity and inhibition of cytokine release. *Phytochemistry* **53:** 689-97.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 10, Issue 1, 2014

Invitro survay on effect of root Methanol extract of two floral plants of Azarbaijan province, Iran (*Ferula szowitziana and Ferula rigidula*) on promasigote of *Leishmania infantum*

Fallah, E.[1]*, Naderi, Sh.[2], Nazemiyeh, H.[3], Bazmani, A.[4], Barar, J.[5], Khanmohammadi, M.[6]

1- Infectious and Tropical Diseases Research Centre, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. Professor of Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine,, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
2- Senior Expert of Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine,, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
3- Professor of Research Center for Pharmaceutical Nanotechnology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
4- Senior Expert of Infectious and Tropical Diseases Research Centre, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
5- Associate Professor of Research Center for Pharmaceutical Nanotechnology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
6- Department of Laboratory Sciences, Marand Branch, Islamic Azad University, Marand, Iran

Received Date:4 May 2013 *Accepted Date: 16 November 2013*

Abstract: *Leishmania infantum is responsible for visceral leishmaniasis regarded as one of the health problems of over than 88 countries. Drugs used to treat leishmaniasis have undesired side effects or they are not effective at all. Considering the prevalence of leishmaniasis disease, it is necessary to produce an effective, safe and inexpensive drug. Different species of ferula have antibacterial, antifungal and anti-Leishmania features. However, no study has been conducted on the effects of extracts of plants including Ferula rigidula and Ferula szowitsiana on promastigote of Leishmania infantum parasite. Two species of Azerbaijan province indigenous ferula were collected and their chloromethane and methanol extracts were prepared. Promastigotes of Leishmania infantum were cultivated at RPMI cultivation in vitro environment and the effects of the mentioned extracts on growth and survival of promastigotes of Leishmania infantum were evaluated using homocytometer slide under a microscope. Methanol extract of both ferula species with different concentrations were successful in controlling promastigote dose-dependent growth of Leishmania infantum. All outcomes resulted from verifying the extracts using homo cytometer slide. According to the results of the study, Ferula rigidula and Ferula szowitziana indigenous species of Iran demonstrated their appropriateness to study leishmaniacidal effects in vitro. Therefore, it is required to further study and identify the effective compounds found in methanol extract of the studied species.*
Keywords: *Ferula, Leishmania infantum, Promastigote.*

**Corresponding author: Fallah, E.*
Address: Assistant Professor, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. Tel:
Email: Efallah37@gmail.com & fallahe@tbzmed.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir