Downloaded from journal.rums.ac.ir at 21:13 IRST on Sunday September 24th 2017

مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۴، آبان ۱۳۹۴، ۶۷۸-۶۶۵

مطالعه برون تنی اثر مهارکنندگی تری‌ترپن‌های استخراجی گیاه فرفیون بر فعالیت آنزیم سیکلواکسیژناز-۱ و بررسی سایتوتوکسیسیتی بر رده سلولی ال-۹۲۹

عباسعلی پالیزبان[۱]، سید مصطفی قنادیان[۲]، حجت صادقی[۳]، بهاره قیصری[۴]

دریافت مقاله: ۹۳/۱۰/۱۳ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۳/۱۱/۲۸ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۴/۴/۲۱ پذیرش مقاله:۹۴/۶/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: تری‌ترپن‌ها می‌توانند اثر ضد التهابی داشته باشند. هدف از این مطالعه بررسی میزان مهارکنندگی مشتق سیکلوآرتانی تری‌ترپن‌های استخراج شده از گیاه فرفیون با نام‌های "سیکلوآرتان-۲۴-متیلن-۳-اُل (۱)، سیکلوآرتان-۲۳-ان-۳و۲۵-دی اُل (۲)، سیکلوآرتان-۲۳-ان-۲۵-متواکسی-۳- اُل (۳) و سیکلوآرتان-۲۴-ان-۳-اُل (۴)" بر فعالیت آنزیم سیکلواکسیژناز-۱ می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه از نوع تجربی است. آنزیم سیکلواکسیژناز-۱ از سلول‌های خونی (پلاکت و سلول‌های مونو-نوکلئار) توسط روش فیکول-پک استخراج شد. میزان مهارکنندگی تری‌ترپن‌ها (در غلظت‌های لگاریتمی ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌لیتر/میکروگرم) بر اساس فعالیت پراکسیدازی آنزیم سیکلواکسیژناز-۱ به روش نقطه پایانی مورد ارزیابی قرار گرفت. اثر سایتوتوکسیسیتی هر ترکیب بر رده سلولی اُل-۹۲۹، با اندازه‌گیری مرگ و میر سلولی (MTT) مطالعه شد.

یافته‌ها: ترکیبات ۱، ۲ و ۴ در غلظت‌های (۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌لیتر/میکروگرم) "به ترتیب" با میزان IC۵۰ برابر با، ۹/۶۵، ۱۶/۵۱، ۹/۲۲ (میلی‌لیتر/میکروگرم) اثر مهارکنندگی قابل قبولی بر آنزیم را در مقایسه با ترکیب کنترل، مهار کننده اختصاصی سیکلواکسیژناز-۱ (SC-560)، از خود نشان دادند. ترکیب ۳ در مقایسه با ترکیبات دیگر اثر مهارکنندگی ضعیفی بر آنزیم سیکلواکسیژناز-۱ از خود نشان داد (۱۰۰ میلی‌لیتر/میکروگرم < IC۵۰).تأثیر سمیت ترکیبات بر مرگ و میر سلول‌های اُل-۹۲۹ در مقایسه با دوکسوروبیسین نشان داد که ترکیبات ۱، ۲، ۳ و ۴ دارای اثر توکسیک با IC۵۰ به ترتیب برابر با ۶۴/۸۸، ۶۴/۴۷، ۶۰< و ۶۶/۲۳ میکروگرم/ میلی‌لیتر هستند.

نتیجه‌گیری: تری‌ترپن‌های نوع سیکلوآرتان گیاه فرفیون می‌توانند خاصیت مهارکنندگی آنزیم سیکلواکسیژناز-۱ از خود نشان دهند. مطالعه سایتوتوکسیسیتی نشان می‌دهد که احتمالاً از این ترکیبات در غلظت‌های کم می‌توان برای درمان بیماری‌های ناشی از افزایش فعالیت این آنزیم استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: تری‌ترپن، سیکلواکسیژناز-۱، سیکلوآرتان، التهاب، رده سلولی اُل-۹۲۹

۱- دانشیار گروه بیوشیمی‌بالینی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
تلفن:۰۳۱-۳۷۹۲۷۰۳۵، دورنگار: ۰۳۱-۳۷۹۲۷۰۳۵، پست الکترونیکی: palizban@pharm.mui.ac.ir
۲- استاد یار گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی و مرکز تحقیقات علوم دارویی اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- استاد گروه شیمی‌دارویی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- دکترای عمومی‌داروسازی، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی و علوم داروئی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 21:13 IRST on Sunday September 24th 2017

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی جهت درمان انواع التهاب‌ها در سرتاسر جهان بسیار متداول می‌باشد. بررسی اثرات ضد التهابی گیاهان دارویی که بر اساس اطلاعات اولیه از طب سنتی گرفته شده است مدتی است که در کشور ایران مورد توجه واقع شده است. به عنوان مثال در یک مطالعه نشان داده شده است که گیاه گشنیز (Coriandrum sativum L) دارای اثر ضد دردی و ضد التهابی است [۱]. همچنین، در یک مطالعه دیگر نشان داده شده است که عصاره هیدروالکلی میوه کرفس (Apium graveolens) دارای اثر ضد دردی و ضد التهابی است [۲].

گیاه فرفیون به عنوان یک گیاه شناخته شده در طب سنتی می‌باشد که در درمان بیماری‌هایی از قبیل رماتیسم، دردهای پشتی و آسم سابقه‌ای طولانی دارد و اثرات ضد دردی و ضد ویروسی آن نیز ثابت شده است [۴-۳]. خانواده فرفیون، خانواده بزرگی از گیاهان دارویی می‌باشد که دارای حدود ۳۰۰ جنس و ۵۰۰۰ گونه می‌باشد که در نواحی حاره و معتدله انتشار وسیع دارد و مهم‌ترین جنس آن اوفوربیا Euphorbia می‌باشد. گونه‌های مختلف این جنس دارای ترکیبات شیمیایی متفاوتی هستند. یکی از انواع این ترکیبات، تری‌ترپن‌ها می‌باشند. تری‌ترپن‌ها متابولیت‌های ثانویه مشتق از منابع طبیعی می‌باشند که دارای یک اسکلت ۳۰ کربنه که از ۶ واحد ایزوپرن مشتق شده است، می‌باشند [۵]. تری‌ترپن‌ها دارای انواع خطی، چهار حلقه‌ای و پنج حلقه‌ای می‌باشند که یکی از انواع حلقه‌های موجود در این دسته ترکیبات سیکلوآرتان با ساختار استروئیدی می‌باشند که از حلقوی شدن اسکوالن ۲-۳ اپوکساید بدست می‌آیند و به عنوان یک ترکیب حد واسط در بیوسنتز گیاهی به کار می‌روند [۸-۶].

مطالعات اولیه که بر روی اوفوربیا و ترکیبات تری‌ترپنی و استروئیدی استخراج شده از این گیاه انجام شده، مشاهده شده است که این ترکیبات اثر ضد درد و ضد التهاب دارند [۱۰-۹]. اما تاکنون مطالعه‌ای که اثر این ترکیبات را به طور ویژه بر روی آنزیم سیکلواکسیژناز بررسی کند گزارش نشده است. التهاب به عنوان یک پاسخ محافظتی طبیعی و واکنش دفاعی بدن در برابر آسیب بافتی ناشی از ضربه فیزیکی، مواد شیمیایی خطرناک و عوامل میکروبیولوژیک است. در این شرایط مسیر آراشیدونیک اسید که حاوی ۲ مسیر متابولیکی (سیکلواکسیژناز و لیپواکسیژناز) می‌باشد، به عنوان یکی از سازوکارهای مهم و اساسی در التهاب شناخته می‌شود، فعال می‌گردد. در این مسیر پروستاگلاندین‌ها به عنوان مهم‌ترین واسطه‌های التهابی به حساب می‌آیند که در طی مسیر سیکلواکسیژناز توسط آنزیم‌های COX تولید می‌شوند [۵].

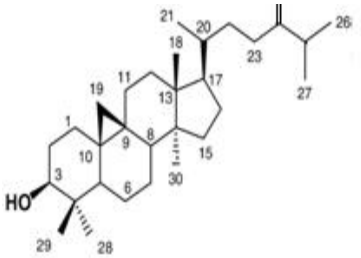
آنزیم سیکلواکسیژناز (EC.1.14.99.1) که به طور رسمی و در ژنتیک به نام پروستاگلاندین-اندوپراکسید سنتاز معروف است، در سنتز ترکیباتی بنام پروستانوئیدها که شامل پروستاگلاندین‌ها (PG)، پروستاسیکلین و ترومبوکسان(Tx) هستند نقش اساسی دارند. این آنزیم دارای دو جزء می‌باشد، سیکلواکسیژناز و پراکیسداز. بنابراین، دو نقش را از خود به نمایش می‌گذارد. جزء سیکلو اکسیژناز در ابتدا آراشیدونیک اسید را به هیدروپراکسی اندوپراکسید (PGG_2) تبدیل می‌کند و

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 21:13 IRST on Sunday September 24th 2017

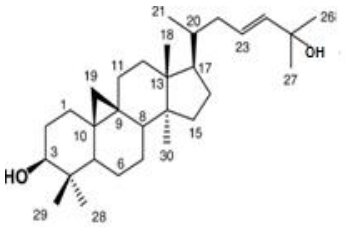
سپس جزء پراکسیداز، اندوپراکسیدا (گروه پراکسید) را به الکل مربوطه خود (PGH_2) احیا می‌کند که این ترکیب پیش‌ساز پروستاگلاندین‌ها، ترمبوکسان‌ها و پروستاسایکلین‌ها می‌باشد [۱۳-۱۱]. به خوبی مشخص شده است که آنزیم سیکلواکسیژناز دارای دو ایزوفرم می‌باشد. سیکلواکسیژنار-۱ (COX-1) و سیکلواکسیژناز-۲ (COX-2). در بعضی از مطالعات آزمایشگاهی که توسط Sigthorsson G و همکاران انجام شده است وجود سیکلواکسیژناز-۳ (COX-3) به صورت مشکوکی مشاهده شده است ولی به صورت تجربی قابل تشخیص و شناسایی نشده که ممکن است به دلیل طول عمر کوتاه آن باشد [۱۴]. آنزیم‌های سیکلو اکسیژناز-۱ و -۲ جزو آنزیم‌های گروه اکسیدوردوکتازها می‌باشد. آنزیم سیکلو اکسیژناز-۱ در انواع سلول‌ها یافت می‌شود و در تنظیم عملکرد طبیعی مخاط معده، پلاکت‌های خونی و جریان خون کلیوی درگیر می‌باشد در حالی که آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ بر خلاف سیکلو اکسیژناز-۱ در شرایط فیزیولوژیکی در انواع سلول‌ها یافت نمی‌شود ولی در شرایط التهابی و استرس تب و درد فعال می‌شود [۱۶-۱۵]. سیستم‌های سنجش فراوانی جهت تعیین اثر مهاری داروها و ترکیبات جدید بر روی این دو ایزوفرم وجود دارد. به طور معمول در این سیستم‌ها از آنزیم خالص شده از سلول‌های ترانسفکت شده [۱۹-۱۷] و یا از خون کامل و یا از یک نوع سلول خونی جداشده استفاده می‌شود [۲۳-۲۰]. اما معمولاً در اکثر پروتکل‌ها از خون کامل و یا از سلول‌های خونی استفاده می‌شود. این در حالی است که در تمام این سیستم‌ها از پلاکت، PGE-2 و یا از TXA-2، جهت تعیین فعالیت سیکلواکسیژناز-۱ استفاده می‌شود [۲۵-۲۴]. مهار کننده‌های این آنزیم به عنوان مسکن و ضد درد به طور وسیعی استفاده می‌شوند. مهم‌ترین آنها داروهای غیر-استروئیدی ضد التهاب (NSAIDs) مثل آسپیرین و ایبوپروفن را می‌توان نام برد.

تحقیقات گسترده‌ای در شرف انجام است تا عوارض ناشی از این دسته داروهای ضد درد و ضد التهاب را کاهش دهند. امروزه گیاهان دارویی در تأمین بهداشت و سلامتی جوامع به لحاظ درمان و پیشگیری از بیماری‌های، از ارزش و اهمیت خاصی برخوردار است. گرایش به استفاده از داروهای شیمیایی و سنتزی به ویژه در طی سال‌های اخیر روبه افزایش بوده است. اگرچه داروهای شیمیایی را نمی‌توان به دلیل سرعت اثر درمانی در مدت زمان کوتاه و مقدار کم به راحتی با داروهای گیاهی جایگزین کرد ولی نباید از عوارض و سمیت در طول دوره درمان غافل بود. بنابراین، اثرات مخرب و جانبی داروهای شیمیایی از یک طرف و ایجاد آلودگی‌های زیست محیطی از سوی دیگر گرایش استفاده از فرآورده‌های دارویی گیاهی را بیشتر می‌کند. در این بین امروزه ترکیبات شیمیایی بدست آمده از گیاهان، فرصت‌های مهمی را جهت پیدا کردن داروهای جدید با منشاء طبیعی فراهم آورده است. در این راستا بر آن شدیم تا ترکیبات استخراج شده از گیاهان دارویی را که احتمالاً دارای اثرات ضد درد و ضد التهاب هستند را مورد مطالعه قرار دهیم. لذا با توجه به کاربرد و استفاده گیاه فرفیون در طب سنتی، مطالعه برون‌تنی اثر مهارکنندگی تری‌ترپن‌های استخراجی این گیاه بر فعالیت آنزیم سیکلواکسیژناز-۱ و بررسی سایتوتوکسیسیتی بر رده سلولی ال-۹۲۹ مورد مطالعه قرار گرفت. لازم به ذکر است که رده سلولی فیبروبلاست

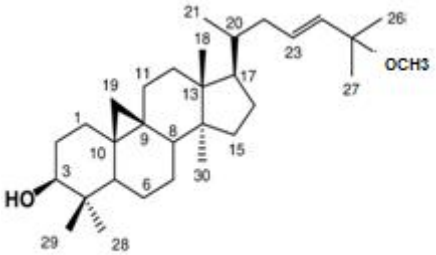
موشی ال-۹۲۹ یک رده سلولی استاندارد و نرمال است که توسط کمپانی ATCC جهت مطالعه و بررسی توکسیسیتی دارویی معرفی و عرضه می‌شود. به همین دلیل در این مطالعه جهت آزمون توکسیسیتی ترکیبات تری‌ترپنی از این رده سلولی استفاده شده است تا نتایج حاصل از این تحقیق بتواند به چگونگی استفاده این گیاه و شناسایی اثرات سایتوتوکسیک آن کمک کند.



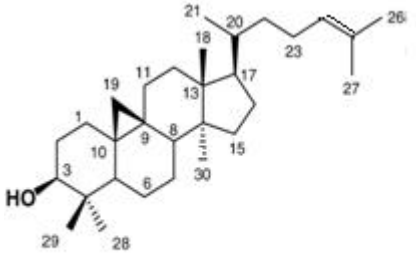
ترکیب ۱: سیکلوآرتان-۲۴- متیلن-۳- ال



ترکیب ۲: سیکلوآرتان-۲۳- ان-۳و۲۵- دی ال



ترکیب ۳: سیکلوآرتان-۲۳-ان-۲۵- متواکسی-۳- ال



ترکیب ۴: سیکلوآرتان-۲۴-ان-۳-ال

شکل ۱- ساختارترکیبات تری‌ترپن نوع سیکلوآرتان

مواد و روش‌ها

نوع مطالعه بر اساس شیوه انجام پژوهش و مداخله‌گرها از نوع تجربی است. نتایج مداخله از طریق مقایسه شاهد و آزمایش مشخص می‌گردد. انتخاب ترکیبات تری‌ترپنی عبارتند از چهار ترکیب خالص تری‌ترپن نوع سیکلو آرتان (شکل ۱) که از گیاه فرفیون استخراج شده بود و ساختار آن قبلاً توسط طیف NMR تعیین شده بود از مرکز تحقیقات علوم دارویی دانشکده داروسازی اصفهان جهت بررسی میزان مهارکنندگی آنزیم سیکلو اکسیژناز-۱ دریافت شد.

یک بسته پلاکت خالص از بانک انتقال خون دریافت و در دمای ۴°C نگهداری شد. ابتدا مقدار ۱۰۰۰µl از پلاکت را برداشته، به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰g و در دمای ۴°C سانتریفیوژ شد. آنگاه محلول رویی خالی و سلول‌های ته نشین شده در بافر سرد تریس هیدروکلراید (۰/۱M و pH=۷/۸) که حاوی EDTA (۱ mM) بود، قرارداده تا پراکنده شوند. سپس سلول‌ها را در آب سرد به مدت ۱۰ دقیقه، سونی کیت شدند تا به صورت هموژن در بافر در آیند و دیواره سلولی آنها تخریب و محتوای سلولی خارج شوند. سپس این محلول به مدت ۱۰ دقیقه در

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 21:13 IRST on Sunday September 24th 2017

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 21:13 IRST on Sunday September 24th 2017

۱۰۰۰۰g در دمای ۴°C بار دیگر سانتریفوژ شد و مایع رویی حاصل از سانتریفوژ روی یخ نگهداری شد و به منظور تعیین فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است آنزیم سیکلواکسیژناز-۱ از سلول‌های خونی با روش فیکول-پک نیز استخراج شد.

جهت انجام اندازه‌گیری فعالیت کیت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سیکلواکسیژناز به روش فلوریمتریک از شرکت سایمن آمریکا خریداری و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. تعیین اثر مهاری ترکیبات تری‌ترپنی استخراج شده از گیاه فرفیون، بر روی آنزیم سیکلواکسیژناز-۱ از طریق سنجش فعالیت پراکسیدازی آنزیم سیکلو اکسیژناز انجام شد. در این روش آزمایش فعالیت پراکسیدازی آنزیم به روش کالریمتریک از طریق اکسید شدن رنگ تترا متیل-پارا-فنیلن دی آمین [Tetramethyl-p-phenylenediamine ,TMPD] و شدت رنگ در طول موج ۵۹۰ نانومتر با دستگاه پلیت ریدر اندازه‌گیری شد.

قبل از پر کردن چاهک‌ها و انجام آزمایش، از نمونه‌های حاوی آنزیم که در مرحله قبل تهیه شده بود، به طور جداگانه ۱۵۰µl برداشته و به میکروتیوپ‌های مجزا منتقل شد و به مدت ۵ دقیقه روی بن ماری گذاشته شد. سپس میکروتیوپ‌ها به مدت ۱ دقیقه در ۸۰۰۰g سانتریفیوژ شدند و از محلول رویی به سه چاهک‌های پلیت آزمایش انتقال داده شد. این سری چاهک‌ها به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفتند.

در مرحله بعد بافر تریس هیدروکلراید موجود در کیت با غلظت ۲۰۰ mM به نسبت ۱:۱ با آب دیونیزه رقیق شد و pH بافر با محلول ۰/۱ نرمال سود یا ۰/۱ نرمال اسید کلریدریک روی ۷/۴ تنظیم شد. این بافر در دمای ۴°C تا زمان انجام آزمایش نگهداری گردید و برای محلول‌سازی نیز مورد استفاده قرار گرفت. محلول هم (Heme) در این آزمایش بر اساسدستورالعمل بدین صورت تهیه شد که µl ۴۰ از محلول هم (Heme) موجود در کیت که در DMSO حل شده به ۹۶۰µl بافر تریس هیدروکلراید ۷/۴ pH اضافه شد. این محلول هم (Heme) رقیق شده تا ۱۲ ساعت در دمای اطاق پایدار و قابل استفاده است. محلول آراشیدونیک اسید موجود در کیت نیز ابتدا به نسبت ۱:۱ با KOH مخلوط شد و سپس به نسبت ۱:۸ با آب دیونیزه رقیق شد. باید توجه داشت که این محلول رقیق شده آراشیدونیک اسید در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه پایدار است که قبل آزمایش باید تهیه شود.

جهت اندازه‌گیری میزان مهارکنندگی ترکیبات تری‌ترپنی بر آنزیم مورد آزمایش ترتیب چاهک‌های پلیت به صورت هفت ردیف و با دو بار تکرار به ترتیب زیر در نظر گرفته شده است. حجم نهایی هر چاهک µl ۲۰۰ بود. لازم به ذکر است که حلال ترکیبات مورد آزمایش دی متیل سولفواکسید (DMSO) بود.

۱-شاهد: چاهکی است که هیچ‌گونه فعالیت آنزیمی ندارد که حاوی ۱۰µl محلول هم(Heme)، ۴۰µl آنزیم غیر فعال سلولی، ۱۰µlحلال DMSO و ۱۴۰µl بافر تریس می‌باشد.

۲-کنترل منفی: چاهکی است که باید دارای ۱۰۰٪ یا ماکزیمم فعالیت آنزیم سیکلو اکسیژناز-۱ باشد. این چاهک حاوی ۱۰µlمحلول هم(Heme)، ۴۰µl آنزیم سیکلواکسیژناز-۱ استخراج شده سلولی، ۱۰µl حلال DMSO و ۱۴۰µl بافر تریس می‌باشد. جهت بررسی

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 21:13 IRST on Sunday September 24th 2017

تأثیر احتمالی حضور حلالِ DMSO بر فعالیت آنزیم این آزمایش به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.

۳-کنترل اثر حلال: چاهکی است که حاوی ترکیبات موجود در مورد ۲ است، بجز این که به جای حلال ۱۰µl بافر تریس اضافه شده است. با مقایسه نتایج آزمایش‌های مورد ۲ و ۳ اثر حلال بر جذب و فعالیت آنزیم مشخص می‌شود.

۴-کنترل مثبت: جهت مقایسه میزان مهار کنندگی ترکیبات این آزمایش انجام شد. کنترل مثبت چاهکی است که دارای آنزیم استخراج شده از سلول به همراه مهار کننده اختصاصی سیکلو اکسیژناز-۱ به نام ۵-(۴-کلروفنیل)-۱-(۴-متوکسی فنیل)-۳-تری فلورومتیل پیرازول (SC-560) که به صورت آماده در کیت موجود است، می‌باشد. این چاهک حاوی ۱۰µlمحلول هم (Heme)، ۴۰µl آنزیم سیکلو اکسیژناز-۱ استخراج شده سلولی، ۱۰µlحلال DMSO، ۱۰µl SC-560 (۶µM) و ۱۳۰µl بافر تریس می‌باشد.

۵-آزمایش‌ها: در نهایت برای سنجش فعالیت مهاری ترکیبات تری‌ترپنی چاهک‌هایی بدین صورت تهیه شد. هر چاهک حاوی ۱۰µlمحلول هم (Heme)، ۴۰µl آنزیم سیکلو اکسیژناز-۱ استخراج شده سلولی، ۱۰ µlحلال DMSO، ۱۰µl از ترکیبات تری‌ترپنی با غلظت‌های ۱ µg /ml، ۱۰ و۱۰۰ و ۱۳۰µl بافر تریس می‌باشد. لازم به ذکر است تهیه ترکیبات تری‌ترپنی با غلظت‌های ۱،۱۰ µg/ml از نمونه اولیه (۱۰۰µg /ml) استفاده شد و با رقیق کردن توسط بافر تریس به میزان ۱۰۰ و ۱۰ برابر به ترتیب ساخته شد.

بعد از اتمام مراحل فوق پلیت به مدت چند ثانیه به آرامی‌تکان داده می‌شود و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری می‌شود. سپس به همه چاهک ۲۰µl از معرف ان، ان، ان-تترامتیل-پارا-فنیلن دی آمین (TMPD) موجود در کیت اضافه می‌شود. واکنش آنزیمی‌با اضافه کردن ۲۰µl محلول آراشیدونیک اسید به تمامی‌چاهک‌ها آغاز می‌شود. دوباره پلیت به مدت چند ثانیه به خوبی تکان داده می‌شود و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری می‌شود. جذب یا دانسیته نوری هر چاهک در طول موج ۵۹۰ نانومتر با یک پلیت ریدر اندازه‌گیری می‌شود. درصد مهارکنندگی ترکیبات به کمک فرمول زیر محاسبه گردید، همچنین غلظت ترکیبات که ۵۰٪ اثر مهار کنندگی دارد (IC۵۰) نیز محاسبه گردید.

درصد مهار آنزیم توسط نمونه =[(جذب بلانک−جذب نمونه)-(جذب بلانک−جذب کنترل منفی)]/(جذب بلانک−کنترل منفی)]×۱۰۰

جهت تعیین توکسیسیتی ترکیبات مورد آزمایش از رده سلولی فیبروبلاست ال-۹۲۹ استفاده شد. این رده سلولی اصولا جهت تعیین مطالعات توکسیسیتی مورد استفاده قرار می‌گیرد و یک رده سلولی استاندارد جهت این‌گونه مطالعات است و به همین دلیل انتخاب شد. این رده سلولی ابتدا در محیط کشت RPMI 1640، در شرایط دمای ۳۷° C و ۵٪ CO_2 کشت داده شد.

حجم ۱۸۰µl از سلول‌ها با غلظت $۲×۱۰^{۴}$ سلول بر میلی‌لیتر به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه انتقال داده شد. سلول‌های موجود در پلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO_2 و شرایط ذکر شده، رشد پیدا کردند. حجم ۲۰µl از ترکیبات تری‌ترپنی که با بافر PBS به صورت سریالی با

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 21:13 IRST on Sunday September 24th 2017

غلظت‌های μg/ml ۱، ۱۰، ۲۰،۴۰،۶۰، ۸۰ تهیه شده بودند، به چاهک‌ها مورد آزمایش انتقال یافتند.

همچنین، برای هرغلظت، درصد حلال محاسبه و یک چاهک به عنوان کنترل منفی برای هر غلظت در نظر گرفته شد. بعد از ۴۸ ساعت انکوبه کردن پلیت، در دمای۳۷°C و CO_2 ۵٪، حجم ۲۰μl از معرف MTT به تمام چاهک‌ها اضافه گردید و ۳ ساعت انکوبه شد. در نهایت کریستال‌های فورمازان تشکیل شده در چاهک‌ها به کمک DMSO ۱۵۰μl به کمک میکرو پیپت حل شد. جذب رنگ تولید شده در هر چاهک به کمک یک الایزا ریدر در ۵۷۰nm اندازه‌گیری شد. درصد بقای سلولی طبق فرمول زیر برای هر غلظت محاسبه گردید.

$$\text{درصد بقای سلولی} = \frac{(\text{میزان جذب بلانک} - \text{میزان جذب نمونه})}{(\text{میزان جذب بلانک} - \text{میزان جذب کنترل})} \times ۱۰۰$$

در این مطالعه از نرم‌افزار Excel جهت ترسیم گراف‌ها و آنالیز آماری توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. برای بررسی متغیرهای کمی از آزمون t مستقل و در صورت لزوم از آزمون Mann-Whitney استفاده شد. مقادیر IC۵۰ و فاصله اطمینان ۹۵ ٪ آن بر اساس مدل رگرسیون پروبیت محاسبه و گزارش شده است. در این مطالعه مقدار p کمتر از ۰/۰۵ به عنوان ارتباط معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سیکلواکسیژناز-۱: فعالیت پراکسیدازی آنزیم سیکلواکسیژناز-۱ به روش نقطه پایانی مورد مطالعه قرار گرفت. مهار کنندگی ترکیبات تری‌ترپنی حاوی سیکل آرتان ۱، ۲، ۳ و۴ با غظت‌های ۱، ۱۰ و۱۰۰ میکرو گرم در میلی‌لیتر بر آنزیم سیکلواکسیژناز-۱ مطالعه شد.

نمودار ۱ نشان می‌دهد که با افزایش غلظت، درصد مهار کنندگی افزایش می‌یابد. اثر تغییرات غلظت این ترکیبات بر مهار کنندگی آنزیم با مهار کننده ویژه سیکلو اکسیژناز-۱ به نام ۵-(۴-کلروفنیل)-۱-(۴-متوکسی فنیل)-۳-تری فلورومتیل پیرازول (SC-560) که در غلظت ۹/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر اثر ماکزیمم مهار کننده‌گی را دارد مقایسه شد. همان‌گونه که در نمودار ۱ در نمودار ستونی مشخص است، غلظت‌های ۱۰۰ میکروگرم / لیتر از ترکیبات ۱، ۲، و ۴ با غلظت ۹/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر از SC-560 قابل مقایسه است (p>۰/۰۵).

در حالی که ترکیب شماره ۳ در غلظت ۱۰۰ میکروگرم / میلی‌لیتر در مقایسه با SC-560 در غلظت ۹/۶ میکروگرم / میلی‌لیتر، بطور قابل ملاحظه‌ای اثر مهارکنندگی کمتری از خود نشان می‌دهد (p<۰/۰۵). IC۵۰ ترکیبات تری‌ترپنی در فاصله اطمینان ۹۵٪، بر اساس مدل رگرسیون پروبیت محاسبه و در جدول ۱ گزارش شده است. همان‌گونه که در جدول ۱ نشان داده شده است، ۵۰ IC ترکیبات ۱، ۲، و ۴ به ترتیب برابر با ۹/۶۵، ۱۶/۵۱، ۹/۲۲ میلی‌لیتر/میکروگرم می‌باشد. IC۵۰ ترکیب شماره ۳ بیش از ۱۰۰ میلی‌لیتر/میکروگرم بدست آمد.

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 21:13 IRST on Sunday September 24th 2017

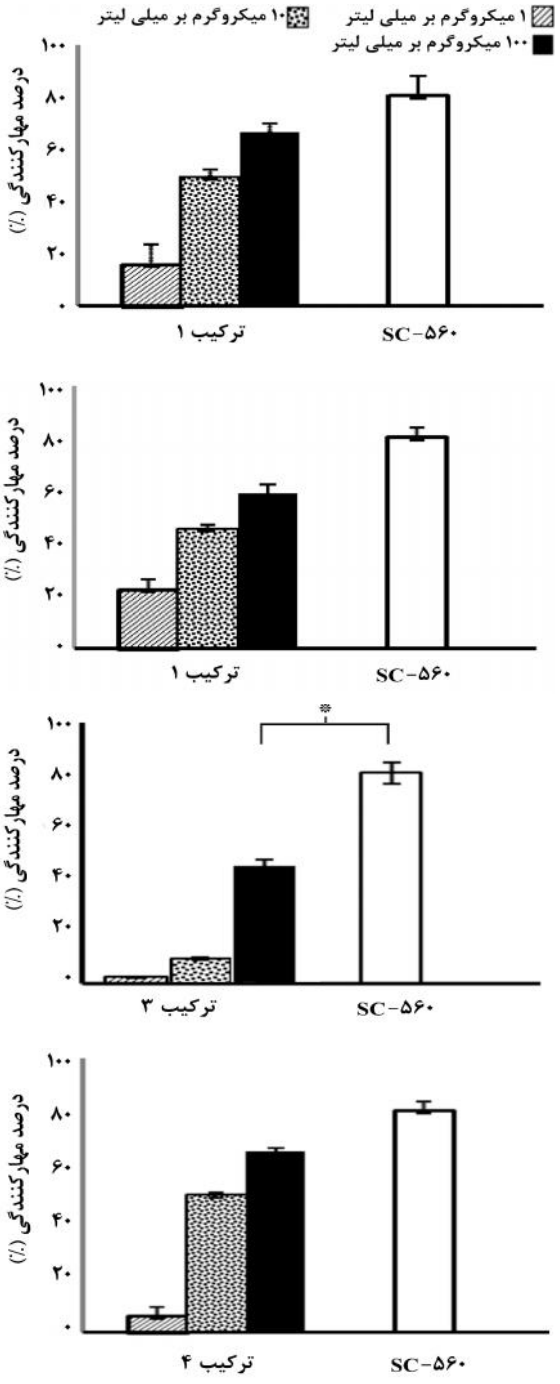
جدول ۱- درصد مهار آنزیم سیکلو اکسیژناز-۱ و Inhibitory Concentration (IC۵۰) ترکیبات در غلظت‌های ۱،۱۰،۱۰۰ µg /ml

ترکیب	غلظت (µg /ml)	میزان مهارکنندگی آنزیم سیکلو اکسیژناز-۱ (%)	IC۵۰ (µg /ml)	فاصله اطمینان ۹۵٪	
				دامنه پایین	دامنه بالا
۱	۱	۱۶/۴۶	۹/۶۵	۰ /۹۱۷	۰/۵۳۲
	۱۰	۵۱/۵۷			
	۱۰۰	۶۹/۰۷			
۲	۱	۲۳/۴۵	۱۶/۵۱	۰/۳۲۱	۰ /۶۸۷
	۱۰	۴۷/۶۸			
	۱۰۰	۶۱/۴۷			
۳	۱	۲/۵۴	>۱۰۰*	۰/۹۸۳	۱/۵۷۰
	۱۰	۱۰/۰۹			
	۱۰۰	۴۶/۹۵			
۴	۱	۶/۱۷	۹/۲۲	۰/۷۲۲	۱/۱۴۲
	۱۰	۵۱/۵۹			
	۱۰۰	۶۸/۳۵			

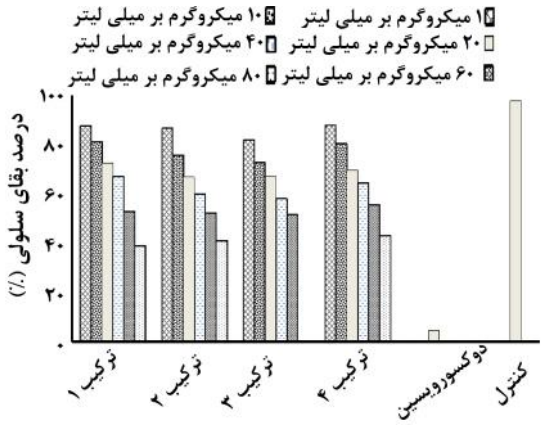
برای بررسی متغیرهای کمی از آزمون t مستقل و در صورت لزوم از آزمون Mann-Whitney استفاده شد. مقادیر IC۵۰ و فاصله اطمینان ۹۵٪ آن بر اساس مدل رگرسیون پروبیت محاسبه و گزارش شده است. مقدار p کمتر از ۰/۰۵ به عنوان ارتباط معنی‌دار در نظر گرفته شد و با ستاره مشخص شده است.

همان گونه که در بخش مواد و روشها شرح داده شد، جهت تعیین توکسیسیتی ترکیبات تری‌ترپنی از رده سلولی ال-۹۲۹ استفاده شد. آزمایش MTT، آزمایشی است که می‌توان مرگ و میر سلول‌ها را در حضور یک ترکیب سمی اندازه‌گیری کرد. نتایج حاصل از این آزمایش در نمودار ۱ نشان داده شده است. نمودار ۲ درصد بقای سلول‌های ال-۹۲۹ را در حضور چهار ترکیب ۱،۲، ۳ و ۴ در غلظت‌های ۱،۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با کنترل سلولی به عنوان کنترل منفی و دوکسوروبیسین (۱۰۰ng/well) به عنوان کنترل مثبت نشان می‌دهد. دوکسوروبیسین یک آنتراسایکلین آنتی‌بیوتیک است که به طور گسترده‌ای به عنوان یک عامل ضد سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد. دوکسوروبیسین احتمالاً با اتصال به DNA و مهار ساخت DNA و RNA از طریق ایجاد اختلال در ساختمان مولکولی و ایجاد ممانعت فضایی از رشد و گسترش سلول‌ها جلوگیری می‌کند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که IC۵۰ توکسیسیتی ترکیبات تری‌ترپنی حاوی سیکل آرتان ۱، ۲، ۳ و۴ به ترتیب برابر با ۶۴/۸۸، ۶۴/۶۷، ۶۰< و ۶۶/۲۳ می‌باشد.

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 21:13 IRST on Sunday September 24th 2017



نمودار ۱- مقایسه میزان مهار آنزیم سیکلو اکسیژناز- ۱ توسط ترکیبات با شماره ۱، ۲ ، ۳ و ۴ در مقایسه با مهار کننده اختصاصی SC-560. درصد مهارکنندگی ترکیبات ۱، ۲، ۳ و۴ با غلظت‌های ۱، ۱۰ و۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر با ترکیب SC-560 که مهارکننده اختصاصی سیکلواکسیژناز-۱ با غلظت ۹/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد مقایسه شده است. مقدار p کمتر از ۰/۰۵ به عنوان ارتباط معنی‌دار در نظر گرفته شد که به صورت ستاره‌دار نشان داده شده است.



نمودار۲- درصد بقای سلولی، سلول‌های اُل-۹۲۹ در غلظت‌های مختلف چهار ترکیب تری‌ترپنی مورد آزمایش در مقایسه با کنترل سلولی و دوکسوروبیسین به عنوان کنترل مثبت مقایسه شده‌اند. غلظت‌های ترکیبات مورد آزمایش ۱، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد.

بحث

ترکیبات شیمیایی که دارای ساختار سیکلو آرتانی هستند از گیاهان مختلف جداسازی و تخلیص شده‌اند [۲۷-۲۶] ترکیبات تری‌ترپنی نوع سیکلوآرتان محدوده وسیعی از فعالیت‌های زیستی از جمله فعالیت ضد التهابی را دارا می‌باشند [۲۹-۲۸]. در این مطالعه اثر مهار کنندگی بعضی از مشتقات سیکلوآرتانی تری‌ترپن‌های استخراج شده از گیاه فرفیون از جمله سیکلوآرتان-۲۴-متیلن-۳-اُل (۱)، سیکلوآرتان-۲۳-ان-۳و۲۵-دی اُل (۲)، سیکلوآرتان-۲۳-ان-۲۵-متواکسی-۳- اُل (۳) و سیکلوآرتان-۲۴-ان-۳-اُل (۴) بر فعالیت آنزیم سیکلواکسیژناز-۱ مورد بررسی قرار گرفته است. التهاب در پاسخ به آسیب بافتی است که همراه با درد است و واکنش طبیعی و دفاعی بدن را جهت ترمیم و درمان خودبخود در پی دارد. این مسیر وابسته به سیستم ایمنی بدن نیز می‌باشد. در این مسیر آنزیم‌هایی مانند سیکلواکسیژناز ۱و ۲ و لیپواکسیژنازها فعال می‌شوند تا پیش ماده خود آراشیدونیک اسید را به واسطه‌های التهابی جهت ترمیم

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 21:13 IRST on Sunday September 24th 2017

آسیب تبدیل کنند. پروستاگلاندین‌ها به عنوان مهمترین واسطه‌های التهابی به حساب می‌آیند که در طی مسیر فعالیت آنزیم سیکلو اکسیژناز تولید می‌شوند [۵].

در این مطالعه نشان داده شد که ترکیبات تری‌ترپنی ۱، ۲ و ۴ با ترکیب SC-560، که مهار کننده اختصاصی سیکلو اکسیژناز-۱ است و در غلظت ۹/۶μM دارای ماکزیمم اثر مهار کنندگی است (۸۳/۵۸٪) قابل مقایسه هستند. ترکیبات ۱، ۲ و ۴ درغلظت ۱ μg/ml به ترتیب ۱۶/۴۶٪، ۲۳/۴۵٪ و ۶/۱۷٪ آنزیم را مهار کردند، اما اثر مهار کنندگی قابل قبولی تری‌ترپن‌های فوق در غلظت ۱۰ μg /ml به ترتیب ۵۱/۵۷٪، ۴۷/۶۸٪ و ۵۱/۵۹٪ می‌باشد. اثر مهارکنندگی این سه ترکیب بر فعالیت آنزیم سیکلو اکسیژناز-۱ با افزایش غلظت (۱۰۰μg/ml) به ترتیب ۶۹/۰۷٪، ۶۱/۴۷٪ و ۶۸/۳۵٪ نیز افزایش می‌یابد. این روند نشان می‌دهد که با افزایش غلظت ترکیبات ۱، ۲ و ۴، آنزیم به طور موثر مهار می‌شود. این در حالیست که ترکیب ۳ در غلظت‌های ۱ μg/ml، ۱۰ و۱۰۰ به ترتیب توانست به میزان ۲/۵۴٪ ، ۱۰/۰۹٪ و ۴۶/۹۵٪ آنزیم سیکلو اکسیژناز-۱ را مهار کند. مشاهدات نشان می‌دهد که ترکیب ۳ از قدرت مهار کنندگی کمتری نسبت به ترکیبات دیگر دارد. یکی از مواردی که در توجیه اثرات مشاهده شده می‌توان گفت این است که احتمالا ترکیب ۳ بدلیل حضور گروه متوکسی ($-OCH_3$) بر روی کربن شماره ۲۵ نتوانسته به طور موثر در جایگاه فعال آنزیم قرار گیرد و آن را مهار کند. ولی آنچه مشخص است ترکیبات دارای ساختار مشابهی هستد که فقط اختلاف در استخلاف و اتصال کربن‌های شماره ۲۳، ۲۴ و ۲۵ می‌باشد. کربن شماره ۲۵ در ترکیب ۱ دارای پروتون (-H)، در ترکیب شماره ۲ گروه هیدروکسیل (-OH)، در ترکیب ۳ گروه متوکسی ($-OCH_3$) و در ترکیب شماره ۴ فقط اتصال دو گانه موجود است. با توجه به اینکه آنزیم‌ها فضا گزین هستند، بنابراین، یک تغییر جزیی در ساختار یک مهار کننده می‌تواند اثر چشمگیری از خود نشان دهد. در مورد ترکیب ۱ با حضور گروه متیل روی کربن ۲۵ و گروه متیلن روی کربن ۲۴ اثر مهاری با مقداری کاهش حفظ شده است و در ترکیب ۴ نیز نسبت به ترکیب ۱ با حذف گروه متیلن اثر مهار کنندگی ترکیب هنوز حفظ شده است. این موضوع نیاز به مطالعات بیشتری دارد تا بتوان علت اصلی را پیدا کرد.

مطالعاتی که اثر ترکیبات تری‌ترپنی یا عصاره‌های گیاهی حاوی ترکیبات تری‌ترپنی بر فعالیت آنزیم سیکلو اکسیژناز را بررسی کرده باشند بسیار نادر است. به همین دلیل محدودیت این پژهش مقایسه این مطالعه با سایر مطالعات در این حیطه می‌باشد. یکی از مطالعات که می‌توان به آن اشاره کرد، مطالعه‌ای است که در جنوب آفریقا توسط Eldeen و همکاران یک تری‌ترپن را از برگ‌های گیاه Trichilia dregeana استخراج کرده‌اند و مطالعات ضد التهابی روی آن انجام داده‌اند. تری‌ترپن مورد آزمایش سیکلوآرتان-۲۳- ان-۳و۲۵- دی اُل است که در غلظت ۱۰۰μM آنزیم سیکلو اکسیژناز-۱ و ۲ را تا حدودی توانسته مهار کند و اثر ضد التهابی در محیط *in vitro* از خود نشان دهد [۳۰]. این تحقیق، مشاهدات ما در مطالعه اثر ضد التهابی ترکیب ۲ (سیکلوآرتان-۲۳-ان-۳و۲۵- دی‌اُل) را نیز تأیید می‌کند. همچنین، در مطالعه ای توسط Fernandez-Areche و همکاران انجام شده است، مشاهد شده که استفاده موضعی از لاتکس گیاه افوربیا که حاوی تری‌ترپن‌های چهار حلقه ای است، دارای اثر ضد التهابی قوی بر روی ادم گوش موش است [۳۱].

در بررسی دیگر که در دانشگاه نیجریه توسط Falodun و همکاران انجام شد، عصاره آبی گیاه Euphorbia heterophylla که حاوی ترکیبات تری‌ترپنی بود، بر روی مدل حیوانی اثرات ضد التهابی بارزی از خود نشان داد [۳۲].

در این مطالعه مشاهده شد که اثر توکسیسیتی تمام ترکیبات وابسته به دوز می‌باشد و میزان IC۵۰ محاسبه شده برای ترکیبات تری‌ترپنی ۱، ۲، ۳، و ۴ که به ترتیب عبارت بودند از µg /ml ۶۴/۸۸، ۶۴/۴۷، ۶۰< و ۶۶/۲۳. می‌توان نتیجه گرفت هیچکدام از ترکیبات در غلظت کمتر از µg /ml ۶۰ توکسیک نمی‌باشند. ترکیبات ۱، ۲ و۴ توانسته اند در غلظت‌های کمتر از IC۵۰ حاصل از آزمایش توکسیسیتی، ۵۰ درصد از فعالیت آنزیم سیکلو اکسیژناز-۱ را مهار کنند، بنابراین این ترکیبات اثر مهاری کنندگی مؤثرتری برآنزیم در غلظت‌های غیر توکسیک از خود نشان دادند.

محدودیت این مطالعه این است که به اثرات مهار کنندگی این دسته از ترکیبات بر فعالیت آنزیم سیکلو اکسیژناز-۲ پرداخته نشده است. بنابر این مطالعات بیشتری نیاز است تا اثر این ترکیبات را بر فعالیت آنزیم سیکلو اکسیژناز-۱و۲ هم زمان مورد بررسی قرار گیرد تا اختصاصی بودن آنها برای هر کدام از آنزیم‌ها مشخص شود.

نتیجه‌گیری

اثر مهارکنندگی ترکیبات تری‌ترپنی نوع سیکلو آرتان استخراج شده از گیاه فرفیون بر فعالیت آنزیم سیکلواکسیژناز-۱ نشان می‌دهد که از این گیاه و ترکیبات تری‌ترپنی استخراج شده از آن، که در غلظت کم اثری بر سلول‌های طبیعی ندارند، ممکن است بتوان در درمان بیماریهایی که مرتبط با افزایش فعالیت این آنزیم است مورد استفاده قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب طرح پژوهشی و با حمایت دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و مرکز تحقیقات علوم دارویی اصفهان انجام پذیرفته است.

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 21:13 IRST on Sunday September 24th 2017

References

[1] Haj-Hashemi V, Ghanadi A, Sharif B. Anti-inflammatory and analgesic effects of Coriandrum sativum L. in animal models. *J Shahrekord Univ Med Sci*. 2003; 5: 8-15.

[2] Nasri S, Ramazani M, Yasa N. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of hydro-alcoholic extract of Apium graveolens. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2009; 10:25-31.

[3] Mohammadi-kamalabadi M, Ghanadian M, Karimi A, Salimzade H, Rafieian M, Amjad L. In vitro antiviral screening of euphorbia spinidens extract and its fractions against herpes simplex virus type 1. *Res Pharmaceut Sci* 2012; 7: 79.

[4] Shirani M, Alibabaei Z, Kheiri S, Shirzad H, Taji F, Asgari A, et al. Effect of Euphorbia Helioscopia

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 21:13 IRST on Sunday September 24th 2017

Extract on Acute and Chronic Pain in Mice. *J Babol Univ Med Sci* 2011; 13: 14-8.

[5] Goodwin TW. Biosynthesis of Isoprenoid Compounds. Wiley. New York. (Porter, J W and Spurgeon S L. eds) 1980; 1:443-80.

[6] Dey PM, Harborne JB. Plant Biochemistry, Academic Press, London. 422-3, 1997.

[7] Ayatollahi SA, Ahmed Z, Malik A, Malik A, Afza N, Badar Y. Cycloclarkeanol new triterpene from Euphorbia Clarkeana. *J Nat Prod* 1992; 55: 959-620.

[8] Ghanadian M. Isolation and structural studies of terpenoidal contents of Euphorbia aellenii and Euphorbia microsciadia (Euphorbiaceae). Thesis for PhD in pharmacognosy of Isfahan Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. Isfahan University of Medicinal Sciences. Isfahan, I.R.Iran. 2010; 56-78

[9] Alakurtti S, Maleka T, Koskimies S, Yli-Kauhaluoma J. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product botulin. *Eur J Pharm Sci* 2006; 29: 1-13.

[10] Alibabaei Z, Pilehvarian AA, Shirani M, Kheiri S, Taji F, Asgari A, Rafeiyan M. Effect of Euphorbia helioscopia on acetic acid-induced abdominal constrictions in Balb/c mice. *J Shahrekord Univ Med Sci*. 2010; 11: 9-14.

[11] Nugteren DH, Hazelhof E. Isolation and properties of intermediate in prostaglandin biosynth_ esis. *Biochim Biophys Acta.* 1973; 326: 448-61.

[12] Hamberg M, Samuelsson B. Detection and isolation of an endoproxide intermediate in prostaglandin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70: 899-903.

[13] Lipsky LP, Abramson SB, Crofford L, Dubois RN, Simon LS, van de Putte, LB. The classification of cyclooxygenase inhibitors. *J Rheumatol* 1998; 12: 2298–303.

[14] Sigthorsson G, Simpson RJ, Walley M, Anthony A, Foster R, Hotz-Behoftsitz C, et al. COX-1 and 2, intestinal integrity, and pathogenesis of nonsteroidal anti-inflammatory drug enteropathy in mice. *Gastroenterology* 2002; 122: 1913-23.

[15] Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LBA, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998; 12: 1063-73.

[16] Seibert K, Zhang Y, Leahy, K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 25: 12013-17.

[17] Cromlish WA, Kennedy BP. Selective inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 using intact insect cell assays. *Biochem Pharmacol* 1996; 52: 1777-85.

[18] Barnett J, Chow J, Ives D, Chiou M, Mackenzie R, Osen E, et al. Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1209:130–9.

[19] Ouellet M, Percival M D. Effect of inhibitor time-dependency on selectivity towards cyclooxygenase isoforms. *Biochem J* 1995; 306: 247-51.

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 21:13 IRST on Sunday September 24th 2017

[20] Brideau C, Kargman S, Liu S, Dallob AL, Ehrich EW, Rodger I W, et al. A human whole blood assay for clinical evaluation of biochemical efficacy of cyclooxygenase inhibitors. *Inflamm Res* 1996; 45: 68-74.

[21] Young JM, Panah S, Satchawatcharaphong C, Cheung P S. Human whole blood assays for inhibition of prostaglandin G/H synthases-1 and -2 using A23187 and lipopolysaccharide stimulation of thromboxane B2 production. *Inflamm Res* 1996; 45: 246-53.

[22] Grossman CJ, Wiseman J, Lucas FS, Trevethick MA, Birch PJ. Inhibition of constitutive and inducible cyclooxygenase activity in human platelets and mononuclear cells by NSAIDS and COX-2 inhibitiors. *Inflamm Res* 1995; 44: 253-57.

[23] Laufer S, Zechmeister P, Klein T. Development of an in-vitro test system for the evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Inflamm Res* 1999; 48: 133-8.

[24] Patrignani P, Panara M.R, Greco A, Fusco O, Natoli C, Iacobelli S, et al. Biochemical and pharmacological characterization of the cyclooxygenase activity of human blood prostaglandin endoperoxide synthases. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 271:1705–12.

[25] Cheng X, YU X, Ding YJ, FU QQ, Xie JJ, Tang TT, et al. The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome. *Clin Immunol* 2008; 127: 89-97.

[26] Furlan, M, Roque N.F, Filho WW. Cycloartane derivatives from Guarea trichilioides. *Phytochemistry* 1993; 32: 1519-22.

[27] Lee D, Cuendet M, Axelrod F, Chavez PI, Fong HHS, Pezzuto JM, Kinghorn AD. Novel 29-nor-3,4-seco-cycloartane triterpene methyl esters from the aerial parts of Antirhea acutata. *Tetrahedron* 2001; 57: 7107-12.

[28] Antonio R, Toshihiro A, Motohiko U, Ken Y, Sandeman R, Mark Chandler DS, et al. Inhibition of trypsin and chymotrypsin by anti-inflammatory triterpenoids from Compositae flowers. *Planta Medica* 2001; 67: 599-604.

[29] Lutskii VI, Gromova AS, Khamidullina EA, Owen, NL. Structural studies and biological activity of plant triterpenoids from the Thalictrum genus. *Chem Nat Compd* 2005; 41: 117-40.

[30] Eldeen IMS, Van Heerden FR, Van Staden J. Biological activities of cycloart-23-ene-3, 25-diol isolated from the leaves of Trichilia dregeana. *S Afr J Bot* 2007; 73: 366-71.

[31] Fernandez-Areche A, Saenz MT, Arroyo M, de la Puerta R, Garcia MD. Topical anti-inflammatory effect of triucallol, a triterpene isolated from Euphorbia lacteal latex. *Phytomedicine* 2010; 17: 146-8.

[32] Falodun A, Okunrobo LO, Uzoamaka N. Phytochemical screening and anti-inflammatory evaluation of methanolic and aqueous extracts of *Euphorbia heterophylla* Linn (Euphorbiaceae). *Afr J of Biotech* 2006; 5 (6): 529-31.

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 21:13 IRST on Sunday September 24th 2017

The in Vitro Study of Inhibitory Properties of Triterpenes fromExtracted Euphorbia Plant on Cyclooxygenase-1 Activity and the Evaluation of their Cytotoxicity on L-929 Cell Lines

A.A. Palizban[1], S.M. Ghanadian[2], H. Sadeghi[3], B. Ghaisari[4]

Received: 03/01/2015 Sent for Revision: 16/02/2015 Received Revised Manuscript: 12/07/2015 Accepted: 14/09/2015

Background and Objective: Triterpenes could exert anti-inflammatory properties. The aim of this study was to evaluate the inhibitory activities of cycloartan triterpene derivatives extracted from Euphorbia with names as; cycloartan-24-methylene3-ol(1), cycloartan-23-ene-3,25-diol(2), cycloartan-23-ene-25-methoxy-3-ol (3) and cycloartan-24-ene-3-ol (4) on cyclooxygenase-1(cox-1) activity.

Materials and Methods: This is an experimental study. The cyclooxygenase enzyme was extracted from platelets and peripheral blood mononuclear cells by Ficoll-Paque density gradient. The inhibitory activities of the compounds were assessed by measuring the peroxidase activity of enzyme by End point Enzyme activity assay. The inhibitory effects of the compounds were examined using logarithmic concentrations of them (1, 10,100 µg/ml). The cytotoxicity of each compound was measured using Cell Survival of L-929 cell lines by MTT assay.

Results: The cox-1 inhibitory effect of compound 3 was very weak at a concentration more than 100 µg/ml and IC_{50}>100 (µg/ml). The results revealed that; the compounds 1, 2 and 4 at concentrations (1, 10, and 100 µg/ml) demonstrated the acceptable inhibitory effects for the cox-1 enzyme with the IC50 of 9.65, 16.51 and 9.22 (µg/ml) compared with SC-560 control, respectively. The toxicity effects of compounds compared with Doxorubicin on the survival of L-929 cells, revealed that the IC50 of the 1, 2, 3, and 4 compounds are equal to 64.88, 64.47, >60 and 66.23 (µg/ml), respectively.

Conclusion: Cycloartan triterpene derivatives extracted from Euphorbia plant could have inhibitory activities on cox-1 enzyme. The cytotoxicity study showed that these compounds probably at low concentrations could be useful to treat the diseases caused by increasing cycloxygenese-1 activity.

Key words: Triterpenes, Cyclooxygenase-1, Cycloartan, Inflammatory diseases, L-929 cell lines.

Funding: This study was supported financially by Isfahan University of Medical Sciences, Iran.

Conflict of interest: None declared.

How to cite this article: Palizban AA, GhanadianSM, Sadeghi H, Ghaisari B. The in Vitro Study Of Inhibitory Properties of Extracted Euphorbia Plant Triterpenes on Cyclooxygenase-1 Activity and the Evaluation of their Cytotoxicity on L-929 Cell Line. *J RafsanjanUniv Med Sci* 2015; 14(8): 665-78. [Farsi]

1- Associate Prof, Dept. of Clinical Biochemistry, School of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
(Corresponding Author) Tel: (031)37927035, Fax: (031) 37927035, Email: palizban@pharm.mui.ac.ir
2- Assistant Prof, School of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences and Isfahan Pharmaceutical Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Professor, School of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences and Isfahan Pharmaceutical Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, IRAN
4- Pharmacy Doctor, School of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences and Isfahan Pharmaceutical Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran