مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره هفدهم، شماره ۶، خرداد ۱۳۹۴، صفحه ۷۳-۶۴

اثر بخشی عصاره متانولی دو گونه جاشیر Prangos uloptera و Prangos crossoptera بر رشد و تکثیر لنفوسیت های انسانی و جهش زایی آن ها در آزمون ایمز

مختار نصرتی (MSc)[۱]، ماندانا بهبهانی (PhD)[۱*]

۱-گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، دانشگاه اصفهان

دریافت: ۹۳/۱۰/۵، اصلاح:۹۳/۱۱/۱۵، پذیرش:۹۴/۲/۱۶

خلاصه

سابقه و هدف: جنس جاشیر از جمله جنس های گیاهی با گونه های متعدد دارویی است که اثرات مطلوب درمانی آن ها در بررسی های متعدد به اثبات رسیده است. هدف ار پژوهش حاضر بررسی تاثیر عصاره متانولی دو گونه جاشیر Prangos uloptera و Prangos crossoptera بر رشد و تکثیر لنفوسیت های انسانی و پتانسیل جهش زایی آنها می‌باشد.

مواد و روشها: در این مطالعه تجربی گیاهان مورد نظر پس از جمع آوری و تعیین گونه خشک و سپس آسیاب شدند. عصاره متانولی دو گونه جاشیر Prangos uloptera وPrangos crossoptera با روش غوطه وری تهیه شده و با استفاده از PBS استریل به غلظتهای ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰و ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر رقیق و اثر بخشی عصاره های مذکور بر رشد و تکثیر لنفوسیت های انسانی استخراج شده با لنفودکس و کشت شده در محیط RPMI با آزمون MTT و پتانسیل جهش زایی آن ها توسط آزمون ایمز مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که عصاره حاصل از بخش های مختلف در هر دو گونه موجب افزایش (۵ الی ۳۰۰ درصد برابر) رشد و تکثیر لنفوسیت ها شده و فاقد پتانسیل جهش زایی می‌باشند. عصاره بذر و برگ در هر دوگونه به ترتیب با (۵ الی ۷ درصد برابر)و (۳/۱-۲/۱ درصد برابر) رشد سلول ها کمترین و بیشترین تاثیر را بر رشد و تکثیر لنفوسیت ها دارند.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که دو گونه جاشیر مورد بررسی گیاهان دارویی ایمن و فاقد پتانسیل جهش زایی بوده و موجب افزایش رشد و تکثیر لنفوسیت های انسانی می شوند.

واژه های کلیدی: آزمون ایمز، جاشیر، عصاره متانولی، لنفوسیت.

مقدمه

یکی از رهیافت های نوین در عرصه مبارزه با بیماری های عفونی و تضعیف کننده سیستم ایمنی معرفی ترکیبات دارویی جدید با توان تعدیل سیستم ایمنی است که در این بین ترکیبات طبیعی بویژه ترکیبات گیاهی با توان اثر گذاری بر روند رشد و تکثیر سلول های سیستم ایمنی از اهمیت ویژه ای برخوردارند(۱). به طور کلی ترکیبات تعدیل‌گر فعالیت سیستم ایمنی به دو گروه کلی افزاینده و کاهنده پاسخ های ایمنی تقسیم می شوند، که گروه اول در انواع مختلف بیماری های عفونی و دسته دیگر در پیوند عضو و بیماری های خود ایمنی از اهمیت بالایی بر خوردارند(۲). اهمیت این موضوع به حدی است که طی سال های اخیر بخش عمده ای از تحقیقات دارویی به شناسایی و معرفی ترکیبات تحریک کننده و یا سرکوب کننده سیستم ایمنی جهت تحقق اهداف مختلفی همچون معرفی ترکیبات ضد سرطانی داروهای موثر در بیماریهای خود ایمن و یا تقویت کننده پاسخ های ایمنی معطوف شده است (۳). اگرچه گیاهان دارویی دارای طیف وسیعی از متابولیت های ثانویه با اثرات دارویی متعدد می باشند و اثر بخشی گیاهان مختلف در بررسی های متعدد به اثبات رسیده است. اما گیاهان ممکن است حاوی ترکیبات سمی و تهدید کننده سلامت انسان نیز باشند لذا بررسی سمیت و پتانسیل جهش زایی آنها از اهمیت بالایی بر خوردار است (۴). شیوع بیماری های جدید، مقاومت های دارویی، هزینه بالای داروهای شیمیایی و اثرات جانبی نامطلوب برخی از آن ها موجب شده تا تحقیقات گسترده ای در خصوص اثرات مطلوب درمانی گیاهان دارویی صورت گیرد (۶و۵). به طوری که مطالعات آزمایشگاهی متعدد انجام شده طی سال های اخیر اثرات مطلوب درمانی همچون خواص ضد میکروبی(۷)، ضد سرطانی (۸) و ضد دیابتی (۹) و نیز حضور ترکیبات دارویی با ارزش را در گیاهان تایید نموده است (۱۰). خانواد چتریان از جمله خانواده های گیاهی با پراکنش وسیع و مصارف متعدد خوراکی و دارویی در ایران می باشند. این خانواده گیاهی دارای بیش از ۳۰۰ جنس و ۲۵۰۰ گونه در دنیاست که از این تعداد ۱۱۳ جنس و ۳۲۰ گونه در ایران یافت می‌شود (۱۱). جنس جاشیر یکی از جنس های مهم خانواده چتریان با حدود ۳۰

این مقاله حاصل پایان نامه مختارنصرتی دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی دانشگاه اصفهان می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر ماندانا بهبهانی
آدرس:اصفهان،دانشگاه‌اصفهان.دانشکده‌علوم‌وفناوری های نوین.گروه‌بیوتکنولوژی.تلفن: ۰۳۱۳-۷۹۳۴۳۷۲
E-mail: ma_behbahani@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.6.9.6]
[DOI: 10.22088/jbums.17.6.64]

گونه است که ۱۵ گونه از آن در ایران رویش یافته و ۵ گونه آن بومی ایران می‌باشند (۱۲). از جمله خواص دارویی گونه های مختلف جاشیر می‌توان به خواص ضد التهاب، ضد انگل، ضد ویروس، ضد باکتری، تقویت اعصاب و دفع سنگ های مجاری ادراری و ضد نفخ اشاره نمود که اثر بخشی بسیاری از آن ها طی بررسی های آزمایشگاهی ثابت شده است(۱۵-۱۳).

Prangos uloptera از جمله گونه های مهم جنس جاشیر است که در مناطق مدیترانه ای، مرکز و غرب آسیا از جمله ایران پراکنش وسیعی دارد. این گونه که به جاشیر صخره رست معروف است در طب سنتی جهت درمان اختلالات گوارشی، التیام زخم ها و بیماری لکوپلاکیا (گژنه سفید) به کار میرود(۱۷و۱۶). وجود ترکیبات موثر دارویی از جمله انواع مختلف کومارین و فورانو کومارین، پینن‌ها و سایر متابولیت های ثانویه گیاهی موجب شده که پژوهش زیادی در خصوص اثرات مطلوب دارویی این گونه جاشیری صورت گیرد (۱۸). بررسی های آزمایشگاهی انجام شده بر روی خواص دارویی این گیاه خواص متعددی از جمله ضد سرطانی، ضد اکسیدانی و ضد باکتریایی را اثبات نموده است (۱۹). crossoptera Prangos یا جاشیر زاگرس یکی دیگر از گونه های جنس جاشیر است که بومی ایران بوده و پراکنش آن در نواحی غربی ایران بیشتر است (۲۰).

با وجود گزارش های متعدد در خصوص اثرات مطوب درمانی و ترکیبات موثر دارویی در گیاهان جاشیری تاکنون مطالعه ای بر روی اثرات درمانی و خواص دارویی P.crossoptera صورت نگرفته و مطالعات صورت گرفته بر روی این گونه محدود به ویژگی‌های گیاه شناسی می باشد (۲۲و۲۱و۷). وجود طیف گسترده ای از متابولیت های ثانویه با خواص درمانی مختلف در گیاهان جاشیری و پراکنش وسیع آن ها در نقاط مختلف جهان بویژه ایران موجب شده تا تحقیقات دارویی گسترده ای در خصوص معرفی اثرات مطلوب درمانی گیاهان این جنس انجام شود (۲۳). لذا بررسی خواص دارویی و پتانسیل جهش زایی گیاهان جنس جاشیر بویژه گونه های بومی ایران جهت معرفی گونه های جدید با خواص درمانی و ایمن از لحاظ جهش زا بودن از اهمیت بالایی بر خوردار است .در این مطالعه برای اولین بار تاثیر عصاره متانولی دو گونه جاشیر بومی ایران بر رشد و تکثیر لنفوسیت های انسانی بررسی و پتانسیل جهش زایی آنها بوسیله آزمون ایمز مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

تعیین گونه و تهیه نمونه: نمونه های گیاهی مربوط به P.crossoptera و P.uloptera در اردیبهشت و خرداد ۱۳۹۳ در سه مرحله قبل از گل دهی، گل دهی و تولید بذر به ترتیب از ارتفاعات شمال سنندج و سارال دیواندره در استان کردستان جمع آوری و تعیین گونه و نام علمی در مرکز تحقیقات کشاورزی سنندج انجام گرفت. سپس نمونه های مذکور به شماره هرباریومی ۱۴۱۲ (P.crossoptera) و ۱۵۳۶ (P.uloptera) در هرباریوم دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه کردستان ذخیره و نگهداری شدند. قسمت های مختلف نمونه گیاهی اعم از گل، برگ، ساقه، ریشه و بذر جدا شده و پس از شستشوی کامل بطور جداگانه در سایه خشک، سپس آسیاب گردید.۵۰ گرم از پودر های بدست آمده بطور جداگانه در ۱۵۰ میلی لیتر متانول ۹۶٪ بر روی شیکر با دور rpm۱۶۰ و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفتند. عصاره های حاصل پس از ۳ بار عبور از کاغذ صافی بوسیله دستگاه تحت خلا روتاری در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد تغلیظ شده و سپس توسط دستگاه فریز درایر خشک گردیدند. عصاره های حاصل در ظروف پلاستیکی درب دار استریل در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. به منظور تهیه غلظت های مختلف از از عصاره های بدست آمده ۱۰ میلی گرم از هر کدام از عصاره ها را در ۵۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید ۳٪ (DMSO) حل شده سپس بوسیله بافر فسفات (PBS) و تحت شرایط استریل در زیر هود زیستی لامینار فلو به غلظت های ۱۰،۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر رقیق شدند.

استخراج، نگهداری و کشت سلول های لنفوسیت: ۱۰ میلی لیتر خون از اهداکنندگان سالم که سابقه مصرف آنتی بیوتیک و سایر دارو های تاثیر گذار بر سیستم ایمنی را نداشتند در لوله های حاوی ماده ضد انعقاد هپارین جمع آوری شد. خون های جمع آوری شده در شرایط استریل به فالکون های ۱۵ میلی لیتری حاوی ۵ میلی لیتر لنفودکس منتقل و در سانتریفوژ با دور rpm۱۸۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از خارج ساختن فالکون ها از سانتریفیوژ خون موجود به سه لایه تقسیم می‌شود. بالاترین لایه که بصورت لایه زرد رنگ می‌باشد حاوی پلاکت ها می‌باشد. لایه میانی سفید رنگ حاوی لنفوسیت ها و لایه سوم حاوی گلبول های قرمز خون می‌باشد. لنفوسیت های جدا شده در شرایط استریل و بوسیله پیپت پاستور از سایر لایه ها جدا شده و به پلیت های کشت حاوی محیط RPMI شامل: ۱۰ ٪ سرم گاوی، ۱۰۰ U/ml پنی سیلین، ۱۰۰mg/ml استرپتومایسین، ۲mMگلوتامین، 1mM پیرووات منتقل و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۵٪ CO2 کشت داده شدند.

بررسی رشد و تکثیر سلولهای لنفوسیت با استفاده از روش MTT: جهت مطالعه اثر عصاره های بر رشد و تکثیر لنفوسیت ها از آزمون MTT با استفاده از محلول ۵ میلی گرم بر میلی لیتر تترازولیوم بروماید فیلتر شده استفاده شد. این آزمون یک روش رنگ سنجی است. اساس این روش احیای کریستال های زرد رنگ تترازولیوم با فرمول مولکولی (C18H16BrN) و شیمیایی 3-(4,5-Dimethyl-2-thizolyl)-2, 5-diphenyltertazoliu bromide bromide و ایجاد کریستال های آبی رنگ نامحلول فورمازان بوسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز سلولی می‌باشد.

شدت رنگ ایجاد شده بر اثر انحلال این کریستال ها ارتباط مستقیمی با تعداد سلول های موجود در چاهک های کشت دارد. به منظور انجام تست MTT در ابتدا در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه ۱۸۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی و ۲۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف عصاره های گیاهی افزوده شده تا حجم نهایی به ۲۰۰ میکرولیتر برسد. پس از ۷۲ ساعت انکوبه کردن سلول ها در دمای ۳۷ درجه به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر MTT فیلتر شده افزوده و ۴ ساعت دیگر انکوباسیون ادامه داده شد. پس از اتمام انکوباسیون لنفوسیت ها به منظور حل کردن کریستال های نامحلول MTT از ۱۰ میکرولیتر محلول ۰/۰۴ مولار HCL در ۲ پروپانول به همراه تریتون X100 استفاده شد. در پایان جذب MTT در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر اندازه گیری شد. در این مطالعه از غلظت های ۳-۱درصد DMSO به عنوان کنترل منفی استفاده شد. برای مشخص شدن تاثیر هر غلظت از عصاره های مذکور سه بار تکرار صورت گرفته و در نهایت میزان تکثیر لنفوسیت ها از فرمول زیر محاسبه گردید.

فرمول۱:

$$\text{درصد بقا} = \frac{\text{جذب حاصل از هر نمونه}}{\text{جذب کنترل منفی}} \times ۱۰۰$$

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.6.9.6]
[DOI: 10.22088/jbums.17.6.64]

بررسی میزان جهش زایی عصاره ها بوسیله ی آزمون ایمز:

آزمون های تایید سویه TA98: به منظور بررسی قابلیت جهش زایی عصاره ها در غلظت های مختلف از آزمون ایمز استفاده شد. در این آزمون از سویه های مختلف سالمونلا استفاده می شود. این باکتری ها دارای جهش های مختلفی در اپرون مربوط به سنتز هیستیدین بوده لذا قابلیت رشد در عدم حضور این اسید آمینه را ندارند. اما در صورت قرارگیری این باکتری ها در معرض یک ماده جهش‌زا ممکن است جهش ایجاد شده به حالت عادی بازگشته و باکتری توان سنتز هیستیدین را مجددا بدست آورد.

در این پژوهش از سالمونلا تیفی موریوم TA98 استفاده گردید. این سویه از سالمونلا علاوه بر وابستگی به هیستیدین دارای دو جهش مهم و یک فاکتور مقاومت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین که ناشی از حضور پلاسمید PKM101 نیز می‌باشد. که از این خصوصیات برای شناسایی این سویه استفاده می‌شود. جهش های موجود در این سویه عبارتند از :

۱-جهش rfa که موجب حسایت به کریستال ویولت می‌شود. ۲- جهش UVrB که موجب عدم توا نایی باکتری در ترمیم آسیب های ناشی از پرتو های UV شده و در صورت قرارگیری در معرض این پرتو ها سلول از بین خواهد رفت. جهت تایید سویه TA98 سه آزمون وابستگی به هیستیدین، مقاوت به آمپی سیلین و عدم رشد در صورت تابش پرتو های UV صورت گرفت. به این منظور تعداد ۱/۵×۱۰^{۸} باکتری موسوم به نیم مک فارلند را در میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری حاوی ا میلی لیتر PBS حل کرده و جداگانه به محیط حداقل حاوی (آگار، گلوگز، اسید سیتریک یک آبه، پتاسیم فسفات دی بازیک، سدیم آمونیوم فسفات و منیزیوم سولفات) و محیط مستر حاوی (نوتریت آگار، نمک طعام، بیوتین و هیستیدین) وارد کرده و با سواپ استریل به صورت یکنواخت پخش شد. جهت تایید مقاومت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین از دیسک استاندارد آمپی سیلین حاوی ۱۰ میلی گرم آنتی بیوتیک استفاده شد.

به منظور تعیین حضور جهش UVrB نیز پس از پخش یکنواخت باکتری ها در محیط مستر نصفی از پلیت کشت را کاملا با فویل آلومینیومی پوشانده و به مدت ۱۰ ثانیه در معرض لامپ UV قرار داده شد. در نهایت وابستگی رشد به حضور هیستیدین نیز با تلقیح مقادیر مساوی از سوسپانسیون باکتری به دو محیط حداقل و مستر مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی میزان جهش زایی غلظت های مختلف عصاره های گیاهی: پس از انجام آزمون های تایید سویه جهت بررسی میزان جهش زایی از روش شمارش تعداد کلنی های برگشتی، تعیین درصد برگشت و مقایسه شاخص Qm استفاده شد. به این منظور غلظت های مختلفی از عصاره ها با انحلال ۱۰ میلی گرم از عصاره ها در ۱۰۰ میکرولیتر DMSO تهیه گردید. سپس رقیق سازی بوسیله PBS استریل به غلظت های ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ و۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر انجام شد. جهت مشخص شدن میزان جهش زایی دیسک های کاغذی غوطه ور در غلظت های مختلف عصاره ها در محیط کشت حداقل حاوی کشت یکنواخت سالمونلا تیفی موریوم TA98 قرار گرفت. سپس برای هرکدام از غلظت های مختلف عصاره های مورد بررسی شاخص Qm تعریف شد. شاخص ذکر شده تعیین کننده میزان جهش زایی نمونه های مورد مطالعه است. به طوری که Qm پایین تر از ۱/۶ نشان دهنده عدم جهش زایی، Qm در محدوده ۱/۹-۱/۷ نشان دهنده احتمال جهش زا بودن ماده مورد مطالعه و Qm در حدود ۲ و بالاتر جهش زا بودن ماده مورد مطالعه را نشان می‌دهد (۷). در این بررسی از ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۱ میکروگرم بر میلی لیتر سدیم آزید به عنوان کنترل مثبت و غلظت های ۳-۱ درصد DMSO به عنوان کنترل منفی استفاده شد. برای هر غلظت از عصاره های مختلف سه بار تکرار صورت گرفت. در نهایت تعداد کلنی های رشد کرده روی محیط حداقل که ناشی از بازیابی توان سنتز هیستیدین است را با کلنی های رشد کرده در مجاورت کنترل مثبت و منفی مقایسه و از فرمول زیر برای تعیین شاخص Qm استفاده شد.

فرمول۲:

$$\text{شاخص کمی جهش زایی(Qm)} = \frac{\text{تعداد کلنی برگشتی ناشی از نمونه مورد بررسی}}{\text{تعداد کلنی ناشی از کنترل منفی}}$$

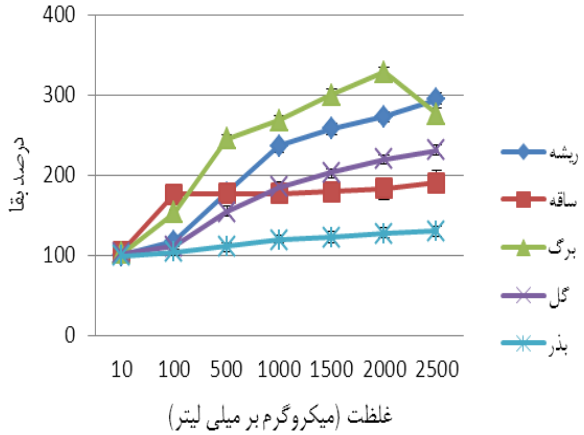
یافته ها

نتایج حاصل از اثر عصاره های متانولی بر تکثیر لنفوسیت ها: داده های بدست آمده نشان داد که عصاره حاصل از بخش های مختلف این دو گونه موجب افزایش تکثیر لنفوسیت ها می شوند. میزان تاثیر این عصاره ها وابسته به غلظت بوده به طوری که در اکثر عصاره ها غلظت های ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر کمترین و در غلظت ۲۵۰۰ میکروگرم بی میلی لیتر بیشترین تاثیر را بر تکثیر لنفوسیت ها داشته اند مقایسه اثر بخشی عصاره بخش های مختلف در دو گونه مورد مطالعه نشان داد که بیشترین تاثیر گذاری در گونه P.uloptera مربوط به غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بی میلی لیتر عصاره برگ و کمترین تاثیر مربوط به غلظت ۱۰۰-۱۰ بذر می‌باشد.

در خصوص اثر بخشی عصاره بخش های مختلف گونه P.crossoptera. نیز نتایج مشابهی حاصل شد. در این گونه بیشترین تاثیر مربوط به غلظت ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره برگ و کمترین تاثیر مربوط به غلظت های ۱۰۰-۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر بذر می‌باشد (نمودار ۲و۱). ترتیب اثر بخشی عصاره بخش های مختلف گونه P.uloptera بترتیب شامل: برگ، ریشه، گل، ساقه و بذر و در گونه P.crossoptera برگ، گل، ریشه، ساقه و بذر می باشد. بررسی مقایسه ای بین دوگونه نیز حاکی از اثر بخشی بالاتر گونه P.uloptera نسبت به گونه P.crossoptera می‌باشد.

نمودار۱. اثر گذاری عصاره بخش های مختلف گونه P.crossoptera بر رشد و تکثیر لنفوسیت های انسانی(هریک از مقادیر نشان دهند میانگین درصد بقای لنفوسیت ها±خطای معیار میانگین)

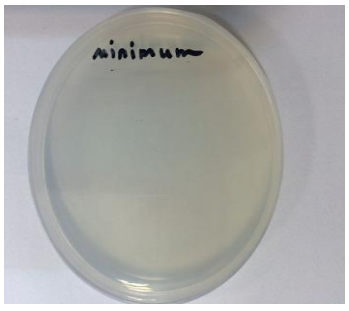
[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.6.9.6]
[DOI: 10.22088/jbums.17.6.64]



نمودار ۲. اثر گذاری عصاره بخش های مختلف گونه P.uloptera بر رشد و تکثیر لنفوسیت های انسانی(هریک از مقادیر نشان دهند میانگین درصد بقای لنفوسیت ها±خطای معیار میانگین)

نتایج حاصل از بررسی جهش زایی:

نتایج آزمون های تائید سویه TA98: نتایج نشان داد که باکتری های تلقیح شده به محیط حداقل قابلیت رشد بر روی این محیط را نداشته (شکل ۱) و فقط در حضور هیستیدین و بیوتین توان رشد دارند (شکل ۲) در خصوص سایر جهش‌های موجود در این سویه نیز مشخص شد که باکتری ها به کریستال ویولت حساس (شکل ۳) و در صورت قرارگیری در معرض پرتو های UV نیز رشد نمی کنند (شکل ۴). این نتایج حاکی از تایید دو جهش rfa وUVrB است. رشد کامل باکتری ها در اطراف دیسک آمپی سیلین نیز تایید کننده حضور پلاسمید PKM101 در این باکتری است (شکل ۵).

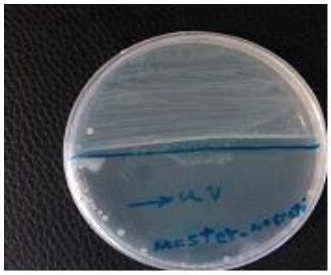


شکل ۱. عدم رشد سالمونلا تیفی موریوم در محیط حداقل فاقد هیستیدین

شکل ۲. رشد سالمونلا تیفی موریوم در محیط مستر حاوی هیستیدین

شکل ۳. حساسیت سالمونلا تیفی موریوم نسبت به کریستال ویولت

شکل ۴. مقاومت سالمونلا تیفی موریوم نسبت به آمپی سیلین



شکل ۵. عدم رشد سالمونلا تیفی موریوم در صورت قرار گیری در معرض UV

نتایج حاصل ازمیزان جهش زایی غلظت های مختلف عصاره های گیاهی:

شمارش تعداد کلنی های رشد یافته نشان داد که در مقادیر مساوی از سوسپانسیون باکتری ۳۰۰ کلنی بر سطح محیط مستر،۲۸کلنی بر سطح محیط حداقل حاوی کنترل منفی ۳-۱٪ DMSO و ۷۵ کلنی بر سطح محیط حداقل حاوی کنترل مثبت سدیم آزید رشد نموده است.که نشان دهنده وجود ۹/۳٪ جهش خودبخودی در سویه مورد مطالعه است. بررسی شاخص Qm در غلظتهای مطالعه شده نشان داد که این شاخص با افزایش غلظت به تدریج افزایش می یابد اما در هیچکدام از غلظت های مورد مطالعه به مرز جهش زایی نمی رسد. لازم به ذکر است کهQm در تمامی غلظت های مورد مطالعه عصاره بخش های مختلف دو گونه P.crossoptera و P.uloptera کمتر از۱/۶ محاسبه گردید. لذا بر اساس تعریف های صورت گرفته در خصوص شاخص جهش زاییQm مبنی بر عدم جهش زایی ترکیاتی با Qm کمتراز ۱/۶ بنابراین عصاره های حاصل از بخش های مختلف دو گونه جاشیر مورد مطالعه هیچ گونه جهش زایی ندارند (۲۴). بررسی مقایسه ای بین میانگین شاخص Qm مربوط به عصاره حاصل از بخش های مختلف دو گونه نیز نشان داد که تعداد کلنی های برگشتی ناشی از عصاره های حاصل از گونه P.crossoptera کمتر از گونه P.uloptera می باشد (جدول ۱).

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.6.9.6]
[DOI: 10.22088/jbums.17.6.64]

جدول۱. نتایج حاصل از محاسبه شاخص کمی جهش زایی(Qm) مربوط به غلظت های مختلف عصاره های دوگونه P.uloptera وP.crossoptera

منشا عصاره	گونه گیاهی	میانگین شاخص کمی جهش زایی (Qm)±خطای معیار میانگین					
		۵۰۰	۱۰۰۰	۱۵۰۰	۲۰۰۰	۲۵۰۰	۳۰۰۰
برگ	uloptera	۱/۲۳±۰/۰۶	۱/۲۵±۰/۰۳	۱/۲۹±۰/۰۴	۱/۳۵±۰/۰۴	۱/۳۹±۰/۱	۱/۴۴±۰/۰۹
گل		۱/۳۴±۰/۰۸	۱/۳۶±۰/۰۶	۱/۳۷±۰/۲	۱/۳۹±۰/۰۴	۱/۴۶±۰/۰۶	۱/۴۸±۰/۱
ریشه		۱/۳۲±۰/۰۳	۱/۳۴±۰/۰۲	۱/۳۷±۰/۰۳	۱/۴۰±۰/۰۳	۱/۴۷±۰/۰۷	۱/۴۹±۰/۰۴
ساقه		۱/۲۵±۰/۰۷	۱/۲۷±۰/۰۹	۱/۲۹±۰/۰۴	۱/۳۱±۰/۰۴	۱/۳۸±۰/۰۲	۱/۴۲±۰/۰۲
بذر		۱/۲۰±۰/۰۹	۱/۲۳±۰/۰۶	۱/۲۶±۰/۱	۱/۲۸±۰/۰۹	۱/۳۵±۰/۰۶	۱/۳۸±۰/۰۳
برگ	crossoptera	۱/۲۵±۰/۱	۱/۲۸±۰/۰۹	۱/۳۱±۰/۰۴	۱/۳۳±۰/۰۷	۱/۳۷±۰/۰۹	۱/۴۰±۰/۰۴
گل		۱/۲۷±۰/۰۳	۱/۳۰±۰/۰۴	۱/۳۳±۰/۰۵	۱/۳۷±۰/۱	۱/۴۲±۰/۰۳	۱/۴۷±۰/۰۷
ریشه		۱/۳۴±۰/۰۴	۱/۳۴±۰/۰۶	۱/۳۷±۰/۰۲	۱/۴۱±۰/۰۲	۱/۴۴±۰/۰۴	۱/۴۵±۰/۰۲
ساقه		۱/۲۰±۰/۰۲	۱/۲۴±۰/۰۵	۱/۲۵±۰/۰۲	۱/۲۸±۰/۰۳	۱/۳۲±۰/۰۳	۱/۳۵±۰/۰۳
بذر		۱/۲۴±۰/۰۳	۱/۲۶±۰/۰۶	۱/۳۰±۰/۰۸	۱/۳۵±۰/۰۲	۱/۳۷±۰/۰۲	۱/۴۰±۰/۰۶

بحث و نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره متانولی حاصل از بخش های مختلف دو گونه جاشیر مورد بررسی موجب افزایش رشد و تکثیر لنفوسیت های انسانی شده و فاقد پتانسیل جهش زایی می‌باشند. این افزایش رشد وابسته به غلظت بوده بطوری که در بالاترین غلظت های اغلب عصاره های گیاهی بیشترین میزان رشد و تکثیر مشاهده شد. بررسی های مقایسه ای نیز نشان داد که اثر بخشی عصاره های مورد بررسی از الگویی مشابه تبعیت کرده بطوری که در هر دو گونه مورد بررسی برگ بیشترین و بذر کمترین تاثیر را بر رشد و تکثیر لنفوسیت ها داشت و بطور کلی میزان افزایش رشد و تکثیر لنفوسیت ها تحت تاثیر عصاره متانولی گونه P.uloptera نسبت به گونه P.crossoptera بیشتر بود.

شیوع گسترده بیماری های عفونی و نیز نقص های وراثتی و اکتسابی تاثیر گذار بر عملکرد سیستم ایمنی طی سال های اخیر موجب رشد چشمگیر تحقیقات دارویی در خصوص شناسایی و معرفی ترکیبات جدید دارویی خصوصا ترکیبات گیاهی با توان تعدیل پاسخ های ایمنی شده است(۲۵). در این بین ترکیبات گیاهی با توان تحریک رشد و تکثیر لنفوسیت ها به عنوان یکی از اجزای اصلی سیستم ایمنی در افزایش عملکرد پاسخ های سیستم ایمنی در انواع مختلف بیماری های عفونی از اهمیت ویژه ای برخوردارند(۲۶). Sumardi و همکارانش نشان دادند که عصاره متانولی گیاه Myrmecodia tuberos موجب افزایش تکثیر سلول های $TCD4^+$ در رت های مورد مطالعه می شود اما اثر قابل توجهی بر جمعیت سلول های $TCD8^+$ ندارد (۲۷). مطالعه Wang و همکاران نشان داد که عصاره گیاه Allium sativum موجب افزایش فعالیت سلول های کشنده طبیعی (NK cell) و نیز افزایش ترشح اینترفرون آلفا،اینترلوکین ۲و TNF-α شده اما موجب کاهش حجم ترشح اینترلوکین ۴ می شود(۲۸). Punturee و همکارانش نیز نشان دادند که عصاره آبی گیاه Centella asiatica موجب افزایش تکثیر لنفوسیت ها شده در حالی که عصاره اتانولی همین گیاه موجب سرکوب تکثیر لنفوسیت ها می‌شود (۲۹). پژوهش های متعدد انجام شده در خصوص اثرات درمانی گیاهان دارویی نشان داده که علیرغم خواص متعدد به اثبات رسیده از گیاهان دارویی مختلف این گیاهان می‌توانند حاوی ترکیبات سمی، جهش زا و تهدید کننده سلامت انسان نیز باشند. لذا طی سال های اخیر بررسی‌های متعددی جهت اطمینان یافتن از ایمن بودن گیاهان دارویی انجام شده که یکی از مهمترین آن ها حصول اطمینان از عدم وجود پتانسیل جهش زایی گیاهان دارویی مورد استفاده توسط جوامع مختلف است که برخی بررسی ها ایمنی و برخی نیز خطرات بالقوه این گیاهان را تایید می‌نمایند (۳۰). Eren و همکارانش پتانسیل جهش زایی و سمیت عصاره آبی گیاه دارویی Limonium globuliferum را مورد بررسی قرار داده، نتایج این پژوهش نشان داده که علیرغم استفاده های دارویی این گیاه عصاره آن موجب آسیب های کروموزومی در سلول های مریستمی پیاز شده و نتایج حاصل از آزمون ایمز نیز نشان دهنده وجود پتانسیل جهش زایی در این گیاه می‌باشد (۳۱). در پژوهشی مشابه Ali و همکارانش نشان دادند که عصاره گیاه Limonium sokotranum که بصورت سنتی در درمان بیماری های قارچی بکار میرود در غلظت ۶۱۵/۱ میکروگرم بر میلی لیتر دارای قابلیت کشندگی بر سلول های اپیتلیالی آمنیوتیک انسانی است (۳۲) اما در مقابل پژوهش های بسیاری نیز نشان دهنده ایمنی بسیاری از گیاهان دارویی از حیث پتانسیل جهش زایی میباشند. مطالعه Thepouyporn و همکارانش نشان داد که عصاره آبی Peperomia pellucid, Colocasia esculenta Brachiaria mutica که جزو گیاهان گیاهان دارویی پرکاربرد در تایلند میباشند فاقد هر گونه اثرات جهش زایی در آزمون ایمز می‌باشند (۳۳). در پژوهشی دیگر Resende و همکارانش نشان دادند که عصاره اتیل استات گیاه دارویی Baccharis dracunculifolia که در برزیل کاربرد های دارویی زیادی دارد نه تنها فاقد اثرات جهش زایی است بلکه تاحدی نیز دارای اثرات ضد جهش زایی نیز می‌باشد(۳۴).

کاربرد های متعدد گونه های مختلف جنس جاشیر در طب سنتی موجب شده تا تحیقات گسترده ای در خصوص تایید علمی اثرات درمانی این گیاهان انجام شود. دو گونه جاشیر بررسی شده در این مطالعه (P.uloptera وP.crossoptera) بومی ایران بوده و به علت وجود خواص متعدد دارویی

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.6.9.6]
[DOI: 10.22088/jbums.17.6.64]

بویژه در انواع مختلف عفونت های باکتریایی و قارچی و پراکنش وسیع در اکثر مناطق ایران بررسی اثرات درمانی و قابلیت جهش زایی آن ها حائز اهمیت می‌باشد. مطالعات انجام شده در خصوص خواص درمانی و ترکیبات موثر دارویی گونه های مختلف جنس جاشیر اثرات دارویی مختلفی همچون خواص ضد میکروبی،ضد اکسیدانی،ضد سرطانی و ضد دیابتی آنها را اثبات نموده است (۲۴). بررسی انجام شده بر روی خواص ضد اکسیدانی گونه Prangos ferulacea نشان داده که وجود متابولیت های ثانویه همچون انواع مختلفی از ترکیبات آلکالوئیدی، فلاوونوئید ها و ترپنوئید ها در عصاره این گیاه موجب شده که ویژگی های ضد اکسیدانی بیشتری نسبت به ویتامین E داشته و فعالیت آنزیم گلوتاتیون- S- ترانسفراز را نیز تحت تاثیر قرار دهد (۳۵).

مطالعات انجام شده در خصوص خواص ضد باکتریایی گونه ذکر شده نیز نشان داده که در بین عصاره های متانولی، اتانولی، آبی و هگزانی عصاره متانولی این گیاه بیشترین خاصیت آنتی بیوتیکی را علیه باکتری های گرم مثبت و منفی همچون: Escherichia coli Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis,Klebsiella pneumonia داشته است (۳۶). در بررسی انجام شده توسط Ulubelen و همکاران در خصوص اثرات ضد قارچی و ضد باکتریایی گونهPrangos platychlaena مشخص شدکه عصاره این گیاه دارای اثرات آنتی بیوتیکی علیه Staphylococcus aureus Bacillus subtilis, Staphylococcus epidermidis, Candida albicans می‌باشد(۳۷). Kogure و همکاران نیز در بررسی دیگر نشان دادند که دوگونه Prangos papularia و Prangos tschimganica حاوی ترکیباتی جدید با قابلیت ضداکسیدانی بالا و توان مهار اکسیداسیون چربی ها می باشند (۳۸). مطالعات فیتوشیمیایی صورت گرفته در خصوص ترکیبات موجود در بخش های مختلف گونه های جنس جاشیر منجر به معرفی ترکیبات مختلف آلکالوئیدی، فلاوونوئیدی، کومارینی و ترپنوئیدی مختلف شده است (۳۹). مطالعه انجام شده توسط Alikhah-Asl و همکاران در خصوص ترکیبات موجود در روغن بخش های هوایی گونه P.uloptera در دو حالت تازه و خشک شده نشان داده که در حلت تازه ۳۵ و در حالت خشک شده ۳۵ ترکیب در روغن این گیاه وجود دارند که عمده ترین این ترکیبات در حالت تازه به ترتیب شامل: آلفاپینن، ترانس بتااوسیمن، بتاکاریوفیلن، دلتا-۳-کارن، ژرماسرن دی و بتامیرسن و در حالت خشک شده شامل: بتاکاریوفیلن، آلفاپینن، کاریوفیلن اکساید، اسپاتولنول و ژرماسرن دی می‌باشند (۴۰). در بررسی انجام شده توسط Razavi و همکاران در خصوص کومارین های موجود درعصاره هگزانی بخش های هوایی گونه P.uloptera نتایج نشان داده که این ترکیبات دارای خاصیت ضد اکسیدانی قابل توجهی می‌باشند (۱۸). در پژوهشی مشابه نیز که در خصوص بررسی کومارین های موجود در ریشه صورت گرفت نتایج نشان داد که ۳ مشتق جدید کومارینی در ریشه این گیاه وجود دارد که قابلیت ضد اکسیدانی بالایی به این گیاه داده است(۴۱). بررسی خواص دارویی ریشه P.uloptera نیز نشان داده که عصاره این بخش از گیاه دارای اثر کشندگی بر روی سلول های سرطانی رده Hela بوده همچنین دارای میزان قابل توجهی ترکیبات ضد اکسیدانی و ضد باکتریایی می‌باشد (۱۹).

مطالعات Zahri و همکاران در خصوص القای آپوپتوز توسط عصاره P.uloptera نشان داد که عصاره دی کلرومتانی بخش های مختلف این گونه جاشیری می‌تواند موجب القای مرگ برنامه ریزی شده در سلولهای سرطانی رده McCoy شود(۴۲). بر خلاف گونه P.uloptera که پژوهش های زیادی به منظور تایید خواص متعدد درمانی آن صورت گرفته تا کنون بررسی در خصوص خواص درمانی گونه P.crossoptera انجام نشده و پژوهش حاضر از معدود مطالعات صورت گرفته در خصوص این گیاه دارویی است. بیشتر بررسی های صورت گرفته در خصوص این گیاه در زمینه ویژگی های گیاه شناسی و معرفی جایگاه رویش آن می باشد (۲۰). بنابراین با توجه به اثر بخشی مطلوب عصاره های دوگونه مورد بررسی بر رشد و تکثیر لنفوسیت ها و تجمع مقادیر بالایی از متابولیت های ثانویه گیاهی بویژه آلفاپینن ها و کومارین ها در آنها می-توان این ترکیبات را در ظهور اثر بخشی این گیاهان موثر دانست. در پایان با توجه به اثرات مثبت عصاره های متانولی حاصل از بخش های مختلف دو گونه جاشیر بررسی شده بر تکثیر لنفوسیت ها و عدم جهش زایی آن ها این گیاهان می‌توانند به عنوان گیاهان دارویی ایمن در بیماران مبتلا به نقص های ایمنی و انواع عفونت های میکروبی مورد استفاده قرار بگیرند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه اصفهان به دلیل حمایت مالی از این تحقیق تشکر و قدر دانی به عمل می‌آید.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.6.9.6]
[DOI: 10.22088/jbums.17.6.64]

The effects of the Methanolic Extracts of Prangos Uloptera and Crossoptera on the Growth, Mutagenicity and Proliferation of Human Lymphocytes, Based on Ames Test

M. Nosrati (MSc)[1], M. Behbahani (PhD)[*1]

1.Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 17(6); Jun 2015; PP: 64-73

Received: Dec 26th 2014, Revised: Feb 4th 2015, Accepted: May 6th 2015.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: The genus Prangos is among plants with numerous species. The positive medicinal effects of this herb have been demonstrated in multiple studies. The aim of this study was to evaluate the effects of methanolic extracts from Prangos uloptera and crossoptera on the growth and proliferation of human lymphocytes and determine their mutagenic potentials.

METHODS: In this experimental study, the plants were dried and milled after determining their species. The methanolic extracts of Prangos uloptera and crossoptera were prepared by immersion and were diluted to final concentrations of 10, 100, 500, 1000, 1500, 2000 and 2500 mg/ml, using sterile phosphate-buffered saline. The effects of the extracts on the growth and proliferation of human-extracted lymphocytes were evaluated by lymphodex. The samples cultured in RPMI medium were evaluated by MTT assay, and the mutagenic potential was measured by Ames test.

FINDINGS: The results showed that the extracts from both Prangos species increased the growth and proliferation of lymphocytes (by 5-300 %) and exhibited no mutagenic potentials. The seed and leaf extracts from both species had the least and most significant impacts on the growth and proliferation of lymphocytes (5-7% and 2.1-3.1 % times, respectively), respectively.

CONCLUSION: The obtained results showed that the two evaluated species of Prangos are safe and lack any mutagenic potentials. They also enhanced the growth and proliferation of human lymphocytes.

KEY WORDS: *Ames Test, Species, Methanolic Extract, Lymphocyte.*

Please cite this article as follows:

Nosrati M, Behbahani M. The effects of the Methanolic Extracts of Prangos Uloptera and Crossoptera on the Growth, Mutagenicity and Proliferation of Human Lymphocytes, Based on Ames Test. J Babol Univ Med Sci. 2015; 17(6):64-73.

*** Corresponding Author; M. Behbahani (PhD)**

Address: Department of Biotechnology, Faculty of advanced Science and technologies, University of Isfahan, I.R. Iran

Tel: +98 313 7934372

E-mail: ma_behbahani@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.6.9.6]

[DOI: 10.22088/jbums.17.6.64]

References

1. Sriwanthana B, Treesangsri W, Boriboontrakul B, Niumsakul S, Chavalittumrong P. In vitro effects of Thai medicinal plants onhuman lymphocyteactivity. Songklanakarin J Sci Technol. 2007;29(Suppl 1):17-28.

2.Philippi ME, Duarte BM, Da Silva CV, De Souza MT, Niero R, Cechinel Filho V, et al. Immunostimulatory activity of Calophyllum brasilianse,ipomoea pes-caprae and matatba elaeagnoides demonstrated by human peripheral blood mononuclear cells prolipheration. Acta Pol Pharm. 2010;67(1):69-73.

3.Hasan NM, Al Sorkhy MK. Herbs that promote cell proliferation. Int J Herb Med. 2014;1(6):18-21.

4.Akintonwa A, Awodele O, Afolayan G, Coker H. Mutagenic screening of som commonly used medicinal plants in Nigeria. J Ethnopharmacol. 2009;125(3):461-70.

5.Calixto JB. Twenty-five years of research on medicinal plant in Latin America: a personal view .J Ethnopharmacol 2005; 100(1-2):131-4.

6.Nafisy AT. A Review of traditional medicinal in Iran. Isfahan:Isfahan Univ Pub;1989.8(11):121.

7.Massumi MA, Fazeli MR, Alavi SHR, Ajani Y. Chemical constituents and antibacterial activity of essential oil of Prangos ferulacea (L.) Lindl. Fruits. Iran J Pharm Sci. 2007;3(3):171-6.

8.Shirzad H, Taji F, Rafieian-Kopaei M. Correlation between antioxidant activity of garlicextracts and WEHI-164 fibrosarcoma tumor growth in BALB/c mice. J Med Food. 2011; 14(9): 969-74.

9. Asgary S, Kazemi S, Moshtaghian SJ, Rafieian M, Bahrami M, Adelnia A. The protective effect of Cucurbita pepo L. on liver damage in alloxan-induced diabetic rats. J Shahrekord Univ Med Sci. 2010;11(4):59-65.[In Persian]

10.Tada Y, Shikishima Y, Takaishi Y, Shibata H, Higuti T, Honda G, et al. Coumarins and γ- pyrone derivatives from Prangos pabularia antibacterial activity and inhibition of cytokine release. Phytochemistry 2002; 59: 649–54.

11.Rechinger Kh. Flora Iranica:vol 162, Umbelliferae. Verlagsanstalt, Graz: Academische Druck-u.1980.

12. Ghahraman A. Flora of Iran:Iran color flora, Vol 6. Tehran: Forest Res Institute; 1985.p.?. [In Persian].

13.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.

14. Baser K, Ermin N, Adigüzel N, Aytac Z. Composition of the essential oil of Prangos ferulacea (L.) Lindl. J Essent Oil Res. 1996; 8(3): 297-8.

15.Mavi A, Terzi Z, Ozgen U, Yildirim A, Coskun M. Antioxidant properties of some medicinal plants: Prangos ferulacea (Apiaceae), Sedum sempervivoides (Crassulaceae), Malva neglecta (Malvaceae), Cruciata taurica (Rubiaceae), Rosa pimpinellifolia (Rosaceae), Galium verum subsp. verum (Rubiaceae), Urtica dioica (Urticaceae). Biol Pharm Bull.2004;27(5):702-5.

16.Razavi SM, Nazemiyeh H, Delazar A, Asnaashari S, Hajiboland R, Sarker SD, et al. Chemical variation of the essential oil of Prangos uloptera DC. at different stages of growth. Nat Prod Res. 2011;25(7):663-8.

17.Razavi SM, Zahri S, Nazemiyeh H, Zarrini G, Mohammadi S, Abolghassemi-Fakhri MA. A furanocoumarin from Prangos uloptera, biological effects. Nat Prod Res.2009;23(16):1522-7.

18.Razavi SM, Nazemiyeh H, Hajiboland R, Kumarssamy Y, Delazar A, Nahar L, et al. Coumarins from the aerial parts of Prangos uloptera(Apiaceae). Braz J Pharmacogn. 2008;18(1):1-5.

19.Razavi SM, Zarrini G, Zahri S, Mohammadi S. Biological activity of prangos uloptera DC. roots, a medicinal plant from Iran. Nat Prod Res. 2010;24(9):797-803.

20.Rahimi S, Kazemi S, Ahmadi M, Ebrahimi HR, Hasan shahi S. Study the distribution of different species jashir plant in Iran. J Appl Sci Agric. 2014;9(8):21-3.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.6.9.6]
[DOI: 10.22088/jbums.17.6.64]

21. Shikishima Y, Takaishi Y, Honda G, Ito M, Takeda Y, Kodzimatov OK, et al. Chemical constituents of prangos tschimganica; structure elucidation and absolute configuration of coumarin and furanocoumarin derivatives with anti-HIV activity. Chem Pharm Bull. 2001;49(7):877-80.

22. Rahimi S, Kazemi S, Hasanshahi S, Rahimi H, Hosayeni N. Introduction to the floristic of Kaftar Lake basin in Eghlid (Fars province). J Appl Sci Agric. 2014;9(4):2303-6.

23. Kafash-Farkhad N, Asadi-Samani M, Khaledifar B. A review on secondary metabolites and pharmacological effects of Prangos ferulacea (L.) Lindl. J Shahrekord Univ Med Sci. 2013;15(3):98-108. [In Persian]

24.Barzan E, Mehrabian S, Irian S. Antimicrobial and genotoxicity effects of zero-valent iron nanoparticles. Jundishapur J Microbiol. 2014;7(5):1-5.

25.Bukoye O, Musbau A. Immune modulation potentials of aqueous extract of andrographis paniculata leaves in male rat. Researcher. 2011;3(1):48-57.

26.Darwis D, Hertiani T, Samito E. The effects of Hydnophytum formicarum ethanolic extract towards lymphocyte, vero and T47d cells proliferation in vitro. J Appl Pharmaceut Sci. 2014;4(6):103-9.

27. Sumardi A, Heritani T, Sasmito E. Ant Plant (Myrmecodia tuberosa) hypocotyl extract modulates TCD4+ and TCD8+ Cell profile of doxorubicin-induced immune-s Sprague dawley rats in vivo. Sci Pharm. 2013;81(4):1057-69.

28.Wang D,Feng Y,Liu J,Yan J,Wang M,Sasaki M, et al. Black garlic(Allium sativum) extracts enhance the immune system. Med Arom Plant Sci Iotecnol. 2010;4(1):37-40.

29. Punturee Kh, Kasinrerk W, Paul Wild C, Vinitketkumnuen U. The immunomodulatory effects of Thai medicinal plants on the mitogen stimulated proliferation of human peripheral blood mononuclear cells in vitro. Chiang Mai Med Bull 2005; 44(1):1-12.available at: http://www.medicine.cmu.ac.th/secret/edserv/journal/fulltext/Kanitta.pdf.

30.Akintonwa A, Awodele O, Afolayan G, Coker HA. Mutagenic screening of some commonly used medicinal plants in Nigeria. J Ethnopharmacol .2007;125(3):461–470.

31.Eren Y, Özata A. Determination of mutagenic and cytotoxic effects of Limonium globuliferum aqueous extracts by Allium, Ames, and MTT tests. Braz J Farma. 2014;2491):51-9.

32.Ali NA, Mothana R, Ghaleb NA, Lindequist U. Screening of traditionally used endemic soqotraen plants for cytotoxic activity. Afr J Tradit Complement Altern Med. 2007; 4(4):529-31.

33. Thepouyporn A, Kwanbunjan K, Pooudong S, Changbumrung S. Mutagenicity study of weeds and common plants used in traditional medicin and for animal feed. Southeast Asian J Trop Med Public Health .2006;37(Suppl 3):195-202.

34.Resende FA, Munari CC, de Azevedo Bentes Monteiro Neto M, Tavares DC, Bastos JK, da Silva Filho AA, Varanda EA. Comparative studies of the (Anti) mutagenicity of baccharisdracunculifolia and artepillin C by the bacterial reverse mutation test. Molecules. 2012;17(3):2335-50.

35.Coruh N, Celep AGS, Ozgokce F. Antioxidant properties of Prangos ferulacea (L.) Lindl. Chaerophyllum macropodum Boiss. and Heracleum persicum Desf. From Apiaceae family used as food in Eastern Anatolia and their inhibitory effects on glutathione-S-transferase. Food Chem. 2007; 100(3): 1237-42.

36.Durmaz H, Sagun E, Tarakci Z, Ozgokce F. Antibacterial activities of Allium vineale, Chaerophyllum macropodum and Prangos ferulacea. Afr J Biotechnol. 2006;5(19): 1795-8.

37.Ulubelen A, Topcu G, Tan N, Olçal S, Johansson C, Uçer M, et al. Biological activities of Turkish medicinal plant Prangos platychlaena. J Ethanopharmacol. 1995;45(3):193-7.

38.Kogure K, Yamauchi I, Tokumura A, Kondou K, Tanaka N, Takaishi Y, et al. Novel antioxidants isolated from plants of the genera Ferula, Inula, Prangos and Rheum collected in Uzbekistan. Phytomidicine. 2004;11(7-8):645-51.

39.Ayres D, Tamm C, Raphael R, Shamma M. Dictionary of natural products. London:Chapman & Hall; 1994.p?

40.Alikhah-Asl M, Azarnivand H, Jafari M, Arzani H, Amin GH, Zare-Chahouki MA. Variations of essential oils in fresh and dried aerial parts of Prangos uloptera. J Natur Prod. 2012;5:5-9.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.6.9.6]
[DOI: 10.22088/jbums.17.6.64]

41.Razavi SM, Nazemiyeh H, Delazar A, Hajiboland R, Mukhlesur Rahmane M, Gibbons S, et al. Coumarins from the roots of Prangos uloptera. Phytochem Lett. 2008;1(3):159-62.
42.Zahri S, Razavi SM, Hassanzadeh Niri F, Mohammadi S. Induction of programmed cell death by Prangosuloptera, a medicinal plant. Biol Res.2009; 42: 517-522.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.6.9.6]
[DOI: 10.22088/jbums.17.6.64]