

اثر بخشی عصاره متابولی دو گونه جاشیر Prangos crossoptera و Prangos uloptera بر رشد و تکثیر لنفوسيت های انسانی و جهش زایی آن ها در آزمون ايمز

مخترن نصرتی (PhD)^{۱*}، ماندانا بهبهانی (MSc)^۲

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

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

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 متابولی دو گونه جاشیر Prangos crossoptera و Prangos uloptera بر رشد و تکثیر لنفوسيت های انسانی و پتانسیل جهش زایی آنها می باشد.

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

یافته ها: نتایج نشان داد که عصاره حاصل از بخش های مختلف در هر دو گونه موجب افزایش (۵ الی ۳۰ درصد برابر) رشد و تکثیر لنفوسيت ها شده و قادر پتانسیل جهش زایی می باشد. عصاره بذر و برگ در هر دو گونه به ترتیب با (۵ الی ۷ درصد برابر) رشد سلول ها کمترین و بیشترین تاثیر را بر رشد و تکثیر لنفوسيت ها دارند.

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

واژه های کلیدی: آزمون ايمز، جاشیر، عصاره متابولی، لنفوسيت.

مقدمه

می باشدند 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 خودار 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 گستره ای در خصوص اثرات مطلوب درمانی گیاهان دارویی صورت گیرد (۵). به طوری که مطالعات آزمایشگاهی متعدد انجام شده طی سال های اخیر اثرات مطلوب درمانی همچون خواص ضد میکروبی (۶)، ضد سرطانی (۷) و ضد دیابتی (۸) و نیز حضور ترکیبات دارویی با ارزش را در گیاهان تایید نموده است (۹). خانواد چتریان از جمله خانواده های گیاهی با پراکنش وسیع و مصارف متعدد خوارکی و دارویی در ایران می باشند. این خانواده گیاهی دارای بیش از ۳۰۰ جنس و ۲۵۰۰ گونه در ذیاست که از این تعداد ۱۱۳ جنس و ۳۲۰ گونه در ایران یافت می شود (۱۱). جنس جاشیر یکی از جنس های مهم خانواده چتریان با حدود ۳۰

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 طبی 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 تعديل گر 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 برخوردارند (۲). اهمیت این موضوع به حدی است که طی سال های اخیر بخش عمده ای از تحقیقات دارویی به شناسایی و معرفی ترکیبات تحريك کننده و یا سرکوب کننده سیستم ایمنی جهت تحقق اهداف مختلفی همچون معرفی ترکیبات ضد سرطانی داروهای موثر در بیماری های 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

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

* مسئول مقاله: دکتر ماندانا بهبهانی

آدرس: اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوری های نوین، گروه بیوتکنولوژی، تلفن: ۰۳۱۳-۷۹۳۴۳۷۷

در ظروف پلاستیکی درب دار استریل در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. به منظور تهیه غلظت های مختلف از از عصاره های بدبست آمدہ ۱۰ میلی گرم از هر کدام از عصاره ها را در ۵۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوكساید ۳٪ (DMSO) حل شده سپس بوسیله بافر فسفات (PBS) و تحت شرایط استریل در زیر هود زیستی لامینار فلو به غلظت های ۲۰۰۰، ۱۵۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر رقیق شدند.

استخراج، نگهداری و کشت سلول های لنفوسيت: ۱۰ میلی لیتر خون از اهداکنندگان سالم که ساققه 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 لفودکس منتقل و در ساتریفیوژ با دور rpm ۱۸۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه ساتریفیوژ شد. پس از خارج ساختن فالکون ها از ساتریفیوژ خون موجود به سه لایه تقسیم می شود. بالاترین لایه که بصورت لایه زرد رنگ می باشد حاوی پلاکت ها می باشد. لایه میانی سفید رنگ حاوی لنفوسيت ها و لایه سوم حاوی گلbulous های قرمز خون می باشد. لنفوسيت های جدا شده در شرایط استریل و بوسیله پیپت استرور از سایر لایه ها جدا شده و به پلیت های کشت حاوی محیط RPMI شامل: ۱۰ % سرم گاوی، ۱۰۰ U/ml پنی سیلین، ۱mM استریتو مایسین، ۲mM کلوتامین، ۱mM پیرووات منتقل و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور CO2 ۵٪ کشت داده شدند.

بررسی رشد و تکثیر سلولهای لنفوسيت با استفاده از روش MTT: جهت مطالعه اثر عصاره های بر رشد و تکثیر لنفوسيت ها از آزمون MTT با استفاده از محلول ۵ میلی گرم بر میلی لیتر ترازو لیوم بروماید فیلتر شده استفاده شد. این آزمون یک روش رنگ سنجی است. اساس این روش احیا کریستال های زرد رنگ ترازو لیوم با فرمول مولکولی (C18H16BrN) و شیمیابی ۳-(4,5-Dimethyl-2-thizolyl)-2, 5-diphenyltertazoliu bromide و ایجاد کریستال های آبی رنگ نامحلول فورمازان بوسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژن اسید سلولی می باشد.

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 سوپاپنسیون 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 لنفوسيت ها به منظور حل کردن کریستال های نامحلول MTT از ۱۰ میکرولیتر محلول ۰/۰۴ مولار HCL در ۲ پروپیانول به همراه تربیتون 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 ۱-۳ درصد 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 لنفوسيت ها از فرمول زیر محاسبه گردید.

فرمول۱:

$$\frac{\text{ذب حاصل از هر نمونه}}{\text{ذب کنترل منفی}} \times 100 = \text{درصد بقا}$$

گونه است که ۱۵ گونه از آن در ایران رویش یافته و ۵ گونه آن بومی ایران می باشد (۱۲). از جمله خواص دارویی گونه های مختلف جاشاری می توان به خواص ضد التهاب، ضد اکگل، ضد ویروس، ضد باکتری، تقویت اعصاب و دفع سنگ های مجرای اداری و ضد نفح اشاره نمود که اثر بخشی بسیاری از آن ها طی بررسی های آزمایشگاهی ثابت شده است (۱۳-۱۵).

از جمله گونه های مهم جنس جاشاری است که در مناطق مدیترانه ای، مرکز و غرب آسیا از جمله ایران پراکنش وسیعی دارد. این گونه که به جاشاری صخره رست معروف است در طب سنتی جهت درمان اختلالات گواراشی، التیام زخم ها و بیماری لکپلاکیا (گزنه سفید) به کار می رود (۱۶). 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 جاشاری صورت گیرد (۱۸). بررسی های آزمایشگاهی انجام شده بر روی خواص دارویی این گونه جاشاری را اثبات نموده است (۱۹). یکی دیگر از گونه های جاشاری است که بومی ایران بوده و پراکنش آن در نواحی غربی ایران بیشتر است (۲۰).

با وجود گزارش های متعدد در خصوص اثرات مطلوب درمانی و ترکیبات موثر P.crossoptera صورت نگرفته و مطالعات صورت گرفته بر روی این گونه محدود به ویژگی های گیاه شناسی می باشد (۲۱ و ۲۲). وجود طیف گسترده ای از متابولیت های ثانویه با خواص درمانی مختلف در گیاهان جاشاری و پراکنش دارویی 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 جاشاری بویژه گونه های بومی ایران جهت معرفی گونه های جدید با خواص درمانی و این از لحاظ جهش زا بودن از اهمیت بالانی بر خود دارد است. در این مطالعه برای اولین بار تاثیر عصاره متابولی دو گونه جاشاری بومی ایران بر رشد و تکثیر لنفوسيت های انسانی بررسی و پتانسیل جهش زایی آنها بوسیله آزمون ایمز مورد بررسی قرار می گیرد.

مواد و روش ها

تیزی گونه و تهیه نمونه: نمونه های گیاهی مربوط به P.uloptera در اردیبهشت و خرداد ۱۳۹۳ در سه مرحله قبل از گل دهی، گل دهی و تولید بذر به ترتیب از ارتفاعات شمال سندج و سارال دیواندره در استان کردستان جمع آوری و تعیین گونه و نام علمی در مرکز تحقیقات کشاورزی سندج انجام گرفت. سپس نمونه های مذکور به شماره هر باریومی (P.uloptera) ۱۴۱۲ و ۱۵۳۶ در هر باریوم 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 متابول ۹۶٪ بر روی شیکر با دور rpm ۱۶۰ 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 تقطیع شده و سپس توسط دستگاه فریز درایر خشک گردیدند. عصاره های حاصل

میکرولیتر محلول ۱ میکروگرم بر میلی لیتر سدیم آزید به عنوان کنترل مثبت و غلظت‌های ۱-۳ درصد DMSO به عنوان کنترل منفی استفاده شد. برای هر غلظت از عصاره‌های مختلف سه بار تکرار صورت گرفت. در نهایت تعداد کلی‌های رشد کرده روی محیط حداقل که ناشی از بازیابی توان سنتز هیستیدین است را با کلی‌های رشد کرده در مجاورت کنترل مثبت و منفی مقایسه و از فرمول زیر برای تعیین شاخص Qm استفاده شد.

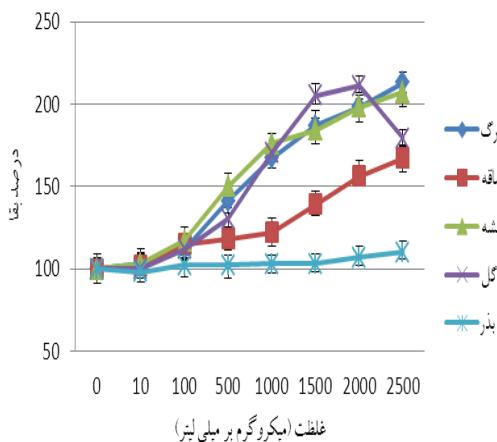
فرمول:

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

یافته‌ها

نتایج حاصل از اثر عصاره‌های متابولی بر تکثیر لنفوسيت‌ها: داده‌های بدست آمده نشان داد که عصاره حاصل از بخش‌های مختلف این دو گونه موجب افزایش تکثیر لنفوسيت‌ها می‌شوند. میزان تاثیر این عصاره‌ها وابسته به غلظت بوده به طوری که در اکثر عصاره‌ها غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر کمترین و در غلظت ۲۵۰۰ میکروگرم بی میلی لیتر بیشترین تاثیر را بر تکثیر لنفوسيت‌ها داشته‌اند مقایسه اثر بخشی عصاره بخش‌های 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 مربوط به غلظت ۱۰-۱۰۰ بذر می‌باشد.

در خصوص اثر بخشی عصاره بخش‌های 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 غلظت‌های ۱۰۰-۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر بذر می‌باشد (نمودار ۲). ترتیب اثر بخشی عصاره بخش‌های مختلف گونه *P.uloptera* بترتیب شامل: برگ، ریشه، گل، ساقه و بذر و در گونه *P.crossoptera* برگ، گل، ریشه، ساقه و بذر می‌باشد. بررسی مقایسه‌ای بین دو گونه نیز حاکی از اثر بخشی بالاتر گونه *P.uloptera* نسبت به گونه *P.crossoptera* می‌باشد.



نمودار ۱. اثر گذاری عصاره بخش‌های مختلف گونه *P.crossoptera* بر رشد و تکثیر لنفوسيت‌های انسانی (هریک از مقادیر نشان دهنده میانگین درصد بقای لنفوسيت‌ها ± خطای معیار میانگین)

بررسی میزان جهش زایی عصاره‌ها بوسیله‌ی آزمون ایمز: آزمون‌های تایید سویه TA98: به منظور بررسی قابلیت جهش زایی عصاره‌ها در غلظت‌های مختلف از آزمون ایمز استفاده شد. در این آزمون از سویه‌های مختلف سالمونلا استفاده شد. این باکتری‌ها دارای جهش‌های مختلفی در اپرون مربوط به سنتز هیستیدین بوده لذا قابلیت رشد در عدم حضور این اسید آمینه را ندارند. اما در صورت قرارگیری این باکتری‌ها در معرض یک ماده جهش‌زا ممکن است جهش ایجاد شده به حالت عادی بازگشته و باکتری توان سنتز هیستیدین را مجدداً بدست آورد.

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

جهش‌های موجود در این سویه عبارتند از: ۱- جهش rfa که موجب حسایت به کریستال ویولت می‌شود. ۲- UVrB که موجب عدم توا نایی باکتری در ترمیم آسیب‌های ناشی از پرتوهای UV شده و در صورت قرارگیری در معرض این پرتو‌ها سلول از بین خواهد رفت. جهت تایید سویه TA98 سه آزمون واستگی به هیستیدین، مقاومت به آمپی سیلین و عدم رشد در صورت تابش پرتوهای UV صورت گرفت. به این منظور تعداد $10^{1/5}$ باکتری موسوم به نیم مک فارلند را در میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری حاوی امیلی لیتر PBS حل کرده و جداگانه به محیط حداقل حاوی آگار، گلوگز، اسید سیتریک یک آب، پتانسیم فسفات دی بازیک، سدیم آمونیوم فسفات و منیزیوم سولفات) و محیط مستر حاوی (نوتریت آگار، نمک طعام، بیوتین و هیستیدین) وارد کرده و با سوپ 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 باکتری‌ها در محیط مستر نصفی از پلیت کشت را کاملاً با فویل آلومینیومی پوشانده و به مدت ۱۰ ثانیه در معرض لامپ UV قرار داده شد. در نهایت واستگی 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 غلظت‌های مختلف عصاره‌های مختلفی: پس از انجام آزمون‌های تایید سویه جهت بررسی میزان جهش زایی از روش شمارش تعداد کلی‌های برگشتی، تعیین درصد برگشت و مقایسه شاخص Qm استفاده شد. به این منظور غلظت‌های مختلفی از عصاره‌ها با اتحلال ۱۰ میلی گرم از عصاره‌ها PBS استریل به غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر انجام شد. جهت مشخص شدن میزان جهش زایی دیسک های کاغذی غوطه‌ور در غلظت‌های مختلف عصاره‌ها در محیط کشت حداقل حاوی کشت یکنواخت سالمونلا تیفی موریوم TA98 قرار گرفت. سپس برای هر کدام از غلظت‌های مختلف عصاره‌های مورد بررسی شاخص Qm تعریف شد. شاخص ذکر شده تعیین کننده میزان جهش زایی نمونه‌های مورد مطالعه است. به طوری که Qm پایین تر از $1/6$ نشان دهنده عدم جهش زایی، Qm در محدوده $1/9$ - $1/7$ 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



شکل ۳. حساسیت سالمونولا تیفی موریوم نسبت به کریستال ویولت

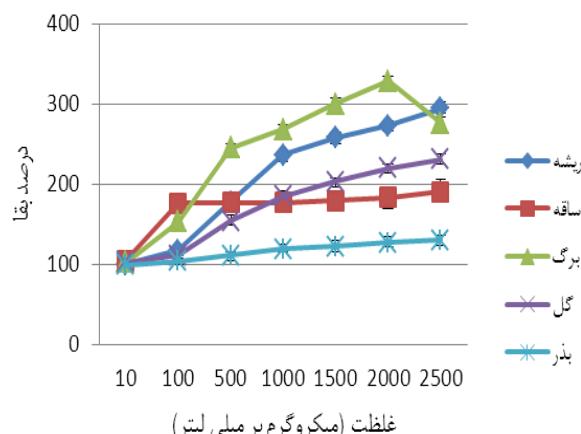


شکل ۴. مقاومت سالمونولا تیفی موریوم نسبت به آمپی سیلین



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

نتایج حاصل از امیزان 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، ۲۸۰ کلنی بر سطح محیط حداقل حاوی کنترل منفی DMSO ۱-۳٪ و ۷۵ کلنی بر سطح محیط حداقل حاوی کنترل مثبت سدیم آزید رشد نموده است. که نشان دهنده وجود $\frac{9}{3}$ ٪ جهش خودبخودی در سویه مورد مطالعه است. بررسی شاخص Qm در غلظتها 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 که Qm در تمامی غلظت های مورد مطالعه عصاره بخش های مختلف دو گونه P.uloptera و P.crossoptera کمتر از ۱/۶ محاسبه گردید. لذا بر اساس تعریف های صورت گرفته در خصوص شاخص جهش زایی Qm مبنی بر عدم جهش زایی ترکیاتی با Qm کمتر از ۱/۶ بنابراین عصاره های حاصل از بخش های مختلف دو گونه جاشیر مورد مطالعه هیچ گونه جهش زایی ندارند (۳۴). 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.uloptera کمتر از گونه P.crossoptera می باشد (جدول ۱).



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

نتایج حاصل از بررسی جهش زایی:

نتایج آزمون های تأیید 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 جهش های 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 چهش UVrB و rfa 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 سالمونولا تیفی موریوم در محیط حداقل فاقد هیستیدین



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

جدول ۱. نتایج حاصل از محاسبه شاخص کمی جهش زایی (Qm) مربوط به غلظت های مختلف عصاره های دو گونه *P.crossoptera* و *P.uloptera*

شاخص کمی جهش زایی (Qm) باخطای میانگین							منشا عصاره	گونه گیاهی
۳۰۰۰	۲۵۰۰	۲۰۰۰	۱۵۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰			
۱/۴۴±۰/۰۹	۱/۳۹±۰/۱	۱/۳۵±۰/۰۴	۱/۲۹±۰/۰۴	۱/۲۵±۰/۰۳	۱/۲۳±۰/۰۶		برگ	
۱/۴۸±۰/۱	۱/۴۶±۰/۰۶	۱/۳۹±۰/۰۴	۱/۳۷±۰/۰۲	۱/۳۶±۰/۰۶	۱/۳۴±۰/۰۸		گل	
۱/۴۹±۰/۰۴	۱/۴۷±۰/۰۷	۱/۴۰±۰/۰۳	۱/۳۷±۰/۰۳	۱/۳۴±۰/۰۲	۱/۳۲±۰/۰۳	<i>uloptera</i>	ریشه	
۱/۴۲±۰/۰۲	۱/۳۸±۰/۰۲	۱/۳۱±۰/۰۴	۱/۲۹±۰/۰۴	۱/۲۷±۰/۰۹	۱/۲۵±۰/۰۷		ساقه	
۱/۳۸±۰/۰۳	۱/۳۵±۰/۰۶	۱/۲۸±۰/۰۹	۱/۲۶±۰/۰۱	۱/۲۳±۰/۰۶	۱/۲۰±۰/۰۹		بذر	
۱/۴۰±۰/۰۴	۱/۳۷±۰/۰۹	۱/۳۳±۰/۰۷	۱/۳۱±۰/۰۴	۱/۲۸±۰/۰۹	۱/۲۵±۰/۱		برگ	
۱/۴۷±۰/۰۷	۱/۴۲±۰/۰۳	۱/۴۷±۰/۰۱	۱/۳۳±۰/۰۵	۱/۳۰±۰/۰۴	۱/۴۷±۰/۰۳		گل	
۱/۴۵±۰/۰۲	۱/۴۴±۰/۰۴	۱/۴۱±۰/۰۲	۱/۳۷±۰/۰۲	۱/۳۴±۰/۰۶	۱/۳۴±۰/۰۴	<i>crossoptera</i>	ریشه	
۱/۳۵±۰/۰۳	۱/۳۲±۰/۰۳	۱/۲۸±۰/۰۳	۱/۲۵±۰/۰۲	۱/۲۴±۰/۰۵	۱/۲۰±۰/۰۲		ساقه	
۱/۴۰±۰/۰۶	۱/۳۷±۰/۰۲	۱/۳۵±۰/۰۲	۱/۳۰±۰/۰۸	۱/۲۶±۰/۰۶	۱/۲۴±۰/۰۳		بذر	

بحث و نتیجه گیری

ابات رسیده از گیاهان دارویی مختلف این گیاهان می توانند حاوی ترکیبات سمی، جهش زا و تهدید کننده سلامت انسان نیز باشند. لذا طی سال های اخیر بررسی های متعددی جهت اطمینان یافتن از اینم 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 اینمی و برخی نیز خطرات بالقوه این گیاهان را تایید می نمایند (۳۰). Eren و Limonium همکارانش پتانسیل جهش زایی و سمیت عصاره آبی گیاه دارویی globuliferum را مورد بررسی قرار داده، نتایج این پژوهش نشان داد 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 می باشد (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 کشنده بسیاری از اینتویک انسانی است (۳۲) اما در مقابل پژوهش های بسیاری نیز نشان دهنده اینمی بسیاری از گیاهان دارویی از حیث پتانسیل جهش زایی میباشدند. مطالعه Peperomia و همکارانش نشان داد که عصاره آبی Thepouyporn pellucid, Colocasia esculenta Brachiaria mutica گیاهان گیاهان دارویی پر کاربرد در تایلند میباشدند فاقد هر گونه اثرات جهش زایی در آزمون ایمز می باشند (۳۳). در پژوهشی دیگر Resende و همکارانش نشان دادند که عصاره اتل استات گیاه Baccharis dracunculifolia در بزریل کاربرد های دارویی زیادی دارد نه تنها فاقد اثرات جهش زایی است بلکه تاحدی نیز دارای اثرات ضد جهش زایی نیز می باشد (۳۴).

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

نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره متابولی حاصل از بخش های مختلف دو گونه جاشاری مورد بررسی موجب افزایش رشد و تکثیر لنفوسيت های انسانی شده و قادر پتانسیل جهش زایی می باشند. این افزایش رشد وابسته به غلظت بوده بطوري که در بالاترین غلظت های اغلب عصاره های گیاهی پیشترین میزان رشد و تکثیر مشاهده شد. بررسی های مقایسه ای نیز نشان داد که اثر بخشی عصاره های مورد بررسی از الگویی مشابه تعیت کرد بطوري که در هر دو گونه مورد بررسی برگ بیشترین و بذر کمترین تأثیر را بر رشد و تکثیر لنفوسيت ها داشت و بطوري کلی میزان افزایش رشد و تکثیر لنفوسيت ها تحت تاثیر عصاره متابولی گونه *P.uloptera* نسبت به گونه *P.crossoptera* بیشتر بود.

شیوع گسترده بیماری های عفونی و نیز نقص های وراتی و اکتسابی تأثیر 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 تعديل پاسخ های اینمی شده است (۲۵). در این بین ترکیبات گیاهی با توان تحریک رشد و تکثیر لنفوسيت 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 متابولی گیاه Myrmecodia tuberosa در رت های مورد مطالعه می شود اما اثر قابل توجهی بر جمعیت سلول های TCD4⁺ ندارد (۲۷). مطالعه Wang و همکاران نشان داد که عصاره گیاه Allium sativum موجب افزایش فعالیت سلول های کشنده TNF-α (NK cell) و نیز افزایش ترشح ایترولوکین ۲ و ۳ (Punturee) شده اما موجب کاهش حجم ترشح ایترولوکین ۴ می شود (۲۸). همکارانش نیز نشان دادند که عصاره آبی گیاه Centella asiatica موجب افزایش تکثیر لنفوسيت ها شده در حالی که عصاره اتابولی همین گیاه موجب سرکوب تکثیر لنفوسيت ها می شود (۲۹). پژوهش های متعدد انجام شده در خصوص اثرات درمانی گیاهان دارویی نشان داده که علیرغم خواص متعدد به

Razavi اسپاتولنول و ژرماسن دی می باشدند (۴۰). در بررسی انجام شده توسط همکاران در خصوص کومارین های موجود در عصاره هنگزانی بخش های هوایی گونه P.uloptera نتایج نشان داده که این ترکیبات دارای خاصیت ضد اکسیدانی قابل توجهی می باشدند (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 کشنندگی بر روی سلول های سرطانی Hela بوده همچنین دارای میزان قابل توجهی ترکیبات ضد اکسیدانی و ضد باکتریایی می باشد (۱۹).

Zahri مطالعات و همکاران در خصوص القای آپوتوز توسط عصاره P.uloptera نشان داد که عصاره دی کلرومنانی بخش های مختلف این گونه جاشاری می تواند موجب القای مرگ برنامه ریزی شده در سلولهای سرطانی رده McCoy شود (۴۲). برخلاف 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 محدود 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 دو گونه مورد بررسی بر رشد و تکثیر لنفوسيت ها و تجمع مقادیر بالایی از متabolیت های ثانویه گیاهی بویژه آلفاپین 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 متابولی حاصل از بخش های مختلف دو گونه جاشار بررسی شده بر تکثیر لنفوسيت ها و عدم جهش زایی آن ها این گیاهان می توانند به عنوان گیاهان دارویی اینم در بیماران مبتلا به نقش های اینمی 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 می آید.

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 می باشد. مطالعات انجام شده در خصوص خواص درمانی و ترکیبات موثر دارویی گونه های مختلف جنس جاشار 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 متabolیت های ثانویه همچون انواع مختلفی از ترکیبات آلکالوئیدی، فلاونوئیدی ها و ترپنوئیدی 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 متابولی، اتانولی، آبی و هگزانی عصاره متابولی این گیاه بیشترین خاصیت آنتی بیوتیکی را علیه باکتری های گرم مثبت و منفی Escherichia coli Staphylococcus aureus, Bacillus همچون: subtilis, Klebsiella pneumonia شده توسط Ulubelen و همکاران در خصوص اثرات ضد قارچی و ضد باکتریایی گونه Prangos platychlaena مشخص شده که عصاره این گیاه Staphylococcus aureus Bacillus subtilis, Staphylococcus epidermidis, Candida albicans دارای اثرات آنتی بیوتیکی علیه Kogure Prangos tschimganica و Prangos papularia می باشد (۳۷). و همکاران نیز در بررسی دیگر نشان دادند که دو گونه حاوی ترکیباتی Prangos papularia جدید با قابلیت ضد اکسیدانی بالا و توان مهار اکسیداسیون چربی ها می باشدند (۳۸). مطالعات فیتوشیمیایی صورت گرفته در خصوص ترکیبات موجود در بخش های مختلف گونه های جنس جاشار منجر به معرفی ترکیبات مختلف آلکالوئیدی، فلاونوئیدی، 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 عمدۀ ترین این ترکیبات در حالت تازه به ترتیب شامل: آلفاپین، ترنس بتا-اوسمین، بتاکاریوفیلن، دلتا-۳-کارن، ژرماسن دی و بتامیرسن و در حالت خشک شده شامل: بتاکاریوفیلن، آلفاپین، کاریوفیلن اکساید،

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

۱. 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

References

1. Sriwanthana B, Treesangsri W, Boriboontrakul B, Niumsakul S, Chavalittumrong P. In vitro effects of Thai medicinal plants on human lymphocyte activity. *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 brasiliense*, *ipomoea pes-caprae* and *matatba elaeagnoides* demonstrated by human peripheral blood mononuclear cells proliferation. *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 some 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 garlic extracts and WEHI-164 fibrosarcoma tumor growth in BALB/c mice. *J Med Food.* 2011; 14(9): 969-74.
9. Asgary S, Kazemi S, Moshtaghan 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.

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. Thepouyorn 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 macropodium* 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 macropodium* and *Prangos ferulacea*. *Afr J Biotechnol.* 2006;5(19): 1795-8.
37. Ulubelen A, Topcu G, Tan N, Olçal S, Johansson C, Ucer 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. *Phytomedicine.* 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.

- 41.Razavi SM, Nazemiyeh H, Delazar A, Hajiboland R, Mukhlesur Rahmene 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.