Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2015; 18(97): 81-93

The Evaluation Effect of methanol extracts from *Prangos ferulacea* and *Prangos acaulis* on Human lymphocytes proliferation and their mutagenicity in Ames test

Mokhtar Nosrati[1], Mandana Behbahani[1*]

1- Department of Microbial Biotechnology, Isfahan University, Isfahan, Iran

Received: 14 Jan 2015, Accepted: 25 Feb 2015

Abstract

Background: Medicinal plants are primery source of many drugs to cure different diseases. The genus *Prangos*, (Umbelliferae family) consists of several medicinal plants that their desirable dffects have been approved. The aim of this study is to investigate the effectiveness of methanol extract in different parts of *prangos ferulacea* and *prangos acaualis* on human lymphocytes proliferation and their mutagenicity in *salmonella typhimurium* TA98.

Materials and Methods: In this experimental study, the plants were collected from different areas of Kurdistan. Then, samples were air dried and powdered and methanol material of plants was extracted. The extracts were diluted to give concentrations of 10, 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 µg/ml. Finally, the effects of these extracts on human lymphocytes proliferation and their mutagenecity have been investigated by the MTT and Ames test.

Results: The results showed that different organs extract from both tested plants caused a significant increase in lymphocytes proliferation, specially in concentrations of 500 to 2500 µg/ml. Of studied excrtacts, the highest and lowest effect on lymphocytes proliferation was obtained in presence of flower and seed, respectively. In total, the levels of proliferation resulted of *prangos ferulacea* as compared with *prangos acaulis* were higher. Also, the results of study showed no mutagenicity of studied plant exctracts with considered concentrations.

Conclusion: The findings revealed that both species of *prangos* can increase immune system function and were used as an safe medicinal plant to cure patients with immune deficiencies and microbial infections.

Keywords: lymphocytes proliferation, Mutagenesis, *Prangos*, *Salmonella Typhimurium* TA98

*Corresponding Author:
Address: Department of Microbial Biotechnology, Isfahan University, Isfahan, Iran.
Email: ma_behbahani@yahoo.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۸، شماره ۴ (شماره پیاپی ۹۷)، تیر ۱۳۹۴، ۹۳-۸۱

بررسی تاثیر عصاره‌های متانولی حاصل از *Prangos ferulacea* و *Prangos acaulis* بر رشد وتکثیر لنفوسیت‌ای انسانی و جهش‌زایی آن‌ها در آزمون ایمز

مختار نصرتی[۱]، ماندانا بهبهانی[۲*]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲-استادیار، گروه بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۶

چکیده

زمینه و هدف: گیاهان دارویی منبع اولیه بسیاری از داروها جهت درمان بیماری‌های مختلف می‌باشند. جنس جاشیر *(Prangos)* از خانواده چتریان شامل گیاهان دارویی بسیاری است که اثرات مطلوب دارویی آن‌ها در بررسی‌های متعدد ثابت شده است. هدف از این پژوهش، بررسی اثر بخشی عصاره متانولی بخش‌های مختلف دو گونه جاشیر با نام‌های علمی *Prangos ferulacea* و *Prangos acaulis* بر رشد و تکثیر لنفوسیت‌های انسانی و نیز جهش‌زایی آن‌ها در سالمونلا تیفی موریوم TA98 می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، نمونه‌های گیاهی از مناطق مختلف استان کردستان جمع‌آوری گشتند و سپس خشک و آسیاب شدند. بعد از آن عصاره متانولی این گیاهان استخراج شد و از عصاره‌های به دست آمده غلظت‌های۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه گشت. در نهایت اثر گذاری عصاره‌های حاصل بر رشد و تکثیر لنفوسیت‌های انسان و نیز جهش‌زایی آن‌ها به وسیله تست‌های MTT و ایمز بررسی گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که عصاره اندام‌های مختلف هر دو گونه به ویژه در غلظت‌های ۵۰۰ تا ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر موجب افزایش معنی‌داری در میزان رشد و تکثیر لنفوسیت‌ها می‌شود. در بین عصاره‌های بررسی شده، گل و بذر در هر دوگونه به ترتیب بیشترین و کمترین تأثیر را بر تکثیر لنفوسیت‌ها داشتند. به طور کلی، میزان افزایش رشد و تکثیر ناشی از عصاره‌های گونه *Prangos ferulacea* بیشتر از گونه *Prangos acaulis* بود. نتایج حاصل از بررسی جهش‌زایی نیز حاکی از عدم جهش‌زایی عصاره‌های دو گونه مطالعه شده در غلظت‌های بررسی شده بود.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که دو گونه جاشیر مورد بررسی می‌توانند عملکرد سیستم ایمنی را افزایش دهند و به عنوان گیاهان دارویی ایمن در بیماران مبتلا به نقص‌های ایمنی و انواع عفونت‌های میکروبی مورد استفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی: رشد و تکثیرلنفوسیت، جهش زایی، جاشیر، سالمونلا تیفی موریوم TA98

***نویسنده مسئول:** اصفهان،دانشگاه اصفهان، گروه بیوتکنولوژی میکروبی

E-mail: ma_behbahani@yahoo.com

مقدمه

استفاده از گیاهان در طب سنتی کشورهای مختلف از دیر باز مرسوم بوده است. اثرات مطلوب دارویی بسیاری از این گیاهان در تحقیقات آزمایشگاهی متعددی ثابت شده است، به طوری که نتایج حاصل از درمان بیماری‌های مختلفی هم‌چون دیابت، سرطان، اختلالات گوارشی و بیماری‌های عفونی با گیاهان دارویی بسیار مطلوب بوده است(۴-۱).

عوارض جانبی و هزینه کمتر نسبت به داروهای شیمیایی، کاهش سمیت داروهای دیگر به علت خواص آنتی‌اکسیدانی و منشأ طبیعی گیاهان دارویی موجب شده تا ترکیبات موجود در این گیاهان به عنوان داروهای جدید و موثر مطرح شده و سهم عمده‌ای از تحقیقات دارویی به شناسایی گونه‌های جدید دارویی و استخراج مواد موثر موجود در آن‌ها معطوف شود. گیاهان علیرغم داشتن اثرات درمانی و ویژگی‌های مطلوب دارویی ممکن است حاوی ترکیبات مختلفی باشند که تهدید کننده سلامت انسان است. از این رو علاوه بر بررسی اثرات درمانی گیاهان دارویی، مطالعه ویژگی‌های دارو شناختی و آگاهی از اثرات متقابل دارویی با داروهای شیمیایی و نیز بررسی پتانسیل جهش‌زایی جهت اطمینان از ایمن بودن آن‌ها اهمیت بالایی دارد(۸-۵).

یکی از رهیافت‌های نوین در عرصه تحقیقات ایمونولوژیکی به ویژه در خصوص بیماری‌های عفونی و اثر گذار بر سیستم ایمنی، جستجو و معرفی ترکیبات جدیدی است که موجب افزایش پاسخ‌های سیستم ایمنی اعم از ایمنی هومورال و ایمنی سلولی در مقابل عوامل پاتوژن می‌شوند. این امر در بیماران دارای نقص ایمنی اکتسابی یا وراثتی و نیز در سالمندان و کودکان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این بین گیاهان دارویی با دارا بودن مجموعه‌ای از متابولیت‌های ثانویه و اثر درمانی، منبعی مناسب جهت جستجوی ترکیبات افزاینده پاسخ‌های سیستم ایمنی می‌باشند(۹).

خانواده چتریان از جمله خانواده‌های گیاهی با پراکنش وسیع است که دارای گونه‌های دارویی متعددی است(۱۰). جنس جاشیر از جنس‌های معروف این خانواده با حدود ۳۰ گونه است که شامل گیاهان خوراکی و دارویی زیادی می‌باشد. این جنس در ایران پراکنش وسیعی دارد، به طوری که ۱۵ گونه از آن در مناطق مختلف ایران به ویژه در امتداد رشته کوه‌های زاگرس گزارش شده است که از این تعداد ۵ گونه آن بومی ایران می‌باشد(۱۱، ۱۲).

در طب سنتی، گیاهان متعلق به جنس جاشیر به عنوان ضد التهاب، ضد انگل، ضد ویروس، ضد باکتری، تقویت کننده اعصاب و دفع کننده سنگ‌های مجاری ادراری جهت درمان بسیاری از بیماری‌ها و اختلالات استفاده شده است که اثر بخشی بسیاری از آن‌ها طی بررسی‌های آزمایشگاهی ثابت گشته است(۱۳، ۱۴).

دو گونه معروف از جنس جاشیر با نام‌های علمی *Prangos ferulacea* و *Prangos acaulis* که به ترتیب به جاشیر رنگی و جاشیر کوتوله معروف هستند، دارای پراکنش نسبتا وسیعی در ایران می‌باشند(۱۵، ۱۶). جاشیر رنگی علاوه بر خواص درمانی دارای قابلیت رنگ‌زایی بالایی است و در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی در خصوص مواد متشکله، خواص درمانی و پتانسیل رنگ‌زایی آن صورت گرفته است(۱۷). این گونه گیاهی که به صورت پایا ایستاده و به ارتفاع ۸۰ تا ۲۰۰ ساتی‌متر در مناطق سرد سیر رویش یافته است، دارای خواص متعدد دارویی است. در پژوهش‌های متعدد صورت گرفته بر روی این گیاه، خواص دارویی هم‌چون توان بالای ضد اکسیدانی، ضد ویروسی، ضد باکتریایی، ضد درد، ضد دیابت و رفع آسیب‌های کلیوی به اثبات رسیده است(۱۸، ۱۹).

جاشیر کوتوله نیز یکی دیگر از گونه‌های مهم دارویی و خوراکی جنس جاشیر است. این گیاه از لحاظ داشتن ارتفاع کوتاه و برگ‌های پوشیده از کرک، ظاهری متفاوت نسبت به جاشیر رنگی دارد و پراکنش آن در مناطق غربی ایران بیشتر است. این گیاه دارای مصرف خوراکی و مصارف متعدد دارویی در طب سنتی است. بیشتر تحقیقات صورت گرفته در خصوص این گونه جاشیر مربوط به شناسایی و معرفی ترکیبات موجود در این گیاه می‌باشد(۲۰).

پراکنش وسیع، خواص متعدد دارویی و تنوع بالای گیاهان جنس جاشیر از جمله دلایل انجام تحقیقات گسترده برای جستجوی ترکیبات موثر دارویی جهت درمان بیماری‌های نوظهور و صعب العلاج می‌باشد.

با توجه به کاربردهای متعدد دارویی در بیماری‌های مختلف و نیز استفاده خوراکی و رنگ‌زایی دو گونه جاشیر ذکر شده، بررسی خاصیت جهش‌زایی و هم‌چنین اثرات آن‌ها بر رشد و تکثیر لنفوسیت‌ها به عنوان یکی از اجزای اصلی سیستم ایمنی ضروری به نظر می‌رسد. در این پژوهش، برای اولین بار اثر بخشی عصاره متانولی اندام‌های مختلف دو گونه جاشیر ذکر شده بر رشد و تکثیر لنفوسیت‌های انسانی و نیز جهش زایی آن‌ها در سالمونلا تیفی موریوم TA98 مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

تعیین گونه و تهیه نمونه :

این پژوهش به روش تجربی صورت گرفت. گیاهان تازه در ماه‌های اردیبهشت و خرداد ۱۳۹۳ طی سه مرحله قبل از گل دهی، گل دهی و تولید بذر از نقاط مختلف استان کردستان(شمال سنندج، سارال دیواندره، دهگلان و مریوان) جمع‌آوری شدند. تعیین گونه و نام علمی در مرکز تحقیقات کشاورزی سنندج انجام گرفت.

بخش‌های مختلف نمونه گیاهی اعم از گل، برگ، ساقه، ریشه و بذر جدا شدند و پس از شستشوی کامل به طور جداگانه در سایه خشک شدند، سپس آسیاب گردیدند. ۵۰ گرم از پودرهای به دست آمده به طور جداگانه به مدت ۷۲ ساعت در ۱۵۰ میلی‌لیتر متانول ۹۶ درصد بر روی شیکر با ۱۶۰ دور بر دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

عصاره‌های حاصل پس از ۳ بارعبور از کاغذ صافی به وسیله دستگاه تحت خلا روتاری در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شدند و سپس از طریق دستگاه فریز درایر خشک گردیدند. عصاره‌های حاصل در ظروف پلاستیکی درب دار استریل تحت شرایط دمایی ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

به منظور تهیه غلظت‌های مختلف از عصاره‌های به دست آمده، ۱۰ میلی‌گرم از هر کدام از عصاره‌ها در ۵۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید۳ درصد (DMSO) حل شدند، سپس به وسیله بافر فسفات سالین و تحت شرایط استریل در زیر هود زیستی لامینار فلو به غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رقیق شدند.

استخراج، نگهداری و کشت سلول‌های لنفوسیت:

۱۰ میلی‌لیتر خون از اهداکنندگان سالم که سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک و سایر داروهای تاثیر گذار بر سیستم ایمنی را نداشتند، در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد هپارین جمع‌آوری شد. خون‌های جمع‌آوری شده در شرایط استریل به فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتری حاوی ۵ میلی‌لیتر لنفودکس منتقل گردیدند و به مدت ۲۰ دقیقه و در سانتریفوژ با ۱۸۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از خارج ساختن فالکون‌ها از سانتریفیوژ، خون موجود به سه لایه تقسیم شد. بالاترین لایه که به صورت لایه زرد رنگ است حاوی پلاکت‌ها می‌باشد. لایه میانی سفید رنگ حاوی لنفوسیت‌ها و لایه سوم حاوی گلبول‌های قرمز خون است. لنفوسیت‌های جدا شده تحت شرایط استریل به وسیله پیپت پاستور از سایر لایه‌ها جدا شده و به پلیت‌های کشت حاوی محیط RPMI شامل ۱۰ درصد سرم گاوی، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۲ میکرو مول گلوتامین و ۱ میکرومول پیرووات منتقل شدند و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۵ درصد CO_2 کشت داده شدند.

بررسی رشد و تکثیر سلول‌های لنفوسیت با استفاده از روش MTT:

به منظور مطالعه اثر عصاره‌ها بر رشد و تکثیر لنفوسیت‌ها، آزمون MTT با استفاده از محلول ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تترازولیوم بروماید فیلتر شده استفاده شد. این آزمون یک روش رنگ سنجی است. اساس این روش احیای کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم با فرمول مولکولی

C18H16BrN و فرمول شیمیایی 3-(4,5-Dimethyl-2-thizolyl)-2,5-diphenyltertazoliu bromide و ایجاد کریستال‌های آبی رنگ نا محلول فورمازان به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز سلولی می‌باشد. شدت رنگ ناشی از اثر انحلال این کریستال‌ها ارتباط مستقیمی با تعداد سلول‌های موجود در چاهک‌های کشت دارد. به منظور انجام تست MTT ، در ابتدا ۱۸۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی و ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه افزوده شد تا حجم نهایی به ۲۰۰ میکرولیتر برسد. پس از ۷۲ ساعت انکوبه کردن سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه، ۲۰ میکرولیتر MTT فیلتر شده به هر چاهک افزوده شد و ۴ ساعت دیگر انکوباسیون ادامه یافت. پس از اتمام انکوباسیون لنفوسیت‌ها، از ۱۰ میکرولیتر محلول ۰/۰۴ مولار HCL در ۲ پروپانول به همراه تریتون X100 به منظور حل کردن کریستال‌های نامحلول MTT استفاده شد. در پایان، جذب MTT در طول موج ۴۹۲ نانومتر از طریق دستگاه الایزا ریدر اندازه‌گیری شد. در این مطالعه از غلظت‌های ۱ تا ۳ درصد DMSO به عنوان کنترل منفی استفاده شد. برای مشخص شدن تأثیر هر غلظت از عصاره‌های مذکور سه بار تکرار صورت گرفت و در نهایت میزان تکثیر لنفوسیت‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

(فرمول۱)
$$\text{درصد بقا} = \frac{\text{جذب حاصل از هر نمونه}}{\text{جذب کنترل منفی}} \times ۱۰۰$$

بررسی میزان جهش‌زایی عصاره‌ها به وسیله آزمون ایمز:

آزمون‌های تأیید سویه TA98:

به منظور بررسی قابلیت جهش‌زایی عصاره‌ها در غلظت‌های مختلف از آزمون ایمز استفاده شد. در این آزمون، سویه‌های مختلف سالمونلا به کار گرفته شدند. این باکتری‌ها دارای جهش‌های مختلفی در اپرون مربوط به سنتز هیستیدین هستند. از این رو، قابلیت رشد در عدم حضور این اسید آمینه را ندارند. اما در صورت قرار گیری این باکتری‌ها در معرض یک ماده جهش‌زا ممکن است جهش ایجاد شده به حالت عادی گردد و باکتری توان سنتز هیستیدین را مجدداً به دست آورد. در این پژوهش از سالمونلا تیفی موریوم TA98 که از شرکت بیوریلاینس تهیه شده بود استفاده گردید. این سویه از سالمونلا علاوه بر وابستگی به هیستیدین دارای دو جهش مهم و یک فاکتور مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین است که ناشی از حضور پلاسمید PKM101 می‌باشد، از این خصوصیات برای شناسایی این سویه استفاده می‌شود. جهش‌های موجود در این سویه عبارت‌اند از:

۱- جهش rfa که موجب حساسیت به کریستال ویولت می‌شود.

۲- جهش UVrB که موجب عدم توانایی باکتری در ترمیم آسیب‌های ناشی از پرتوهای UV می‌شود و در صورت قرارگیری در معرض این پرتوها سلول از بین می‌رود.

جهت تأیید سویه T98، سه آزمون وابستگی به هیستیدین، مقاومت به آمپی‌سیلین و عدم رشد در حضور تابش پرتوهای UV صورت گرفت. بدین منظور، تعداد $۱/۵\times۱۰^{۸}$ باکتری موسوم به نیم مک فارلند را در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی یک میلی‌لیتر بافر فسفات سالین 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 نموده و با سواپ استریل به صورت یکنواخت پخش کردیم. جهت تایید مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین از دیسک استاندارد آمپی‌سیلین حاوی ۱۰ میلی‌گرم آنتی‌بیوتیک استفاده شد. هم‌چنین به منظور تعیین حضور جهش UVrB، پس از پخش یکنواخت باکتری‌ها در محیط مستر، نصفی از پلیت کشت کاملا با فویل آلومینیومی پوشانده شد و به مدت ۱۰ ثانیه در معرض لامپ UV قرار گرفت. 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 جهش‌زایی غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی:

پس از انجام آزمون‌های تأیید سویه، روش شمارش تعداد کلنی‌های برگشتی، تعیین درصد برگشت و مقایسه شاخص QM جهت بررسی میزان جهش‌زایی به کار گرفته شد. بدین منظور غلظت‌های مختلفی از عصاره‌ها با انحلال ۱۰ میلی‌گرم از عصاره‌ها در ۱۰۰ میکرولیتر DMSO تهیه گردید. سپس رقیق سازی به وسیله بافر فسفات سالین استریل با غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر انجام شد. جهت مشخص شدن میزان جهش‌زایی، دیسک‌های کاغذی غوطه ور با غلظت‌های مختلف عصاره‌ها در محیط کشت حداقل حاوی کشت یکنواخت سالمونلا تیفی موریوم T98 قرار گرفتند. شاخص QM تعیین کننده میزان جهش‌زایی نمونه‌های مورد مطالعه است؛ به طوری که QM پایین‌تر از ۱/۶ نشان دهنده عدم جهش‌زایی ،QM در محدوده ۱/۹ تا ۱/۷ نشان دهنده احتمال جهش‌زا بودن ماده مورد مطالعه و QM در حدود ۲ و بالاتر نشان دهنده جهش زا بودن ماده مورد مطالعه است. در این بررسی از ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر سدیم آزید به عنوان کنترل مثبت و از غلظت‌های ۱ تا ۳ درصد DMSO به عنوان کنترل منفی استفاده شد. برای هر غلظت از عصاره‌های مختلف سه بار تکرار صورت گرفت. در نهایت تعداد کلنی‌های رشد کرده روی محیط حداقل که ناشی از بازیابی توان سنتز هیستیدین بود با کلنی‌های رشد کرده در مجاورت کنترل مثبت و منفی مقایسه گردید و از فرمول زیر برای تعیین شاخص QM استفاده شد:

(فرمول۲)

$$\text{شاخص کمی جهش زایی(QM)} = \frac{\text{تعداد کلنی‌های برگشتی ناشی از نمونه مورد بررسی}}{\text{تعداد کلنی‌های ناشی از کنترل منفی}} \times ۱۰۰$$

به علت برگشت خود به خودی جهش موجود در اپرون سنتز هیستیدین، به منظور تعیین دقیق نقش عصاره‌ها در ایجاد جهش‌های برگشتی، درصد برگشت طبیعی نیز با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

(فرمول ۳)

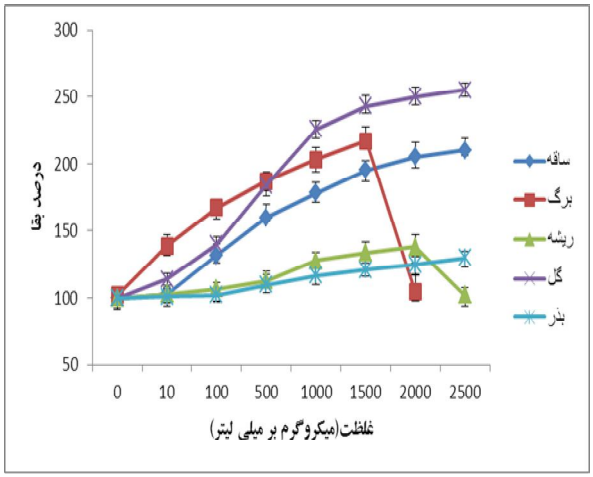
$$\text{درصد برگشت خود به خودی} = \frac{\text{تعداد کلنی‌های برگشتی ناشی از عصاره ها روی محیط حداقل}}{\text{تعداد کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط مستر}} \times ۱۰۰$$

یافته‌ها

نتایج حاصل از اثر عصاره‌های متانولی بر تکثیر لنفوسیت‌ها:

نتایج حاصل از تأثیر عصاره متانولی اندام‌های مختلف دو گونه *P.ferulacea* و *p.acaulis* در غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده است. داده های به دست آمده نشان داد که عصاره حاصل از بخش‌های مختلف این دو گونه موجب افزایش تکثیر لنفوسیت‌ها می‌شود. میزان تأثیر این عصاره‌ها به غلظت بستگی دارد، به طوری که در غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کمترین و در غلظت ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین تأثیر را بر تکثیر لنفوسیت‌ها نشان می‌دهند. مقایسه اثر بخشی عصاره بخش‌های مختلف در دو گونه مورد مطالعه نشان داد که بیشترین تأثیرگذاری در گونه *P. ferulacea* مربوط به غلظت ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره گل و کمترین تأثیر مربوط به غلظت ۱۰ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بذر می‌باشد. در خصوص اثر

بخشی عصاره بخش‌های مختلف گونه *P.acaulis* نیز نتایج مشابهی حاصل شد. در این گونه بیشترین تاثیر مربوط به غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره ریشه و کمترین تأثیر مربوط به غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰ بذر است. ترتیب اثر بخشی سایر اندام‌های گونه *P.ferulacea* به ترتیب شامل برگ، ساقه، ریشه و در گونه *P. acaulis* گل، برگ و ساقه می‌باشد. بررسی مقایسه‌ای بین دوگونه نیز حاکی از اثر بخشی بالاتر گونه *P. ferulacea* نسبت به گونه *P. acaulis* می‌باشد.



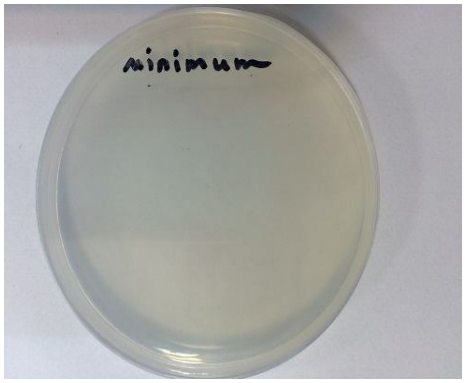
نمودار۱. اثر گذاری عصاره بخش های مختلف *P.ferulacea*

نمودار۲. اثر گذاری عصاره بخش های مختلف *P.acaulis*

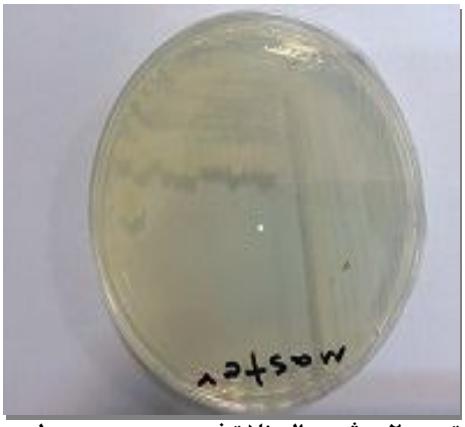
نتایج حاصل از بررسی جهش‌زایی:

نتایج آزمون‌های تأیید سویه TA98 :

نتایج حاصل از آزمون‌های تایید سویه در تصاویر ۱، ۲، ۳ و ۴ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که باکتری‌های تلقیح شده به محیط حداقل، قابلیت رشد بر روی این محیط را نداشته(تصویر ۱) و فقط در حضور هیستیدین و بیوتین توان رشد دارند(تصویر۲). در خصوص سایر جهش‌های موجود در این سویه نیز مشخص شد که باکتری‌ها به کریستال ویولت حساس هستند(تصویر۳) و در صورت قرارگیری در معرض پرتوهای UV نیز رشد نمی کنند(تصویر۴). این نتایج حاکی از تأیید دو جهش rfa و UVrB است. رشد کامل باکتری‌ها در اطراف دیسک آمپی‌سیلین نیز تأیید کننده حضور پلاسمید PKM101 در این باکتری است(تصویر۵).



تصویر۱. عدم رشد سالمونلا تیفی موریوم در محیط حداقل فاقد هیستیدین



تصویر۲ . رشد سالمونلا تیفی موریوم در محیط مستر حاوی هیستیدین

تصویر ۳. حساسیت سالمونلا تیفی موریوم نسبت به کریستال ویولت

تصویر ۴. مقاومت سالمونلا تیفی موریوم نسبت به آمپی سیلین

تصویر۵. عدم رشد سالمونلا تیفی موریوم در صورت قرار گیری در معرض UV

نتایج حاصل ازمیزان جهش‌زایی غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی:

شمارش تعداد کلنی‌های رشد یافته نشان داد که در مقادیر مساوی از سوسپانسیون باکتری، ۳۰۰ کلنی بر سطح محیط مستر، ۲۸ کلنی بر سطح محیط حداقل حاوی کنترل منفی DMSO(۱ تا ۳ درصد) و ۷۵ کلنی بر سطح محیط حداقل حاوی کنترل مثبت سدیم آزید رشد می‌نمایندکه این موضوع نشان دهنده وجود ۹/۳ درصد جهش خود به خودی در سویه مورد مطالعه است. درصد جهش برگشتی و شاخص QM مربوط به عصاره‌های دو گونه مورد مطالعه در غلظت‌های ذکر شده در جدول ۱ نشان داده شده است. بررسی شاخص QM در غلظت‌های مطالعه شده نشان داد که این شاخص با افزایش غلظت به تدریج افزایش می‌یابد، اما در هیچ کدام از غلظت‌های مورد مطالعه به مرز جهش‌زایی نمی‌رسد. لازم به ذکر است که QM در تمامی غلظت‌های مورد مطالعه عصاره بخش‌های مختلف دو گونه *P.ferulacea* و *P.acaulis* کمتر از ۱/۷ محاسبه گردید. از این رو، بر اساس تعریف‌های صورت گرفته در خصوص شاخص جهش‌زایی QM مبنی بر عدم جهش‌زایی ترکیباتی با QM کمتر از ۱/۷، عصاره‌های حاصل از بخش‌های مختلف دو گونه جاشیر مورد مطالعه هیچ گونه جهش‌زایی ندارند. بررسی مقایسه‌ای بین میانگین شاخص QM مربوط به عصاره حاصل از بخش‌های مختلف دو گونه نیز نشان داد که به طور کلی میزان جهش‌زایی حاصل از عصاره‌های گونه *P.ferulacea* کمتر از گونه *P.acaulis* است.

جدول ۱. نتایج حاصل از میزان جهش زایی غلظت های مختلف عصاره های دوگونه *P.ferulacea* و*P.acaulis* (درصد برگشت مربوط به تعداد کلنی های رشد یافته ناشی از نمونه مورد مطالعه و شاخص کمی جهش زایی (QM) معرف تعداد کلنی های برگشتی ناشی از نمونه بر تعداد کلنی های ناشی از کنترل منفی می‌باشد.)

ردیف	گونه گیاهی	منشا عصاره	تعداد کلنی‌های برگشتی در غلظت‌های بررسی شده، درصد برگشت وQM											
			۵۰۰	درصد برگشت	QM	۱۰۰۰	درصد برگشت	QM	۱۵۰۰	درصد برگشت	QM	۲۰۰۰	درصد برگشت	QM	۲۵۰۰	درصد برگشت	QM
۱	ferulacea	برگ	۳۴	۱۱	۱/۱۳±۰/۱	۳۸	۱۲/۵	۱/۲۶±۰/۱	۴۲	۱۴	۱/۴۰±۰/۰۹	۴۴	۱۴/۵	۱/۴۶±۰/۰۷	۵۰	۱۶/۵	۱/۶۶±۰/۱
۲	ferulacea	گل	۳۳	۱۱	۱/۱۰±۰/۰۸	۳۵	۱۱/۵	۱/۱۶±۰/۰۹	۳۸	۱۲/۵	۱/۲۶±۰/۰۸	۴۰	۱۳	۱/۳۳±۰/۰۹	۴۳	۱۴	۱/۴۳±۰/۰۹
۳	ferulacea	ریشه	۳۶	۱۲	۱/۲۰±۰/۰۹	۳۸	۱۲/۵	۱/۲۶±۰/۰۸	۳۸	۱۲/۵	۱/۲۶±۰/۰۹	۴۰	۱۳	۱/۳۳±۰/۰۶	۴۴	۱۴/۵	۱/۴۶±۰/۰۸
۴	ferulacea	ساقه	۳۸	۱۲/۶	۱/۲۶±۰/۱۱	۴۰	۱۳	۱/۳۳±۰/۰۹	۴۲	۱۴	۱/۴۰±۰/۰۵	۴۴	۱۴/۵	۱/۴۶±۰/۰۷	۴۶	۱۵	۱/۵۳±۰/۱
۵	ferulacea	بذر	۳۳	۱۱	۱/۱۰±۰/۱۳	۳۷	۱۲	۱/۲۳±۰/۰۹	۴۲	۱۴	۱/۴۰±۰/۰۸	۴۴	۱۴/۵	۱/۴۶±۰/۰۷	۴۸	۱۶	۱/۶۰±۰/۰۹
۶	acaualis	برگ	۳۰	۱۰	۱±۰/۱	۳۵	۱۱/۵	۱/۱۶±۰/۷	۴۰	۱۳	۱/۳۳±۰/۱	۴۲	۱۴	۱/۴۰±۰/۰۶	۴۵	۱۵	۱/۵۰±۰/۸
۷	acaualis	گل	۳۶	۱۲	۱/۲۰±۰/۰۹	۴۰	۱۳	۱/۳۳±۰/۰۸	۴۷	۱۵/۵	۱/۵۶±۰/۱	۵۰	۱۶/۵	۱/۶۶±۰/۰۹	۵۰	۱۶/۵	۱/۶۶±۰/۰۴
۸	acaualis	ریشه	۳۴	۱۱	۱/۱۳±۰/۰۸	۳۷	۱۲	۱/۲۳±۰/۱	۴۲	۱۴	۱/۴۰±۰/۰۹	۴۴	۱۴/۵	۱/۴۶±۰/۰۱	۴۷	۱۵/۵	۱/۵۶±۰/۰۷
۹	acaualis	ساقه	۳۰	۱۰	۱±۰/۰۸	۱۳۴	۱۱	۱/۱۳±۰/۰۶	۴۰	۱۳	۱/۳۳±۰/۰۹	۴۶	۱۵	۱/۵۳±۰/۰۸	۴۸	۱۶	۱/۶۰±۰/۱
۱۰	acaualis	بذر	۳۵	۱۱/۵	۱/۱۶±۰/۰۸	۳۸	۱۲/۵	۱/۲۶±۰/۸	۴۲	۱۴	۱/۴۰±۰/۰۹	۴۸	۱۶	۱/۶۰±۰/۱	۵۰	۱۶/۵	۱/۶۶±۰/۹

بحث

نتیجه این پژوهش نشان داد که عصاره تمامی بخش‌های هر دوگونه مورد بررسی موجب افزایش تکثیر لنفوسیت‌ها می‌شود و هم‌چنین فاقد اثر جهش‌زایی می‌باشد.

گسترش انواع بیماری‌های عفونی و نقص‌های اکتسابی و ارثی تأثیر گذار بر سیستم ایمنی طی سال‌های اخیر موجب شده است تا مطالعات زیادی به منظور معرفی ترکیبات جدید دارویی به ویژه با منشأ طبیعی انجام شود. در این بین سهم عمده‌ای از تحقیقات دارویی در خصوص معرفی اثر بخشی گیاهان دارویی بوده است که البته ممکن است علاوه بر اثرات مثبت دارای ترکیباتی با آثار زیان بار بر سلامتی انسان از جمله ترکیبات جهش‌زا نیز باشند. از این رو استفاده از آن‌ها مستلزم بررسی‌های دقیق داروشناختی است(۲۱).

مطالعه انجام شده ماگیش و همکاران در خصوص اثرات سمیت ژنتیکی عصاره *Boswellia serrata* که دارای کاربردهای دارویی متعددی برای بیماری‌هایی هم‌چون آرتریت و بیماری‌های التهابی و تب‌زا است، *با استفاده از سویه‌های مختلف آزمون ایمز شامل TA97,TA98,TA100,TA102* نشان داد که این گیاه دارویی فاقد پتانسیل جهش‌زایی بوده و به عنوان یک گیاه دارویی ایمن قابل استفاده است(۲۲). اما پژوهش انجام شده به وسیله پینگ و همکاران نشان داد که عصاره متانولی *Euphorbia hirta* در روش سنجش *Allium cepa* دارای اثرات جهش‌زایی قابل توجهی در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است(۲۳).

بررسی انجام شده توسط حقیقی و همکاران نشان داد که شاخص‌های ایمونولوژیکی هم‌چون تعداد گلبول‌های قرمز و سفید ولوکوسیت‌ها در ماهی‌های تغذیه شده با غذای حاوی عصاره آلئوورا نسبت به گروه کنترل تغییر محسوسی ندارد(۲۴). اما پژوهش بارت نشان داد که عصاره گیاه Echinacea purpurea می‌تواند به عنوان تحریک کننده سیستم ایمنی و افزاینده پاسخ‌های هومورال و ایمنی سلولی عمل نماید(۹).

گیاهان جاشیری از جمله گیاهان دارویی هستند که اثرات مطلوب درمانی بسیاری از آن‌ها در بررسی‌های متعدد به اثبات رسیده است. تاکنون مطالعات زیادی در خصوص اثرات مطلوب درمانی و تعیین مواد موثره موجود در دو گونه *Prangos ferulacea* و *Prangos acaulis* انجام گرفته است. وجود انواع مختلفی از متابولیت‌های ثانویه در این گیاهان سبب بروز توان بالای ضد اکسیدانی در آن‌ها شده است، به طوری که مطالعات انجام شده در این زمینه قابلیت ضد اکسیدانی *P. ferulacea* را بیشتر از ویتامین E گزارش نموده‌اند(۱۷، ۲۵). نتایج مطالعه‌ای در خصوص اثرات ضد باکتریایی انواع مختلف عصاره‌های گونه *P. ferulacea* نشان داده است که عصاره‌های آبی، هگزانی، متانولی و اتانولی این گیاه دارای خاصیت ضد باکتریایی قوی علیه باکتری‌هایی هم‌چون کلبسیلا پنومونیه، اشریشیا کولای، باسیلوس سرئوس، پروتئوس میرابیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد(۲۶). در پژوهشی مشابه که در خصوص خواص ضد باکتریایی اسانس این گیاه صورت گرفته است نتایج نشان داده است که اسانس این گیاه دارای خاصیت ضد باکتریایی علیه استافیلوکوک اپیدرمیدیس، استافیلوکوک ساپروفیتکوس، سودوموناس آئروژینوزا و به ویژه استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد(۱۹). از جمله خواص دارویی دیگر گونه *P. ferulacea* که طی بررسی‌های آزمایشگاهی ثابت شده است، قابلیت ضد ویروسی علیه ویروس HSV می‌باشد(۱۸).

مطالعه انجام شده در خصوص خواص ضد قارچی *P.ferulacea* نیز نشان داده است که عصاره ساقه این گیاه دارای قابلیت ضد قارچی مناسبی علیه قارچ‌های فیتوفتورا درچلری، ریزو کتونیا سولانی و فیتیوم افانی درماتیوم است(۲۷). در یک بررسی، ویژگی تسکین دهندگی عصاره‌های آبی و اتانولی این گونه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی حاکی از قابلیت کاهش درد القا شده با فرمالین در رت‌های آزمایشگاهی بود(۲۸). از سایر خواص دارویی این گونه که در پژوهش‌های آزمایشگاهی مورد تأیید قرار گرفته است، می‌توان به اثرات ضد انقباضی

وضد دیابتی اشاره نمود که این بررسی‌ها نشان دهنده قابلیت مناسب این گیاه در کاهش گلوکز خون و رفع انقباض موجود در عضلات صاف رحمی در موش‌های آزمایشگاهی مورد مطالعه است(۲۰، ۲۹).

بر خلاف گونه *P. ferulacea* که پژوهش‌های زیادی به منظور تأیید خواص متعدد درمانی آن صورت گرفته است، تاکنون بررسی‌های محدودی در خصوص خواص درمانی گونه *p.acaulis* انجام گرفته است و پژوهش حاضر از معدود مطالعات صورت گرفته در خصوص این گیاه دارویی می‌باشد. بیشتر بررسی‌های صورت گرفته در مورد این گیاه در زمینه فیتو شیمی و معرفی ترکیبات موجود در بخش‌های مختلف آن بوده است(۳۰).

بررسی‌های فیتو شیمیایی صورت گرفته منجر به شناسایی انواع مختلفی از متابولیت‌های گیاهی هم‌چون کومارین‌ها، فلاوونویدها، ترپنوئیدها، آلکالویدها، پینن‌ها و برخی دیگر از ترکیبات آروماتیکی با خواص متعدد دارویی از گیاهان متعلق به جنس جاشیر شده که خواص درمانی بسیاری از این ترکیبات مورد تأیید قرار گرفته است(۳۱).

بررسی‌های فیتو شیمیایی صورت گرفته در خصوص گونه *P.ferulacea* منجر به شناسایی ۳۳ ترکیب مختلف در روغن بخش‌های هوایی و ۳۹ ترکیب در روغن ضروری میوه این گیاه شده است که در این بین آلفا پینن بیشترین مقدار را تشکیل می‌دهد. بررسی ترکیبات اسانس این گیاه نیز نشان داد که ترکیبات مونو ترپنی به ویژه آلفا و بتا پینن بیش از ۶۵ درصد از اسانس ترکیبات اصلی موجود در اسانس این گیاه را تشکیل می‌دهند(۳۲).

بررسی‌های فیتوشیمیایی انجام شده بر روی گونه *P.acaulis* نیز حاکی از تجمع میزان بالایی از آلفا پینن در گل و سایر بخش‌های این گیاه است. مطالعه انجام شده در خصوص شناسایی ترکیبات موجود در روغن ضروری ساقه، برگ و گل این گیاه موجب جدا سازی و شناسایی ۱۱ ترکیب از روغن ساقه، ۱۸ ترکیب از روغن برگ و ۲۲ ترکیب از گل شده است که عمده‌ترین ترکیبات موجود در آن‌ها آلفا پینن و آلفا ترپینن می‌باشند(۳۳).

مطالعه انجام شده در خصوص خواص زیستی آلفا پینن و سایر ایزومرهای فضایی آن نشان داده است که این ترکیب دارای خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی بالایی علیه استافیلوکوکوس اورئوس و قارچ‌های کاندیدا آلبیکنز و کریپتوکوکوس نئوفورمانس است. در بررسی‌های دیگری که در خصوص خواص درمانی آلفا پینن‌ها انجام شده است، نتایج نشان می‌دهند که این ترکیبات به طور موثری از تکثیر سلول‌های تومورهای مغزی جلوگیری می‌کنند(۳۴). علاوه بر این نتیجه، تحقیقات مختلف حاکی از این است که آلفا پینن‌ها دارای خواص درمانی متعددی هم‌چون ضد اکسیدانی، ضد التهابی، ضداسترس، مسکن و تحریک کننده سیستم ایمنی می‌باشند(۳۵).

نتیجه‌گیری

با توجه به اثر بخشی مطلوب عصاره‌های دوگونه مورد بررسی بر رشد و تکثیر لنفوسیت‌ها و گزارش‌های مبنی بر تجمع مقادیر زیاد آلفا پینن و مونوترپن‌ها در این گیاهان، می‌توان نقش این ترکیبات را در اثر بخشی آن‌ها بر رشد و تکثیر لنفوسیت‌ها موثر دانست. در پایان با توجه به اثرات مثبت عصاره‌های متانولی حاصل از بخش‌های مختلف دو گونه جاشیر بررسی شده بر تکثیر لنفوسیت‌ها و عدم جهش‌زایی آن‌ها، این گیاهان می‌توانند به عنوان گیاهان دارویی ایمن در بیماران مبتلا به نقص‌های ایمنی و انواع عفونت‌های میکروبی مورد استفاده قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

بودجه پژوهشی این مطالعه با حمایت مالی دانشکده علوم و فن آوری‌های نوین دانشگاه اصفهان تأمین شده است. بدین وسیله از کلیه مسئولان این دانشکده تشکر و قدردانی به عمل می‌آید. هم‌چنین نویسندگان از آقای مهندس حسین معروفی عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی سنندج کمال تشکر و امتنان را دارند.

منابع

1. Sedigheh A, Jamal MS, Mahbubeh S, Somayeh K, Mahmoud R-k, Azadeh A, et al. Hypoglycaemic and hypolipidemic effects of pumpkin (Cucurbita pepo L.) on alloxan-induced diabetic rats. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2011; 5(23): 2620-6.
2. Shirzad H, Taji F, Rafieian-Kopaei M. Correlation between antioxidant activity of garlic extracts and WEHI-164 fibrosarcoma tumor growth in BALB/c mice. Journal of medicinal food. 2011; 14(9):969-74.
3. Shahrani M, Nabavizade F, Rafian M, Shirzad H, Hashemzade M, Yousefi H, et al. Effect of Allium Sativum extract on acid and pepsin secretion in basal condition and stimulated with Pentagastrin in rat. Arak Medical University Journal. 2007; 6(24): 28-37.
4. Moradi MT, Karimi A, Rafieian M, Kheiri S, Saedi M. The inhibitory effects of myrtle (Myrtus communis) extract on Herpes simplex virus-1 replication in Baby Hamster Kidney cells. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences. 2011; 12(4):54-61.
5. Asadi S, Zamiri A, Ezzati S, Parsaei P, Rafieian M, Shirzad H. Effect of alcoholic extract of green tea (Camellia sinensis) on the healing process in surgical and burn wounds in rats. Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2011; 18(1):1-9.
6. 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. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences. 2010; 11(4):59-65.
7. Heidarian E, Rafieian-Kopaei M. Effect of silymarin on liver phoshpatidate phosphohydrolase in hyperlipidemic rats. Biosci Res. 2012; 9(2):59-67.
8. Asadi-Samani M, Rafieian-Kopaei M, Azimi N. Gundelia: a systematic review of medicinal and molecular perspective. Pakistan journal of biological sciences: PJBS. 2013; 16(21):1238-47.
9. Feizi A, Dadian F. The effects of Echinacea purpurea dried extract on humoral immune response of broiler chicks to Newcastle vaccination. African Journal of Biotechnology. 2012; 11(94):16095-8.
10. Ghahraman A. Iran color flora. Tehran: Forest Res Institute. 1985; 845.
11. Mehregan SESI. Chemical Composition of The Essential Oil of Prangos Asperula Boiss. Subsp. Haussknechtii (BOISS.) Herrnst. Etheyn Fruits. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences. 2003; 11(2):79-81.
12. Kazerooni T, Mousavizadeh K, Abdollahee A, Sarkarian M, Sattar A. Abortifacient effect of Prangos ferulacia on pregnant rats. Contraception. 2006; 73(5):554-6.
13. Ulubelen A, Topcu G, Tan N, Ölçal S, Johansson C, Üçer M, et al. Biological activities of a Turkish medicinal plant, Prangos platychlaena. Journal of ethnopharmacology. 1995; 45(3):193-7.
14. Baser K, Ermin N, Adigüzel N, Aytac Z. Composition of the essential oil of Prangos ferulacea (L.) Lindl. Journal of Essential Oil Research. 1996; 8(3):297-8.
15. Coşkun B, Gülşen N, Umucalılar H. The nutritive value of Prangos ferulacea. Grass and Forage Science. 2004; 59(1):15-9.
16. Rechinger K, Hedge I. Ferulago. Flora Iranica, Umbelliferae. 1987(167):430-1.
17. Coruh N, Celep AS, Özgökçe 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 chemistry. 2007; 100(3):1237-42.
18. Gholamzadeh S, Behbahani M, Fattahi A, Sajjadi S, Shokoohinia Y. Antiviral evaluation of coumarins from Prangos ferulacea L.(Lindl). Research in Pharmaceutical Sciences. 2012; 7(5): S783-4.
19. Massumi M, Fazeli M, Alavi S, Ajani Y. Chemical constituents and antibacterial activity of essential oil of Prangos ferulacea (L.) Lindl. fruits. Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2007; 3(3):171-6.
20. Sadraei H, Shokoohinia Y, Sajjadi S, Ghadirian B. Antispasmodic effect of osthole and Prangos ferulacea extract on rat uterus

smooth muscle motility. Research in Pharmaceutical Sciences. 2012; 7(3):141-9.
21. Tripathi L, Tripathi JN. Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2003; 2(2): 243-53.
22. Magesh V, Raman D, Pudupalayam K. Genotoxicity studies of dry extract of Boswellia serrata. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2008; 7(4):1129-35.
23. Yuet Ping K, Darah I, Yusuf UK, Yeng C, Sasidharan S. Genotoxicity of Euphorbia hirta: An Allium cepa assay. Molecules. 2012; 17(7): 7782-91.
24. Haghighi M, Sharif Rohani M, Samadi M, Tavoli M, Eslami M, Yusefi R. Study of effects Aloe vera extract supplemented feed on hematological and immunological indices of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). International journal of Advanced Biological and Biomedical Research. 2014; 2(6):2143-54.
25. Kafash Farkhad N, Farokhi F, Togmechi A. Effects of hydro-alcoholic extract of Prangos ferulacea (L.) Lindle on histopathology of pancreas and diabetes treatment in STZ-induced diabetic rats. Avicenna Journal of Phytomedicine. 2011; 2(1):31-8.
26. Durmaz H, Sagun E, Tarakci Z, Ozgokce F. Antibacterial activities of Allium vineale, Chaerophyllum macropodum and Prangos ferulacea. African Journal of Biotechnology. 2006; 5(19): 1795-8.
27. Bahraminejad S, Maerefatzadah-Khamenah M, Abbasi S, Zare-Khafari A. In vitro screening of 27 plant species against phytopathogenic fungi. Modern Technology in Agriculture. 2010; 4(2):1-11.
28. Emamghoreishi M, Taghavi A, Javidnia K. The effect of aqueous and methanolic extracts of Prangos ferulacea on formalin-induced pain in mice. Journal of Jahrom University of Medical Sciences. 2012; 9(4):2-7.
29. Farkhad NK, Farokhi F, Tukmacki A. Hydro-alcoholic extract of the root of Prangos ferulacea (L.) Lindl can improve serum glucose and lipids in alloxan-induced diabetic rats. Avicenna Journal of Phytomedicine. 2012; 2(4):179-80.
30. Ayres D, Tamm C, Raphael R, Shamma M. Dictionary of Natural Products**.** London: Chapman & Hall; 1994.
31. Kuznetsova G, Yur'ev YN, Kuzmina L, Senchenko G, Shagova L. Essential oil composition of fruit of some species of Prangos. Rast Resur. 1973; 9:388-91.
32. AMIRI H. Essential oil variation of Prangos ferulacea Lindl. in different stage of plant growth. 2007; 23(1): 121-7.
33. Meshkatalsadat MH, Mirzaei HH. Chemical compositions of the essential oils of stems, leaves and flowers of Prangos acaulis (Dc) Bornm. Pakistan Journal of Biological Sciences. 2007; 10(16):2775-7.
34. Silva ACRd, Lopes PM, Azevedo MMBd, Costa DCM, Alviano CS, Alviano DS. Biological activities of a-pinene and β-pinene enantiomers. Molecules. 2012; 17(6):6305-16.
35. Aydin E, Türkez H, Geyikoğlu F. Antioxidative, anticancer and genotoxic properties of α-pinene on N2a neuroblastoma cells. Biologia. 2013; 68(5):1004-9.