

## 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)<sup>۱</sup>، ماندانا بهبهانی (PhD)<sup>۱\*</sup>

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 از 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 می باشد.

**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* و *Prangos crossoptera* با روش غوطه وری تهیه شده و با استفاده از PBS استریل به غلظتهای ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ و 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.

**یافته ها:** 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 می باشند. عصاره بذر و برگ در هر دو گونه 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 تعدیل گر فعالیت سیستم ایمنی به دو گروه کلی افزایش دهنده و کاهش دهنده 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 تحریک 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

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 برخوردار 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 (۵). به طوری که مطالعات آزمایشگاهی متعدد انجام شده طی سال های اخیر اثرات مطلوب درمانی همچون خواص ضد میکروبی (۶)، 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 می شود (۱۱). جنس جاشیر یکی از جنس های مهم خانواده چتریان با حدود ۳۰

این مقاله حاصل پایان نامه مختار نصرتی 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: ۰۳۱۳-۷۹۳۴۳۷۲

E-mail: ma\_behbahani@yahoo.com

**فرمول ۱:**

**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 ۱۶۰rpm و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۲ 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

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

### 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 جهش زا 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 می باشد. که از این خصوصیات برای شناسایی این سویه استفاده می شود. جهش های موجود در این سویه عبارتند از:

۱- جهش rfa که موجب حسایت به کریستال ویولت می شود. ۲- جهش UVrB که موجب عدم توانایی 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  $10^4 \times 1/5$  باکتری موسوم به نیم مک فارلند را در میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری حاوی ۱ میلی لیتر PBS حل کرده و جداگانه به محیط حداقل حاوی (آگار، گلوکز، اسید سیتریک یک آبه، پتاسیم فسفات دی بازیک، سدیم آمونیوم فسفات و منیزیم سولفات) و محیط مستر حاوی (نوتریت آگار، نمک طعام، بیوتین و هیستیدین) وارد کرده و با سواب 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 کاملاً 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 و ۲۵۰۰ 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 هر کدام 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 می دهد (۷). در این بررسی از ۱۰۰

میکرولیتر محلول ۱ میکروگرم بر میلی لیتر سدیم آزید به عنوان کنترل مثبت و غلظت های ۱-۳ 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.

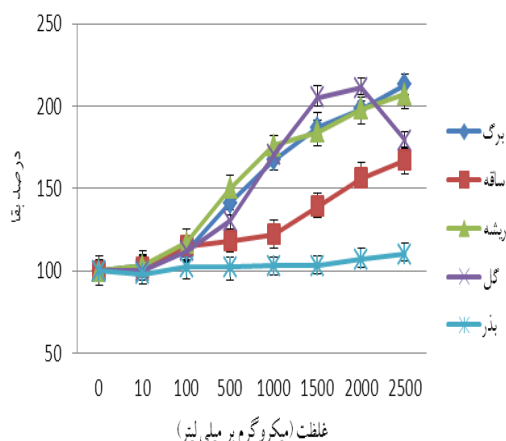
### فرمول ۲:

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

### 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 ۱۰-۱۰۰ بذر می باشد.

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 ۱۰-۱۰۰ 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 دو گونه نیز حاکی از اثر بخشی بالاتر گونه *P. uloptera* نسبت به گونه *P. crossoptera* می باشد.



**نمودار ۱. 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)**



شکل ۳. حساسیت سالمونلا تیفی موریوم نسبت به کریستال ویولت

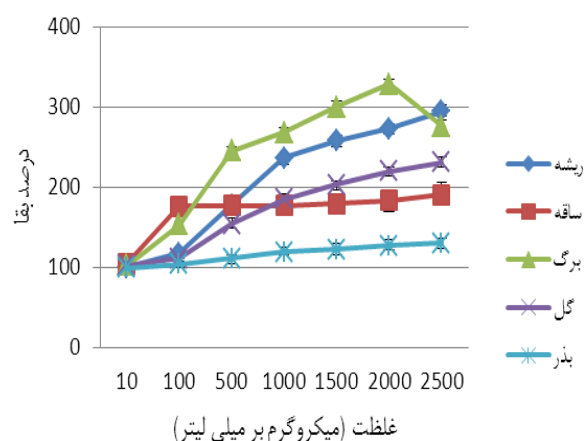


شکل ۴. مقاومت سالمونلا تیفی موریوم نسبت به آمپی سیلین



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

نتایج حاصل از میزان 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، ۲۸ کلنی بر سطح محیط حداقل حاوی کنترل منفی ۱-۳٪ 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 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 ترکیباتی با Qm کمتر از 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).



نمودار ۲. اثر گذاری عصاره بخش های مختلف گونه *P. uloptera* بر رشد و تکثیر لئفوسیت های انسانی (هریک از مقادیر نشان دهند میانگین درصد بقای لئفوسیت 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 تأیید دو جهش *UVrB* و *rfa* است. رشد کامل باکتری ها در اطراف دیسک آمپی سیلین نیز تأیید 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

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

| منشا عصاره  | گونه گیاهی | ۵۰۰       | ۱۰۰۰      | ۱۵۰۰      | ۲۰۰۰      | ۲۵۰۰      | ۳۰۰۰      |
|-------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| ulopectera  | برگ        | ۱/۲۳±۰/۰۶ | ۱/۲۵±۰/۰۳ | ۱/۲۹±۰/۰۴ | ۱/۳۵±۰/۰۴ | ۱/۳۹±۰/۰۱ | ۱/۴۴±۰/۰۹ |
|             | گل         | ۱/۳۴±۰/۰۸ | ۱/۳۶±۰/۰۶ | ۱/۳۷±۰/۰۲ | ۱/۳۹±۰/۰۴ | ۱/۴۶±۰/۰۶ | ۱/۴۸±۰/۰۱ |
|             | 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±۰/۰۱ | ۱/۲۸±۰/۰۹ | ۱/۳۵±۰/۰۶ | ۱/۳۸±۰/۰۳ |
| crossoptera | برگ        | ۱/۲۵±۰/۰۱ | ۱/۲۸±۰/۰۹ | ۱/۳۱±۰/۰۴ | ۱/۳۳±۰/۰۷ | ۱/۳۷±۰/۰۹ | ۱/۴۰±۰/۰۴ |
|             | گل         | ۱/۳۷±۰/۰۳ | ۱/۳۰±۰/۰۴ | ۱/۳۳±۰/۰۵ | ۱/۳۷±۰/۰۱ | 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 می باشند. 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 الگوی 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.ulopectera* 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 خصوصاً 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 tuberosa* 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 ۲ و  $TNF-\alpha$  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 می شود (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 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 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 می نمایند (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 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 کشندگی بر سلول های اپیتلیالی آمینوتیک انسانی است (۳۲) اما در مقابل پژوهش های بسیاری نیز نشان دهنده ایمنی بسیاری از گیاهان دارویی از حیث پتانسیل جهش زایی میباشند. مطالعه *Peperomia* و *Thepouyporn* و همکارانش نشان داد که عصاره آبی *pellucid, Colocasia esculenta Brachiararia mutica* که جزو گیاهان دارویی پرکاربرد در تایلند میباشند فاقد هر گونه اثرات جهش زایی در آزمون ایمز می باشند (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 می باشد (۳۴).

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

اسپاتونول و ژرماسرن دی می‌باشند (۴۰). در بررسی انجام شده توسط Razavi و همکاران در خصوص کومارین‌های موجود در عصاره هگزانی بخش‌های 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 کومارین‌های 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 سلول‌های 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 بخش‌های مختلف این گونه جاشیری می‌تواند موجب القای مرگ برنامه ریزی شده در سلول‌های سرطانی رده McCoy شود (۴۲). بر خلاف گونه *P. uloptera* که پژوهش‌های 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 بررسی‌های صورت گرفته در خصوص این گیاه در زمینه ویژگی‌های گیاه‌شناسی و معرفی جایگاه رویش آن می‌باشد (۲۰). بنابراین با توجه به اثر بخشی مطلوب عصاره‌های دوگونه مورد بررسی بر رشد و تکثیر لنفوسیت‌ها و تجمع مقادیر بالایی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی بویژه آلفاپینن‌ها و کومارین‌ها در آنها می‌توان این ترکیبات را در ظهور اثر بخشی این گیاهان 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 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.

بویژه در انواع مختلف عفونت‌های باکتریایی و قارچی و پراکنش وسیع در اکثر مناطق ایران بررسی اثرات درمانی و قابلیت جهش‌زایی آن‌ها حائز اهمیت می‌باشد. مطالعات انجام شده در خصوص خواص درمانی و ترکیبات موثر دارویی گونه‌های 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 متابولیت‌های ثانویه همچون انواع مختلفی از ترکیبات آلکالوئیدی، فلاونوئیدها و ترپنوئیدها در عصاره این گیاه موجب شده که ویژگی‌های ضد اکسیدانی بیشتری نسبت به ویتامین E داشته و فعالیت آنزیم گلوکاتایون-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 عصاره‌های متانولی، اتانولی، آبی و هگزانی عصاره متانولی این گیاه بیشترین خاصیت آنتی بیوتیکی را علیه باکتری‌های 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 گونه *Prangos platychaena* مشخص شد که 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 tschimganica* و *Prangos papularia* حاوی ترکیباتی جدید با قابلیت ضد اکسیدانی بالا و توان مهار اکسیداسیون چربی‌ها می‌باشند (۳۸). مطالعات فیتوشیمیایی صورت گرفته در خصوص ترکیبات موجود در بخش‌های مختلف گونه‌های جنس جاشیر 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 بخش‌های 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 بتاوسیمین، بتاکاریوفیلین، دلتا-۳-کارن، ژرماسرن دی و بتامیرسن و در حالت خشک شده شامل: بتاکاریوفیلین، آلفاپینن، کاربوفیلین 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)<sup>1</sup>, M. Behbahani (PhD)<sup>\*1</sup>

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 26<sup>th</sup> 2014, Revised: Feb 4<sup>th</sup> 2015, Accepted: May 6<sup>th</sup> 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, Niumsukul 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, 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  $\gamma$ -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: Akademische 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 *androphis 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-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 Iotecol*. 2010;4(1):37-40.
29. Punturee Kh, Kasinrer 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;24(91):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 medicine 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 *baccharis dracunculifolia* 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, Uçer M, et al. Biological activities of Turkish medicinal plant *Prangos platychlaena*. *J Ethnopharmacol*. 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 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 *Prangos uloptera*, a medicinal plant. *Biol Res*. 2009; 42: 517-522.