

In Vitro Protective Effects of Aqueous and Alcoholic Extracts of *Caryophyllus aromaticus* on Reducing H₂O₂-Induced DNA Damage in Human Mononuclear White Blood Cells

Mojtaba Kianmehr¹, Seyed Hossein Abtahi Eivary², Jafar Hajavi^{3*}

1. Professor, Department of Medical Physics, Faculty of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran. ORCID: 0000-0002-2943-7789.

2. Associate Professor, Department of Medical Sciences of Laboratory, Infectious Diseases Research Center, School of Para-Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran. ORCID: 0000-0001-5807-8933.

3. Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Infectious Diseases Research Center, Gonabad University of Medical Science, Gonabad, Iran. ORCID: 0000-0002-4257-6070. Tel: 051-57225027. E-mail: hajavi.jaf@gmail.com

ABSTRACT

Background and Aim: This study aimed to investigate the protective effects of aqueous and ethanolic extracts of *Caryophyllus aromaticus* on DNA damage in mononuclear white cells of human blood using the COMET method.

Materials and Methods: Mononuclear white blood cells were isolated from blood samples taken from 15 healthy volunteers. Cells were treated with H₂O₂ (25, 50, 100, and 200 μM), as well as with aqueous and ethanolic extracts of aerial parts of cloves (0.05, 0.1, 0.5, 1, and 2.5 mg/ml). Finally, to induce DNA damage the cells were incubated in a combination of 100 μM H₂O₂ with each of the two aqueous and alcoholic extracts at a concentration of 2.5 mg/ml at 4°C for 30 minutes. The extent of DNA migration was measured using the alkaline single cell gel electrophoresis approach assay, and DNA damage was expressed as tail length (μm), percentage of tail DNA, and tail moment (μm).

Results: DNA damage in the mononuclear white blood cells exposed to the combination of hydrogen peroxide with aqueous extract of clove plant was significantly less than that in the mononuclear white blood cells treated with H₂O₂ alone. Tail length (μm) was 5.30±1.21 versus 21.84±3.91, percentage of tail DNA (%) was 4.29±1.21 versus 16.21±4.18, and tail movement (μm) was 0.24±0.08 versus 2.35±0.72, respectively (p < 0.001).

Conclusion: The results showed that the aqueous extract of clove plant (2.5 mg/ml) can prevent oxidative DNA damage in human mononuclear white blood cells, which is probably due to the presence of antioxidant compounds in the extract.

Keywords: COMET assay, DNA damage, Oxidative stress, *Caryophyllus aromaticus*

Received: Oct 5, 2022

Accepted: Mar 6, 2023

How to cite the article: Mojtaba Kianmehr, Seyed Hossein Abtahi Eivary, Jafar Hajavi. In Vitro Protective Effects of Aqueous and Alcoholic Extracts of *Caryophyllus aromaticus* on Reducing H₂O₂-Induced DNA Damage in Human Mononuclear White Blood Cells. SJKU 2023;28(5):37-50.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

اثر محافظتی برون تنی عصاره‌های آبی و الکلی گیاه میخک بر کاهش آسیب‌های DNA ناشی از تماس با آب‌اکسیژنه در گلبول‌های سفید تک‌هسته‌ای خون انسان

مجتبی کیان مهر^۱، سید حسین ابطحی ایوری^۲، جعفر حاجوی^۳

۱. استاد، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران.

کد ارکید: ۷۷۸۹-۲۹۴۳-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۲. دانشیار، گروه علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران. کد ارکید: ۸۹۳۳-۵۸۰۷-۰۰۰۱-۰۰۰۰

۰۰۰۰

۳. استادیار، گروه میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران، کد ارکید: ۶۰۷۰-۴۲۵۷-۰۰۰۲-۰۰۰۰

تلفن ثابت: ۰۲۷ ۵۷۲۲۵۰۵۱-۰۵۱، پست الکترونیک: hajavi.jaf@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: هدف از این مطالعه بررسی اثرات محافظتی عصاره آبی و اتانولی گیاه میخک *Caryophyllus aromaticus* بر آسیب‌های DNA گلبول‌های سفید تک‌هسته‌ای خون انسان با روش کامت Comet بود.

مواد و روش‌ها: گلبول‌های سفید تک‌هسته‌ای از نمونه‌های خون گرفته شده از ۱۵ داوطلب سالم جدا شد. سلول‌ها با H_2O_2 (۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) و نیز عصاره‌های آبی و الکلی قسمت‌های هوایی گیاه میخک (۰/۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۲/۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر) تیمار شدند. نهایتاً سلول‌ها در ترکیبی از ۱۰۰ میکرومولار H_2O_2 جهت ایجاد آسیب DNA با هر یک از دو عصاره آبی و الکلی با غلظت ۲/۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر در دمای ۴ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ دقیقه، انکوبه شدند. میزان مهاجرت DNA در سلول‌ها با استفاده از روش الکتروفورز ژلی در محیط قلبیایی اندازه‌گیری گردید و آسیب DNA به صورت سه شاخص: طول دنباله، درصد DNA در دنباله و اندازه حرکت دنباله بیان شد.

یافته‌ها: آسیب DNA گلبول‌های سفید تک‌هسته‌ای که در معرض ترکیب آب اکسیژنه با عصاره آبی گیاه میخک بودند به طور قابل توجهی کمتر از گلبول‌های سفید تک‌هسته‌ای تیمار شده با H_2O_2 به تنهایی بود. طول دنباله بر حسب میکرومتر به ترتیب $5/30 \pm 1/21$ در مقابل $21/84 \pm 3/91$ ، درصد DNA در دنباله $4/29 \pm 1/21$ در مقابل $16/21 \pm 4/18$ و اندازه حرکت دنباله بر حسب میکرومتر $0/24 \pm 0/08$ در مقابل $2/35 \pm 0/72$ بود ($P < 0/001$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که عصاره آبی گیاه میخک با غلظت ۲/۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر می‌تواند از آسیب اکسیداتیو به DNA گلبول‌های سفید تک‌هسته‌ای خون انسان جلوگیری کند که احتمالاً به دلیل وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در عصاره است.

کلمات کلیدی: آزمون کامت، آسیب DNA، استرس اکسیداتیو، گیاه میخک

وصول مقاله: ۱۴۰۱/۷/۱۳ اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۱/۱۲/۷ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۵

رادیکال‌های آزاد تولید شده در بدن حیوانات نشان داده است (۱۱ و ۱۰).

عصاره گیاه میخک (Clove) با نام علمی *Caryophyllus aromaticus* به عنوان نگهدارنده و طعم دهنده به مواد غذایی افزوده می‌شود. گیاه میخک دارای ۱۵ تا ۲۰ درصد روغن، تانن، صمغ و رزین و تعدادی گلوکوزید استرول است. ترکیبات اصلی روغن میخک (۶۰ تا ۹۰ درصد) فیل پروپانوئیدها هستند که عمدتاً شامل اوژنول و کارواکرول، تیمول و سینامالدئید می‌شود. این روغن همچنین حاوی تقریباً ۱۰ درصد استیل اوژنول و مقادیر کمی اسید گالیک، سسکوی ترپن‌ها، فورفورال، وانیلین و متیل-ان-آمیل کتون است. سایر ترکیبات آن شامل فلاونوئیدها، کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، اسید اولئانولیک، رامنتین و ویتامین‌ها است. اسانس برگ نیز حاوی اوژنول، کاریوفیلن، هومولن و اوژنیل استات است (۱۲).

خواص بسیار زیادی برای گیاه میخک چه در زمینه صنایع غذایی و چه در طب سنتی برشمرده شده که از جمله آن‌ها می‌توان به خاصیت ضد سرطانی (۱۳)، ضد باکتریایی (۱۴) و پایین آورنده قند خون (۱۵) آن اشاره نمود. میخک یک ادویه با ارزش است که هم به عنوان نگهدارنده غذا و هم به دلایل درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. اسانس میخک و به خصوص جزء فعال اصلی آن، اوژنول، اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی داشته و با توجه به معطر بودن و ایجاد ایمنی، به عنوان ضد عفونی کننده ارزشمند در صنایع غذایی استفاده می‌شود. مشخص شده است که اسانس میخک دارای اثرات بازدارنده قوی بر روی انواع باکتری‌های منبع غذایی می‌باشد (۱۶). یکی از مهم‌ترین خواص گیاه میخک خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن است. مطالعات متعددی با روش‌های مختلف نشان داده اند که انواع عصاره این گیاه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی می‌باشند (۱۷ و ۱۸). یک مطالعه انجام شده درخصوص بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیش از ۳۱۰۰ نوع گیاه، نشان داد که گیاه

عوامل مختلف شیمیایی و فیزیکی از جمله عوامل ژنوتوکسیک موجود در محیط زندگی و کار، سبب ایجاد انواع آسیب DNA از جمله شکستگی در تک رشته و دو رشته DNA می‌شوند و در صورتی که سلول‌ها قادر به تعمیر آن‌ها نباشند، منجر به انواع موتاسیون در ژن‌ها می‌گردد که این موتاسیون‌ها باعث بیماری‌های مختلف از جمله سرطان‌ها می‌شوند (۲ و ۱). مواد سرطان‌زا، شیمیایی یا فیزیکی، توانایی ایجاد آسیب DNA را از طریق مکانیسم‌های مختلف دارند (۳). رادیکال‌های آزاد ایجاد شده توسط عوامل مختلف ژنوتوکسیک، سبب جلوگیری از عملکرد درست سلول‌ها یا حتی باعث مرگ آن‌ها می‌شوند (۴). یکی از حساس‌ترین و بهترین روش‌های سنجش آسیب‌های ایجاد شده در DNA توسط رادیکال‌های آزاد، آزمون کامت (Comet Assay) است. این آزمون در عین سادگی یکی از پرکاربردترین روش‌های بررسی قرارگیری سلول‌ها در معرض عوامل ژنوتوکسیک است. روش کامت یک روش حساس و قابل اعتماد برای تعیین آسیب DNA است که در انواع سلول‌های یوکاریوتی قابل استفاده است. این روش برای بررسی اثرات مواد ژنوتوکسین محیط زندگی و کار، میزان تعمیر و سینتیک تعمیر DNA آسیب دیده در اثر عوامل مختلف به کار می‌رود (۵-۷).

آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که مانع از تخریب سلول‌ها توسط رادیکال‌های آزاد می‌شوند؛ بنابراین مانع بروز انواع سرطان و بیماری‌های قلبی و عروقی می‌شوند (۹ و ۸). آنتی‌اکسیدان‌ها به دو دسته عمده سنتزی و طبیعی تقسیم می‌شوند (۸). با توجه به مشکلات و خطرات ناشی از استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی برای سلامت انسان، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های استخراج شده از منابع طبیعی، توجه محققین را به خود جلب کرده است (۱۰). یکی از بهترین منابع آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، ترکیبات فنلی موجود در نمونه‌های گیاهی و مواد مشتق شده از گیاهان است که برخی تحقیقات انجام شده نقش این ترکیبات را در کنترل

میخک در بین این گیاهان دارویی، بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی را داشته است (۱۹). در مطالعات قبلی میزان آنتی‌اکسیدان در عصاره‌های مختلف میخک با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی تعیین شده است؛ ولی تاکنون تأثیر این عصاره‌ها بر تعمیر آسیب‌های DNA با روش کامت انجام نشده است. با توجه به تفاوت اثر آکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها در گونه‌های مختلف جانوری و نیز حتی در بافت‌های مختلف یک گونه، این مطالعه به منظور تعیین میزان قدرت آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره‌های آبی و الکلی گیاه میخک و تأثیر حفاظتی برون تنی آن‌ها بر کاهش ژنوتوکسیسیتی ناشی از آب اکسیژنه در گلبول‌های سفید تک هسته‌ای خون انسان با استفاده از روش کامت انجام شد.

مواد و روش‌ها

۱- مواد

آگاروز با نقطه ذوب پایین از شرکت Fermentas کانادا، فسفات بافر سالین و دی سدیم اتیلن دی آمین تترا استیک اسید از شرکت Sigma، تریس بازی از شرکت Roche آلمان، فایکول از سازمان انتقال خون ایران و بقیه مواد با درجه کاربرد آزمایشگاهی از شرکت Merck آلمان خریداری گردیده است.

۲- روش‌ها

۲-۱- انتخاب افراد و خونگیری

این مطالعه از نوع تجربی آزمایشگاهی است. جامعه مورد مطالعه گلبول‌های سفید تک هسته‌ای خون متعلق به افرادی بود که دارای معیارهای ورود به مطالعه بودند. معیارهای ورود افراد به مطالعه عبارت بودند از: جهت شرکت در پژوهش رضایت داشته باشد، از لحاظ معاینه پزشکی سالم باشد، استعمال دخانیات و الکل نداشته باشد، سابقه بیماری ژنتیکی مشخصی که منجر به آسیب DNA می‌شود نداشته باشد و رژیم غذایی صرفاً گیاهی یا صرفاً حیوانی نداشته باشد. حجم نمونه با استفاده از مقدار آسیب DNA از

داده‌های رفرنس (۲۰) طبق فرمول مقایسه میانگین‌های دو گروه مستقل با ضریب اطمینان ۹۵ درصد و توان آزمون ۸۰ درصد محاسبه گردید که در این تحقیق برای هر گروه ۱۳/۳ نفر به دست آمد که با در نظر گرفتن ۱۰ درصد افت احتمالی نمونه، حجم هر گروه ۱۵ نفر تعیین شد. از روش تصادفی ساده برای نمونه‌گیری افراد استفاده گردید. پس از انتخاب نمونه‌ها فرم رضایت جهت شرکت در پژوهش و نیز فرم مشخصات دموگرافیک نمونه‌هایی که دارای ملاک‌های ورود به مطالعه بودند، تکمیل گردید. جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای با کمی تغییرات انجام شد. ابتدا با سرنگ ۵ میلی‌لیتری مقدار ۴ میلی‌لیتر از خون افراد انتخاب شده گرفته شد و سپس جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون بر روی فایکول انجام گردید. در هر لوله آزمایش ۲ میلی‌لیتر فایکول و ۴ میلی‌لیتر خون ریخته شد. سپس لوله‌ها در داخل سانتریفیوژ یخچال دار قرار داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در ۸۰۰ g و دمای ۲۰ درجه سلیسیوس سانتریفیوژ گردید. لوله حاوی مایع سانتریفیوژ شده دارای چهار ناحیه قابل تشخیص است که منطقه حلقه‌ای سفید رنگ که بین پلاسما و فایکول قرار دارد، ناحیه تجمع سلول‌های تک هسته‌ای محیطی است. با استفاده از میکروپیت ناحیه حلقه سفید رنگ به آرامی در یک ویال ۱/۵ میلی‌لیتر جمع‌آوری نموده و با ۵۰۰ میکرو لیتر محلول PBS مورد شستشو قرار داده شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۵۰g در دمای ۲۰ درجه سلیسیوس سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ، مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب به دست آمده ۴۰۰ میکرو لیتر (PBS Phosphate-Buffered Saline) اضافه گردید (۲۱-۲۴).

در یک ویال تمیز مقدار ۱۰ میکرو لیتر از محلول یک دهم در صد متیل گرین با ۱۰ میکرو لیتر از محلول حاوی سلول به آرامی مخلوط گردید. برای شمارش و مشاهده سلول‌ها از لام نئوبار و میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ استفاده گردید. برای تعیین درصد سلول‌های زنده از رنگ اختصاصی تریپان بلو استفاده شد و نسبت سلول‌های زنده به

۴-۲- اندازه گیری ترکیبات فنلی:

مقدار کل ترکیبات فنلی در عصاره‌ها به وسیله روش رنگ سنجی و با استفاده از روش فولین سیوکالتو (Folin-Ciocalteu) اندازه گیری شد [۲۷]. برای انجام آزمایش ۸۰ میکرولیتر عصاره با ۴۰۰ میکرولیتر محلول ۱۰ درصد فولین سیوکالتو مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده شد. به مخلوط فوق ۳۲۰ میکرولیتر سدیم کربنات ۷/۵ درصد افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سلیسیوس انکوبه گردید. در انتها جذب لوله‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد. برای تعیین مقدار کل ترکیبات فنلی عصاره، از منحنی استاندارد که با استفاده از غلظت‌های مختلف گالیک اسید به دست آمده است، استفاده گردید.

۵-۲- آزمایش 2,2-Diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH)

DPPH یک روش بسیار معتبر، دقیق، آسان، مقرون به صرفه و با قابلیت تکرارپذیری بالاست که برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها استفاده می‌شود [۲۷]. برای انجام آزمایش ۳۰ میکرولیتر از عصاره + ۹۰۰ میکرولیتر از معرف مخلوط گردید و پس از ۳۰ دقیقه جذب آن در ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. برای محاسبه فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره با روش DPPH، از شاخص IC₅₀ استفاده شد. منظور از این شاخص غلظتی از عصاره است که قادر باشد ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH را احیا کند. برای به دست آوردن IC₅₀ از نموداری استفاده می‌شود که در محور افقی غلظت‌های مختلف عصاره قرار گرفته و در محور عمودی درصد مهار وارد می‌شود. برای پیدا کردن درصد مهار از فرمول زیر استفاده می‌شود که در آن Ac جذب شاهد، As جذب نمونه، و A% درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد است.

$$\frac{(Ac - As)}{Ac} \times 100 = A\%$$

۶-۲- آزمایش Ferric Reducing Activity (FRAP) of Plasma

مردم مشخص گردید. درصد سلول‌های زنده طبق رابطه ($n/V = 100 \times N_t$) محاسبه گردید که n تعداد سلول‌های زنده و N_t تعداد کل سلول‌ها است و درصد بقای سلول‌ها بیش از ۹۵ درصد به دست آمد (۲۵).

سپس از گلبول‌های سفید تک هسته‌ای هر یک از افراد به طور تصادفی به هر یک از ۷ گروه تجربی مورد مطالعه افزوده شد. گروه‌های مورد مطالعه عبارت بودند از: گروه کنترل (بدون هیچ مداخله‌ای) تا میزان آسیب موجود در DNA گلبول‌های سفید تک هسته‌ای افراد مشخص شود، گروه عصاره آبی گیاه میخک، گروه عصاره الکلی گیاه میخک، گروه آب اکسیژنه جهت ایجاد آسیب DNA، گروه آب اکسیژنه + عصاره آبی گیاه میخک، گروه آب اکسیژنه + عصاره الکلی گیاه میخک و گروه آب اکسیژنه + ویتامین C (به عنوان یک آنتی‌اکسیدان سنتزی).

۲-۲- تهیه عصاره میخک

گیاه میخک مورد استفاده در این مطالعه از یک داروخانه گیاهی در شهرستان گناباد خریداری شد و توسط متخصصین گیاه شناسی دانشگاه آموزش عالی گناباد مورد تایید قرار گرفت. عصاره آبی و الکلی گیاه با استفاده از روش ماسریزاسیون (خیساندن) و سپس تبخیر حلال در دمای ۴۰ درجه سلیسیوس در بن ماری تهیه شد. سپس با استفاده از آب مقطر از پودرهای خشک شده، محلول‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر از هر یک از عصاره‌های آبی و اتانولی تهیه شد.

۳-۲- اندازه گیری فلاونوئیدها:

برای اندازه گیری فلاونوئیدها از روش Chang و همکاران استفاده شد (۲۶). در این آزمایش ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از عصاره‌ها، با ۹۰۰ میکرولیتر محلول واکنش (300 μl methanol, 20 μl AlCl₃ 10%, 20 μl KCH₃COO 1M, 560 μl DW) مخلوط و سپس جذب آن در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت گردید. برای رسم منحنی استاندارد از رقت‌های سریالی غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر کوئرستین در متانول استفاده شد.

لام ها در یخچال قرار گرفت. برای هر نفر ۴ لام مجزا برای هر یک از گروه‌ها تهیه شد.

پس از جامد شدن ژل و خارج کردن لام ها از یخچال، لامل ها برداشته شده و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آگاروز با نقطه ذوب پایین ۰/۵ درصد بر روی دو لایه قبلی اضافه گردید و لامل روی آن قرار گرفت و بدین ترتیب سلول ها در وسط لایه های آگاروز ساندویچ گردید تا در طی مراحل بعدی از ژل خارج نگردد. مجدد لام ها در یخچال قرار گرفت. پس از جامد شدن لایه ژل آخر لامل ها برداشته شد و لام ها به صورت افقی در یک ظرف مناسب قرار داده شدند. مقدار لازم از محلول لیز کننده NaCl 2.5 M، Tris base 10 mM، Dimethyl (DMSO)، Na₂ EDTA 0.1 M، 10% sulfoxide و Triton X-100 بر روی لام ها ریخته شد، به طوری که ژل ها به طور کامل در زیر محلول قرار گیرند و این مجموعه به مدت یک ساعت در داخل یخچال قرار داده شد. پس از اتمام مرحله لیز، لام ها از داخل محلول لیز کننده بیرون آورده شد و با محلول الکتروفورز Na₂ EDTA 1 mM و NaOH 300 mM شستشو داده شد.

پس از آن بلافاصله لام ها در تانک الکتروفورز افقی قرار داده شد و داخل تانک پر از محلول الکتروفورز با دمای ۴ درجه سلسیوس گردید و تانک در یخچال قرار داده شد. لام ها به مدت ۲۰ دقیقه در این وضعیت قرار گرفت تا دو رشته DNA از هم باز شوند. پس از پایان مرحله تیمار قلیایی، مرحله الکتروفورز آغاز شد. در این مرحله ولتاژ منبع تغذیه بر روی ۲۰ ولت (۰/۶۵ V/cm و طول ظرف ۳۰ سانتی متر) تنظیم گردید. با کم و زیاد نمودن حجم محلول الکتروفورز موجود در تانک، شدت جریان الکتریکی بر روی ۲۳۰ میلی آمپر تنظیم گردید. طول مدت الکتروفورز ۲۰ دقیقه و دمای محلول الکتروفورز ۴ درجه سلسیوس بود. تمام مراحل آزمون کامت در تاریکی انجام شد. در مرحله بعد لام ها ۳ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه با محلول تریس خنثی ساز شستشو داده شدند. پس از خنثی سازی، لام ها به مدت ۵

در این آزمون قدرت آنتی اکسیدانی ترکیبات احیا کننده با استفاده از احیای یون فریک (Fe⁺³) به یون فرو (Fe⁺²) سنجیده می شود. در این آزمون معرف 2,4,6-tri-2-pyridinyl-1,3,5-triazine (TPTZ) است. هرچه احیای یون فریک بیشتر باشد، شدت رنگ آبی حاصله از واکنش یون فرو با TPTZ؛ بیشتر است که در طول موج ۵۹۵ نانومتر جذب دارد. مواد مورد نیاز عبارت‌اند از بافر استات ۰/۳ مولار با pH=۳، معرف TPTZ (۲۳/۴ میلی گرم حل شده در ۷/۵ میلی لیتر اسید کلریدریک ۴۰ میلی مولار) و محلول ۲۰ میلی مولار کلرید آهن III که با نسبت ۱۰-۱-۱ مخلوط و در جای تاریک نگهداری می شود. از محلول ۲ میلی مولار سولفات آهن II جهت تهیه نمودار استاندارد استفاده شد. ۲۵ میکرولیتر از هر یک از نمونه ها و نیز محلول استاندارد با ۷۵۰ میکرولیتر از معرف و ۷۵ میکرولیتر آب مقطر با هم مخلوط نموده و پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، جذب نمونه ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت گردید.

۷-۲-آزمون کامت قلیایی:

برای انجام آزمون کامت قلیایی (۲۸)، ابتدا با سرنگ ۵ میلی لیتری مقدار ۴ میلی لیتر از خون هر یک از افراد انتخاب شده گرفته شد و سپس جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون بر روی فایکول انجام گردید. برای تعیین درصد سلول‌های زنده از رنگ اختصاصی تریپان بلو استفاده شد که درصد بقای سلول‌ها بیش از ۹۵ درصد تعیین شد. پس از آماده کردن سوسپانسیون سلولی، برای هر لام مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آگاروز با نقطه ذوب پایین یک درصد به ۱۰۰ میکرولیتر از سلول ها اضافه شد و این مخلوط با پیتاژ سریع و مکرر آگاروز توسط سمپلر با نوک بریده شده به طور کامل مخلوط شد. با استفاده از همان سر سمپلر مقدار ۲۰۰ میکرولیتر مخلوط تهیه شده برداشته شد و بر روی لام هایی که از قبل با یک لایه آگاروز معمولی پوشانده شده بود، قرار داده شد و با یک لامل ۱۸×۳۶ میلی متر پوشانده شد و

جهت توصیف داده ها از جداول و نمودارها استفاده گردید و برای تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات جمع آوری شده، چون آسیب DNA متغیر کمی بوده و در هفت گروه مختلف مقایسه گردید، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد و جهت مقایسه میانگین مقدار آسیب DNA بین گروه‌های مختلف از تست تعقیبی توکی استفاده گردید. سطح معنی داری کوچک‌تر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، نتایج حاصل از ارزیابی آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف به دست آمده از میخک، مقدار ترکیبات فنلی در عصاره خشک میخک در اتانول ۵۰٪، بیشتر بود و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن نیز بالاتر بود.

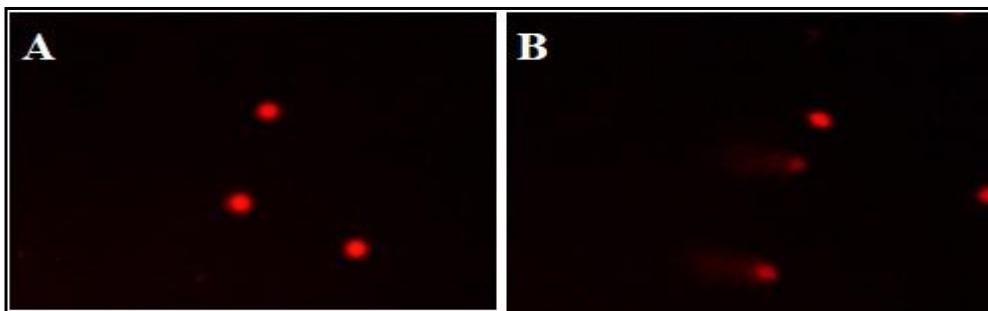
دقیقه در متانول قرار دادند تا فیکس گردند و سپس در معرض هوا قرار گرفتند تا خشک شوند. رنگ آمیزی توسط اتیدیوم برمایید با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر انجام گرفت و پس از ۱۰ دقیقه لام‌ها شسته شده و در تاریکی قرار گرفتند. برای مشاهده کامت‌ها از میکروسکوپ نیکون i۵۰ با محدوده طول موج ۵۴۶-۵۱۶ نانومتر و همچنین فیلتر Barrier با طول موج ۵۹۰ نانومتر و با بزرگ‌نمایی ۲۰۰ برابر استفاده گردید. برای هر نمونه ۴ اسلاید آماده گردید و از هر اسلاید با دوربین بالای میکروسکوپ متصل به کامپیوتر ۲۵ عکس تهیه و ذخیره گردید. ارزیابی نتایج با استفاده از نرم افزار comet score v۱/۵ انجام گرفت. آسیب‌های DNA با بررسی نمودن ۱۰۰ سلول در هر یک از شرایط آزمایشی در هر نمونه به وسیله نرم افزار محاسبه گردید.

۸-۲- تجزیه و تحلیل و استنتاج:

جدول ۱: نتایج حاصل از ارزیابی آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف به دست آمده از گیاه میخک

نام عصاره	مقدار ترکیبات فنلی در عصاره خشک (g)	مقدار ترکیبات فلاونوئیدی در عصاره خشک (g)	فعالیت FRAP (میکرومول) در عصاره خشک (g)	آزمایش DPPH: IC ₅₀ عصاره خشک (mg/ml)
آبی	۸/۳۷۴	۱/۶۵۴۳	۵۵۸/۷۳	۶/۰۸۹
اتانول ۵۰٪	۱۸/۳۶۶	۲/۳۵۷۳	۷۶۶/۹۹	۶/۳۵۶

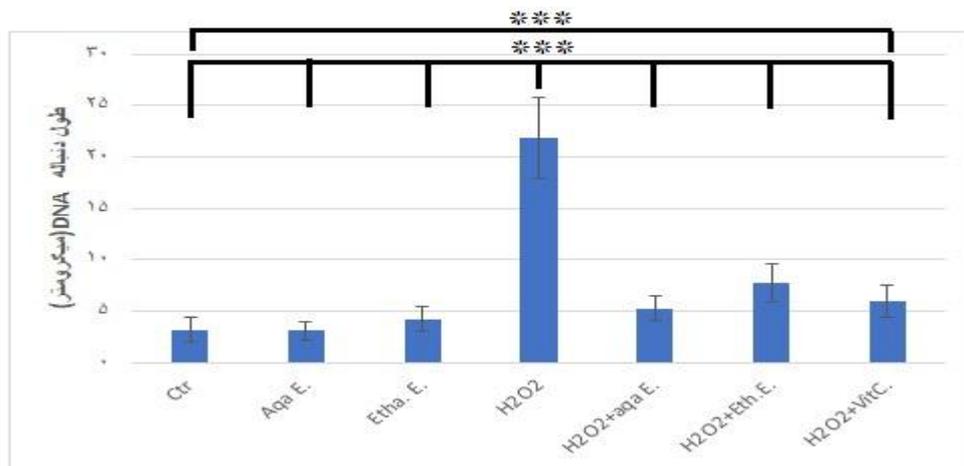
شکل ۱، نشان دهنده تصاویر میکروسکوپ فلوسنت در یکی از کامت‌های گروه در معرض آب اکسیژنه در مقایسه با گروه کنترل است که میزان آسیب بیشتر را در گروه در معرض آب اکسیژنه نشان می‌دهد.



شکل ۱: نمونه کامت‌های گلبول‌های سفید تک هسته‌ای خون محیطی. A: یکی از افراد گروه کنترل، B: یکی از افراد گروه H₂O₂.

در معرض آب اکسیژنه + عصاره الکی وجود داشت ($p < 0/001$). میانگین طول دنباله DNA، در گروه قرار گرفته در معرض عصاره آبی، کمتر از عصاره الکی بود. (شکل ۲).

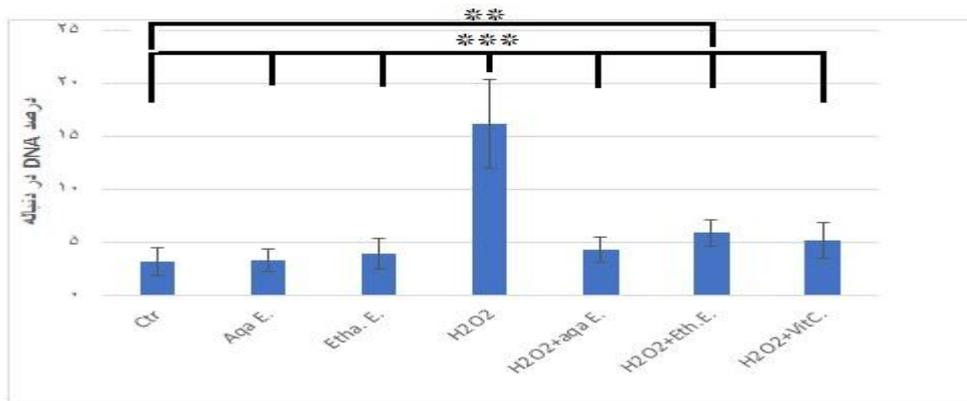
با استفاده از آزمون تعقیبی توکی مشخص گردید اختلاف معنی داری بین گروه در معرض آب اکسیژنه با تمامی گروه ها از نظر میانگین طول دنباله DNA وجود داشت ($p < 0/001$). همچنین اختلاف معنی داری بین گروه کنترل با گروه



شکل ۲: مقایسه میانگین طول دنباله DNA (میکرومتر) در کامت گلبول‌های سفید تک هسته‌ای خون در گروه‌های مورد تحقیق. * $p < 0/05$ ، ** $p < 0/01$ ، *** $p < 0/001$. ۱: گروه Ctr (کنترل بدون هیچ مداخله‌ای)، ۲: گروه Aqa E (عصاره آبی گیاه میخک)، ۳: گروه Etha. E (عصاره الکی گیاه میخک)، ۴: گروه H₂O₂ (آب اکسیژنه)، ۵: گروه H₂O₂+aqa E (آب اکسیژنه + عصاره آبی گیاه میخک)، ۶: گروه H₂O₂+Eth. E (آب اکسیژنه + عصاره الکی گیاه میخک)، ۷: گروه H₂O₂+VitC (آب اکسیژنه + ویتامین C).

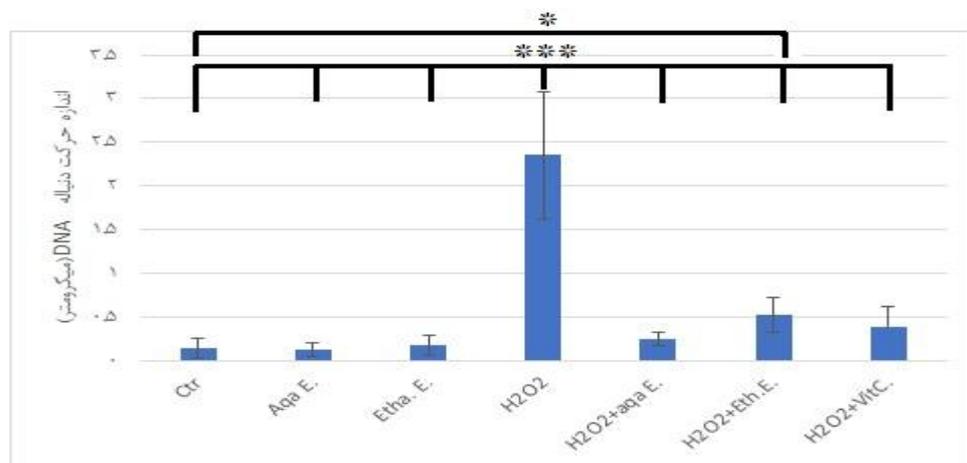
با گروه در معرض آب اکسیژنه + عصاره الکی وجود داشت ($P = 0/006$). میانگین درصد DNA در دنباله، در گروه قرار گرفته در معرض عصاره آبی، کمتر از عصاره الکی بود. (شکل ۳).

با استفاده از آزمون تعقیبی توکی مشخص گردید اختلاف معنی داری بین گروه در معرض آب اکسیژنه با تمامی گروه ها از نظر میانگین درصد DNA در دنباله وجود داشت ($P < 0/001$). همچنین اختلاف معنی داری بین گروه کنترل



شکل ۳: مقایسه میانگین درصد DNA در دنباله کامت گلبول های سفید تک هسته ای خون در گروه های مورد تحقیق. * $p < 0/05$; ** $p < 0/01$; *** $p < 0/001$. ۱: گروه Ctr (کنترل بدون هیچ مداخله‌ای)، ۲: گروه Aqa E (عصاره آبی گیاه میخک)، ۳: گروه Etha. E (عصاره الکلی گیاه میخک)، ۴: گروه H₂O₂ (آب اکسیژنه)، ۵: گروه H₂O₂ + aqa E (آب اکسیژنه + عصاره آبی گیاه میخک)، ۶: گروه H₂O₂ + Eth. E (آب اکسیژنه + عصاره الکلی گیاه میخک)، ۷: گروه H₂O₂ + VitC (آب اکسیژنه + ویتامین C).

با استفاده از آزمون تعقیبی توکی مشخص گردید اختلاف معنی داری بین گروه در معرض آب اکسیژنه با تمامی گروه ها از نظر میانگین اندازه حرکت دنباله DNA وجود داشت ($P < 0/001$). همچنین اختلاف معنی داری بین گروه کنترل با گروه در معرض آب اکسیژنه + عصاره الکلی وجود داشت ($P = 0/021$). میانگین اندازه حرکت دنباله DNA، در گروه قرار گرفته در معرض عصاره آبی، کمتر از عصاره الکلی بود (شکل ۴).



شکل ۴: مقایسه میانگین اندازه حرکت دنباله DNA بر حسب میکرومتر در کامت گلبول های سفید تک هسته ای خون در گروه های مورد تحقیق. * $p < 0/05$; ** $p < 0/01$; *** $p < 0/001$. ۱: گروه Ctr (کنترل بدون هیچ مداخله‌ای)، ۲: گروه Aqa E (عصاره آبی گیاه میخک)، ۳: گروه Etha. E (عصاره الکلی گیاه میخک)، ۴: گروه H₂O₂ (آب اکسیژنه)، ۵: گروه H₂O₂ + aqa E (آب اکسیژنه + عصاره آبی گیاه میخک)، ۶: گروه H₂O₂ + Eth. E (آب اکسیژنه + عصاره الکلی گیاه میخک)، ۷: گروه H₂O₂ + VitC (آب اکسیژنه + ویتامین C).

بحث

در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی روی اثر ضد رادیکالی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی انجام شده است. در مطالعه ما اثرات آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه میخک با استفاده از کاهش ظرفیت رادیکالی به کمک DPPH مورد ارزیابی قرار گرفت. در این ارتباط عصاره‌های آبی و اتانولی میخک به ترتیب IC_{50} برابر $6/089$ میکروگرم بر میلی لیتر و $6/356$ میکروگرم بر میلی لیتر را نشان دادند. همان طور که مشاهده می‌شود قدرت مهار رادیکال‌های آزاد در عصاره‌های آبی بسیار نزدیک به آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT است.

در مطالعه تیروگانا و همکاران مشخص گردید که فنول‌های موجود در گیاهان می‌توانند از اثر سرطان‌زایی ناشی از رادیکال‌های آزاد جلوگیری کنند و اثر بازدارنده بر روی آسیب DNA دارند که همسو با مطالعه ما بود (۲۹).

مطالعه ماتا و همکاران بر روی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آبی، اتانولی و اسانس گیاهان نعناع و پونه، نشان داد که IC_{50} به دست آمده از DPPH، در مورد نعناع برای عصاره آبی $7/5$ میکروگرم بر میلی لیتر و برای عصاره اتانولی $2/65$ میکروگرم بر میلی لیتر و در مورد پونه برای عصاره آبی و اتانولی به ترتیب $9/8$ میکروگرم بر میلی لیتر و $9/24$ میکروگرم بر میلی لیتر بود. مطالعه ما نشان از بالاتر بودن فعالیت ضد رادیکالی عصاره‌های آبی و اتانولی میخک در مقایسه با پونه بود؛ اما در مقایسه با نعناع فعالیت عصاره آبی، بیشتر ولی عصاره الکلی، کمتر بود (۳۰).

مطالعه نبوی و همکاران روی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی چهار گونه گیاهی زولنگ، چوچاخ، تلکا و خرمنندی نشان داد که فعالیت ضد رادیکالی به وسیله آزمایش DPPH، به ترتیب IC_{50} گیاهان زولنگ، چوچاخ، تلکا و خرمنندی 420 ، 270 ، 3000 و 1450 میکروگرم بر میلی لیتر بود؛ لذا به خوبی دیده می‌شود که فعالیت ضد رادیکالی عصاره الکلی در تحقیق ما بسیار بیشتر از این عصاره‌ها بوده است (۳۱).

در این تحقیق دیده می‌شود که نتایج به دست آمده از آزمایش بتاکاروتن لینولئیک اسید به خوبی با نتایج آزمایش DPPH مطابقت دارد و اثر مهاری و آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی فعالیت بهتری را از خود نشان می‌دهد. در مطالعه گلوس و همکاران، اثر مهاری عصاره متانولی و اسانس پونه به ترتیب 24 و 36 درصد بود که در مقایسه با BHT (۹۶ درصد) دارای قدرت آنتی‌اکسیدانی بسیار پایینی بودند (۳۲). در مطالعه ما بر خلاف مطالعه گلوس و همکاران، عصاره‌ها دارای اثر مهاری خوبی بودند و نتایج آزمایش DPPH و بتاکاروتن لینولئیک اسید با یکدیگر همخوانی داشتند.

در مطالعه میراندا و همکاران مشخص شد که گیاه چای ماته اثرات محافظتی روی آسیب DNA ناشی از H_2O_2 دارد و سبب تعمیر DNA در موش می‌شود (۳۳). در مطالعه انجام شده توسط شنگ و همکاران، افزایش قدرت ترمیم آسیب DNA گلبول‌های سفید انسان توسط عصاره آبی پنجه‌گره نشان داده شده است (۳۴). در مطالعه ما همسو با مطالعات میراندا و شنگ، گیاه میخک اثرات محافظتی روی DNA ناشی از H_2O_2 داشت.

مطالعه سرپلونی و همکاران بر روی عصاره گونه توت و مطالعه Li و همکاران بر روی عصاره گیاه آرابیدوپسیس تالیانا، اثر محافظتی آن‌ها را بر روی آسیب DNA، با استفاده از روش comet نشان می‌دهد که با مطالعه ما همسو است (۳۵ و ۳۶).

در مطالعه بنگ و همکاران مشخص شد که عصاره آبی گیاه گراسیلاریا نقش محافظتی علیه آسیب DNA ناشی از آب اکسیژنه در سلول‌های H_{1290} دارد. درصد DNA در دنباله در گروه کنترل 12 درصد بود که در گروه H_2O_2 به حدود 70 درصد افزایش یافت. عصاره این گیاه با غلظت 2 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، آسیب DNA را به طور معنی‌داری به 35 درصد کاهش داد (۲۰). در مطالعه ما هم درصد DNA در دنباله در گروه H_2O_2 برابر $16/21$ بود که به خاطر اثرات حفاظتی عصاره‌های آبی و الکلی میخک به ترتیب به $4/29$ و $5/87$ به طور معنی‌داری کاهش یافت.

در تمام مطالعات انجام شده آسیب DNA در سلول های مختلف مورد تحقیق در حضور H_2O_2 به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است که با مطالعه ما همخوانی دارد. عصاره آبی نیز در همه این پژوهش ها مانند مطالعه ما سبب کاهش معنی داری در آسیب DNA شده است. همچنین در مطالعه ما میزان آسیب DNA در مردان نسبت به زنان در تمام گروه ها اندکی بیشتر بود، هر چند که اختلاف معنی داری بین آن ها وجود نداشت. مطالعه انجام شده در بین افراد سالم در افراد هندی نیز نشان داده که میزان آسیب DNA در افراد سالم زن و مرد با هم متفاوت است و این آسیب در مردان کمی بیشتر از زنان است (۴۰).

نتیجه گیری

نتایج نشان می دهد که عصاره آبی گیاه میخک می تواند با غلظت ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر، از آسیب اکسیداتیو به DNA گلوبول های سفید تک هسته ای خون انسان جلوگیری کند که احتمالاً به دلیل وجود ترکیبات آنتی اکسیدانی در عصاره گیاه است.

تشکر و قدردانی

محققین از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی گناباد به دلیل حمایت مالی و مساعدت و همکاری در انجام این طرح پژوهشی (کد طرح ۴۱۴ / ۱ پ)، تشکر می نمایند. همچنین از افراد نمونه های مورد پژوهش که در این تحقیق شرکت کردند، قدردانی می گردد. هیچ کدام از نویسندگان این مطالعه، افراد و یا دستگاه ها تعارض منافی برای انتشار این مقاله ندارند.

مطالعه سلطانی و همکاران بر روی گیاه آمبلی پرنین بر روی لنفوسیت ها نشان داد که میزان درصد DNA در دم در گروه کنترل، گروه H_2O_2 به تنهایی با غلظت ۲۵ میلی مولار و گروه H_2O_2 با گیاه آمبلی پرنین، به ترتیب ۳/۷۵، ۶۷/۲۸ و ۳۹/۱۷ است که نشان دهنده تأثیر گیاه در کاهش میزان آسیب DNA است (۳۷). مطالعه ما مشابه با مطالعه سلطانی نشان داد که میزان درصد DNA در دم در گروه کنترل، گروه H_2O_2 به تنهایی، گروه در معرض آب اکسیژنه + عصاره آبی میخک و گروه در معرض آب اکسیژنه + عصاره الکلی میخک به ترتیب، ۳/۱۳، ۱۶/۲۱، ۴/۲۹ و ۵/۸۷ می باشد، که نشان دهنده اثرات ترمیمی عصاره آبی و الکلی گیاه میخک در کاهش آسیب های ناشی از H_2O_2 است.

مطالعه ینگ و همکاران نیز مشابه با مطالعه ما تأثیر عصاره آبی برگ گیاه یوکومویا را بر روی گلوبول های سفید تک هسته ای انسانی که تحت تأثیر استرس اکسیداتیو ناشی از H_2O_2 قرار گرفته بودند نشان داد. به طوری که میزان آسیب DNA در گروه عصاره آبی برگ گیاه در مقایسه با گروه H_2O_2 به تنهایی، از ۱۹۸ میکرومتر به ۱۲۳ میکرومتر کاهش یافت (۳۸).

در مطالعه بهروان و همکاران، آسیب DNA ناشی از H_2O_2 در گلوبول های سفید تک هسته ای انسانی ۵۲/۵ درصد بود که در اثر حفاظتی عصاره آبی گیاه خرفه به ۳ درصد کاهش یافت؛ اما عصاره الکلی این گیاه تفاوت معنی داری از نظر اثر حفاظتی در مقایسه با گروه H_2O_2 به تنهایی نشان نداد [۳۹]. برخلاف مطالعه بهروان و همکاران، در مطالعه ما هر دو عصاره آبی و الکلی گیاه میخک در کاهش آسیب DNA نسبت به گروه H_2O_2 به تنهایی، نقش مؤثری داشتند.

منابع

1. Sicinska P, Mokra K, Wozniak K, Michałowicz J, Bukowska B. Genotoxic risk assessment and mechanism of DNA damage induced by phthalates and their metabolites in human peripheral blood mononuclear cells. *Sci Rep*. 2021;11(1):1-13.
2. Swift LH, Golsteyn RM. Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. *Int J Mol Sci*. 2014;15(3):3403-31.
3. Barnes JL, Zubair M, John K, Poirier MC, Martin FL. Carcinogens and DNA damage. *Biochem Soc Trans*. 2018;46(5):1213-24.
4. Moller P. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2006;612(2):84-104.
5. Faust F, Kassie F, Knasmüller S, Boedecker RH, Mann M, Mersch-Sundermann V. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2004;566(3):209-29.
6. Kianmehr M, Amiri M, Ebrahimzadeh-Bideskan A, Hajavi J. DNA damage assessment in the lymphocytes of construction painters by comet assay. *Toxicol Ind Health*. 2016;32(11):1902-9.
7. Kianmehr M, Hajavi J, Gazeri J. Assessment of DNA damage in blood lymphocytes of bakery workers by comet assay. *Toxicol Ind Health*. 2017;33(9):726-35.
8. Shahidi F, Liyana-Pathirana CM, Wall DS. Antioxidant activity of white and black sesame seeds and their hull fractions. *Food Chemistry*. 2006;99(3):478-83.
9. Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med*. 2006;27(1):1-93.
10. Bor Z, Arslan R, Bektaş N, Pirildar S, Dönmez AA. Antinociceptive, antiinflammatory, and antioxidant activities of the ethanol extract of *Crataegus orientalis* leaves. *Turk J Med Sci*. 2012;42(2):315-24.
11. Zangiabadi M, Sahari M, Barzegar M, Naghdi Badi H. *Zataria multiflora* and *Bunium persicum* essential oils as two natural antioxidants. *J Med Plants*. 2012;1(41):8-21.
12. Adel M, Sadegh AB, Yeganeh S, Movafagh AN, Saoud IP. Anesthetic efficacy of clove oil, propofol, 2- phenoxyethanol, and ketamine hydrochloride on Persian Sturgeon, *Acipenser persicus*, juveniles. *J World Aquac Soc*. 2016;47(6):812-9.
13. Dwivedi V, Shrivastava R, Hussain S, Ganguly C, Bharadwaj M. Comparative anticancer potential of clove (*Syzygium aromaticum*)—an Indian spice—against cancer cell lines of various anatomical origin. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(8):1989-93.
14. Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Kahla- Nakbi AB, Rouabhia M, Mahdouani K, et al. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytother Res*. 2007;21(6):501-6.
15. Kuroda M, Mimaki Y, Ohtomo T, Yamada J, Nishiyama T, Mae T, et al. Hypoglycemic effects of clove (*Syzygium aromaticum* flower buds) on genetically diabetic KK-A y mice and identification of the active ingredients. *J Nat Med*. 2012;66(2):394-9.
16. Shams R, Singh R, Dar A, Pandiselvam R, Rusu A, Trif M. A comprehensive review on clove (*Caryophyllus aromaticus* L.) essential oil and its significance in the formulation of edible coatings for potential food applications. *Front Nutr*. 2022;9:987674-.
17. Abdel- Wahhab M, Aly S. Antioxidant property of *Nigella sativa* (black cumin) and *Syzygium aromaticum* (clove) in rats during aflatoxicosis. *J Appl Toxicol*. 2005;25(3):218-23.

18. Kim I-S, Yang M-R, Lee O-H, Kang S-N. Antioxidant activities of hot water extracts from various spices. *Int J Mol Sci*. 2011;12(6):4120-31.
19. Carlsen MH, Halvorsen BL, Holte K, Bohn SK, Dragland S, Sampson L, et al. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutr J*. 2010;9(1):3-14.
20. Yang J-I, Yeh C-C, Lee J-C, Yi S-C, Huang H-W, Tseng C-N, et al. Aqueous extracts of the edible *Gracilaria tenuistipitata* are protective against H₂O₂-induced DNA damage, growth inhibition, and cell cycle arrest. *Molecules*. 2012;17(6):7241-54.
21. Boyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol*. 1976;5:9-15.
22. Dagur PK, McCoy Jr JP. Collection, storage, and preparation of human blood cells. *Curr Protoc Cytom*. 2015;73(1):5-16.
23. Lowes LE, Allan AL. Circulating tumor cells and implications of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Adv Clin Chem*. 2018;83:121-81.
24. Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2008;659(1-2):93-108.
25. Aslanturk OS. In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. *Genotoxicity-A predictable risk to our actual world*. 2018;2:64-80.
26. Chang C-C, Yang M-H, Wen H-M, Chern J-C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal*. 2002;10(3):178-82.
27. Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat Protoc*. 2007;2(4):875-7.
28. Singh RK, Mishra SK, Kumar N, Singh AK. Assessment of DNA damage by comet assay in lymphocytes of workers occupationally exposed to petroleum fumes. *Int J Genet*. 2010;2(1):18.
29. Thirugnanasampandan R, Jayakumar R. Protection of cadmium chloride induced DNA damage by Lamiaceae plants. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2011;1(5):391-4.
30. Mata A, Proença C, Ferreira A, Serralheiro M, Nogueira J, Araújo M. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chem*. 2007;103(3):778-86.
31. Nabavi S, Nabavi S, Ebrahimzadeh M, Eslami B. In Vitro Antioxidant Activity of *Pyrus Boissieriana*, *Diospyros Lotus*, *Eryngium Caucasicum* and *Froriepiea Subpinnata*. *JRUMS*. 2009;8(2):139-50.
32. Gulluce M, Sahin F, Sokmen M, Ozer H, Daferera D, Sokmen A, et al. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food chem*. 2007;103(4):1449-56.
33. Miranda DD, Arçari DP, Pedrazzoli J, Carvalho PdO, Cerutti SM, Bastos DH, et al. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice. *Mutagenesis*. 2008;23(4):261-5.
34. Sheng Y, Li L, Holmgren K, Pero R. DNA repair enhancement of aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* in a human volunteer study. *Phytomedicine*. 2001;8(4):275-82.
35. Li A, Schuermann D, Gallego F, Kovalchuk I, Tinland B. Repair of damaged DNA by *Arabidopsis* cell extract. *Plant Cell*. 2002;14(1):263-73.
36. Serpeloni JM, Bisarro dos Reis M, Rodrigues J, Campaner dos Santos L, Vilegas W, Varanda EA, et al. In vivo assessment of DNA damage and protective effects of extracts from

- Miconia species using the comet assay and micronucleus test. *Mutagenesis*. 2008;23(6):501-7.
- 37.Soltani F, Mosaffa F, Iranshahi M, Karimi G, Malekaneh M, Haghghi F, et al. Evaluation of antigenotoxicity effects of umbelliprenin on human peripheral lymphocytes exposed to oxidative stress. *Cell Biol Toxicol*. 2009;25(3):291-6.
- 38.Yen GC, Hsieh CL. Inhibitory effect of *Eucommia ulmoides* Oliv. on oxidative DNA damage in lymphocytes induced by H₂O₂. *Teratog Carcinog Mutagen*. 2003;23(S1):23-34.
- 39.Behravan J, Mosafa F, Soudmand N, Taghiabadi E, Razavi BM, Karimi G. Protective effects of aqueous and ethanolic extracts of *Portulaca oleracea* L. aerial parts on H₂O₂-induced DNA damage in lymphocytes by comet assay. *J Acupunct Meridian Stud*. 2011;4(3):193-7.
- 40.Bajpayee M, Dhawan A, Parmar D, Pandey AK, Mathur N, Seth PK. Gender-related differences in basal DNA damage in lymphocytes of a healthy Indian population using the alkaline Comet assay. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2002;520(1-2):83-91.