In Vitro Protective Effects of Aqueous and Alcoholic Extracts of *Caryophyllus aromaticus* on Reducing H_2O_2-Induced DNA Damage in Human Mononuclear White Blood Cells

Mojtaba Kianmehr[1], Seyed Hossein Abtahi Eivary[2], 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 H_2O_2 (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 H_2O_2 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 H_2O_2 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 H_2O_2-Induced DNA Damage in Human Mononuclear White Blood Cells.ŚJKU 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

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

تلفن ثابت: ۵۷۲۲۵۰۲۷-۰۵۱، 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 قسمت های هوایی گیاه میخک (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۲/۵ میلی‌گرم 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 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در دمای ۴ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ دقیقه، انکوبه شدند. میزان مهاجرت DNAدر سلول ها با استفاده از روش الکتروفورز ژلی در محیط قلیایی 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 تک هسته ای 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_2به تنهایی بود. طول دنباله بر حسب میکرومتر به ترتیب ۱/۲۱±۵/۳۰ در مقابل ۳/۹۱±۲۱/۸۴، درصد DNA در دنباله ۱/۲۱±۴/۲۹ در مقابل ۴/۱۸±۱۶/۲۱ و اندازه حرکت دنباله بر حسب میکرومتر ۰/۰۸±۰/۲۴ در مقابل ۰/۷۲±۲/۳۵ بود ($P < ۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که عصاره آبی گیاه میخک با غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌تواند از آسیب اکسیداتیو به DNA گلبول‌های سفید تک هسته ای خون انسان جلوگیری کند که احتمالاً به دلیل وجود ترکیبات آنتی اکسیدانی 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

مقدمه

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 ژن ها می‌گردد که این موتاسیون ها باعث بیماری‌های مختلف از جمله سرطان‌ها می‌شوند(۲و 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 می شوند(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 می رود(۵-۷).

آنتی اکسیدان ها ترکیباتی هستند که مانع از تخریب سلول ها توسط رادیکال های آزاد می شوند؛ بنابراین مانع بروز انواع سرطان و بیماری‌های قلبی و عروقی می‌شوند(۹ و ۸). آنتی‌اکسیدان‌ها به دو دسته عمده سنتزی و طبیعی تقسیم می شوند(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 نمونه های گیاهی و مواد مشتق شده از گیاهان است که برخی تحقیقات انجام شده نقش این ترکیبات را در کنترل رادیکال‌های آزاد تولید شده در بدن حیوانات نشان داده است(۱۰و۱۱).

عصاره گیاه میخک (Clove) با نام علمی *Caryophyllus aromaticus* به عنوان نگهدارنده و طعم دهنده به مواد غذایی افزوده می شود. 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) فنیل پروپانوئیدها هستند که عمدتاً شامل اوژنول و کارواکرول، تیمول و سینامالدئید می شود. این روغن همچنین حاوی تقریباً ۱۰ درصد استیل اوژنول و مقادیر کمی اسید گالیک، سسکوی ترپن ها، فورفورال، وانیلین و متیل-ان-آمیل کتون است. سایر ترکیبات آن شامل فلاونوئیدها، کربوهیدرات ها، لیپیدها، اسید اولئانولیک، رامنتین و ویتامین ها 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 آن ها 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 می شود. مشخص شده است که اسانس میخک دارای اثرات بازدارنده قوی بر روی انواع باکتری های منبع غذایی می باشد(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(۱۸و ۱۷). یک مطالعه انجام شده درخصوص بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیش از ۳۱۰۰ نوع گیاه، نشان داد که گیاه

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 آسیب های DNA با روش کامت انجام نشده است. با توجه به تفاوت اثر اکسیدان ها و آنتی‌اکسیدان ها در گونه های مختلف جانوری و نیز حتی در بافت های 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 گلبول های سفید تک هسته ای 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 ترا 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-روش ها

۲-۱- انتخاب افراد و خونگیری

این مطالعه از نوع تجربی آزمایشگاهی است. جامعه مورد مطالعه گلبول‌های سفید تک هسته ای 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 می شود 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 نمونه ها فرم رضایت جهت شرکت در پژوهش و نیز فرم مشخصات دموگرافیک نمونه هایی که دارای ملاک های ورود به مطالعه بودند، تکمیل گردید. جداسازی سلول های تک هسته ای با کمی تغییرات انجام شد. ابتدا با سرنگ ۵ میلی لیتری مقدار ۴ میلی لیتر از خون افراد انتخاب شده گرفته شد و سپس جداسازی سلول های تک هسته ای خون بر روی فایکول انجام گردید. در هر لوله آزمایش ۲ میلی لیتر فایکول و ۴ میلی لیتر خون ریخته شد. سپس لوله ها در داخل سانتریفیوژ یخچال دار قرار داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در g ۸۰۰ 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 سلول های تک هسته ای محیطی است. با استفاده از میکروپیپت ناحیه حلقه سفید رنگ به آرامی در یک ویال ۱/۵ میلی لیتر جمع‌آوری نموده و با ۵۰۰ میکرو لیتر محلول PBS مورد شستشو قرار داده شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت g۲۵۰ در دمای ۲۰ درجه سلیسیوس سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ، مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب به دست آمده ۴۰۰ میکرو لیتر(PBSPhosphate-Buffered Saline) اضافه گردید(۲۱-۲۴).

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

مرده مشخص گردید. درصد سلول‌های زنده طبق رابطه ($V=100\times N_t$ / n) محاسبه گردید که n تعداد سلول های 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 DNAگلبول‌های 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 تائید قرار گرفت. عصاره آبی و الکلی گیاه با استفاده از روش ماسریزاسیون (خیساندن) و سپس تبخیر حلال در دمای ۴۰ درجه سلسیوس در بن ماری تهیه شد. سپس با استفاده از آب مقطر از پودرهای خشک شده، محلول های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر از هر یک از عصاره های آبی و اتانولی تهیه شد.

۳-۲-اندازه‌گیری فلاونوئیدها:

برای اندازه‌گیری 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 $AlCl_3$ 10%, 20 µl KCH_3COO 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 کوئرسیتین در متانول استفاده شد.

۴-۲-اندازه‌گیری ترکیبات فنلی:

مقدار کل ترکیبات فنلی در عصاره‌ها به وسیله روش رنگ سنجی و با استفاده از روش فولین سیوکالتو (Folin-Ciocalteau) اندازه‌گیری شد [۲۷]. برای انجام آزمایش ۸۰ میکرولیتر عصاره با ۴۰۰ میکرولیتر محلول ۱۰درصد 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-picryl (DPPH) hydrazyl

DPPH یک روش بسیار معتبر، دقیق، آسان، مقرون به صرفه و با قابلیت تکرارپذیری بالاست که برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها استفاده می شود[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 IC_{50} 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 IC_{50} از نموداری استفاده می‌شود که در محور افقی غلظت‌های مختلف عصاره قرار گرفته و در محور عمودی درصد مهار وارد می شود. برای پیداکردن درصد مهار از فرمول زیر استفاده می شود 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

در این آزمون قدرت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات احیا کننده با استفاده از احیای یون فریک (Fe^{+3}) به یون فرو (Fe^{+2}) سنجیده می‌شود. 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 (TPTZ ۲۳/۴ میلی گرم حل شده در ۷/۵ میلی لیتر اسید کلریدریک ۴۰ میلی‌مولار) و محلول ۲۰ میلی‌مولار کلرید آهن III که با نسبت ۱۰–۱–۱ مخلوط و در جای تاریک نگهداری می‌شود. از محلول ۲ میلی‌مولار 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 پیپتاژ 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 ۳۶×۱۸ میلی متر پوشانده شد و 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، Na_2 EDTA 0.1 M، Dimethyl sulfoxide10% (DMSO) 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 Na_2 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 سلیسیوس 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

دقیقه در متانول قرار داده شدند تا فیکس گردند و سپس در معرض هوا قرار گرفتند تا خشک شوند. رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم برماید با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر انجام گرفت و پس از ۱۰ دقیقه لام ها شسته شده و در تاریکی قرار گرفتند. برای مشاهده کامت ها از میکروسکوپ نیکون ۵۰i با محدوده طول موج ۵۴۶-۵۱۶ نانومتر و همچنین فیلتر Barrier با طول موج ۵۹۰ نانومتر و با بزرگ نمایی 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 cometscore v۱/۵ انجام گرفت. آسیب های 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:

جهت توصیف داده ها از جداول و نمودارها استفاده گردید و برای تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات جمع‌آوری 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 معنی‌داری کوچک‌تر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

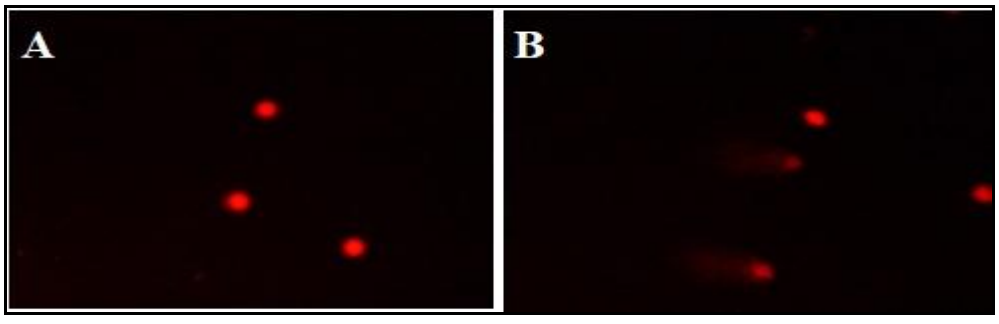
یافته‌ها

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

جدول ۱: نتایج حاصل از ارزیابی آنتی اکسیدانی عصاره های مختلف به دست آمده از گیاه میخک

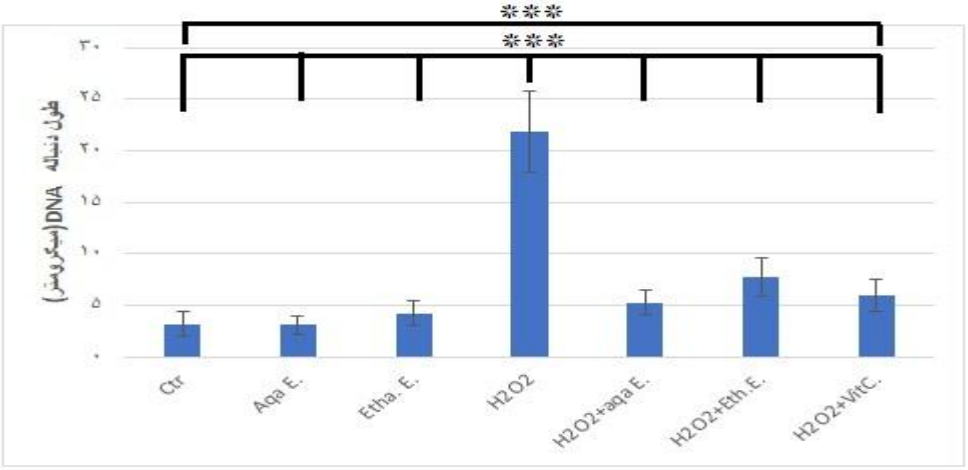
نام عصاره	مقدار ترکیبات فنلی در عصاره خشک (g)	مقدار ترکیبات فلاونوئیدی در عصاره خشک (g)	فعالیت FRAP (میکرومول) در عصاره خشک (g)	آزمایش DPPH: IC۵۰ عصاره خشک (mg/ml)
آبی	۸/۳۷۴	۱/۶۵۴۳	۵۵۸/۷۳	۶/۰۸۹
اتانول ۵۰٪	۱۸/۳۶۶	۲/۳۵۷۳	۷۶۶/۹۹	۶/۳۵۶

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



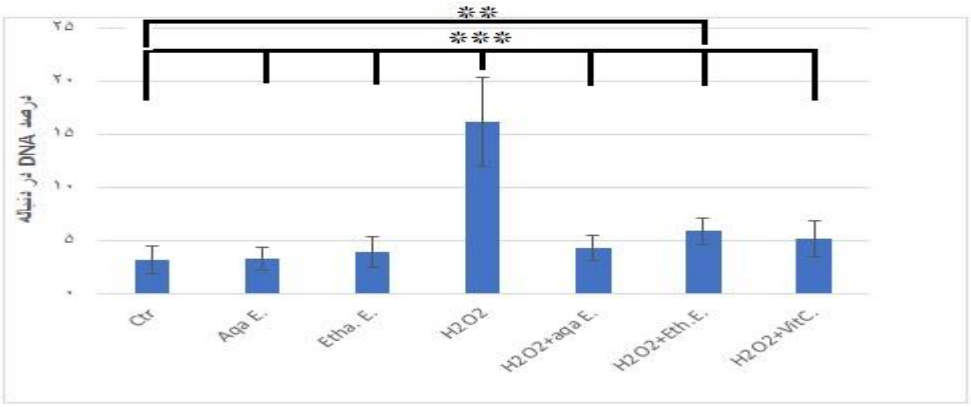
شکل ۱:نمونه کامت های گلبول های سفید تک هسته ای خون محیطی.
A: یکی از افراد گروه کنترل، B: یکی از افراد گروه H_2O_2.

با استفاده از آزمون تعقیبی توکی مشخص گردید اختلاف معنی‌داری بین گروه در معرض آب اکسیژنه با تمامی گروه ها از نظر میانگین طول دنباله DNA وجود داشت (۰/۰۰۱ >p). همچنین اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل با گروه در معرض آب‌اکسیژنه + عصاره الکلی وجود داشت (۰/۰۰۱ >p). میانگین طول دنباله DNA، در گروه قرار گرفته در معرض عصاره آبی، کمتر از عصاره الکلی بود. (شکل ۲).



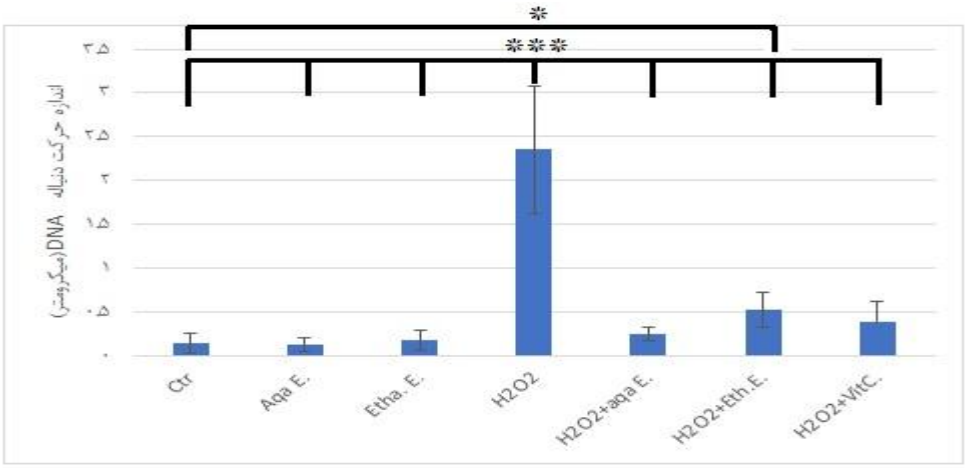
شکل ۲: مقایسه میانگین طول دنباله DNA (میکرومتر) در کامت گلبول‌های سفید تک هسته‌ای خون در گروه‌های مورد تحقیق. *:۰/۰۵ >p، **: ۰/۰۱ >p ، *** ۰/۰۰۱ >p . ۱: گروه Ctr (کنترل بدون هیچ مداخله‌ای)، ۲:گروه Aqa E (عصاره آبی گیاه میخک)، ۳: گروه Etha. E (عصاره الکلی گیاه میخک، ۴: گروه H_2O_2 (آب اکسیژنه)، ۵: گروه H_2O_2 +aqa E (آب اکسیژنه + عصاره آبی گیاه میخک) ۶: گروه H_2O_2 +Eth. E(آب اکسیژنه + عصاره الکلی گیاه میخک)، ۷: گروه H_2O_2 +VitC (آب اکسیژنه + ویتامین C).

با استفاده از آزمون تعقیبی توکی مشخص گردید اختلاف معنی‌داری بین گروه در معرض آب اکسیژنه با تمامی گروه ها از نظر میانگین درصد DNA در دنباله وجود داشت (۰/۰۰۱ >P). همچنین اختلاف معنی داری بین گروه کنترل با گروه در معرض آب‌اکسیژنه + عصاره الکلی وجود داشت (۰/۰۰۶ =P). میانگین درصد DNA در دنباله، درگروه قرار گرفته در معرض عصاره آبی، کمتر از عصاره الکلی بود (شکل ۳).



شکل ۳: مقایسه میانگین درصد DNA در دنباله کامت گلبول های سفید تک هسته ای خون در گروه های مورد تحقیق. *:۰/۰۵ >p، **: ۰/۰۱ >p، *** ۰/۰۰۱ >p. 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 H_2O_2 (آب اکسیژنه) ۵: گروه H_2O_2 +aqa E (آب اکسیژنه + عصاره آبی گیاه میخک) ۶: گروه H_2O_2 +Eth. E (آب اکسیژنه + عصاره الکلی گیاه میخک) ۷: گروه H_2O_2 +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< ۰/۰۰۱). همچنین اختلاف معنی داری بین گروه کنترل با گروه در معرض آب اکسیژنه + عصاره الکلی وجود داشت (P= ۰/۰۲۱). 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 دنبالهDNA بر حسب میکرومتر در کامت گلبول‌های سفید تک هسته ای خون در گروه‌های مورد تحقیق. *:۰/۰۵ >p، **: ۰/۰۱ >p، *** ۰/۰۰۱ >p. ۱: گروه Ctr (کنترل بدون هیچ مداخله‌ای)، ۲:گروه Aqa E (عصاره آبی گیاه میخک)، ۳: گروه Etha. E (عصاره الکلی گیاه میخک، ۴: گروهH_2O_2 (آب اکسیژنه)۵: گروه H_2O_2 +aqa E (آب اکسیژنه + عصاره آبی گیاه میخک)، ۶: گروه H_2O_2 +Eth. E (آب اکسیژنه + عصاره الکلی گیاه میخک)۷: گروه H_2O_2 +VitC (آب اکسیژنه + ویتامین C) .

بحث

در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی روی اثر ضد رادیکالی عصاره‌ها و اسانس های گیاهی انجام شده است. در مطالعه ما اثرات آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره های آبی و اتانولی گیاه میخک با استفاده از کاهش ظرفیت رادیکالی به کمک DPPH مورد ارزیابی قرار گرفت. در این ارتباط عصاره های آبی و اتانولی میخک به ترتیب IC۵۰ برابر ۶/۰۸۹ میکروگرم بر میلی لیتر و ۶/۳۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر را نشان دادند. همان طور که مشاهده می شود قدرت مهار رادیکال‌های آزاد در عصاره‌های آبی بسیار نزدیک به آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT است.

در مطالعه تیروگانا و همکاران مشخص گردید که فنول های موجود در گیاهان می‌توانند از اثر سرطان زایی 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 IC۵۰ به دست آمده از DPPH ، در مورد نعناع برای عصاره آبی ۷/۵ میکروگرم بر میلی لیتر و برای عصاره اتانولی ۲/۶۵ میکروگرم بر میلی لیتر و در مورد پونه برای عصاره آبی و اتانولی به ترتیب ۹/۸ میکروگرم بر میلی لیتر و۹/۲۴ 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 آنتی اکسیدانی عصاره متانولی چهار گونه گیاهی زولنگ، چوچاخ، تلکا و خرمندی نشان داد که فعالیت ضد رادیکالی به وسیله آزمایش DPPH، به ترتیب IC۵۰ گیاهان زولنگ، چوچاخ، تلکا و خرمندی ۴۲۰، ۲۷۰، ۳۰۰۰ و ۱۴۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود؛ لذا به خوبی دیده می شود که فعالیت ضد رادیکالی عصاره الکلی در تحقیق ما بسیار بیشتر از این عصاره ها بوده است(۳۱).

در این تحقیق دیده می شود 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 ۲۴ و ۳۶ 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، عصاره ها 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 می شود(۳۳). در مطالعه انجام شده توسط شنگ و همکاران، افزایش قدرت ترمیم آسیب DNA گلبول‌های سفید انسان توسط عصاره آبی پنجه گربه 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 آن ها را بر روی آسیب DNA، با استفاده از روش comet نشان می دهد که با مطالعه ما همسو است(۳۶و ۳۵).

در مطالعه ینگ و همکاران مشخص شد که عصاره آبی گیاه گراسیلاریا نقش محافظتی علیه آسیب DNA ناشی از آب اکسیژنه در سلول های H۱۲۹۰ دارد. درصد DNA در دنباله در گروه کنترل ۱۲ درصد بود که در گروه H_2O_2 به حدود ۷۰ درصد افزایش یافت. عصاره این گیاه با غلظت ۲ میلی گرم بر میلی‌لیتر، آسیب DNA را به طور معنی داری به ۳۵ درصد کاهش داد(۲۰). در مطالعه ما هم درصد DNA در دنباله در گروه H_2O_2 برابر ۱۶/۲۱ بود که به خاطر اثرات حفاظتی عصاره های آبی و الکلی میخک به ترتیب به ۴/۲۹ و ۵/۸۷ به طور معنی داری کاهش یافت.

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 گلبول‌های سفید تک هسته‌ای انسانی که تحت تأثیر استرس اکسیداتیو ناشی از H_2O_2 قرار گرفته بودند نشان داد. به‌طوری 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 گلبول های سفید تک هسته‌ای انسانی ۵۲/۵ درصد بود که در اثر حفاظتی عصاره آبی گیاه خرفه به ۳ درصد کاهش یافت؛ اما عصاره الکلی این گیاه تفاوت معنی‌داری 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.

در تمام مطالعات انجام شده آسیب DNA در سلول های مختلف مورد تحقیق در حضور H_2O_2 به طور معنی‌داری 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 معنی‌داری 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).

نتیجه‌گیری

نتایج نشان می‌دهد که عصاره آبی گیاه میخک می‌تواند با غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر، از آسیب اکسیداتیو به DNA گلبول‌های سفید تک‌هسته‌ای خون انسان جلوگیری کند که احتمالاً به دلیل وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی 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/ ۱پ)، تشکر می‌نمایند. همچنین از افراد نمونه‌های مورد پژوهش که در این تحقیق شرکت کردند، قدردانی می‌گردد. هیچ‌کدام از نویسندگان این مطالعه، افراد و یا دستگاه‌ها تعارض منافعی برای انتشار این مقاله ندارند.

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 (Syzigium 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 Froriepia 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, Haghighi 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.