



Available online: <https://ijhe.tums.ac.ir>

مقاله پژوهشی

## اثرات آنتی ژنوتوکسیتی آویشن شیرازی بر آسیب DNA ناشی از $H_2O_2$ در لنفوسیت‌های انسانی با استفاده از روش کامت

نبی شریعتی فر<sup>۱</sup>، جعفر حاجوی<sup>۲</sup>، سید حسین ابطحی ایوری<sup>۳</sup>، مجتبی کیان مهر<sup>۴\*</sup>

- ۱- گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۲- گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران
- ۳- گروه علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران
- ۴- گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله:

**زمینه و هدف:** مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات محافظتی عصاره‌های آبی و اتانولی آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss) بر آسیب DNA لنفوسیت‌های انسان با استفاده از روش کامت، انجام شد.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۰۳

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۰

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۱۲/۲۴

**روش بررسی:** لنفوسیت‌های خون محیطی از ۱۶ داوطلب سالم جدا شد. سلول‌ها ابتدا با ۱۰۰ میکرومولار  $H_2O_2$  و نیز عصاره‌های آبی و الکلی برگ آویشن با غلظت  $2/5 \text{ mg/mL}$  بطور جداگانه تیمار شدند. نهایتاً سلول‌ها در ترکیبی از  $H_2O_2$  جهت ایجاد آسیب DNA با عصاره آبی و الکلی در دمای  $4^\circ\text{C}$  به مدت ۳۰ min، انکوبه شدند. میزان مهاجرت DNA در سلول‌ها با استفاده از روش کامت اندازه‌گیری گردید و آسیب DNA به صورت سه شاخص: طول دنباله، درصد DNA در دنباله و اندازه حرکت دنباله بیان شد.

**واژگان کلیدی:** آسیب DNA، لنفوسیت‌های انسانی، عصاره آویشن شیرازی، روش کامت

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که آسیب DNA لنفوسیت‌های در معرض عصاره اتانولی آویشن شیرازی به طور قابل توجهی کمتر از لنفوسیت‌های تیمار شده با  $H_2O_2$  بود. علاوه بر این، طول دم ( $\mu\text{m}$ )  $5/48 \pm 1/62$  در مقابل  $22/82 \pm 6/90$ ، درصد DNA در دم  $4/56 \pm 1/55$  در مقابل  $16/00 \pm 4/55$ ، و اندازه حرکت دم ( $\mu\text{m}$ )  $0/28 \pm 0/11$  در مقابل  $2/33 \pm 0/83$  بود ( $p < 0/01$ ).

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد که عصاره‌های آبی و اتانولی آویشن شیرازی به طور قابل توجهی قادر به حذف رادیکال‌های DPPH از طریق مکانیسم احتمالی فعالیت مهار رادیکال هستند. در نتیجه، عصاره اتانولی اثر بهتری نسبت به عصاره آبی آویشن شیرازی در جلوگیری از آسیب اکسیداتیو DNA به لنفوسیت‌های انسانی داشت.

پست الکترونیکی نویسنده مسئول:

Kianmehr.m@gmail.com

Please cite this article as: Shariatfar N, Hajavi J, Abtahi Eivary SH, Kianmehr M. Antigenotoxicity effects of *Zataria multiflora* Boiss on  $H_2O_2$ -induced DNA damage in human lymphocytes by comet assay. *Iranian Journal of Health and Environment*. 2023;15(4):737-50.

## مقدمه

استرس اکسیداتیو و آسیب DNA نقش مهمی در پاتوژنز بیماری‌های مختلف از جمله بیماری آلزایمر، نارسایی قلبی، سرطان، پیری و غیره دارند (۱). عوامل فیزیکی مانند گرما یا تشعشعات الکترومغناطیسی و مواد شیمیایی مختلف می‌توانند به DNA سلولی آسیب برسانند (۲، ۳). استرس اکسیداتیو در انسان می‌تواند باعث آسیب به پروتئین‌ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک شود که می‌تواند منجر به تغییر در مسیرهای انتقال سیگنال، جهش ژایی سلولی، بیان ژن و مرگ سلولی شود (۴، ۵).

تحقیقات قبلی نشان داده است که ترکیبات گیاهی به طور طبیعی اثرات محافظتی از خود نشان می‌دهند، برخلاف سمیت ژنتیکی ناشی از استرس اکسیداتیو که حضور آن در مواد طبیعی شناخته شده از کامپوزیت‌های گیاهی توجه ویژه‌ای را به خود جلب کرده است (۶). آویشن شیرازی (*Zataria multiflora Boiss*) از خانواده نعنائیان است که شامل نعناع، رزماری و چندین گیاه دارویی نیز می‌شود. این گیاه یک ساله است که به صورت وحشی در بسیاری از مناطق جهان مانند ایران (مرکزی و جنوبی)، پاکستان و افغانستان رشد می‌کند. این گیاه چند ساله با پایه چوبی، فیبری (۷، ۸) و برگ‌های کوچک، ریز، بیضوی و سبز مایل به خاکستری است. در ایران، این گیاه نه تنها به عنوان یک چاشنی عمومی، بلکه به دلیل خاصیت ضدعفونی کننده، تسکین دهنده و ضد نفخ (ضد نفخ و تسکین دهنده روده) در طب عامیانه قدیم مورد استفاده قرار می‌گیرد (۹، ۱۰). مطالعات پزشکی اخیر نشان داده است که آویشن شیرازی دارای خواص بیولوژیکی مانند ضد درد، اسپاسمولیتیک، ضد التهاب، ضد درد، ضد میکروبی و ایمنی تحریک کننده است (۱۱). یک مطالعه نشان داد که کارواکرول ترکیب اصلی این گیاه است (۱۲) در حالی که مطالعات دیگر نشان داده است که تیمول (ایزومر کارواکرول) ترکیب اصلی این گیاه است (۱۳). فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجه عصاره متانولی آویشن شیرازی با ارزیابی فعالیت مهار رادیکال

(DPPH) 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl در

سرم موش‌های تیمار شده اندازه‌گیری شده که فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی نشان داد (۱۴). Karinian و همکاران دریافتند که روغن آویشن شیرازی دارای مقداری نیتریک اکساید و مالون دی آلدئید است که می‌تواند از استرس نیتروژاتیو و پراکسیداسیون لیپیدی جلوگیری کند (۱۵). روغن آویشن شیرازی برای کاهش تولید بیش از حد اکسید نیتریک و  $H_2O_2$  ناشی از گلوکز به همراه NADH اکسیداز و فعالیت‌های نیتریک اکسید سنتاز در مونسیت‌های کشت شده انسانی استفاده شده است. این اثرات با استفاده از تیمول و کارواکرول به جای پاراسیمین گاما ترپینن و لینالول تکرار شد (۱۶). علاوه بر این، اثرات مشابه روغن آویشن شیرازی، تیمول و کارواکرول در مطالعه دیگری بر روی ماکروفاژهای تحریک شده با لیپوپلی ساکارید گزارش شده است (۱۶، ۱۷). برخی از فرمولاسیون‌های دارویی آویشن شیرازی مانند قطره‌های خوراکی، شربت، کپسول‌های نرم و کرم واژینال برای درمان بیماری‌های مختلف تهیه شده است (۱۸، ۱۹). مطالعه Yen و همکاران نشان داد که عصاره آبی برگ گیاه *Eucommia ulmoides Oliv.* بطور معنی‌داری میزان آسیب DNA لنفوسیت‌های انسانی که تحت تاثیر استرس اکسیداتیو ناشی از  $H_2O_2$  قرار گرفته‌اند، را کاهش داده است (۲۰). علاوه بر این مطالعه Behravan و همکاران نشان داد که عصاره آبی و اتانولی گیاه خرفه، آسیب DNA ناشی از  $H_2O_2$  در لنفوسیت‌های انسانی را کاهش داده است (۲۱).

در سال‌های اخیر، روش‌های مختلفی برای بررسی آسیب DNA در سلول‌های پستانداران بویژه روش کامت، استفاده شده 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 (۲۲، ۲۳). با توجه به ترکیبات ذکر شده در گیاه، تاکنون مطالعه‌ای در

برای دو گروه عبارت بودند از:  $\bar{X}_1 = 69/6$ ،  $\bar{X}_2 = 53/6$ ،  $S_1 = 11/9$  و  $S_2 = 17/1$  که با ضریب اطمینان ۹۵ درصد و توان آزمون ۸۰ درصد حجم نمونه این تحقیق برای هر گروه ۱۳/۳ نفر به دست آمد. پس از در نظر گرفتن ۲۰ درصد ریزش احتمالی نمونه‌ها، ۱۶ شرکت کننده برای هر گروه انتخاب شدند که همگی فرم‌های اطلاعات دموگرافیک و رضایت آگاهانه را پر کردند.

#### – روش استخراج عصاره گیاه

گیاه *Zataria multiflora* Boiss مورد استفاده در این مطالعه از یک داروخانه گیاهی در شهرستان تهران خریداری شد و توسط متخصصین گیاه شناسی دانشگاه تهران مورد تایید قرار گرفت. ابتدا عصاره‌های آبی و الکلی گیاه آویشن طبق روش Singh تهیه شد (۲۵). ۵۰ g پودر برگ گیاه آویشن با ۵۰۰ mL اتانول ۸۰ درصد حجمی مخلوط گردید. عصاره اتانولی با صافی با منافذ دارای قطر  $0/45 \mu\text{m}$  فیلتر شد، و سپس تبخیر حلال در دمای ۴۰ درجه سلسیوس در بن ماری انجام شد و لیوفیلیزه گردید. پودر لیوفیلیزه در دمای منفی  $4^{\circ}\text{C}$  ذخیره شد تا بعداً مورد استفاده قرار گیرد. همچنین ۵۰ g پودر برگ گیاه آویشن با ۵۰۰ mL آب مقطر مخلوط گردید. عصاره آبی با صافی دارای منافذ با قطر  $0/45 \mu\text{m}$  فیلتر شد، و سپس تبخیر حلال در دمای ۴۰ درجه سلسیوس در بن ماری انجام شد و لیوفیلیزه گردید. پودر لیوفیلیزه در دمای منفی  $4^{\circ}\text{C}$  ذخیره شد تا بعداً مورد استفاده قرار گیرد.

#### – جمع آوری نمونه خون

نمونه خون از هر شرکت کننده به صورت جداگانه گرفته شد. ابتدا ۵ mL از خون افراد انتخاب شده گرفته شد و سپس سلول‌های لنفوسیتی از خون کامل جدا شدند و زنده ماندن سلول‌ها با روش حذف رنگ تریپان بلو قبل از استفاده از روش سنجش کامت تعیین شد (۲۶). میزان بقای سلول‌ها بالاتر از ۹۶ درصد بود که مناسب است. سلول‌های لنفوسیتی به هفت گروه کنترل (بدون هیچ مداخله‌ای)، عصاره آبی، عصاره اتانولی،  $\text{H}_2\text{O}_2$  (به عنوان جهش زا)،  $\text{H}_2\text{O}_2$  + عصاره آبی،  $\text{H}_2\text{O}_2$

مورد اثرات این گیاه برای جلوگیری از آسیب DNA در ایران انجام نشده است. در مطالعات قبلی میزان آنتی اکسیدان در عصاره‌های مختلف آویشن با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی تعیین شده است، ولی تاکنون تاثیر این عصاره‌ها بر تعمیر آسیب‌های DNA با روش کامت انجام نشده است. بنابراین، مطالعه حاضر به منظور بررسی خواص آنتی ژنوتوکسیک عصاره آبی و اتانولی آویشن شیرازی بر روی لنفوسیت‌های محیطی انسان با روش کامت یا الکتروفورز ژلی تک سلولی قلبیایی (SCGE) انجام شد.

## مواد و روش‌ها

### – مواد

فایکول از سازمان انتقال خون ایران، فسفات بافر سالین و دیسدیم اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید، آگاروز با نقطه ذوب پایین، تریس بازی و بقیه مواد با درجه کاربرد آزمایشگاهی تهیه شدند.

### – روش‌ها

#### انتخاب نمونه‌های پژوهش

این مطالعه از نوع تجربی آزمایشگاهی بود. جامعه مورد مطالعه لنفوسیت‌های خون متعلق به افرادی بود که معیارهای ورود به مطالعه را داشتند. معیارهای ورود شرکت کنندگان عبارت بودند از: «سالم بودن براساس معاینات پزشکی»، «تمایل به شرکت در مطالعه»، «عدم مصرف الکل و سیگار کشیدن»، «عدم ابتلا به بیماری‌های ناشی از ویروس»، «عدم دریافت واکسن اخیر»، «نبودن تحت هر گونه معاینه رادیولوژیکی در حال حاضر»، «نداشتن رژیم غذایی صرفاً گیاهی یا صرفاً حیوانی» و «عدم داشتن هیچ گونه سابقه بیماری ژنتیکی مشخص قبلی که باعث آسیب DNA شود». معیار خروج از مطالعه عبارت بود از: «عدم تمایل افراد برای ادامه مطالعه». تعداد نمونه لازم جهت مطالعه با استفاده از مقدار آسیب DNA از داده‌های رفرنس (۲۴) طبق فرمول مقایسه میانگین‌های دو گروه مستقل محاسبه گردید. مقدار میانگین و انحراف معیار آسیب طول دم ( $\mu\text{m}$ )

الکتریکی روی  $230 \text{ mA}$  تنظیم گردید. طول مدت الکتروفورز  $20 \text{ min}$  و دمای محلول الکتروفورز  $4^\circ \text{C}$  بود. در مرحله بعد لامها ۳ بار و هر بار به مدت  $5 \text{ min}$  با محلول تریس خنثی ساز شستشو داده شدند. سپس لامها به مدت  $5 \text{ min}$  در متانول قرار داده شدند تا فیکس گردند و بعد در معرض هوا قرار گرفتند تا خشک شوند. رنگ آمیزی توسط اتیدیوم برماید با غلظت  $20 \mu\text{g/mL}$  انجام گرفت و پس از  $10 \text{ min}$  لامها شسته شدند. برای مشاهده کامتها از میکروسکوپ نیکون 50i با محدوده طول موج  $516-546 \text{ nm}$  و همچنین فیلتر Barrier با طول موج  $590 \text{ nm}$  و با بزرگنمایی ۲۰۰ برابر استفاده گردید. ارزیابی نتایج با استفاده از نرم افزار cometscore v1.5 انجام گرفت. دو اسلاید برای هر نمونه تهیه شد و برای هر اسلاید، ۵۰ هسته به طور تصادفی انتخاب شد و در مجموع ۱۰۰ هسته مورد بررسی قرار گرفت (۲۸).

#### – تعیین ظرفیت مهار رادیکالهای آزاد

ظرفیت مهار رادیکالهای آزاد عصارهها بهعنوان سفیدکننده سنجش پایدار ۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) با روش kamkar و همکاران با مقداری اصلاح انجام شد (۲۹). برای انجام آزمایش  $30 \mu\text{L}$  از عصاره +  $900 \mu\text{L}$  از معرف مخلوط گردید و پس از  $30 \text{ min}$  جذب آن در  $517 \text{ nm}$  قرائت شد. برای محاسبه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره با روش DPPH، از شاخص  $\text{IC}_{50}$  استفاده شد. منظور از این شاخص غلظتی از عصاره است که قادر باشد ۵۰ درصد از رادیکالهای آزاد DPPH را احیا کند. برای بدست آوردن  $\text{IC}_{50}$  از نموداری استفاده می شود که در محور افقی غلظت های مختلف عصاره قرار گرفته و در محور عمودی درصد مهار وارد می شود. برای پیدا کردن درصد مهار از معادله ۱ استفاده می شود که در آن  $\text{Ac}$  جذب شاهد،  $\text{As}$  جذب نمونه، و  $\%A$  درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد است.

$$\frac{(\text{Ac} - \text{As})}{\text{Ac}} \times 100 = \%A \quad (1)$$

+ عصاره اتانولی و  $\text{H}_2\text{O}_2$  + ویتامین C (به عنوان یک آنتی اکسیدان مصنوعی) تقسیم شدند. غلظت  $\text{H}_2\text{O}_2$ ، عصاره آبی و اتانولی آویشن شیرازی و ویتامین C به ترتیب  $100 \mu\text{M}$ ،  $2/5 \text{ mg/mL}$  و  $50 \mu\text{M}$  بود.

#### – روش تعیین آسیب DNA (Comet assay)

برای بررسی میزان آسیب DNA طبق روش Duty و همکاران (۲۷)، پس از آماده کردن سوسپانسیون سلولی، برای هر لام مقدار  $100 \mu\text{L}$  آگاروز با نقطه ذوب پایین یک درصد به  $100 \mu\text{L}$  از سلولها اضافه شد و مخلوط تهیه شده بر روی لامهایی که از قبل با یک لایه آگاروز معمولی پوشانده شده بود، قرار داده شد و با یک لامل پوشانده شد و لامها در یخچال قرار گرفت. برای هر نفر دو لام مجزا برای هر یک از گروهها تهیه شد.

پس از جامد شدن ژل و خارج کردن لامها از یخچال، لامها برداشته شده و مقدار  $100 \mu\text{L}$  آگاروز با نقطه ذوب پایین  $0/5$  درصد بر روی دو لایه قبلی اضافه گردید و بدین ترتیب سلولها در وسط لایه های آگاروز ساندویچ گردید تا در طی مراحل بعدی از ژل خارج نگردد. پس از جامد شدن لایه ژل آخر در یخچال، لامها برداشته شد و لامها به صورت افقی در یک ظرف مناسب قرار داده شدند. محلول لیز کننده ( $\text{NaCl}$ , 2.5 M, Tris base, 10 mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 0.1 M, DMSO 10% and Triton X-100) بر روی لامها ریخته شد، به طوری که ژلها به طور کامل در زیر محلول قرار گیرند و به مدت  $1 \text{ h}$  در داخل یخچال قرار داده شد. سپس لامها از داخل محلول لیز کننده بیرون آورده شد و با مقدار کمی از محلول الکتروفورز ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 1 mM and  $\text{NaOH}$ , 300 mM) شستشو داده شد. پس از آن لامها در تانک الکتروفورز افقی قرار داده شد و داخل تانک پر از محلول الکتروفورز با دمای  $4^\circ \text{C}$  درجه سلسیوس گردید و تانک در یخچال قرار داده شد. لامها به مدت  $20 \text{ min}$  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  $20 \text{ V}$  و شدت جریان

### تحلیل داده‌ها

جهت توصیف داده‌ها از جداول و نمودارها استفاده گردید. برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov)، استفاده شد. چون آسیب DNA متغیر کمی و دارای توزیع نرمال بوده و در هفت گروه مختلف مقایسه گردید، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-way analysis of variance)، استفاده شد و جهت مقایسه میانگین مقدار آسیب DNA بین گروه‌های مختلف از تست تعقیبی توکی (Tukey) استفاده گردید. سطح معنی‌داری کوچک‌تر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد (۳۲).

### یافته‌ها

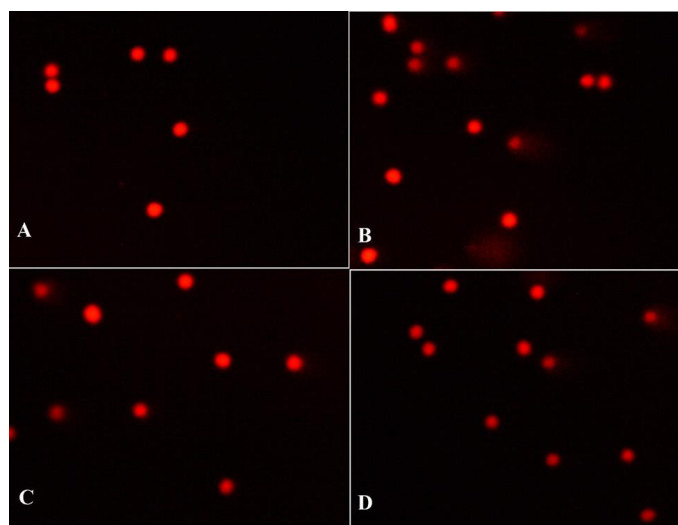
از کل افراد شرکت کننده در مطالعه، ۵۶/۲۵ درصد مرد و ۴۳/۷۵ درصد زن بودند و میانگین سن افراد شرکت کننده ۳۴/۷۶±۵/۴۲ سال بود. تصاویر میکروسکوپ فلورسنت از کامت‌های گروه در معرض آب اکسیژنه در مقایسه با سایر گروه‌ها در شکل ۱ نشان داده شده است. قسمت A، لنفوسیت در گروه کنترل را بدون هیچ آسیبی نشان می‌دهد. در بخش B، اثرات خطرناک  $H_2O_2$  بر لنفوسیت نشان داده شده است. تأثیر عصاره‌های اتانولی و آبی در بهبود آسیب DNA در قسمت‌های C و D در شکل ۱ ارائه شده است.

### تعیین محتوای فنلی کل

محتوای فنلی کل عصاره آویشن شیرازی با استفاده از اسید گالیک به عنوان استاندارد طبق روش Singleton و همکاران با برخی تغییرات انجام شد (۳۰). برای انجام آزمایش  $80 \mu L$  عصاره با  $400 \mu L$  محلول ۱۰ درصد فولین سیوکالتو مخلوط و به مدت ۵ min در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده شد. به مخلوط فوق  $320 \mu L$  سدیم کربنات ۷/۵ درصد افزوده شد و به مدت ۳۰ min در دمای  $40^\circ C$  انکوبه گردید. در انتها جذب لوله‌ها در طول موج ۷۶۵ nm 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.

### تعیین محتوای فلاونوئید کل

مقدار کل فلاونوئید عصاره آویشن شیرازی براساس روش Lin و همکاران با برخی تغییرات تعیین شد (۳۱). در این آزمایش  $100 \mu L$  از هر کدام از عصاره‌ها، با  $900 \mu L$  محلول واکنش ( $300 \mu L$  methanol,  $20 \mu L$   $AlCl_3$  10%,  $20 \mu L$   $KCH_3COO$  1M,  $560 \mu L$  DW) مخلوط و سپس جذب آن در طول موج ۴۱۵ nm قرائت گردید. برای رسم منحنی استاندارد از رقت‌های سریالی غلظت  $100 \mu g/L$  کوئرسیتین در متانول استفاده شد.



شکل ۱- آسیب DNA در شرایط مختلف: (A) کنترل، (B) تیمار شده با  $H_2O_2$ ، (C) عصاره اتانولی و  $H_2O_2$  و (D) عصاره آبی و  $H_2O_2$

گروه آب اکسیژنه + عصاره الکلی ( $p < 0/001$ ) و نیز بین گروه در معرض عصاره الکلی با گروه آب اکسیژنه + عصاره الکلی ( $p = 0/016$ ) وجود دارد. علاوه بر این، از نظر پارامتر میانگین درصد DNA در دنباله، اختلاف معنی داری بین گروه کنترل با گروه در معرض آب اکسیژنه + عصاره آبی ( $p = 0/009$ ) و نیز با گروه آب اکسیژنه + عصاره الکلی ( $p = 0/030$ ) وجود دارد. ضمناً با استفاده از آزمون تعقیبی توکی مشخص گردید از نظر پارامتر میانگین اندازه حرکت دنباله DNA نیز اختلاف معنی داری بین گروه کنترل با گروه در معرض آب اکسیژنه + عصاره الکلی ( $p = 0/021$ ) و گروه عصاره آبی با گروه آب اکسیژنه + عصاره الکلی ( $p = 0/011$ ) وجود دارد.

میانگین و انحراف معیار پارامترهای مختلفی که در روش کامت میزان آسیب DNA را تعیین می کنند، برای هر یک از ۷ گروه مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. با استفاده از آزمون تعقیبی توکی مشخص گردید که اختلاف معنی داری بین گروه در معرض آب اکسیژنه با تمامی گروه های مورد مطالعه، از نظر هر سه پارامتر میانگین طول دنباله DNA، میانگین درصد DNA در دنباله و میانگین اندازه حرکت دنباله DNA وجود دارد ( $p < 0/001$ ). همچنین اختلاف معنی داری از نظر پارامتر میانگین طول دنباله DNA، بین گروه کنترل با گروه در معرض آب اکسیژنه + عصاره الکلی ( $p < 0/001$ ) وجود دارد. ضمناً اختلاف معنی داری بین گروه در معرض عصاره آبی با

جدول ۱- مقایسه پارامترهای آسیب DNA در لنفوسیتها بین ۷ گروه مورد بررسی\*

نام گروه	طول دم ( $\mu\text{m}$ )	درصد DNA دم	اندازه حرکت دم ( $\mu\text{m}$ )
کنترل	$3/51 \pm 1/50$	$3/22 \pm 1/38$	$0/16 \pm 0/13$
عصاره اتانولی	$3/15 \pm 0/91$	$3/31 \pm 1/25$	$0/13 \pm 0/10$
عصاره آبی	$4/73 \pm 1/53$	$4/02 \pm 1/73$	$0/23 \pm 0/13$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$22/82 \pm 6/90$	$16/00 \pm 4/55$	$2/33 \pm 0/83$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + عصاره اتانولی	$5/48 \pm 1/62$	$4/56 \pm 1/55$	$0/28 \pm 0/11$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + عصاره آبی	$8/40 \pm 2/33$	$6/19 \pm 1/52$	$0/57 \pm 0/22$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + ویتامین C	$6/00 \pm 1/97$	$5/87 \pm 2/60$	$0/43 \pm 0/26$
پارامترهای آماری	$f = 81/52, p < 0/001$	$f = 58/30, p < 0/001$	$f = 80/21, p < 0/001$

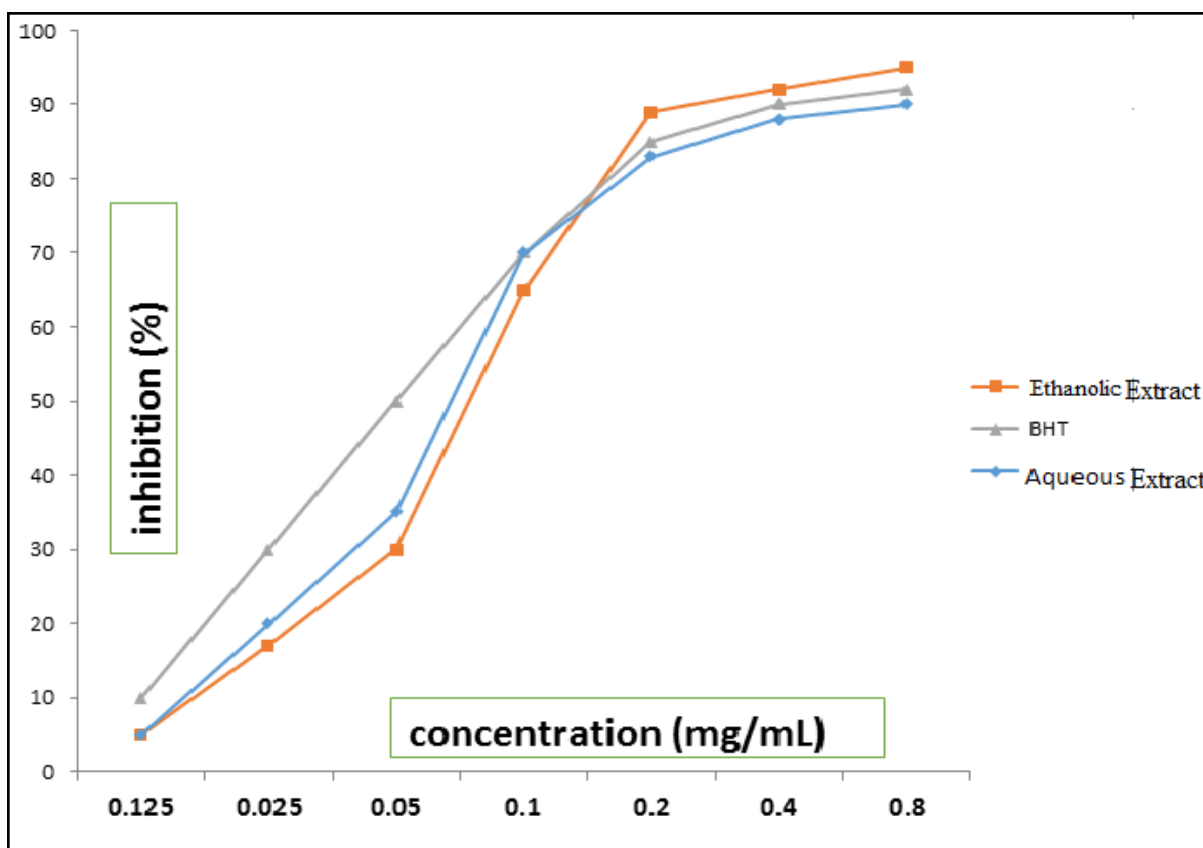
\* تمام مقادیر انحراف معیار  $\pm$  میانگین هستند.

با غلظت های در حال رشد ۹۰ درصد در ۰/۸ mg/mL بود (شکل ۲). اثر مهاری BHT بیشتر از اثرات مهاری عصاره ها در سطح غلظت کمتر بود در حالی که عصاره آویشن شیرازی همان اثر آنتی اکسیدانی را داشت.

همانطور که در جدول ۲ مشاهده می شود، محتویات کل فنلی و محتویات کل فلاونوئیدی عصاره اتانولی بیشتر از عصاره آبی بود. در روش DPPH، یک اثر مهار عالی با عصاره آویشن شیرازی مشاهده شد. اثرات مهار رادیکال های DPPH تقویت شده

جدول ۲- محتوای کل فنلی و محتوای کل فلاونوئیدهای عصاره آویشن شیرازی

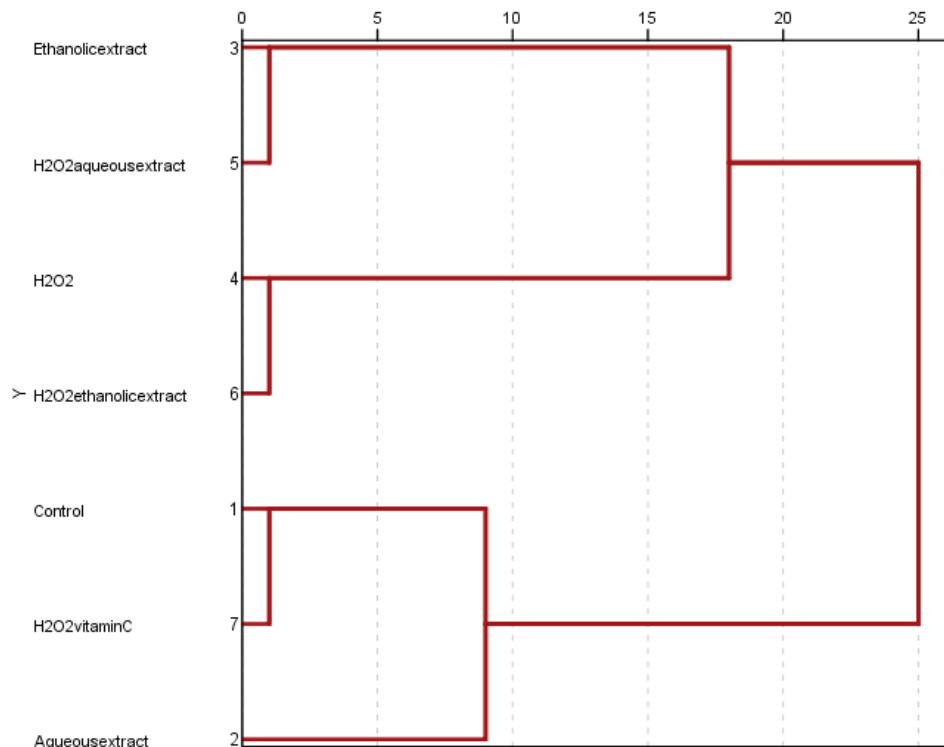
نوع عصاره	محتوای فنلی کل (mgGAE/g)	محتوای فلاونوئیدی کل (QE mgRE/g)
آبی	۲۴۷/۶۴ ± ۲/۱۵	۱۰۸/۱۵ ± ۰/۴۷
اتانولی	۲۶۲/۳۹ ± ۲/۱۵	۱۱۵/۱۸ ± ۰/۵۳



شکل ۲- اثرات مهاري غلظت‌هاي مختلف در عصاره‌هاي آبي و اتانولي آویشن شیرازی و بوتيلیتد هیدروکسیل تولوئن (BHT) بر روی راديکال آزاد DPPH در طول موج ۵۱۷ nm

لنفوسیت‌های انسانی حداکثر مشابه سایر نمونه‌های مورد مطالعه بود. با این حال، گروه‌های کنترل، عصاره اتانولی و  $H_2O_2$  + ویتامین C یک گروه واحد را با فاصله کمتر تشکیل دادند. گروه‌های عصاره آبی و عصاره اتانولی +  $H_2O_2$  یک خوشه مشابه مرتبط با آسیب DNA در فاصله کم را تشکیل دادند (شکل ۳).

شکل ۳ دندروگرام ارتباط بین گروه‌های کنترل، عصاره اتانولی، عصاره آبی،  $H_2O_2$ ،  $H_2O_2$  + عصاره اتانولی،  $H_2O_2$  + عصاره آبی و  $H_2O_2$  + ویتامین C را نشان می‌دهد. از بین هفت گروه مختلف در این مطالعه، گروه  $H_2O_2$  و گروه عصاره آبی +  $H_2O_2$ ، گروه‌های فردی را تشکیل دادند که از لحاظ آسیب DNA در



شکل ۳- دندروگرام ارتباط بین اثرات حفاظتی عصاره‌های آبی و اتانولی آویشن شیرازی بر آسیب‌های DNA در لنفوسیت‌های انسانی

DNA (آلکیله و/یا اکسیداتیو) در مدل‌های مختلف بررسی از آزمایشگاهی تا مطالعات با دخالت انسان جلوگیری کنند (۳).

تأثیر غذاهای گیاهی مورد استفاده در شیمی درمانی، یکی از حوزه‌های ظهور این مواد در نظر گرفته می‌شود. به نظر می‌رسد که آزمون کامت می‌تواند روش مفیدی برای پی بردن به نقش ماده غذایی گیاهی در شیمی درمانی باشد (۳۴).

در یک مطالعه قبلی روی سلول‌های لنفوسیت انسانی، غلظت ۱۰ تا ۲۸۰  $\mu M$  پراکسید هیدروژن باعث تحریک آسیب DNA شد (۳۵). در مطالعه حاضر، از غلظت‌های مختلف

## بحث

مطالعه حاضر اثرات حفاظتی عصاره آویشن شیرازی بر آسیب DNA در لنفوسیت‌های انسانی را در حضور  $H_2O_2$  مورد بررسی قرار داد و نتایج نشان داد که آسیب DNA، در لنفوسیت‌های در معرض عصاره اتانولی آویشن شیرازی به طور قابل توجهی کمتر از لنفوسیت‌های در معرض پراکسید هیدروژن بود. تحقیقات قبلی نشان داده است که سنجش کامت یک روش بسیار کارآمد برای ارزیابی اثرات غذاهای گیاهی بر DNA است (۳۳). برخی از غذاهای گیاهی می‌توانند از آسیب



به ترتیب زیر کاهش یافت:  $\text{thymohydroquinone} > \text{thymoquinone} > \text{thymol}$ . جالب توجه است که اثر مهارى استیل کولین استراز، کارواکرول ۱۰ برابر بیشتر از ایزومر تیمول آن بود، هرچند که تیمول و کارواکرول ساختار بسیار مشابهی داشتند (۴۱). میزان تیمول و کارواکرول عصاره‌های هیدروالکلی به غلظت الکل و روش استخراج گیاه بستگی دارد. عصاره آویشن شیرازی حاوی مقادیر زیادی تیمول و کارواکرول است که میزان آن به روش استخراج و نیز به درجه الکل حلال بستگی دارد. اثرات بیولوژیکی آویشن شیرازی عمدتاً مربوط به ترکیبات فعال زیستی به ویژه تیمول و کارواکرول است (۴۲). اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آویشن شیرازی با روش DPPH بررسی شد. همچنین محتویات کل فلاونوئید و محتویات کل فنلی عصاره‌های آویشن شیرازی مورد بررسی قرار گرفت و نشان داد که عصاره الکی دارای مقادیر بیشتری از ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی است. نتایج نشان داد که اثر عصاره آویشن شیرازی مربوط به ترکیبات شیمیایی آنها مانند فلاونوئیدها، اسیدهای فنولیک و دی‌ترین‌های فنلی است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارند (۴۳).

در مطالعه Li و همکاران مشخص گردید که عصاره گیاه *Arabidopsis* در تعمیر آسیب‌های DNA ناشی از نور مافوق بنفش و مواد شیمیایی مؤثر است (۴۴). مطالعه حاضر نیز نشان از اثرات آویشن در جلوگیری از آسیب DNA ایجاد شده توسط  $\text{H}_2\text{O}_2$ ، در لنفوسیت‌های انسان دارد. در مطالعه Yang و همکاران مشخص شد که عصاره آبی *Gracilaria tenuistipitata* نقش محافظتی علیه آسیب DNA ناشی از آب اکسیژنه با غلظت ۰/۰۳ درصد در سلول‌های H1290 در ۳۷ درجه سلسیوس دارد (۴۵). همسو با مطالعه Yang و همکاران، مطالعه حاضر هم اثرات کاهش آسیب DNA توسط عصاره آویشن را نشان داد. Soltani و همکاران اثر Umbelliprenin را بر روی لنفوسیت‌ها با غلظت‌های ۱۰-۴۰۰  $\mu\text{M}$  بررسی نمودند. نتایج نشان داد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیب از ویتامین C با همین

پراکسید هیدروژن برای ایجاد استرس اکسیداتیو استفاده شد. از طرف دیگر از ویتامین C، به عنوان یک جاذب رادیکال آزاد و جلوگیری کننده از استرس اکسیداتیو، استفاده گردید (۳۶). براساس نتایج تحقیقات قبلی، ویتامین C می‌تواند از خطرات سرطان ریه و معده جلوگیری کند. ویتامین C (محلول در آب) یکی از آنتی‌اکسیدان‌های رژیمی است که با استفاده از سنجش کامت مورد مطالعه قرار گرفته است. برخی از مطالعات نشان داده است که آسیب کمتری در اثر پراکسید هیدروژن و یا تشعشع در DNA ایجاد می‌شود، اگر سلول‌های لنفوسیتی انسان پس از مجاورت با این عوامل، چند ساعت در حضور ویتامین C قرار گرفته باشند (۳۷).

مطالعه حاضر به بررسی اثرات ضد ژنوتوکسیک، عصاره‌های آبی و اتانولی آویشن شیرازی در غلظت‌های مختلف و سنجش قدرت جلوگیری از آسیب DNA ناشی از این عصاره‌ها پرداخت. سنجش کامت یک روش قدرتمند، ظریف، ساده و سریع برای اندازه‌گیری آسیب DNA است (۳۸). تشکیل رادیکال‌های آزاد در طول متابولیسم بیولوژیکی ممکن است باعث جهش زایی و سمیت ژنتیکی در بدن انسان شود. برخی از عوامل ژنوتوکسیک (مانند پراکسید هیدروژن) مستقیماً با DNA مقابله نمی‌کنند (۳۹). علاوه بر این، پراکسید هیدروژن می‌تواند رادیکال‌های آزاد بسیار فعال را در حضور یون‌های فلزی توسط واکنش فنتون تولید کند (۴۰). در این تحقیق، پراکسید هیدروژن در غلظت  $100 \mu\text{M}$  به دلیل تحریک استرس اکسیداتیو، به DNA آسیب رساند. علاوه بر این، هیچ یک از عصاره‌های الکی و آبی باعث آسیب DNA در لنفوسیت‌های انسانی نشدند. عصاره اتانولی آویشن شیرازی بیش از عصاره آبی آن، اثرات محافظتی در برابر آسیب DNA ناشی از پراکسید هیدروژن نشان داد که با یافته‌های چندین مطالعه که نشان می‌دهد آویشن شیرازی جهش زایی را در لنفوسیت انسان مهار می‌کند، مطابقت دارد. ترکیبات شیمیایی مانند تیمول، کارواکرول، تیموکینون و تیموهیدروکینون برای مهار استیل کولین استراز (AChE) مورد آزمایش قرار گرفتند. پتانسیل مهارى استیل کولین استراز

که آسیب DNA در لنفوسیت‌های در معرض عصاره اتانولی آویشن شیرازی به طور قابل توجهی کمتر از لنفوسیت‌های در معرض  $H_2O_2$  بود. همچنین مشخص گردید که عصاره آویشن شیرازی به طور قابل توجهی قادر به مهار رادیکال‌های DPPH است. عصاره اتانولی نسبت به عصاره آبی آویشن شیرازی در جلوگیری از آسیب DNA در لنفوسیت‌های انسانی اثر بهتری داشت. اثر محافظتی عصاره آویشن شیرازی در برابر آسیب اکسیداتیو DNA و حذف رادیکال‌های آزاد ممکن است در زندگی روزمره بسیار مؤثر باشد و منجر به افزایش سلامت و طول عمر شود. بنابراین، عصاره آویشن شیرازی می‌تواند به عنوان یک کاندیدای طبیعی و مقرون به صرفه برای جلوگیری از بیماری‌های ناشی از آسیب DNA استفاده شود.

### ملاحظات اخلاقی

نویسندگان کلیه نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

### تشکر و قدردانی

محققین از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران به دلیل حمایت مالی و مساعدت و همکاری در انجام این طرح پژوهشی (کد طرح ۲۰۸۱۸-۲۷-۰۴-۹۱)، تشکر می‌نمایند. همچنین از نمونه‌های مورد پژوهش که در این تحقیق شرکت کردند، قدردانی می‌گردد. هیچ کدام از نویسندگان این مطالعه، افراد و یا دستگاه‌ها تعارض منافی برای انتشار این مقاله ندارند.

غلظت‌ها بیشتر بوده است. میزان درصد DNA در دم در گروه کنترل ۳/۷۵ درصد است (۴۶). همسو با مطالعه Soltani، مطالعه حاضر هم اثرات آنتی اکسیدانی عصاره‌های آویشن را در مقایسه با گروه  $H_2O_2$  نشان داد. مشابه با مطالعه حاضر، Behravan و همکاران اثر عصاره آبی و اتانولی گیاه خرفه، را روی آسیب DNA ناشی از  $H_2O_2$  در لنفوسیت‌های انسانی بررسی نمودند. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره آبی با غلظت ۲/۵ mg/mL توانست آسیب DNA را از ۵۲/۵ درصد در حضور آب اکسیژنه به حدود ۳ درصد کاهش دهد (۲۱).

فرآیند استخراج نقش مهمی در تعیین غلظت ترکیبات فعال زیستی دارد. ترکیبات پلی فنول در روش‌های استخراج اتانولی نسبت به روش‌های استخراج آبی رایج‌تر هستند در حالی که ترکیبات پلی ساکارید و گلیکوزیدهای فلاونوئید در عصاره‌های آبی رایج‌تر هستند. بازده پلی فنل‌ها در عصاره آبی کاهش یافت، در حالی که محتوای آنها در طول استخراج در عصاره متانولی و اتانولی افزایش یافت. گروهی از ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی موجود در عصاره آویشن شیرازی دارای خواص کلاتینگ و آنتی اکسیدانی قابل توجهی است. در واقع، آنها از پراکسیداسیون لیپیدی جلوگیری می‌کنند، فلزات فعال شده با اکسیداسیون و کاهش کلات می‌کنند، و سایر روش‌های مربوط به گونه‌های فعال اکسیژن را بهبود می‌بخشند (۴۷).

### نتیجه‌گیری

هدف از این مطالعه تعیین اثرات حفاظتی عصاره آویشن شیرازی بر آسیب DNA در لنفوسیت‌های انسانی بود. نتایج نشان داد

### References

1. Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG: Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2011, 711(1-

2):193-201.

2. Shugart LR: DNA damage as a biomarker of exposure. *Ecotoxicology* 2000, 9(5):329-340.

3. Mishina Y, Duguid EM, He C: Direct reversal of DNA alkylation damage. *Chemical Reviews* 2006, 106(2):215-232.

4. Halliwell B: Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochemical Journal* 2007, 401(1):1-11.
5. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A: Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry* 2006, 52(4):601-623.
6. Takamatsu S, Hodges TW, Rajbhandari I, Gerwick WH, Hamann MT, Nagle DG: Marine natural products as novel antioxidant prototypes. *Journal of Natural Products* 2003, 66(5):605-608.
7. Ramezanpour S, Ardestani F, Asadollahzadeh MJ: Combination Effects of *Zataria multiflora*, *Laurus nobilis* and *Chamaemelum nobile* Essences on Pathogenic *E. coli* and Determination of Optimum Formulation Using Fraction and Factorial Statistical Method. *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 2016, 10(2):53-62.
8. Khazaei J, Arabhosseini A, Khosrobeysi Z: Application of superposition technique for modeling drying behavior of avishan (*Zataria Multiflora*) leaves. *Transactions of The ASABE* 2008, 51(4):1383-1393.
9. Mahboubi M, Bidgoli FG: Antistaphylococcal activity of *Zataria multiflora* essential oil and its synergy with vancomycin. *Phytomedicine* 2010, 17(7):548-550.
10. Zomorodian K, Saharkhiz M, Rahimi M, Bandegi A, Shekarkhar G, Bandegani A, Pakshir K, Bazargani A: Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from three ecotypes of *Zataria multiflora*. *Pharmacognosy Magazine* 2011, 7(25):53.
11. Dini S, Dadkhah A, Fatemi F: Biological Properties of Iranian *Zataria Multiflora* Essential Oils: A Comparative Approach. *Electronic Journal of Biology* 2015.
12. Raeesi M, Tajik H, Rohani SMR, Tepe B, Kiani H, Khoshbakht R, Aski HS, Tadrissi H: Inhibitory effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil, alone and in combination with monolaurin, on *Listeria monocytogenes*. In: *Veterinary Research Forum: 2016: Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran; 2016: 7.*
13. Shariatifar N, Jahed GR, Tooryan F, Rezaei M: Stabilization of Soybean oil by *Rosmarinus officinalis* L. extracts during accelerated storage. *International Journal of PharmTech Research*. 2014, 6(5).
14. Babaie M, Yasa N, Mohammadirad A, Khorasani R, Abdollahi M: On the anti oxidative stress potential of *Zataria multiflora* Boiss (*Avishan shirazi*) in rats. *International Journal of Pharmacology*. 2007, 3(6):510-514.
15. Karinian P, Kavooosi G: Antioxidant, nitric oxide scavenging and malondialdehyde scavenging activity of essential oils from different chemotypes of *Zataria multiflora*. *Clinical Biochemistry* 2011, 13(44):S339.
16. Kavooosi G, da Silva JAT: Inhibitory effects of *Zataria multiflora* essential oil and its main components on nitric oxide and hydrogen peroxide production in glucose-stimulated human monocyte. *Food and Chemical Toxicology* 2012, 50(9):3079-3085.
17. Kavooosi G: *Zataria multiflora* essential oil reduces diabetic damages in streptozotocin-induced diabetic rats. *African Journal of Biotechnology* 2011, 10(76):17632-17639.
18. Sajed H, Sahebkar A, Iranshahi M: *Zataria multiflora* Boiss. (*Shirazi thyme*)--an ancient condiment with modern pharmaceutical uses. *Journal of Ethnopharmacology* 2013, 145(3):686-698.
19. Nasserli M, Golmohammadzadeh S, Arouiee H, Jaafari MR, Neamati H: Antifungal activity of *Zataria*

- multiflora essential oil-loaded solid lipid nanoparticles in-vitro condition. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2016, 19(11):1231.
20. Yen GC, Hsieh CL: Inhibitory effect of *Eucommia ulmoides* Oliv. on oxidative DNA damage in lymphocytes induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 2003, 23(S1):23-34.
21. 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage in lymphocytes by comet assay. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies* 2011, 4(3):193-197.
22. Kianmehr M, Amiri M, Ebrahimzadeh-Bideskan A, Hajavi J: DNA damage assessment in the lymphocytes of construction painters by comet assay. *Toxicology and industrial Health* 2016, 32(11):1902-1909.
23. Kianmehr M, Hajavi J, Gazeri J: Assessment of DNA damage in blood lymphocytes of bakery workers by comet assay. *Toxicology and Industrial Health* 2017, 33(9):726-735.
24. Block G, Dietrich M, Norkus EP, Morrow JD, Hudes M, Caan B, Packer L: Factors associated with oxidative stress in human populations. *American Journal of Epidemiology* 2002, 156(3):274-285.
25. Singh N: A comparison of both water and ethanol extracts prepared from *Echinacea purpurea* and *Echinacea angustifolia* on the response to Influenza A/PR/8/34 infection in mice. Iowa State University; 2010.
26. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki Y: Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2000, 35(3):206-221.
27. Duty SM, Singh NP, Silva MJ, Barr DB, Brock JW, Ryan L, Herrick RF, Christiani DC, Hauser R: The relationship between environmental exposures to phthalates and DNA damage in human sperm using the neutral comet assay. *Environmental Health Perspectives* 2003, 111(9):1164-1169.
28. González M, Soloneski S, Reigosa M, Larramendy M: Genotoxicity of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid dimethylamine salt. I. Evaluation of DNA damage and cytogenetic endpoints in Chinese Hamster ovary (CHO) cells. *Toxicology in Vitro* 2005, 19(2):289-297.
29. Kamkar A, Ardekani MRS, Shariatifar N, Misagi A, Nejad ASM, Jamshidi AH: Antioxidative effect of Iranian *Pulicaria gnaphalodes* L. extracts in soybean oil. *South African Journal of Botany* 2013, 85:39-43.
30. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM: [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: *Methods in Enzymology*. vol. 299; 1999: 152-178.
31. Lin J-Y, Tang C-Y: Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry* 2007, 101(1):140-147.
32. Ghelichkhani G, Modaresi MH, Rashidi L, Shariatifar N, Homapour M, Arabameri M: Effect of the spray and freeze dryers on the bioactive compounds of olive leaf aqueous extract by chemometrics of

- HCA and PCA. *Journal of Food Measurement and Characterization* 2019, 13(4):2751-2763.
33. Kolsek K, Sollner Dolenc M, Mavri J: Computational study of the reactivity of bisphenol A-3,4-quinone with deoxyadenosine and glutathione. *Chemical Research in Toxicology* 2013, 26(1):106-111.
34. Ribeiro LR, Salvadori DM: Dietary components may prevent mutation-related diseases in humans. *Mutation Research* 2003, 544(2-3):195-201.
35. Yen G-C, Duh P-D, Su H-J: Antioxidant properties of lotus seed and its effect on DNA damage in human lymphocytes. *Food Chemistry* 2005, 89(3):379-385.
36. Yen G-C, Duh P-D, Tsai H-L: Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chemistry* 2002, 79(3):307-313.
37. Wasson GR, McKelvey-Martin VJ, Downes CS: The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. *Mutagenesis* 2008, 23(3):153-162.
38. Speit G, Rothfuss A: The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *DNA Repair Protocols* 2012:79-90.
39. Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic M, Mazur M: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological Interactions* 2006, 160(1):1-40.
40. Young I, Woodside J: Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology* 2001, 54(3):176-186.
41. Jukic M, Politeo O, Maksimovic M, Milos M, Milos M: In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. *Phytotherapy Research* 2007, 21(3):259-261.
42. Aghamohammadi A, Azadbakht M, Hosseinimehr SJ: Quantification of thymol content in different extracts of *Zataria multiflora* by HPLC method. *Pharmaceutical and Biomedical Research* 2016, 2(1):8-13.
43. Alizadeh A, Alizadeh O, Amari G, Zare M: Essential oil composition, total phenolic content, antioxidant activity and antifungal properties of Iranian *Thymus daenensis* subsp. *daenensis* Celak. as influenced by ontogenetical variation. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 2013, 16(1):59-70.
44. Li A, Schuermann D, Gallego F, Kovalchuk I, Tinland B: Repair of damaged DNA by Arabidopsis cell extract. *The Plant Cell* 2002, 14(1):263-273.
45. Yang J-I, Yeh C-C, Lee J-C, Yi S-C, Huang H-W, Tseng C-N, Chang H-W: Aqueous extracts of the edible *Gracilaria tenuistipitata* are protective against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage, growth inhibition, and cell cycle arrest. *Molecules* 2012, 17(6):7241-7254.
46. Soltani F, Mosaffa F, Iranshahi M, Karimi G, Malekaneh M, Haghighi F, Behravan J: Evaluation of antigenotoxicity effects of umbelliprenin on human peripheral lymphocytes exposed to oxidative stress. *Cell Biology and Toxicology* 2009, 25:291-296.
47. Mohebbati R, Paseban M, Soukhtanloo M, Jalili-Nik M, Shafei MN, Yazdi AJ, Rad AK: Effects of standardized *Zataria multiflora* extract and its major ingredient, Carvacrol, on Adriamycin-induced hepatotoxicity in rat. *Biomedical Journal* 2018, 41(6):340-347.



Available online: <https://ijhe.tums.ac.ir>

Original Article



## Antigenotoxicity effects of *Zataria multiflora* Boiss on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage in human lymphocytes by comet assay

Nabi Shariatifar<sup>1</sup>, Jafar Hajavi<sup>2</sup>, Seyed Hosein Abtahi Eivary<sup>3</sup>, Mojtaba Kianmehr<sup>4,\*</sup>

- 1- Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 2- Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Infectious Diseases Research Center, Gonabad University of Medical Science, Gonabad, Iran
- 3- Department of Medical Sciences of Laboratory, Infectious Diseases Research Center, Faculty of Para-Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran
- 4- Department of Medical Physics, Faculty of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran

### ARTICLE INFORMATION:

**Received:** 24 December 2022  
**Revised:** 05 March 2023  
**Accepted:** 11 March 2023  
**Published:** 15 March 2023

**Keywords:** DNA damage, Human lymphocytes, *Zataria multiflora* Boiss, Comet assay

**\*Corresponding Author:**  
Kianmehr.m@gmail.com

### ABSTRACT

**Background and Objective:** The present study aimed to explore the shielding effects of aqueous and ethanolic extracts of *Zataria multiflora* Boiss on human lymphocyte DNA damage using the comet assay.

**Materials and Methods:** This study was conducted as a laboratory experiment to investigate the protective effects of thyme in preventing DNA damage. Peripheral blood lymphocytes were isolated from 16 healthy volunteers. First, the cells were treated with 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and aqueous and alcoholic extracts of thyme leaves with a concentration of 2.5 mg/mL separately. Finally, the cells were incubated in a mixture of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to cause DNA damage with each of the two aqueous and alcoholic extracts at 4°C for 30 minutes. The amount of DNA migration in cells was measured using the Comet method, and DNA damage was expressed as three indicators: sequence length, percentage of DNA in the sequence, and the amount of sequence movement.

**Results:** The results showed that the DNA damage of lymphocytes exposed to the ethanolic extract of *Z. multiflora* Boiss was significantly lesser than the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated lymphocytes. In addition, tail length ( $\mu$ m) was 5.48 $\pm$ 1.62 versus 22.82 $\pm$ 6.90, tail DNA (%) was 4.56 $\pm$ 1.55 in contrast to 16.00 $\pm$ 4.55, and tail moment ( $\mu$ m) was 0.28 $\pm$ 0.11 against 2.33 $\pm$ 0.83 ( $p < 0.001$ ). The results showed that *Z. multiflora* Boiss aqueous and ethanolic extracts were significantly able to scavenge DPPH radicals through a possible radical scavenging activity mechanism.

**Conclusion:** As a result, the ethanolic extract had a better effect than the aqueous extract of *Z. multiflora* Boiss in preventing oxidative DNA damage to human lymphocytes.

Please cite this article as: Shariatifar N, Hajavi J, Abtahi Eivary SH, Kianmehr M. Antigenotoxicity effects of *Zataria multiflora* Boiss on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage in human lymphocytes by comet assay. *Iranian Journal of Health and Environment*. 2023;15(4):737-50.

