

Protective effects of hydroalcoholic extract of ginger on DNA damage and viability of PC12 cells exposed to sodium dithionite

Mohammad Shokrzadeh¹,
Ramin Ataee²,
Emran habibi³,
Mahboube Rahmati Kukandeh⁴
Maryam Alizade Chapi⁵
Saba Asemi⁶,
Elahe Gharehkhani⁷,

¹ Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Associate Prof, Pharmaceutical Sciences research center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Associate Prof, Department of Pharmacognosy and Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran

⁴ PhD in Toxicology, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

⁶ Pharmacy Student, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

⁷ PhD in Toxicology, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received October 30, 2024; Accepted September 2, 2025)

Abstract

Background and purpose: This study focused on sodium dithionite, a chemical widely used in various industries, which causes oxidative damage to cells and DNA. Considering the well-known antioxidant properties of ginger, the research investigated the effects of hydroalcoholic ginger extract on genetic damage and cell viability. The study specifically evaluated how the extract influenced genetic disorders and improved the survival of PC12 cells that were exposed to the harmful effects of sodium dithionite.

Materials and methods: In this experimental study, PC12 cells were treated with varying concentrations of ginger extract (200, 400, and 600 mg/ml) together with sodium dithionite at its IC₅₀ concentration. Following exposure, cell viability was evaluated using the MTT assay to determine the extract's protective effects. Additionally, DNA damage was quantified using the alkaline Comet assay, which provided insights into the genotoxic effects of sodium dithionite and the potential reduction by ginger extract. All data were statistically analyzed using GraphPad Prism software, with a significance threshold set at $p < 0.05$ to identify meaningful differences between treated and control groups.

Results: The results showed that ginger extract in the maximum concentration (600 mg/ml) maintains cell survival ($P < 0.001$). In addition, the extract caused a significant reduction in DNA damage, and this effect was the most pronounced at the high concentration (600 mg/ml) ($P < 0.001$).

Conclusion: The hydroalcoholic extract of ginger exhibits protective effects against oxidative damage induced by sodium dithionite in PC12 cells. These results indicate that ginger can be used as a protective agent against damage caused by oxidative stress.

Keywords: ginger, sodium dithionite, oxidative stress, DNA damage, PC12 cells

J Mazandaran Univ Med Sci 2025; 35 (248): 32-44 (Persian).

Corresponding Author: Elahe Gharehkhani - Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
(E-mail: egh199012@gmail.co)

اثرات محافظتی عصاره هیدروالکلی زنجبیل بر آسیب DNA و حیات سلول PC12 مواجه شده با سدیم دی تیونیت

محمد شکرزاده^۱رامین عطایی^۲عمران حبیبی^۳محبوبه رحمتی کوکنده^۴مریم علیزاده چپی^۵صبا عاصمی^۶الهه قره خانی^۷

چکیده

سابقه و هدف: این مطالعه بر روی سدیم دیتیونیت، یک ماده شیمیایی که به طور گسترده در صنایع مختلف استفاده می شود و باعث آسیب اکسیداتیو به سلول ها و DNA می شود، متمرکز بود. با توجه به خواص آنتی اکسیدانی شناخته شده زنجبیل، این مطالعه با هدف بررسی اثرات عصاره هیدروالکلی زنجبیل را بر آسیب ژنتیکی و زنده ماندن سلول ها، انجام پذیرفت. این مطالعه به طور خاص ارزیابی کرد که چگونه این عصاره بر اختلالات ژنتیکی تأثیر می گذارد و بقای سلول های PC12 را که در معرض اثرات مضر سدیم دیتیونیت قرار گرفته اند، بهبود می بخشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، سلول های PC12 با غلظت های مختلف عصاره زنجبیل (۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) در کنار دی تیونیت سدیم در غلظت IC₅₀ آن تیمار شدند. پس از مواجهه، زنده ماندن سلول ها از طریق سنجش MTT ارزیابی شد تا اثرات محافظتی عصاره مشخص شود. علاوه بر این، میزان آسیب DNA با استفاده از سنجش Comet قلیایی اندازه گیری شد که دیدگاهی در مورد تأثیر ژنوتوکسیک دی تیونیت سدیم و کاهش احتمالی آن توسط عصاره زنجبیل ارائه می دهد. تمام داده ها با استفاده از نرم افزار Prism و با آستانه معنی داری $p < 0.05$ تجزیه و تحلیل آماری شدند تا تفاوت های معنی دار بین گروه های تیمار شده و کنترل مشخص شود.

یافته ها: نتایج نشان داد که عصاره زنجبیل در غلظت ماکسیمم (۶۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) باعث حفظ بقای سلول ها شد ($p < 0.001$). علاوه بر این، عصاره باعث کاهش قابل توجهی در میزان آسیب DNA در سلول ها شد که این اثر در غلظت بالا (۶۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) بیش ترین میزان را داشت ($P < 0.001$).

استنتاج: عصاره هیدروالکلی زنجبیل دارای اثرات محافظتی در برابر آسیب های اکسیداتیو ناشی از سدیم دیتیونیت در سلول های PC12 است. زنجبیل می تواند به عنوان یک عامل محافظتی در برابر آسیب های ناشی از استرس اکسیداتیو مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: زنجبیل، سمیت ژنتیکی، سلول PC12، سدیم دی تیونیت

E-mail: egh199012@gmail.com

مؤلف مسئول: الهه قره خانی - دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران. دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۱. استاد، گروه سم شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران. گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

۲. دانشیار مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران. موسسه هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. دانشیار گروه فارماکولوژی و بیوتکنولوژی، دانشگاه داروسازی، مازندران

۴. دکترای تخصصی سم شناسی، گروه سم شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۵. کارشناس آزمایشگاه، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

۶. دانشجوی داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۷. دکترای تخصصی سم شناسی، گروه سم شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران. مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ تصویب: ۱۴۰۴/۶/۱۱

تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۳/۸/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۸/۹

مقدمه

سدیم دیتیونیت یا هیدروسولفیت سدیم ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) (SDT) یک پودر کریستالی بسیار واکنش پذیر و سفید رنگ با بوی گوگرد است. به طور گسترده به عنوان یک عامل کاهنده و سفید کننده قوی در بسیاری از زمینه ها از جمله علوم زیستی، نساجی، کاغذ سازی، صنایع غذایی استفاده می شود. در صنایع فرآوری مواد غذایی، سدیم دیتیونیت به عنوان عامل سفید کننده و بهبود کیفیت ظاهری مواد غذایی، به فرآورده های غذایی اضافه می شود (۱). سدیم دیتیونیت به طور گسترده در نان های صنعتی، محصولات قندی و کنسرو استفاده می شود. استفاده از این افزودنی های شیمیایی در محصولات غذایی مختلف تهدیدی جدید برای سلامت انسان می باشد (۲). در صورت مصرف این ترکیب در مواد غذایی، پس از ورود آن به دستگاه گوارش، سبب از بین رفتن پرزهای معده و روده می گردد و در دراز مدت با حذف آنتی اکسیدان های این دستگاه، موجب تسریع در سرطان بخش های گوارشی می شود گزارش شده است که سدیم دی تیونیت سبب هایپوکسی شیمیایی می شود که می تواند شرایط هایپوکسی /ایسکمیک را تقلید کند (۳). با اکسید سدیم دیتیونیت در شرایط بسیار اسیدی و بی هوازی (مانند دستگاه گوارش) دی اکسید گوگرد سمی آزاد و سپس هیدروژن سولفیت و تیوسولفات تشکیل می شود، بنابراین، این امکان وجود دارد که سولفیت هیدروژن توسط دستگاه گوارش جذب شود. سدیم هیدروژن سولفیت هم چنین در مسدود کردن آنزیم های بدن به ویژه انسولین موثر است. بنابراین به طور مستقیم دیابت را در افراد تسریع می کند (۴). سدیم دیتیونیت باعث از بین رفتن پتانسیل غشای میتوکندری می شود. این نشان می دهد که سیگنال دهی از طریق میتوکندری نقش کلیدی در آپوپتوز ناشی از آن را ایفا می کند (۲). دی اکسید گوگرد (SO_2) که باعث ایجاد رادیکال های آزاد می شود و می تواند باعث هیپوکسی شود که مسئول اختلالات متعددی از جمله سمیت اندام ها

و آسیب به عملکرد آن ها است (۳). تولید ROS مهار نشده و سطح ROS کنترل نشده هم چنین می تواند متاستاز سلول های سرطانی و روند سرطان را افزایش دهد. همچنین ROS می تواند از سیستم ایمنی حمایت کند، اما تولید بیش از حد، سیتوتوکسیک می شوند. ROS هم در مرگ سلول های T ناشی از فعال سازی و هم در مرگ خود مختار سلول T فعال نقش دارد. آسیب اکسیداتیو منجر به آسیب سلولی روی DNA، پروتئین و لیپیدها می شود (۵). سدیم دیتیونیت توانایی ایجاد ناهنجاری های کروموزومی و ناباروری را دارد (۶). از جمله خطوط دفاعی سلول ها در برابر رادیکال های آزاد، پروتئین گلو تاتیون به منظور به دام انداختن آن ها می باشد. گلو تاتیون (GSH) یک تری پپتید تیول با بار منفی درون سلولی رایج است که نه تنها در حفظ پتانسیل اکسیداسیون و کاهش سیتوزولی و دفاع در برابر استرس اکسیداتیو بلکه در بسیاری از فرآیندهای سلولی دیگر از جمله سنتز پروتئین و اسید نوکلئیک، ترشح برون ریز و تحمل حرارت و تنظیم چرخه سلولی، تکثیر نقش دارد. هم چنین تعیین کننده اصلی حالت ردوکس سلولی و دفاع در برابر استرس اکسیداتیو است. در داخل سلول ها جمع می شود و در خارج از سلول ها تجزیه می شود و تحت شرایط مختلف فیزیولوژیکی و پاتوفیزیولوژیکی آزاد می شود (۷). ریشه زنجبیل (ریزوم *Zingiber officinale* Roscoe, Zingiberaceae) هزاران سال است که به عنوان چاشنی غذا و داروی گیاهی برای مراقبت های بهداشتی و پیشگیری از بیماری ها استفاده می شود. استفاده سنتی از زنجبیل به عنوان داروی گیاهی به فعالیت جینجرول ها (۶-، ۸- و ۱۰- gingerols و ۶-shogaol) نسبت داده می شود که از اجزای اصلی فعال زیستی در زنجبیل محسوب می شوند (۸). زنجبیل معمولاً به عنوان ادویه مصرف می شود. در طب سنتی گیاهی از زنجبیل برای درمان سرما خوردگی بیماری های گوارشی، روماتیسم، نورالژی، قولنج و بیماری حرکت استفاده می شود. زنجبیل دارای خواص آنتی اکسیدانی است (۹).

با توجه به مصرف مداوم سدیم دیتیونیت و عوارض عصبی و جدی آن و هم‌چنین عدم مطالعه کافی در نمونه‌های *in vitro* و هم‌چنین اثر عصاره زنجبیل بر استرس اکسیداتیو، این مطالعه طراحی و انجام شد. در مطالعه حاضر اثرات محافظتی عصاره هیدروالکلی زنجبیل بر آسیب ژنتیکی و حیات سلولی ناشی از سدیم دی‌تیونیت بر رده سلولی PC12 مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این تجربی، با کد اخلاق در IR.MAZUMS.REC.1402.354 معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران به ثبت رسیده است. در این مطالعه از عصاره گیاه زنجبیل، سدیم دی‌تیونیت (کد ۱۰۶۵۰۷) و رده سلولی PC12 استفاده شد. گروه‌های مورد مطالعه در این تحقیق، ۱، گروه کنترل منفی (عدم تیمار)، ۲، گروه کنترل مثبت (دریافت کننده سدیم دی‌تیونیت در غلظت اپتیمم)، ۳، گروه‌های تیمار شده (pre treat) با عصاره زنجبیل در غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در مواجهه با سدیم دی‌تیونیت در غلظت اپتیمم و ۴، گروه دریافت کننده عصاره زنجبیل در غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به تنهایی، بوده است.

برای تهیه عصاره، از گیاه زنجبیل تهیه شده در شهرستان ساری استفاده شد. مقدار ۱۰۰ گرم از پودر گیاه زنجبیل در داخل بشر حاوی اتانول ۷۰ درصد (به عنوان حلال) ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در شیکر قرار گرفت. سپس محلول توسط کاغذ صافی جدا و برای حذف حلال در روتاری تحت دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در نهایت نمونه عصاره توسط دستگاه فریز درایر به صورت پودر خشک تهیه شد (۱۴).

روش ظرفیت مهارکنندگی رادیکال (DPPH)

ابتدا ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH به ۱ میلی‌لیتر از عصاره اضافه و مخلوط حاصل به خوبی

عصاره‌های زنجبیل سرشار از جینجرول‌ها و شو‌گاول‌ها هستند که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد قارچی و ضد سرطانی، هم در داخل بدن و هم در شرایط آزمایشگاهی هستند (۱۰). مهم‌ترین اجزای فعال زیستی که مسئول فعالیت‌های دارویی مختلف زنجبیل هستند، جینجرول‌ها هستند، گروهی از ترکیبات فنلی شامل ۶-، ۸-، ۱۰-جینجرول که جزء اصلی آن ۶-جینجرول است (۱۱). اقدامات محافظتی جینجرول‌ها از طریق مهار رادیکال‌های آزاد و تعدیل سطح آنزیم‌های سم‌زدایی انجام می‌شود (۸). هم‌چنین در تحقیقات انجام شده مشخص گردید که زنجبیل می‌تواند باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول در ترکیب با سایر مواد شود. به‌عنوان مثال زنجبیل با آنتوسیانین، باعث افزایش محتوای GSH از وضعیت ردوکس سلولی در برابر استرس اکسیداتیو القایی شده و هم‌چنین از طریق کاهش فعالیت آنزیم GPx القایی و صرفه جویی در فعالیت آنزیم SOD بر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی سلولی تأثیر مثبتی بر سلول‌های Caco-2 گذاشتند (۸).

اخیراً آزمایش‌های سمیت عصبی بر روی بیماری‌های سیستم عصبی، بیش‌تر بر مدل‌های حیوانی متکی هستند. سلول‌های فئوکروموسیتوم موش صحرایی PC12 یک مدل پرکاربرد در نوروبیولوژی ارائه می‌دهند زیرا برخی از ویژگی‌های نورون‌های دوپامینرژیک بالغ را نشان می‌دهند و در تحقیقات علوم اعصاب، از جمله مطالعات در مورد سمیت عصبی، محافظت عصبی، ترشح عصبی، التهاب عصبی و سیناپتوزن مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۲). این سلول‌ها در شرایط کشت آزمایشگاهی و تحت تأثیر فاکتورهای القایی به سلول‌هایی با مورفولوژی شبه عصبی تبدیل می‌شوند. نتایج تحقیقات نشان داد که فاکتورهای رشد از جمله فاکتور رشد عصبی NGF (Nerve Growth Factor) و فاکتور رشد فیروبلاستی bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) در فرایندهای مختلفی از جمله تکثیر، بقا و تمایز این سلول‌ها موثر می‌باشند (۱۳).

تکان داده شد سپس به مدت ۳۰ دقیقه در محیط تاریک قرار گرفت و جذب مخلوط توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در ۵۴۲ نانومتر با بلانک متانول قرائت گردید. آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد استفاده شد و در نهایت، مقدار به دام اندازی رادیکال DPPH با فرمول زیر محاسبه گردید (۱۵).

$$\text{درصد مهار رادیکال آزاد} = (A_0 - A_s) / A_0 \times 100$$

A₀ - جذب شاهد
A_s - جذب عصاره مورد آزمایش

اندازه گیری فلاونوئیدها

میزان محتوی فلاونوئید عصاره هیدروالکلی از طریق روش های رنگ سنجی ارزیابی شد. غلظت ۴۰۰ میکروگرم/میلی لیتر از عصاره تهیه شد. ۰/۵ میلی لیتر از عصاره در ۱/۵ میلی لیتر متانول حل و سپس ۰/۱ میلی لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد به آن اضافه شد، سپس ۰/۱ میلی لیتر از محلول استات پتاسیم ۱ مولار و در نهایت ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر هم به آن اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگه داری شد و سپس جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی- ماورا بنفش اندازه گیری شد. کوئرستین به عنوان نمونه استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده گردید. میزان فلاونوئید بر اساس میزان معادل «میلی گرم اکی والان کوئرستین در گرم عصاره» گزارش شد (۱۶).

اندازه گیری محتوای تام فنلی

محتوای ترکیبات فنلی از طریق متد فولین سیو کالتو انجام شد. غلظت ۴۰۰ میکروگرم/میلی لیتر از عصاره تهیه شد. ۰/۵ میلی لیتر از عصاره با ۲/۵ میلی لیتر واکنش گر ۰/۲ نرمال فولین سیو کالتو مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه هم زده شد. سپس ۲ میلی لیتر محلول کربنات سدیم با غلظت ۷۵ گرم در لیتر اضافه شد. جذب نمونه ها پس از ۲ ساعت در دمای اتاق توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ماورا بنفش در ۷۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. نتایج به صورت مقادیر هم ارز با استاندارد گالیک اسید بیان شد، به این

صورت که میانگین جذب حاصل در معادله خط به دست آمده از ترسیم منحنی استاندارد گالیک اسید قرار داده شد و نتیجه به عنوان محتوی تام فنلی عصاره بر اساس میزان معادل «میلی گرم اکی والان گالیک اسید در گرم عصاره» گزارش شد (۱۶).

کشت سلولی

در این مطالعه از رده سلولی PC12 خریداری شده از بانک سلولی انیستیتو پاستور به صورت فریز و منجمد شده، استفاده گردید. رده سلولی در محیط کشت RPMI-1640 با افزودن ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۱ درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین-استرپتومایسین کشت و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و رطوبت کافی و میزان ۵ درصد دی اکسید کربن نگهداری شد و بررسی گردید تا وقتی که به ۷۰ درصد رشد خود رسیدند، سلول ها را توسط تریپسین + EDTA از ته فلاسک جدا و با دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد و رسوب سلولی ایجاد شده را به حالت سوسپانسیون تهیه و برای درصد زنده ماندن سلول ها از رنگ تریپان بلو و لام همو سائتومر توسط میکروسکوپ نوری استفاده گردید (۱۷، ۱۸).

تیمار سلول ها

بدین منظور ۲۴ ساعت پس از کاشت سلول ها، عصاره هیدروالکلی زنجبیل با غلظت های ۲۰۰ و ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر به سلول ها برای مدت ۲۴ ساعت مواجهه شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت با غلظت اپتیمم (IC₅₀) ۰/۰۴۸ میلی گرم بر میلی لیتر سدیم دی تیونیت تنها به مدت ۱ ساعت مواجهه و سپس تست کامت انجام شد (۱۹، ۲۰).

اندازه گیری ROS

محلول استوک DCFH-DA به صورت ۱۰ میلی مولار در DMSO تهیه شده و در ۴ درجه نگهداری

شد. محلول لیز کننده مشابه محلول لیز کننده مورد استفاده در روش کامت تهیه شد. سلول‌های انکوبه شده با داروهای مورد نظر طبق پروتکل زمانی مشخص ۲ بار با HBSS شسته شدند. محلول کار DCFH-DA به صورت ۱۰۰ میکرومولار در HBSS از محلول استوک اولیه تهیه شد. محلول کار DCFH-DA به سلول‌ها اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه شد. محلول DCFH-DA از محیط خارج شده و سپس سلول‌ها ۲ بار دیگر با HBSS شسته شدند. محلول لیز کننده سرد به سلول‌ها اضافه شده و پس از ۱ دقیقه محتویات چاهک‌ها (2800g; 5 min) جمع‌آوری شده و سانتریفوژ شد. ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی به دو چاهک از پلیت ۹۶ خانه منتقل شد و میزان فلورسنس توسط میکرو پلیت ریدر اندازه گیری شد (Excitation: 485 nm, emission: 530 nm). در تمام مراحل سلول‌ها در مکان تاریک بودند (استفاده از فویل آلومینیومی) و H_2O_2 ۰/۱ میلی‌مولار به عنوان کنترل مثبت و سلول‌های انکوبه شده با محیط کشت به تنهایی به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد (۲۱).

اندازه گیری پراکسید/سیون لیپیدی

پس از انکوباسیون سلول‌ها با ترکیبات به ترتیب مذکور میزان پراکسیداسیون لیپیدی براساس روش تیوبایوتوریک اسید اندازه گیری شد. بدین ترتیب که به ۲ml از سوپانسیون سلولی و ۰/۱ ml از معرف TBA شامل 0.5 HCl نرمال، 15% TCA و 0.3% TBA اضافه شد و به خوبی مخلوط و در حمام آب گرم به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید و بعد از سرد شدن به آن 0.2 n -ml بوتانل اضافه شد و خوب تکان داده و سپس در 3500 rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. لایه n- بوتانل برای سنجش در طول موج 532 nm جدا شد و مقدار TBARs از روی منحنی استاندارد محاسبه گردید (۲۲).

روش کامت

لام‌های تست کامت با آگارز با ذوب معمولی (NMA)، ۱ درصد پوشانده شدند و به مدت یک روز

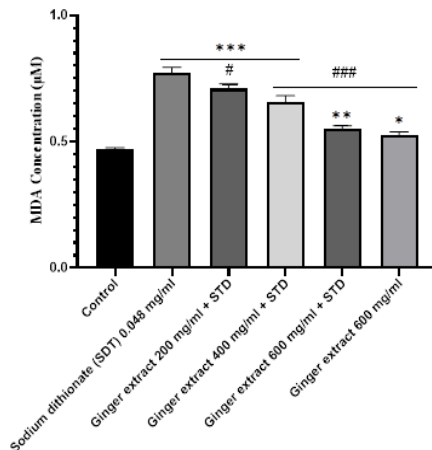
اجازه داده شد تا خشک شوند. سپس محلولی حاوی سلول‌های تریت شده در پلیت‌های ۶ خانه به همراه ۱۸۰ میکرولیتر آگارز با ذوب پایین (LMA)، ۰/۸ درصد تهیه شد و بلافاصله به لایه اول لام‌های کامت منتقل شد. در ادامه لام‌ها در بافر لیز کننده سرد (۲/۵ مولار NaCl، ۱۰۰ میلی‌مولار Na₂EDTA، ۱۰ میلی‌مولار Tris-base، و ۱٪ Triton-X 100) غوطه‌ور شدند و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. ۱ ساعت پس از این بخش، اسلایدها با آب سرد مقطر شسته شدند. سپس لام‌ها در آلکالیک بافر (۳۰۰ میلی‌مولار NaOH، ۱ میلی‌مولار EDTA، pH > 13) غوطه‌ور شدند تا DNA به مدت ۳۰ دقیقه باز شود، سپس با همان بافر در ولتاژ ۰/۷ ولت بر سانتی‌متر به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز انجام شد. در ادامه لام‌ها با اتیدیوم بروماید (۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) رنگ آمیزی شدند. در نهایت، سلول‌ها با بزرگنمایی ۴۰۰× میکروسکوپ فلورسنت Nikon-501 با فیلتر تحریکی ۵۱۰-۵۶۰ نانومتر مشاهده شدند (۲۳، ۲۴).

از لام‌های مورد مطالعه تصاویری ذخیره شد و توسط نرم افزار Comet Score تعداد حداقل ۱۰۰ سلول از هر نمونه مورد بررسی قرار گرفت و پارامترهایی هم‌چون (Tail length، DNA in Tail و Tail Moment) سنجش گردید. محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار Prism نسخه ۸ و تست one way ANOVA و Tukey posttest برای بررسی آماری استفاده شد.

یافته‌ها

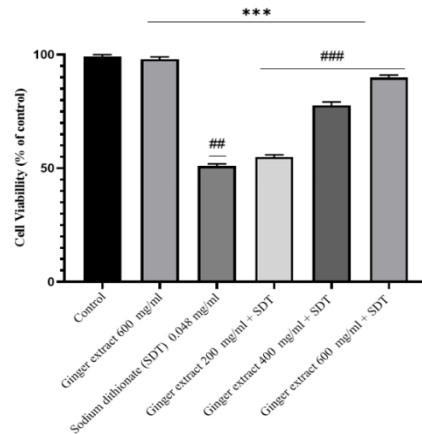
نتایج نشان داد که عصاره هیدروالکلی در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به همراه سدیم دی‌تیونیت دارای اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل مثبت که غلظت سدیم دی‌تیونیت در غلظت IC_{50} ۰/۴۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد ($P < ۰/۰۱$). در غلظت‌های بالاتر و همچنین در غلظت تک دوز ۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره میزان معنی‌داری در مقایسه با کنترل مثبت ($P < ۰/۰۰۱$) افزایش یافت (نمودار شماره ۱).

نتایج مربوط به بررسی میزان MDA تولید شده در سلول نشان داد که عصاره زنجبیل در دو غلظت ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر باعث کاهش چشمگیری در میزان MDA در مقایسه با گروه مواجه شده با سدیم دی تیونیت در غلظت IC50 شد (نمودار شماره ۳).



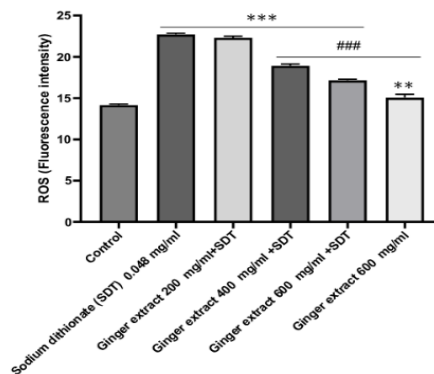
نمودار شماره ۳: اثر عصاره هیدروالکلی زنجبیل بر میزان MDA در رده سلولی PC12 در مواجهه با سدیم دی تیونیت به صورت میانگین $\pm$ SEM، ***: اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل منفی ($P < 0.001$), **: اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل منفی ($P < 0.01$), #: اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل مثبت ($P < 0.05$), ###: اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل مثبت ($P < 0.001$).

نتایج تست کامت به صورت گزارش سه پارامتر Tail Moment، DNA in Tail و Tail length گزارش شد. براساس یافته‌ها مشاهده شد که در مورد هر سه پارامتر گروه کنترل مثبت (سدیم دی تیونیت در غلظت IC50) در مقایسه با گروه کنترل منفی دارای اختلاف معنی دار بود و با * نشان داده شد ($P < 0.001$). گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی زنجبیل، مخصوصاً در غلظت ۶۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر دارای بیش‌ترین اختلاف با گروه کنترل مثبت بود ($P < 0.001$) (نمودارهای شماره ۴، ۵ و ۶).

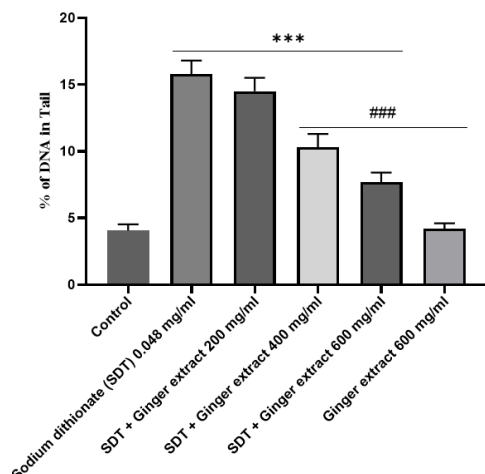


نمودار شماره ۱: اثر عصاره هیدروالکلی زنجبیل بر زنده مانی سلول‌های رده PC12 در مواجهه با سدیم دی تیونیت به صورت میانگین $\pm$ SEM، ***: اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل منفی ($P < 0.001$), #: اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل مثبت ($P < 0.01$), ###: اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل مثبت ($P < 0.001$).

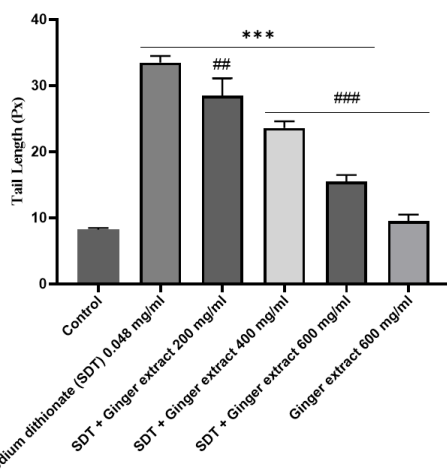
نتایج مربوط به اندازه گیری سطح ROS نشان داد که عصاره هیدروالکلی در دو غلظت ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر باعث کاهش ROS در مقایسه با ROS تولید شده ناشی از سدیم دی تیونیت، با سطح معنی داری ($P < 0.001$) شد (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲: اثر عصاره هیدروالکلی زنجبیل بر میزان ROS سلولی در رده PC12 در مواجهه با سدیم دی تیونیت به صورت میانگین $\pm$ SEM، ***: اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل منفی ($P < 0.001$), **: اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل منفی ($P < 0.01$), ###: اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل مثبت ($P < 0.001$), #: اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل مثبت ($P < 0.05$).



نمودار شماره ۵: اثر عصاره هیدروالکلی زنجبیل بر میزان آسیب به DNA بر سلول های مواجه شده با سدیم دی تیونیت (در غلظت اپتیمم) با بررسی پارامتر % of DNA in Tail به صورت میانگین $\pm$ SEM، ***: اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل منفی ###: اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل مثبت ($P < 0.001$).

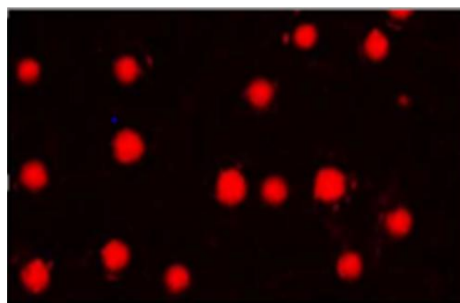


نمودار شماره ۶: اثر عصاره هیدروالکلی زنجبیل بر میزان آسیب به DNA بر سلول های مواجه شده با سدیم دی تیونیت (در غلظت اپتیمم) با بررسی پارامتر Tail Length به صورت میانگین $\pm$ SEM، ***: اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل منفی ###: اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل مثبت ($P < 0.001$).

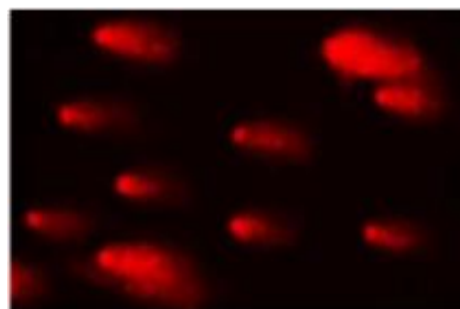
بحث

صنعت غذا به دلیل تأثیر مستقیم مواد غذایی بر دستگاه گوارش و سایر بخش های بدن انسان و همچنین

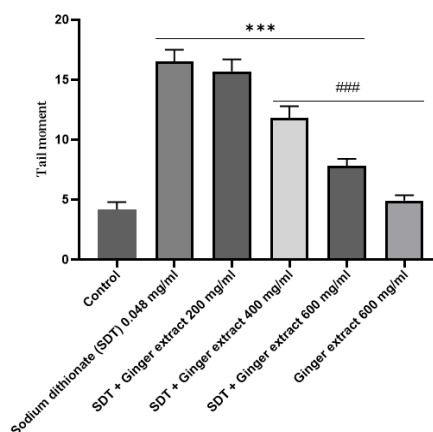
سلامت محتوای ژنتیکی در غیاب سدیم دی تیونیت و آسیب وارده ناشی از سدیم دی تیونیت در تصاویر نشان داده شده است (تصاویر شماره ۱ و ۲).



تصویر شماره ۱: گروه کنترل منفی (سلامت محتوای ژنتیکی سلول)



تصویر شماره ۲: گروه سدیم دی تیونیت (آسیب وارده به محتوای ژنتیکی ناشی از سدیم دی تیونیت)



نمودار شماره ۴: اثر عصاره هیدروالکلی زنجبیل بر میزان آسیب به DNA بر سلول های مواجه شده با سدیم دی تیونیت (در غلظت اپتیمم) با بررسی پارامتر Tail moment به صورت میانگین $\pm$ SEM، ***: اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل منفی ($P < 0.001$) ###: اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل مثبت ($P < 0.001$).

اثرات بلند مدت مواد موجود در محصولات این صنعت، از مهم ترین صنایع تأثیرگذار بر سلامت انسانها است به همین دلیل، نظارت بر افزودنی ها، روش های تولید و تهیه مواد اولیه این صنعت باید در اولویت های هر جامعه ای باشد. با توجه به تنوع و گستردگی تولیدات این صنعت، شناخت روزافزون و تدوین قوانین بهداشتی کارآمد از نیازهای اساسی هر سیستم نظارتی بر سلامت جامعه است. سدیم دیتینیت یک عامل سفید کننده است که جهت بهبود کیفیت محصولات غذایی از جمله نان به آن اضافه شد و این ماده قدرت کاهندگی بالایی داشته که باعث ایجاد آسیب سلولی و ژنتیکی می شود (۲۵). به عبارت ساده، جهش زایی به معنای ایجاد آسیب به DNA و تغییرات ژنتیکی است که می تواند از تغییر در یک یا چند جفت باز (جهش ژنی) تا تغییرات بزرگ در ساختار کروموزوم (ناهنجاری های کروموزومی) یا تعداد کروموزوم ها (آنوپلوئیدی و پلی پلوئیدی) متغیر باشد. به طور کلی، ژنوتوکسیسیته یا سمیت ژنی، اثرات ترکیبی مواد خارجی و پاسخ زیستی بدن به این مواد را در نظر می گیرد (۲۶). مطالعات قبلی در کشور نشان داده است که ماده سدیم دیتینیت در برخی محصولات صنایع غذایی وجود دارد. بررسی های انجام شده در چند شهر و حتی در سطح استانی به اندازه گیری غلظت و تعیین مقدار این ماده در محصولات تولیدی پرداخته اند. سدیم دیتینیت، به دلیل داشتن گروه فعال اکسیژن، پتانسیل بالایی برای ایجاد آسیب های اکسیداتیو به DNA دارد. نتایج مطالعات سید محمدی و همکاران در سال های ۱۳۹۳-۱۳۹۴ در کارگاه های تولیدی نبات شهر همدان نشان داد که بالاترین میزان بلانکیت در کارگاه ها ۲۸.۸۵ میلی گرم بر کیلوگرم و کم ترین آن ۳.۲ میلی گرم بر کیلوگرم بوده است. در تمام کارگاه ها از این ماده استفاده می شد و ۳۷/۵ درصد نمونه ها غلظتی بالاتر از استاندارد کشوری داشتند (۲۷). در تحقیقاتی که توسط Idris و Bektas و همکاران در سال ۲۰۱۶ بر روی اثرات سمیت

ژنتیکی رنگ ایندیگو (که از رنگ های پر کاربرد در صنایع نساجی است) و هم چنین ماده سدیم دیتینیت به عنوان ماده رنگ بر انجام شد، اثرات سمیت ژنتیکی این ماده در دوزهای ۵ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر مشاهده شد، که نتایج این مطالعه همسو با نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر مبنی بر القای سمیت ژنتیکی و همچنین ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو در گروه دریافت کننده سدیم دیتینیت در غلظت اپتیمم بود (۲۸). در تحقیق انجام شده توسط سلیمی و همکاران در سال ۱۳۹۴ مشخص گردید که سدیم دیتینیت با نام بلانکیت که در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می گیرد، به دلیل تولید رادیکال های آزاد و استرس اکسیداتیو، باعث آسیب ژنتیکی، سلولی، آلرژیک و حساسیت و مشکلات تنفسی می شود (۲۹). با توجه به مطالعات انجام شده مشخص گردید که آسیب رسانی سدیم دی تیونیت به حیات و ژنوم سلولی انسان، همسو با نتایج به دست آمده در این تحقیق، مبنی بر مضر بودن آن، می باشد.

در حالت استرس اکسیداتیو بسیاری از ماکرومولکول ها آسیب می بینند و فرایند پراکسیداسیون لیپیدها، اکسیداتیون DNA، اکسیداسیون پروتئین ها، غیر فعال شدن آنزیم ها و اختلال عملکرد غشاهای مختلف اتفاق می افتد. شواهد موجود نشان می دهد که استرس اکسیداتیو در پاتوژنز بیش از یک صد بیماری دخالت دارد. در حال حاضر شاخص مطلق و تعریف شده های برای استرس اکسیداتیو وجود ندارد. ولی شاخص های زیادی وجود دارد. که می تواند تا حدودی نشان دهنده این وضعیت باشند. اندازه گیری آنتی اکسیدان ها به طور کل یا هر یک به تنهایی و هم چنین ارزیابی مولکول های بیولوژیکی اکسید شده و صدمه دیده از مهم ترین این روش ها می باشند که امروزه کاربرد بسیار زیادی پیدا کرده اند که با توجه به مطالعات ابتدایی مطالعه حاضر برای این تحقیق همسو می باشد (۳۰).

گزارش شده است که انواع محصولات طبیعی دارای پتانسیل آنتی اکسیدانی مانند سبزیجات، میوه ها، دانه های

غلات، گیاهان دارویی و دم کرده‌های گیاهی هستند. چندین مطالعه نشان داده است که زنجبیل همچنین دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی است (۳۱). فعالیت آنتی اکسیدانی زنجبیل از طریق روش های قدرت آنتی اکسیدانی کاهنده آهن (ABTS, DPPH, FRAP) در شرایط *in vitro* ارزیابی شده است. نتایج نشان داد که زنجبیل خشک قوی ترین فعالیت آنتی اکسیدانی را به نمایش می گذارد، زیرا تعداد ترکیبات فنلی به ترتیب ۵/۲، ۱/۱ و ۲/۴ برابر بیش تر از زنجبیل تازه stirfried و carbonized ginger بود که با نتایج مطالعه در تست های زنده مانی و ROS سلولی و گلو تاتیون همسو بود (۳۲). چندین مطالعه نشان داده است که زنجبیل برای محافظت در برابر استرس اکسیداتیو موثر است. مکانیسم های اساسی عمل آنتی اکسیدانی در مدل های سلولی بررسی شد. عصاره زنجبیل اثرات آنتی اکسیدانی در سلول های غضروفی انسان نشان داد به واسطه کاهش استرس اکسیداتیو و اینترلوکین ۱ می باشد. علاوه بر این، عصاره زنجبیل می تواند تولید ROS در سلول های فیروسارکومای انسانی را با استرس اکسیداتیو ناشی از H₂O₂ کاهش دهد (۳۳). این نتایج با کاهش سطح ROS سلولی توسط عصاره زنجبیل به دست آمده در این تحقیق همسو بود. مطالعه انجام شده برای بررسی خواص آنتی اکسیدانی زنجبیل و ترکیبات فعال زیستی آن در داخل بدن انجام شده است در آن جا، ۶ شوگائول (6-shogaol) با القای بیان ژن های Nrf2 هدف مانند MT1، HO-1 و GCLC در سلول های روده بزرگ موش ها، پتانسیل آنتی اکسیدانی را به نمایش گذاشته است (۳۴). با توجه به نتایج مطالعات قبلی، عصاره زنجبیل می تواند از افزایش سطح MDA و کاهش فعالیت کاتالاز و هم چنین سطح گلو تاتیون جلوگیری کند که با نتایج به دست آمده

در تست مربوط به اندازه گیری گلو تاتیون همسو بود (۳۵). زنجبیل می تواند سطح H₂O₂ و MDA را کاهش دهد، فعالیت آنزیم آنتی اکسیدان را افزایش دهد و گلو تاتیون را با آسیب اکسیداتیو ناشی از chlorpyrifos افزایش دهد که این نتایج با فرضیه مطالعه حاضر مبنی بر خواص آنتی اکسیدان عصاره زنجبیل در برابر سدیم دیتیونیت همسو بود (۳۶). علاوه بر این، درمان با عصاره زنجبیل باعث افزایش محتوای آنتی اکسیدان ها و تستوسترون در سرم بیضه های موش صحرایی از آسیب در شیمی درمانی با سیکلوفسفامید می شود (۳۷). علاوه بر مطالعات مذکور، در تحقیقات Masuda و همکاران، تحقیقات Chan و همکاران و تحقیقات Ghasemzadeh و همکاران در دهه های اول و دوم قرن بیستم، اثرات آنتی اکسیدانی عصاره زنجبیل ثابت شد (۴۰-۳۸). نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که عصاره هیدروالکلی زنجبیل در غلظت های مختلف باعث مهار سمیت سلولی و ژنتیکی سدیم دی تیونیت در سلول های PC12 شد. با توجه به نتایج مطالعات فوق و نتایج به دست آمده از این مطالعه مشخص گردید که عصاره هیدروالکلی زنجبیل باعث مهار سمیت سلولی و ژنتیکی سدیم دی تیونیت شد.

با توجه به مطالعه که به صورت *in vitro* بود، میزان و قدرت عملکرد عصاره زنجبیل در محیط *in vivo* و اثرات آن از جمله محدودیت های این مطالعه بود.

سپاسگزاری

این مطالعه حاصل پایان نامه دوره دکتری عمومی داروسازی خانم صبا عاصمی با دانشکده داروسازی مازندران بود که منابع مالی آن توسط دانشگاه تامین شده است و بدین وسیله تشکر و قدردانی می شود.

References

1. Yu X, Xiang L, Yang S, Qu S, Zeng X, Zhou Y, et al. A near-infrared fluorogenic probe with fast response for detecting sodium dithionite in living cells. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2021; 245: 118887. PMID: 32927301.

2. Chun-Yan Y, Ling H. Neuroprotective effects of sinapine on PC12 cells apoptosis induced by sodium dithionite. *Chin J Nat Med* 2008; 6(3): 205-209.
3. Zare Gashti R, Mohammadi H. Sodium dithionate ($\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_4$) induces oxidative damage in mice mitochondria heart tissue. *Toxicol Rep* 2022; 9: 1391-1397. PMID: 36518422.
4. Karami M, Alikord M, Mokhtari Z, Sadighara P, Jahed-Khaniki G. Sodium Hydrosulfite (Blankit) in Iranian food as a threat to human health: a review. *J Food Saf Hyg* 2021; 7(1): [page numbers].
5. Yang S, Lian G. ROS and diseases: Role in metabolism and energy supply. *Mol Cell Biochem* 2020; 467: 1-12. PMID: 31813106.
6. Izanloo H, Atafar Z, Aali R, Ghafuri Y. Sodium dithionite concentration in traditional bread and health risk assessment: a case study in Qom city. *Arch Hyg Sci* 2022; 11(1): 13-18.
7. Rashidovna MN, Urmonovich NO. Comparative Characteristics of the Leaving of Glutathione from Cells of Different Types. *Int J Orange Technol* 2020; 2(10): 79-82.
8. Abdurrahim AE, Mazurak VC, Chen L. Gingerols synergize with anthocyanins to induce antioxidant activity in vitro. *Front Nutr* 2023; 10: 1123456. PMID: 37743923.
9. Yaghubi Beklar S, Hamzeh M, Karimpour Malekshah A, Talebpour Amiri F. The hydroalcoholic extract of *Zingiber officinale* diminishes diazinon-induced hepatotoxicity by suppressing oxidative stress and apoptosis in rats. *Biotech Histochem* 2021; 96(4): 269-275. PMID: 32672073.
10. Bidinotto LT, Spinardi-Barbisan ALT, Rocha NS, Salvadori DMF, Barbisan LF. Effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on DNA damage and development of urothelial tumors in a mouse bladder carcinogenesis model. *Environ Mol Mutagen* 2006; 47(8): 624-630. PMID: 16878317.
11. Wen C, Liu Y, Ye Y, Tao Z, Cheng Z, Wang T, et al. Effects of gingerols-rich extract of ginger on growth performance, serum metabolites, meat quality and antioxidant activity of heat-stressed broilers. *J Therm Biol* 2020; 89: 102544. PMID: 32364987.
12. Wiatrak B, Kubis-Kubiak A, Piwowar A, Barg E. PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions. *Cells* 2020; 9(4): 958. PMID: 32295099.
13. Liu Y, Zou L, Wang P, Zhou J, Yuan C, Wang J. Construction of differential expression plasmids of NGF to detect its influence on PC12 cell neuronal differentiation. *Exp Ther Med* 2021; 21(4): 1234-1242. PMID: 33732336.
14. Shokrzadeh M, Ahmadi A, Chabra A, Naghshvar F, Salehi F, Habibi E, et al. An ethanol extract of *Origanum vulgare* attenuates cyclophosphamide-induced pulmonary injury and oxidative lung damage in mice. *Pharm Biol* 2014; 52(10): 1229-1236. PMID: 24646304.
15. Kedare SB, Singh R. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol* 2011; 48(4): 412-422. PMID: 23572765.
16. Vinatoru M, Toma M, Radu O, Filip P, Lazurca D, Mason T. The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrason*

- Sonochem 1997; 4(2): 135-139. PMID: 11237031.
17. Ghassemi-Barghi N, Varshosaz J, Etebari M, Dehkordi AJ. Role of recombinant human erythropoietin loading chitosan-tripolyphosphate nanoparticles in busulfan-induced genotoxicity: Analysis of DNA fragmentation via comet assay in cultured HepG2 cells. *Toxicol In Vitro* 2016; 36: 46-52.
 18. Motafeghi F, Gerami M, Mortazavi P, Khayambashi B, Ghassemi-Barghi N, Shokrzadeh M. Green synthesis of silver nanoparticles, graphene, and silver-graphene nanocomposite using *Melissa officinalis* ethanolic extract: Anticancer effect on MCF-7 cell line. *Iran J Basic Med Sci* 2023; 26(1): 57-65.
 19. Marefati N, Abdi T, Beheshti F, Vafaei F, Mahmoudabady M, Hosseini M. *Zingiber officinale* (Ginger) hydroalcoholic extract improved avoidance memory in rat model of streptozotocin-induced diabetes by regulating brain oxidative stress. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2022; 43(1): 15-26. PMID: 34679261.
 20. Rezaei F, Shokrzadeh M, Majd A, Nezhadsattari T. Cytotoxic Effect of Hydroalcoholic Extract of *Cornus mas* L. fruit on MCF7, HepG2 and CHO cell line by MTT Assay. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2014; 24(113): 130-138.
 21. Ansari M, Shokrzadeh M, Karima S, Rajaei S, Fallah M, Ghassemi-Barghi N, et al. New thiazole-2(3H)-thiones containing 4-(3,4,5-trimethoxyphenyl) moiety as anticancer agents. *Eur J Med Chem* 2020; 185: 111784. PMID: 31669850.
 22. Azadbakht M, Safapour S, Ahmadi A, Ghasemi M, Shokrzadeh M. Anti-diabetic effects of aqueous fruits extract of *Diospyros lotus* L. on streptozotocin-induced diabetic rats and the possible morphologic changes in the liver, kidney and heart. *J Pharmacogn Phytochem* 2010; 2(2): 10-16.
 23. Tavares JMR, Bourauel C, Geris L, Vander Slotte J. Computer Methods, Imaging and Visualization in Biomechanics and Biomedical Engineering II: Selected Papers from the 17th International Symposium CMBBE and 5th Conference on Imaging and Visualization, September 7-9, 2021. Cham: Springer Nature; 2022.
 24. Shokrzadeh M, Ghassemi-Barghi N. Antioxidant and Genoprotective effects of Amifostine against irinotecan toxicity in human hepatoma cells. *Int J Cancer Res Ther* 2018; 3(1): 1-5.
 25. Zare gashti R, Mohammadi H. Sodium dithionate ($\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_4$) induces oxidative damage in mice mitochondria heart tissue. *Toxicol Rep* 2022; 9: 1391-1397. PMID: 36518422.
 26. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68(4): 820-823. PMID: 5279523.
 27. Seidmohammadi A, Asgari G, Lotfi A, Fardmal J, Heshmati A, Pirmoghani A. Investigation of sodium dithionite residues in the rock candies produced in the candies making plants of Hamadan, Iran. *J Health Res Community* 2017; 3(1): 1-8.
 28. Bektaş İ, Karaman Ş, Dıraz E, Çelik M. The role of natural indigo dye in alleviation of genotoxicity of sodium dithionite as a reducing agent. *Cytotechnology* 2016; 68(6): 2245-2255. PMID: 27757710.

29. Salimi F, Nemati A, Amani F, Adeib A, Abbasgholizadeh N. Survey of Blankit Residues in sugarloaf, shakar-panir and rock candy in Ardabil province in 2015. *J Health* 2017; 8(2): 204-210.
30. Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit* 2004; 10(6): 141-147. PMID: 15173684.
31. Aoki S, Morita M, Hirao T, Yamaguchi M, Shiratori R, Kikuya M, et al. Shift in energy metabolism caused by glucocorticoids enhances the effect of cytotoxic anti-cancer drugs against acute lymphoblastic leukemia cells. *Oncotarget* 2017; 8(55): 94271-94282. PMID: 29212227.
32. Li Y, Hong Y, Han Y, Wang Y, Xia L. Chemical characterization and antioxidant activities comparison in fresh, dried, stir-frying and carbonized ginger. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2016; 1011: 223-232. PMID: 26799205.
33. Romero A, Forero M, Sequeda-Castañeda LG, Grismaldo A, Iglesias J, Celis-Zambrano CA, et al. Effect of ginger extract on membrane potential changes and AKT activation on a peroxide-induced oxidative stress cell model. *J King Saud Univ Sci* 2018; 30(2): 263-269.
34. Chen H, Fu J, Chen H, Hu Y, Soroka DN, Prigge JR, et al. Ginger compound [6]-shogaol and its cysteine-conjugated metabolite (M2) activate Nrf2 in colon epithelial cells in vitro and in vivo. *Chem Res Toxicol* 2014; 27(9): 1575-1585. PMID: 25148906.
35. Saiah W, Halzoune H, Djaziri R, Tabani K, Koceir EA, Omari N. Antioxidant and gastroprotective actions of butanol fraction of *Zingiber officinale* against diclofenac sodium-induced gastric damage in rats. *J Food Biochem* 2018; 42(1): e12456.
36. Abolaji AO, Ojo M, Afolabi TT, Arowoogun MD, Nwawolor D, Farombi EO. Protective properties of 6-gingerol-rich fraction from *Zingiber officinale* (Ginger) on chlorpyrifos-induced oxidative damage and inflammation in the brain, ovary and uterus of rats. *Chem Biol Interact* 2017; 270: 15-23. PMID: 28373059.
37. Mohammadi F, Nikzad H, Taghizadeh M, Taherian A, Azami-Tameh A, Hosseini S, et al. Protective effect of *Zingiber officinale* extract on rat testis after cyclophosphamide treatment. *Andrologia* 2014; 46(6): 680-686. PMID: 23889539.
38. Ghasemzadeh A, Jaafar HZ, Rahmat A. Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Molecules* 2010; 15(6): 4324-4333. PMID: 20657444.
39. Jitoe A, Masuda T, Tengah I, Suprpta DN, Gara I, Nakatani N. Antioxidant activity of tropical ginger extracts and analysis of the contained curcuminoids. *J Agric Food Chem* 1992; 40(8): 1337-1340.
40. Chan EWC, Lim YY, Wong L, Lianto FS, Wong S, Lim K, et al. Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chem* 2008; 109(3): 477-483.