

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 Gharekhani⁷,

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 Gharekhani - 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 دیتیونیت

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

چکیده

سابقه و هدف: این مطالعه بر روی سدیم دیتیونیت، یک ماده شیمیایی که به طور گسترده در صنایع مختلف استفاده می‌شود و باعث آسیب اکسیداتیو به سلول‌ها و DNA می‌شود، متمرکز بود. با توجه به خواص آنتی‌اکسیدانی شناخته شده زنجبیل، این مطالعه با هدف بررسی اثرات عصاره هیدروالکلی زنجبیل را بر آسیب ژنتیکی و زنده ماندن سلول‌ها، انجام پذیرفت. این مطالعه به طور خاص ارزیابی کرد که چگونه این عصاره بر اختلالات ژنتیکی تأثیر می‌گذارد و بقای سلول‌های PC12 را که در معرض اثرات مضر سدیم دیتیونیت قرار گرفته‌اند، بهبود می‌بخشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، سلول‌های PC12 با غلظت‌های مختلف عصاره زنجبیل (۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در کنار دی‌تیونیت سدیم در غلظت IC₅₀ آن تیمار شدند. پس از مواجهه، زنده‌مانی سلول‌ها از طریق سنجش MTT ارزیابی شد تا اثرات محافظتی عصاره مشخص شود. علاوه بر این، میزان آسیب DNA با استفاده از سنجش Comet قلیایی اندازه‌گیری شد که دیدگاهی در مورد تأثیر ژنوتوکسیک دی‌تیونیت سدیم و کاهش احتمالی آن توسط عصاره زنجبیل ارائه می‌دهد. تمام داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Prism و با آستانه معنی‌داری $p < 0.05$ تجزیه و تحلیل آماری شدند تا تفاوت‌های معنی‌دار بین گروه‌های تیمار شده و کنترل مشخص شود.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که عصاره زنجبیل در غلظت ماکسیمم (۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) باعث حفظ بقای سلول‌ها شد ($p < 0.001$). علاوه بر این، عصاره باعث کاهش قابل توجهی در میزان آسیب DNA در سلول‌ها شد که این اثر در غلظت بالا (۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بیش‌ترین میزان را داشت ($P < 0.001$).

استنتاج: عصاره هیدروالکلی زنجبیل دارای اثرات محافظتی در برابر آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از سدیم دیتیونیت در سلول‌های PC12 است. زنجبیل می‌تواند به عنوان یک عامل محافظتی در برابر آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: زنجبیل، سمیت ژنتیکی، سلول PC12، سدیم دی‌تیونیت

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. مرکز تحقیقات علوم دارویی، موسسه هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشیار مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. دانشیار گروه فارماکولوژی و بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، مازندران
۴. دکتری 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. دکتری 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 دریافت: ۱۴۰۳/۸/۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۳/۸/۱۲ تاریخ تصویب: ۱۴۰۴/۶/۱۱

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 زمینه‌ها از جمله علوم زیستی، نساجی، کاغذ سازی، صنایع غذایی استفاده می‌شود. در صنایع فرآوری مواد غذایی، سدیم دیتیونیت به عنوان عامل سفید کننده و بهبود کیفیت ظاهری مواد غذایی، به فرآورده‌های غذایی اضافه می‌شود (۱). سدیم دیتیونیت به طور گسترده در نان‌های صنعتی، محصولات قندی و کنسرو استفاده می‌شود. استفاده از این افزودنی‌های شیمیایی در محصولات غذایی مختلف تهدیدی جدید برای سلامت انسان می‌باشد (۲). در صورت مصرف این ترکیب در مواد غذایی، پس از ورود آن به دستگاه گوارش، سبب از بین رفتن پرزهای معده و روده می‌گردد و در دراز مدت با حذف آنتی‌اکسیدان‌های این دستگاه، موجب تسریع در سرطان بخش‌های گوارشی می‌شود گزارش شده است که سدیم دی تیونیت سبب هایپوکسی شیمیایی می‌شود که می‌تواند شرایط هایپوکسی/ایسکمیک را تقلید کند (۳). با اکسید سدیم دیتیونیت در شرایط بسیار اسیدی و بی‌هوازی (مانند دستگاه گوارش) دی‌اکسید گوگرد سمی آزاد و سپس هیدروژن سولفیت و تیوسولفات تشکیل می‌شود، بنابراین، این امکان وجود دارد که سولفیت هیدروژن توسط دستگاه گوارش جذب شود. سدیم هیدروژن سولفیت هم‌چنین در مسدود کردن آنزیم‌های بدن به ویژه انسولین موثر است. بنابراین به طور مستقیم دیابت را در افراد تسریع می‌کند (۴). سدیم دیتیونیت باعث از بین رفتن پتانسیل غشای میتوکندری می‌شود. این نشان می‌دهد که سیگنال دهی از طریق میتوکندری نقش کلیدی در آپوپتوز ناشی از آن را ایفا می‌کند (۲). دی‌اکسید گوگرد (SO_2) که باعث ایجاد رادیکال‌های آزاد می‌شود و می‌تواند باعث هیپوکسی شود که مسئول اختلالات متعددی از جمله سمیت اندام‌ها

و آسیب به عملکرد آن‌ها است (۳). تولید ROS مهار نشده و سطح ROS کنترل نشده هم‌چنین می‌تواند متاستاز سلول‌های سرطانی و روند سرطان را افزایش دهد. هم‌چنین ROS می‌تواند از سیستم ایمنی حمایت کند، اما تولید بیش از حد، سیتوتوکسیک می‌شوند. ROS هم در مرگ سلول‌های T ناشی از فعال‌سازی و هم در مرگ خود مختار سلول T فعال نقش دارد. آسیب اکسیداتیو منجر به آسیب سلولی روی DNA، پروتئین و لیپیدها می‌شود (۵). سدیم دیتیونیت توانایی ایجاد ناهنجاری‌های کروموزومی و ناباروری را دارد (۶). از جمله خطوط دفاعی سلول‌ها در برابر رادیکال‌های آزاد، پروتئین گلوکاتایون به‌منظور به دام انداختن آن‌ها می‌باشد. گلوکاتایون (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 برون‌ریز و تحمل حرارت و تنظیم چرخه سلولی، تکثیر نقش دارد. هم‌چنین تعیین کننده اصلی حالت ردوکس سلولی و دفاع در برابر استرس اکسیداتیو است. در داخل سلول‌ها جمع می‌شود و در خارج از سلول‌ها تجزیه می‌شود و تحت شرایط مختلف فیزیولوژیکی و پاتوفیزیولوژیکی آزاد می‌شود (۷). ریشه زنجبیل (ریزوم *Zingiber officinale* Roscoe, Zingiberaceae) هزاران سال است که به عنوان چاشنی غذا و داروی گیاهی برای مراقبت‌های بهداشتی و پیشگیری از بیماری‌ها استفاده می‌شود. استفاده سنتی از زنجبیل به عنوان داروی گیاهی به فعالیت جینجیرول‌ها (۶-، ۸- و ۱۰-gingerols و ۶-shogaol) نسبت داده می‌شود که از اجزای اصلی فعال زیستی در زنجبیل محسوب می‌شوند (۸). زنجبیل معمولاً به عنوان ادویه مصرف می‌شود. در طب سنتی گیاهی از زنجبیل برای درمان سرما خوردگی بیماری‌های گوارشی، روماتیسم، نورالژی، قولنج و بیماری حرکت استفاده می‌شود. زنجبیل دارای خواص آنتی‌اکسیدانی 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 صرفه‌جویی 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 فیروبللاستی (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).

$$\text{A}_0 - \text{جذب شاهد} \\ \text{A}_0 - \text{جذب عصاره مورد آزمایش} = \frac{(\text{A}_0 - \text{As})}{\text{A}_0} \times 100 = \text{درصد مهار رادیکال آزاد}$$

اندازه گیری فلاونوئیدها

میزان محتوی فلاونوئید عصاره هیدروالکلی از طریق روش‌های رنگ سنجی ارزیابی شد. غلظت ۴۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر از عصاره تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره در ۱/۵ میلی‌لیتر متانول حل و سپس ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد به آن اضافه شد، سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول استات پتاسیم ۱ مولار و در نهایت ۲/۸ میلی‌لیتر 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 «میلی‌گرم 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/میلی‌لیتر از عصاره تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره با ۲/۵ میلی‌لیتر واکنش گر ۰/۲ نرمال فولین سیو کالتو مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه هم زده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم با غلظت ۷۵ گرم در لیتر اضافه شد. جذب نمونه‌ها 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 «میلی‌گرم 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 پنی‌سیلین-استرپتومایسین کشت و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت کافی و میزان ۵ درصد دی‌اکسید کربن نگهداری شد و بررسی گردید تا وقتی که به ۷۰ درصد رشد خود رسیدند، سلول‌ها 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 سلول‌ها از رنگ تریپان بلو و لام همو سائتومر توسط میکروسکوپ نوری استفاده گردید (۱۷، ۱۸).

تیمار سلول‌ها

بدین منظور ۲۴ ساعت پس از کاشت سلول‌ها، عصاره هیدروالکلی زنجبیل با غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به سلول‌ها برای مدت ۲۴ ساعت مواجهه شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت با غلظت اپتیمم (IC₅₀) ۰/۴۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر 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 میلی‌مولار 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 اندازه‌گیری شد (Excitation: 485 nm, emission: 530 nm). در تمام مراحل سلول‌ها در مکان تاریک بودند (استفاده از فویل آلومینیومی) و 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).

اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدی

پس از انکوباسیون سلول‌ها با ترکیبات به ترتیب مذکور میزان پراکسیداسیون لیپیدی براساس روش تیوبایتوریک اسید اندازه‌گیری 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 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 ۱/۱ 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

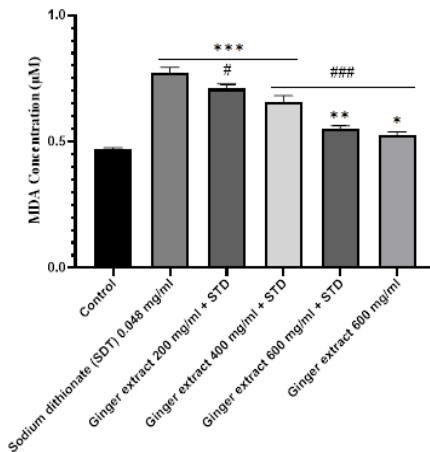
تحریکی ۵۱۰-۵۶۰ نانومتر مشاهده شدند (۲۳، ۲۴).

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 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

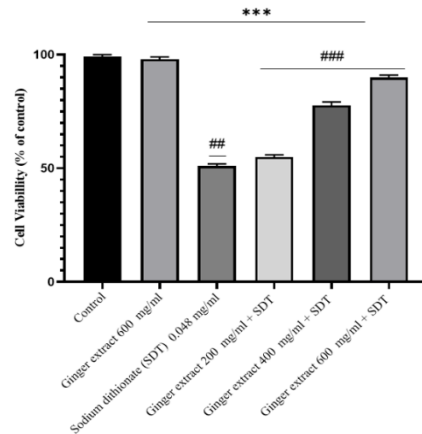
نتایج نشان داد که عصاره هیدروالکلی در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به همراه سدیم دی‌تیونیت دارای اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل مثبت که غلظت سدیم دی‌تیونیت در غلظت IC₅₀ (۰/۰۴۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) می‌باشد (P < ۰/۰۱). در غلظت‌های بالاتر و همچنین در غلظت تک دوز ۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره میزان معنی‌داری در مقایسه با کنترل مثبت (۰/۰۰۱ < P 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).



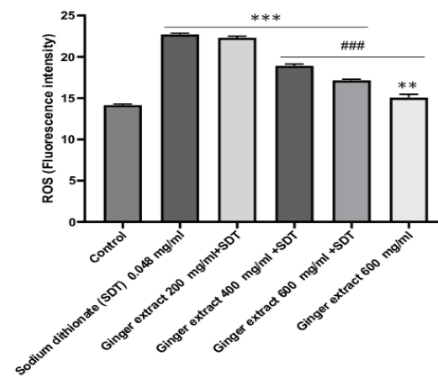
نمودار شماره ۳: اثر عصاره هیدروالکلی زنجبیل بر میزان MDA در رده سلولی PC12 در مواجهه با سدیم دی تیونیت به صورت میانگین \pm SEM، ***: اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل منفی ($P < 0.001$), **: اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل منفی ($P < 0.01$), #: اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل منفی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

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).

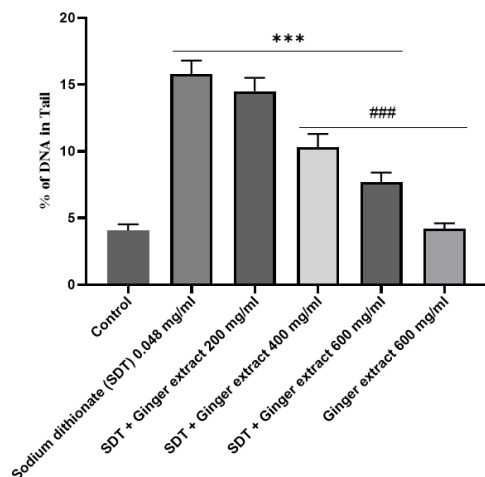


نمودار شماره ۱: اثر عصاره هیدروالکلی زنجبیل بر زنده مانی سلول‌های رده PC12 در مواجهه با سدیم دی تیونیت به صورت میانگین \pm SEM، ***: اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل منفی ($P < 0.001$), #: اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل مثبت ($P < 0.01$), ###: اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل مثبت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

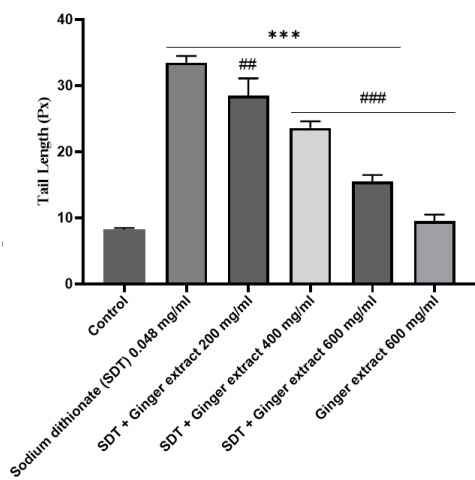
نتایج مربوط به اندازه گیری سطح ROS نشان داد که عصاره هیدروالکلی در دو غلظت ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر باعث کاهش ROS در مقایسه با ROS تولید شده ناشی از سدیم دی تیونیت، با سطح معنی داری ($P < 0.001$) شد (نمودار شماره ۲).



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 ($P < 0.001$).



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 مثبت ($P < 0/001$)، ###: اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل مثبت ($P < 0/001$).

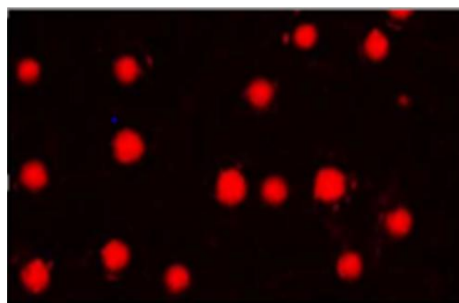


نمودار شماره ۶: اثر عصاره هیدروالکلی زنجبیل بر میزان آسیب به DNA بر سلول های مواجه شده با سدیم دی تیونیت (در غلظت اپتیمم) با بررسی پارامتر Tail Length به صورت میانگین \pm SEM، ***: اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل منفی ($P < 0/001$)، ###: اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل مثبت ($P < 0/001$)، ##: اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل مثبت ($P < 0/01$).

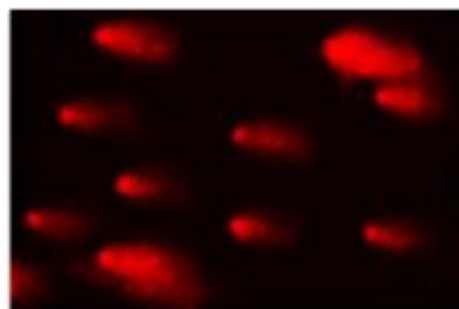
بحث

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

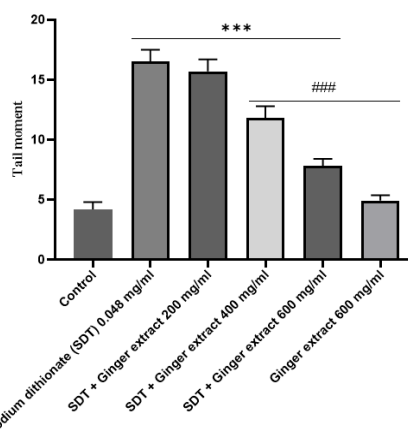
سلامت محتوای ژنتیکی در غیاب سدیم دی تیونیت و آسیب وارده ناشی از سدیم دی تیونیت در تصاویر نشان داده شده است (تصاویر شماره ۱ و ۲).



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 افزودنی‌ها، روش‌های تولید و تهیه مواد اولیه این صنعت باید در اولویت‌های هر جامعه‌ای 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 می‌شود (۲۵). به عبارت ساده، جهش‌زایی به معنای ایجاد آسیب به DNA و تغییرات ژنتیکی است که می‌تواند از تغییر در یک یا چند جفت باز (جهش ژنی) تا تغییرات بزرگ در ساختار کروموزوم (ناهنجاری‌های کروموزومی) یا تعداد کروموزوم‌ها (آنوپلوئیدی و پلی‌پلوئیدی) متغیر باشد. به طور کلی، ژنوتوکسیسیته یا سمیت ژنی، اثرات ترکیبی مواد خارجی و پاسخ زیستی بدن به این مواد را در نظر می‌گیرد (۲۶). مطالعات قبلی در کشور نشان داده است که ماده سدیم دیتینیت در برخی محصولات صنایع غذایی وجود دارد. بررسی‌های انجام شده در چند شهر و حتی در سطح استانی به اندازه‌گیری غلظت و تعیین مقدار این ماده در محصولات تولیدی پرداخته‌اند. سدیم دیتینیت، به دلیل داشتن گروه فعال اکسیژن، پتانسیل بالایی برای ایجاد آسیب‌های اکسیداتیو به DNA دارد. نتایج مطالعات سید محمدی و همکاران در سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۴ در کارگاه‌های تولیدی نبات شهر همدان نشان داد که بالاترین میزان بلانکیت در کارگاه‌ها ۲۸.۸۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و کم‌ترین آن ۳.۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوده است. در تمام کارگاه‌ها از این ماده استفاده می‌شد و ۳۷/۵ درصد نمونه‌ها 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 رنگ‌های پرکاربرد در صنایع نساجی است) و هم‌چنین ماده سدیم دیتینیت به عنوان ماده رنگ‌بر انجام شد، اثرات سمیت ژنتیکی این ماده در دوزهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد، که نتایج این مطالعه همسو با نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر مبنی بر القای سمیت ژنتیکی و هم‌چنین ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو در گروه دریافت‌کننده 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 می‌گیرد، به دلیل تولید رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو، باعث آسیب ژنتیکی، سلولی، آلرژیک و حساسیت و مشکلات تنفسی می‌شود (۲۹). با توجه به مطالعات انجام شده مشخص گردید که آسیب‌رسانی سدیم دی‌تینیت به حیات و ژنوم سلولی انسان، همسو با نتایج به‌دست آمده در این تحقیق، مبنی بر مضر بودن آن، می‌باشد.

در حالت استرس اکسیداتیو بسیاری از ماکرومولکول‌ها آسیب می‌بینند و فرایند پراکسیداسیون لیپیدها، اکسیداتیون DNA، اکسیداسیون پروتئین‌ها، غیرفعال شدن آنزیم‌ها و اختلال عملکرد غشاهای مختلف اتفاق می‌افتد. شواهد موجود نشان می‌دهد که استرس اکسیداتیو در پاتوژنز بیش از یک صد بیماری دخالت دارد. در حال حاضر شاخص مطلق و تعریف شده‌های برای استرس اکسیداتیو وجود ندارد. ولی شاخص‌های زیادی وجود دارد. که می‌تواند تا حدودی نشان دهنده این وضعیت باشند. اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان‌ها به‌طور کل یا هر یک به تنهایی و هم‌چنین ارزیابی مولکول‌های بیولوژیکی اکسید شده و صدمه دیده از مهم‌ترین این روش‌ها می‌باشند که امروزه کاربرد بسیار زیادی پیدا کرده‌اند که با توجه به مطالعات ابتدایی مطالعه حاضر برای این تحقیق همسو می‌باشد (۳۰).

گزارش شده است که انواع محصولات طبیعی دارای پتانسیل آنتی‌اکسیدانی مانند سبزیجات، میوه‌ها، دانه‌های

در تست مربوط به اندازه گیری گلو تاتیون همسو بود (۳۵). زنجبیل می تواند سطح H_2O_2 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 و 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 اکسیداتی 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, Ghafari 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, Vafae 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 Slote 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.