دراسة التأثير الواقي من أشعة غاما من المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس باستخدام مقايسة النوى الصغيرة في الخلايا اللمفاوية البشرية

الدكتورة نهلة إبراهيم*

الدكتور عدنان اختيار**

علا الجهماني***

(تاريخ الإيداع 9 / 7 / 2020. قبل للنشر في 8 / 11 / 2020)

□ ملخّص □

هدفت الدراسة إلى التحقيق في التأثير الواقي للمستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس الشائع من السمية الجينية التي تسببها أشعة غاما في الخلايا اللمفاوية البشرية عند خمسة متبرعين بالغين أصحاء، تم استزراع اللمفاويات بطريقة زراعة الدم الكامل لتحديد الانحرافات الصبغية باستخدام مقايسة النوى الصغيرة. تم التشعيع بجرعة 2 غري وأضيف المستخلص إلى المستنبتات الخلوية بتركيزين مختلفين 50 و100 ميكروغرام/مل بعد تشعيع العينات مباشرة. أظهرت النتائج أن المستخلص سبب انخفاضا في تواتر النوى الصغيرة الناجمة عن أشعة غاما بالتركيزين 50 و100 ميكروغرام /مل ($P<0.05$) بالمقارنة مع المجموعة المشععة، لوحظ أن التركيز 100 ميكروغرام/مل من المستخلص سبب انخفاض أكبر في تردد النوى الصغيرة بالمقارنة مع التركيز 50 ميكروغرام /مل ولم يلاحظ وجود فروق معنوية في تواتر النويات الصغيرة بين المجموعتين ($P>0.05$) .

الكلمات المفتاحية: أشعة غاما، الخلايا اللمفاوية، واقي اشعاعي، الآس الشائع، مقايسة النوى الصغيرة، الاشعاع المؤين.

*أستاذ مساعد – قسم علم الحيوان – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.

**باحث رئيسي في قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوي في هيئة الطاقة الذرية السورية – دمشق – سورية.

***طالبة دراسات عليا (ماجستير–) قسم علم الحيوان – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.

Olajouhmany23@gmail.com

Study of protective Effect of Gamma Rays of Alcoholic Extract of Myrtus Communis L. Leaves Using Micronucleus Assay in Human Lymphocytes

Dr. Nahla Ebrahim*
Dr. Adnan Ekhtiar **
Ola Aljouhmany***

(Received 9 / 7 / 2020. Accepted 8 / 11 /2020)

□ ABSTRACT □

The study aimed to investigate the protective effect of the alcoholic extract of leaves of the Myrtus communisL plant from the genetic toxicity caused by gamma rays in human lymphocytes in five healthy adult donors. Irradiation was done at a dose of 2 Gy and the extract was added to cell cultures at two different concentrations 50 and 100 µg/ml immediately after irradiation of the samples. The results showed that the extract caused a decrease in the frequency of micronuclei induced by gamma rays at concentrations 50 and 100 µg/ml (P<0.05) compared to the irradiated group, It was observed that the concentration 100 µg/ml of the extract caused a greater decrease in the frequency of the micronuclei compared to the concentration of 50 µg/ml and no significant differences were observed in the frequency of the micronuclei between the two groups (P<0.05).

Keyword: gamma radiation ‹lymphocytes ‹Radioprotective‹ Myrtus communis L. micronuclei assay‹ Ionizing radiation.

* **Associate professor, Zoology Department, Faculty of Science, Tishreen University, Lattakia, Syria.**
****Assistant professor, Principal researcher in the Department of Molecular Biology and Biotechnology at Syrian Atomic Energy Commission, Damascus , Syria.**
*****Postgraduate Student, Zoology Department, Faculty of Science, Tishreen University, Lattakia, Syria.**

مقدمة:

يستخدم الإشعاع المؤين على نطاق واسع في العديد من المجالات مثل الطب، الصناعة، الكهرباء، تطبيقات الزراعة، علم الآثار، الجيولوجيا وغيرها، ومع ذلك فإن الإشعاع يمكن أن يكون مميتاً للإنسان فالمواد العضوية في الأنسجة البشرية يمكن أن تتضرر عند التعرض للأشعة المؤينة سواء الجسيمية أو الكهرومغناطيسية (Syaifudin *et al.,*2017). تصاب الخلايا الحية بضرر عند تعرضها للإشعاع المؤين مما يتسبب بموتها أو تحولها إلى خلايا ورمية، وقد تنجو وتبقى حيّة لاحتوائها على جزيئات وآليات بيوكيميائية ترمم ذلك الضرر. تتفاعل الأشعة مع المواد عن طريق نقل الطاقة إلى الإلكترونات في العينة المعرضة للإشعاع ويعزى تأثير الإشعاع على الجزيئات إلى مجموع عمليتين هما التأثير المباشر والتأثير غير المباشر، يتم في التأثير المباشر إيداع الطاقة مباشرة في الجزيء الهدف (Hutchinson ,1985)، فالإشعاع المؤين قادر على التدمير المباشر للجزيئات البيولوجية حيث يتسبب بخلل في الدهون والبروتينات والحمض النووي (Kim *et al.,*2017;Yamini and Gopal,2010). اما التأثير غير المباشر للأشعة فيكون عن طريق التفاعل مع جزيئات الماء وتشكيل الجذور الحرة وأنواع الأكسجين التفاعلية(reactive oxygen species (ROS) [O2، H3O،OH ، H2O2،H] (Kim *et al.,*2017). تهاجم أنواع الأكسجين التفاعلية الناتجة عن الإشعاع الجزيئات الخلوية المختلفة مثل الحمض النووي والدهون (Lee *et al.,* 2009)، وعندما تتفاعل ROS مع الجزيئات الحيوية يمكن أن تنتج الجذور الحرة الثانوية مما يؤدي إلى التأثير السام للخلايا (Kim *et al.,*2017)، ينتج معظم الضرر الناجم عن الإشعاع في الحمض النووي عن طريق الجذور الحرة الأولية قصيرة الأجل التي ينتجها الإشعاع والجذور الحرة الثانوية التي ينتجها التفاعل بين الجذور الحرة الأولية والجزيئات الحيوية (Kim *et al.,*2017). إن الهدف الأكثر أهمية للإشعاع المؤين في الأنسجة الحية هو الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين(Rostami *et al.,*2016) DNA ، حيث يحرض الإشعاع المؤين حدوث كسور DNA مفردة Single Strand Breaks (SSBs) ومضاعفة Double Strand Breaks (DSBs) (Begum *et al.,*2012)، وتكون هذه الكسور السبب في حدوث الزيوغ الصبغية chromosomal aberrations (Syaifudin *et al.,*2017). تتفاعل جذور الهيدروكسيل OHمع السكر في الحمض النووي مما يؤدي إلى استخلاص ذرات H المرتبطة بذرات الكربون الخمس في الحمض النووي DNA، وفي المحلول المؤكسج يتفاعل الأكسجين بسرعة وبشكل غير عكوس مع الجذور الكربونية المتشكلة مما يتسبب بكسور بسلاسل ال DNA (Hutchinson ,1985). بعد حدوث الكسور في سلاسل الحمض النووي تحت تأثير الإشعاع قد يندمج اثنان من الصبغيات لتشكيل صبغي ثنائي المريكز Dicentric chromosomesبالإضافة إلى شظايا عديمة المريكز Acentric fragments of chromosomes (Kravisov *et al.,*2017). الصبغيات ثنائية المريكز غير مستقرة ويتم تفكيكها بأحداث تالية (Syaifudin *et al.,*2017) مما يؤدي الى ظهور شذوذ كالنويات الصغيرة Micronuclei، النوى مذنبة Tailed nuclei، الجسور النووية البلازمية Nucleoplasmatic bridges، نواتان يربط بينهما جسر Dumbbell shaped nuclei وغيرها من الزيوغ الصبغية (Kravisov *et al.,*2017). ينتمي نبات الآس الشائع LMyrtuscommunis إلى عائلة Myrtaceae هو أحد الأنواع الطبية العطرية الهامة، وهو عبارة عن شجيرات صغيرة دائمة الخضرة بارتفاع 1.8–2.4 م، وقد استخدم منذ العصور القديمة لأغراض طبية وغذائية وكتوابل وهو مستوطن في منطقة البحر الأبيض المتوسط (ALeksic and Knezevic,2014). تم شرح التركيب الكيميائي للزيت العطري للآس من قبل

عدد من المؤلفين (Bradesi *et al.*, 1997; Ozek *et al.*, 2000; Koukos *et al.,* 2001; Snow *et al.,* 2001)، وتشمل المركبات التي تم العثور عليها في زيوت الآس كل من: E-2-hexenal و Z-3-hexenol و hexanol و tricyclene و α-thujene و α-pinene و sabinene و β-pinene و myrcene و δ-3- carene و α-terpinene، p-cymene، limonene، 1، 8- cineole، E-β-ocimene، E-oxide، terpinolene، linalool، terpinene-4-ol، borneol، p-cymene-8-ol، α-terpineol، myrtenol، nerol cis-carveol، geraniol، linalylacetate، bornyl acetate، eugenol، myrtenyl acetate، α- terpinyl acetate، geranyl acetate، nerl acetate، methyl eugenol، c- caryophyllene، α-humulene، allo-aromadendrene، germacrene-D، caryophyllene oxide and وcamphene (Beni*et al.,* 2017). وقد ارتبطت الخصائص العلاجية والشفاء لنبات الآس بمحتوى الزيوت الطيارة، وبالمركبات الفينولية phenolic compounds أيضا، والتي يمكن تقسيمها إلى أحماض الفينول phenolic acids، والفلافونويد flavonoids والتانينات tannins التي لها تأثير قوي مضاد للأكسدة (Romani *et al.,* 1999; Balasundram *et al.,* 2006; Gardeli *et al.* , 2008; Yoshimura *et al.,* 2008; Pereira *et al.,* 2012; Aleksic and Knezevic, 2014). إن monoterpenes هي المركبات الرئيسية المسؤولة عن نكهة ورائحة زيت الآس الشائع وهي تتضمن: cineole-1.8، myrtenyl acetate، α-pinene، myrtenol، وlimonene (Gardeli *et al.* ,2008). وتعتبر مركبات myricetin وquercetin و catechin ومشتقاتها من مركبات الفلافونويدات التي تم العثور عليها حتى الآن في أوراق وسيقان الآس الشائع (Aleksic and Knezevic, 2014;Asgarpanah and Ariamanesh, 2015). ويعتبر Myricetin مادة خاصة بالعائلة الآسية Myrtaceae (Haron *et al.* , 1992).

تبين أن المستخلصات والزيوت العطرية للأس ذات فعالية دوائية متعددة واستخدم النبات لعلاج العديد من الاضطرابات منها الالتهاب (Feibt *et al.,*2005) كالتهاب المسالك البولية والشعب الهوائية والجيوب الأنفية، السعال، مشاكل الجهاز الهضمي، البواسير، الإسهال، التشنج، الروماتيزم، المشاكل العصبية كالصرع، مسكن، خافض لسكر الدم(Ahmadi *et al.,*2015;Dincel *et al.*,2007)خافض لضغط الدم(Bouaziz *et al.,*2015)، مضاد للبكتيريا(Touaibia,2015)، والميكروبات(Ahmadi *et al.,*2015;Touaibia,2015) ، والطفيليات(Ahmadi *et al.,*2015) مضاد للقلق وحب الشباب ومبيد للأعشاب ومضاد للفطريات(MirajandKiani,2016) ، وداء المبيضات(Cannas *et al.,*2013)، مضاد للملاريا(Kaur and Kaur,2017) ، خفض خطر تصلب الشرايين (Medhat *et al.,*2017) تحسين الأداء المناعي (Goudarzi *et al.,*2016)، أثار مضادة للسمية الجينية(Ahmadi *et al.,*2015)، بالإضافة إلى الخصائص المضادة للسرطان ضد عدد من السلالات الخلوية السرطانية مثل سرطان الدم(Grandjenette *et al.,* 2015)، سرطان المثانة(Iskender *et al.,*2015)،سرطان الثدي Iskender *etal.,*2016)Iskender *etal.,*2016) ، سرطان البروستات(Ogur,2014) ، بالإضافة إلى الخصائص المضادة للأكسدة (Gunyakti *et al.*,2017;Houbairi *et al.*,2015;Tumen *et al.*, 2012). بدأ الاهتمام بالمنتجات الطبيعية لتخفيف الأثر السلبي للإشعاع (Lee *et al.,*2009) فمكونات النباتات الطبية لها أهمية في تخفيف الضرر الناجم عن الإشعاع من خلال خصائصها المضادة للأكسدة التي تحد من أضرار الإشعاع بما في ذلك الإجهاد التأكسدي الناجم عن أنواع الأكسجين التفاعلية (RosKim *et al.*,2017). تقوم المواد الواقية من ضرر

الإشعاع بتحييد الجذور الحرة مما يؤدي إلى تخفيف حدوث التأثيرات الكيميائية الإشعاعية الأولية التي تلي التعرض للإشعاع (Lee *et al.*,2009) ويعزى النشاط المضاد للأكسدة إلى وجود مركبات الفينول والفلافونيد والعفص في الأجزاء المختلفة لنبات الآس (Gunyakti *et al.*,2017) ويعتمد النشاط المضاد للأكسدة للنبات على عدد وموضع هيدروكسيل الفينول phenolic hydroxyls في جوانب الحلقات العطرية (Aleksic and Knezevic, 2014). يقوم البولي فينول بتثبيط ضرر الجذور الحرة على الدهون والبروتينات (Mirzaee and Najafian,2015) ويمنع التأكسد الضار ويقي من الآثار السامة للجذور الحرة ويخفض من قدرتها ويحولها إلى منتجات أكثر استقرارا من خلال منح الإلكترونات (Bouaziz *et al.*,2015) والهيدروجين للجذور الحرة التفاعلية (Kanoun *et al.*,2014). وقد تناولت معظم المقالات الأثر المضاد للأكسدة لمستخلصات نبات الأس ضد تحريض مركبات كيميائية مختلفة للإجهاد التأكسدي وتبين أن الجزء الفينولي للنبات كان له تأثير مضاد للأكسدة عن طريق تنشيط الانزيمات المضادة للأكسدة وتثبيط نشاط الأنزيمات المؤيدة للأكسدة وتنشيط أنزيمات ترميم الـDNA وخفض بيروكسيد الدهون، (MEDHAT *et al.*,2017 (KIM*et al.*,2017;Ines *et al.*, 2012; وبناء عليه استنتج الباحثون أن قادر على وقاية الخلايا من الإجهاد التأكسدي، ولذلك نعتقد بأنه ربما يكون لمستخلصات الآس أثرا واقيا من الإشعاع المؤين المحرض للإجهاد التأكسدي وتضرر DNA.

أهمية البحث وأهدافه:

أظهرت الدراسات المنشورة احتواء الأجزاء المختلفة لنبات الآس على عدد من المركبات المضادة للإجهاد التأكسدي والقادرة على كنس الجذور الحرة. وبناء عليه كان الهدف من هذا البحث هو تحري مقدرة الخلاصة الكحولية لأوراق الآس على الحد من نسبة الأضرار الوراثية الخلوية المحرضة بأشعة غاما في لمفاويات الدم المحيطي البشري، وآلية هذه الوقاية، إن وجدت، وبالتالي إمكانية الاستفادة من مستخلص هذا النبات الواسع الانتشار في القطر كواقي إشعاعي. وبما أن الأس من النباتات المنتشرة في القطر (بشكل طبيعي ومزروع)، فإن أهمية هذا البحث تكمن في إمكانية استخدامه كأحد الموقيات من تأثير الأشعة المؤينة لدى العاملين المعرضين مهنيا للإشعاع المؤين أو المعالجين بالإشعاع، بما ينعكس على الصحة العامة وقد تمت الدراسات العملية في قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوي في هيئة الطاقة الذرية السورية ولمدة عام.

طرائق البحث ومواده:

1.المواد والادوات:

الجدول (1) قائمة بالمواد الكيميائية والبيولوجية المستعملة في انجاز هذا البحث مع اسمها الكيميائي ومصدرها التجاري.

	المادة	الاسم الأجنبي	درجة النقاوة	المصدر التجاري
1	كحول ايتيلي	Ethanol	%100	Merck # 986
2	حمض خل ثلجي	Acetic Acid	%100	Merck # 56
3	ملون غيمزا	Giemsa L	–	Merck # 9204
4	كلوريد الصوديوم NaCl	Sodium Chloride		ProlaBo

7	وسط زرع صنعي كامل	Chromosome medium B		
8	سيتوشالازين-ب	cytoshalsin-B		Germany
13	كلوريد البوتاسيوم	Potassium chloride		

الجدول (2) قائمة بالأدوات والأجهزة المستعملة مع الطراز والمصدر التجاري.

م.	الأداة أو الجهاز	الاسم الأجنبي	الطراز	المصدر التجاري
1	خيمة زرع عقيمة	Laminar Flow		
2	مجهر مع نظام تضاد الأطوار مع نظام تصوير رقمى	Reasearch Microscope with phase Contrast system and digital Camera	Olympus	Japan
3	حاضنة	Incubator		
4	مثقلة مبردة متعددة السرعات	Swing bucket centrifuge	Eppendorf	Hamburg, Germany
5	ميزان الكتروني رقمي(0,0001 غ)	Digital Balance		
6	هزاز أنابيب مخبرية	Shaker		
7	أنابيب جمع الدم بالتخلية تحوي على K_3EDTA أو K_2EDTA أو هبارين الليثيوم كمانع تجلط.			من شركة BD
8	أنابيب من البوليسترين معقمة أحادية الاستعمال.			من شركة BD (#352058).
9	حوامل أنابيب.			
10	ممصات آلية متفاوتة السعة 50-1000 مكرومتر.		Eppendorf	Hamburg, Germany
11	مجمدة (-80°م).		Operon	Korea
12	براد عادي		الحافظ	سورية

2. المحاليل:

1. محلول الصدمة الحلولية (0.336 غرام من كلوريد البوتاسيوم (KCL) محلول الصدمة الحلولية 0.32 غرام من سيترات ثلاثية الصوديوم 100مل ماء مقطر).
2. محلول التثبيت :(محلول كارنوا 1:3 مزيج من الايتانول او الميتانول: حمض الخل الثلجي).
3. حمض الخل 60%:60مل من حمض الخل الثلجي و4 مل ماء مقطر.
4. الكولشيسين: بتركيز نهائي 0.01 ملغ/مل. سيتوشالازين4μg/ml .

3. طرائق البحث:

1.3.تحضير المستخلص:

تمت إضافة 500 مل من الكحول الإيتيلي بتركيز 70% إلى 50 غرام من أوراق نبات الآس المجففة في الظل بدرجة حرارة المخبر، ثم تم الاستخلاص مرتين في الكحول في كل مرة لمدة 24 ساعة على نفس الأوراق لمدة 48 ساعة، ثم أخذ المستخلص الناتج وتم تبخير الكحول منه بدرجة حرارة 41 مئوية لمدة 3 أيام، تم أخيرا الحصول على المستخلص النهائي ثم وضع في البراد بدرجة حرارة −20 إلى حين الاستخدام.

2.3.التشعيع:

أجريت عمليات تشعيع العينات بأشعة غاما من منبع للكوبالت−60 (^{60}CO) في المخبر العياري التابع لقسم الوقاية في هيئة الطاقة الذرية السورية، وذلك ضمن حمام مائي مضبوط عند درجة حرارة 37 مئوية، وبجرعة قدرها 2 غري.

3.3.التحليل الإحصائي:

تم في هذا العمل إظهار النتائج كمتوسطات ± الانحراف المعياري (mean±SD) كما قمنا بتحليل النتائج إحصائيا باستخدام برنامج (Excel 2003) مستخدمين اختبارT-Test (Two-Sample Assuming Equal Variances) وتستخدم هذه الطريقة بشكل عام لتقدير الفروق بين مجتمعين إحصائيين في حالة العينات الصغيرة (n<30)، وذلك لمعرفة الاختلافات بين المجتمعين، هل هي اختلافات معنوية وبمستوى ثقة 95 %. واعتمدت فيه قيمة P-Valueكقيمة إحصائية معنوية عندما تكون ($p \leq 0.05$)، أو غير معنوية عندما تكون ($p \geq 0.05$).

3.4.الإعتيان:

تم سحب 15 مل من الدم المحيطي البشري بشكل عقيم من وريد الساعد ل 5 متبرعين بالغين أصحاء وغير مدخنين بواسطة إبرة خاصة وضمن أنابيب مفرغة من الهواء معقمة وتحوي على مانع التخثر هيبارين الليثيوم lithium heparin anticoagulant، ثم قسمت كل عينة إلى قسمين: تم تشعيع القسم الأول بجرعة 2 غري أما القسم الأخر بقي بدون تشعيع ثم تم الاستنبات.

3.5.استنبات اللمفاويات:

اعتمدنا في عملنا على طريقتي Frank, Seabright مع بعض التعديلات عليها وتتلخص طريقة استنبات لمفاويات الدم المحيطي كما يلي:

1) تم استنبات الدم تحت شروط عقامة ضمن خيمة زراعة معقمة وباستعمال أدوات وأوساط معقمة وفي أنابيب سعة 15 مل من البولي بربيلين لها قعر مخروطي، كل أنبوب يحوي على وسط زراعة مكون من 10 مل وسط زراعة chromosome B المضاف إليه الصادات الحيوية (بنسيلين بتركيز 100 وحدة/مل وستريبتومايسين بتركيز 100

ميكروغرام/مل)، و10 مل من مصل العجل المولود حديثاً Fetal Calf Serum و50 ميكرولیتر من محلول phytohemagglutinin (محرض انقسامي).

2) تمت إضافة الدم والمستخلص الكحولي لأوراق نبات الأس إلى الأنابيب على الشكل التالي:

- الأنبوب الأول 500 ميكروليتر دم غير مشعع
- الأنبوب الثاني 500 ميكروليتر دم مشعع
- الانبوب الثالث 500 ميكروليتر دم غير مشعع ومستخلص بتركيز 50 ميكروغرام /مل
- الانبوب الرابع 500 ميكروليتر دم غير مشعع ومستخلص بتركيز 100 ميكروغرام /مل
- الأنبوب الخامس 500 ميكروليتر دم مشعع ومستخلص بتركيز 50 ميكروغرام /مل.
- الأنبوب السادس 500 ميكروليتر دم مشعع ومستخلص بتركيز 100 ميكروغرام /مل.

3) تم استنبات اللمفاويات بشكل عقيم تحت خيمة زرع عقيمة ذات ضخ هوائي شاقولي ثم حضنت الأنابيب لمدة 72 ساعة في الحاضنة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية وبجو من الهواء حاوي على 5% من غاز CO_2.

4) بعد 44 ساعة من بداية الاستنبات أضيف السيتوشالازين-ب cytochalasin B (بتركيز نهائي 4μg/ml) وترك الخلايا لتنمو لمدة 28 ساعة إضافية.

3.6. تحضير الخلايا لعد النوى الدقيقة:

1. جمع الخلايا والتثفيل لمدة 10 دقائق بسرعة 1500 دورة/دقيقة.
2. المعالجة بمحلول ملحي منخفض التوتر 0.05 M/ KCl وذلك من أجل حل كريات الدم الحمراء واندباج الخلايا اللمفية مع الحرص على تجانس الخليط وذلك بوضع الأنبوب عند إضافة كلوريد البوتاسيوم على رجاجة انابيب.
3. تثبيت الخلايا بمزيج 1:3 ميتانول /حمض الخل الثلجي، يضاف المثبت أثناء رج الخلايا وذلك لتحاشي تكون التكتلات ثم يتم تثفيل الخلايا مرة أخرى في المثفلة بسرعة 2000 دورة /الدقيقة لمدة 8 دقائق.
4. التخلص من المحلول الطافي بعد التثفيل ثم غسل الخلايا مرتين إضافيتين بالمثبت مع التثفيل بعد كل غسيل والتخلص من المحلول الطافي.
5. رج معلق الخلايا برفق ثم إسقاط الخلايا على صفائح زجاجية نظيفة ورطبة ومبردة مسبقا، والتجفيف بالهواء، ثم التلوين بمحلول 5%من ملون غيمزا لمدة 10 دقائق.
6. دراسة نسبة النويات الصغيرة في 500 خلية ثنائية النواة لكل متبرع باستخدام مجهر أبحاث بتكبير 600.

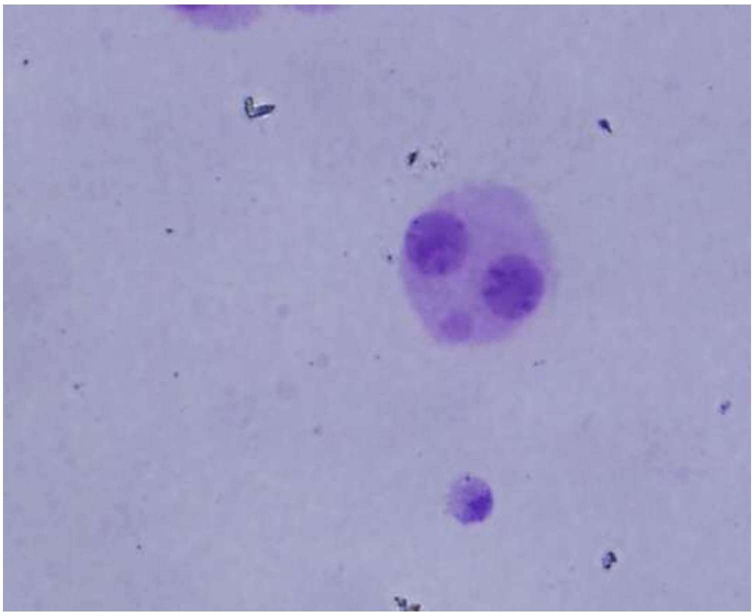
النتائج والمناقشة

النتائج:

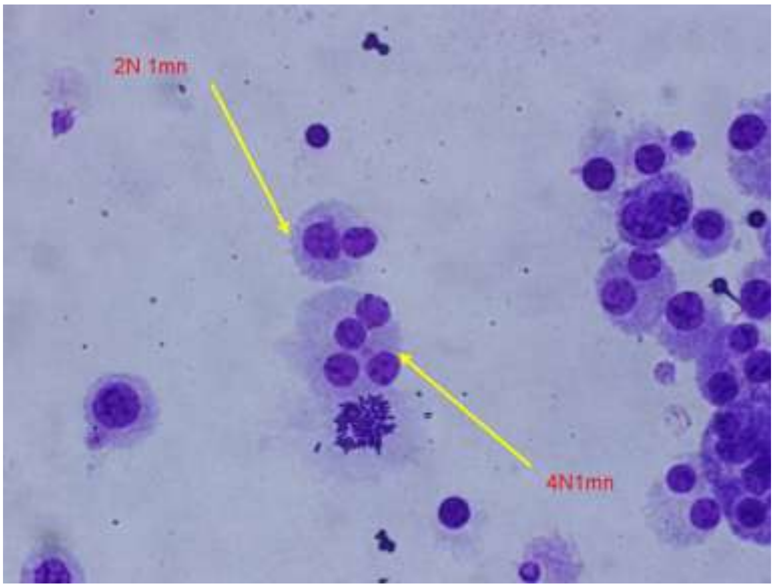
1. الدراسة المجهرية:

تم عند تطبيق الخطوات الخاصة باستنبات لمفاويات الدم المذكورة في فقرة استنبات اللمفاويات، الحصول على خلايا لمفاوية ثنائية النوى بأشكال واضحة وبأعداد مناسبة للدراسة المجهرية. يظهر الشكلان (1 و2) صورتين مجهريتين للخلية اللمفاوية ثنائية النوى الحاوية على نوية صغيرة، وخلايا لمفاوية ثنائية ورباعية النوى تحوي على نوية صغيرة واحدة وخلية ثنائية النوى طبيعية لا تحوي على نويات صغيرة، على التسلسل، والتي حصل عليها في هذه الدراسة،

حيث تم دراسة 500 خلية لمفاوية ثنائية النواة لكل تركيز من المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس ولكل متبرع من المتبرعين الخمسة.



الشكل (1): صورة مجهرية لمستنبتات الخلايا اللمفاوية المعالجة بالسيتوشالازين B في الساعة 44 من الاستنبات والمثبتة في الساعة 72، تظهر خلية ثنائية النوى مع نوية صغيرة.



الشكل (2): صورة مجهرية لخلايا لمفاوية ثنائية النوى طبيعية تحتوي على نواتين (2N)، وخلية لمفاوية ثنائية النوى تحوي على نوية صغيرة (2N 1mn)، وخلية لمفاوية رباعية النوى تحوي على نوية صغيرة (4N 1mn).

2. نتائج الدراسة العملية:

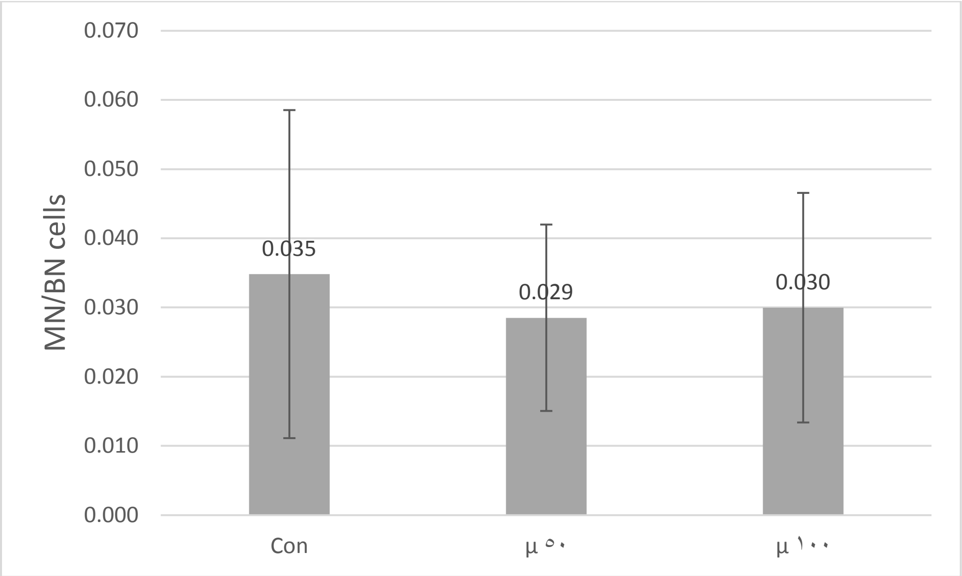
تمت دراسة وإحصاء عدد النويات الصغيرة في الخلايا اللمفاوية ثنائية النوى التي تم الحصول عليها من استنبات لمفاويات الدم المحيطي ل 5 متبرعين أصحاء وغير معرضين للأشعة. يظهر الجدول (3) تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس والتشعيع على تواتر النويات الصغيرة في لمفاويات الدم المحيطي لكافة

المتبرعين (الشاهد السلبي، شاهد إيجابي يتضمن المستخلص فقط بتركيز 50 ميكروغرام/مل، شاهد إيجابي يتضمن المستخلص فقط بتركيز 100ميكروغرام/مل، شاهد مشعع ، المستخلص بتركيز50 ميكروغرام/مل وتمت إضافة المستخلص بعد التشعيع مباشرة، المستخلص بتركيز100ميكروغرام/مل وتمت إضافة المستخلص بعد التشعيع مباشرة)، كما يظهر الجدول (3) متوسط أعداد النويات الصغيرة في الخلايا اللمفاوية ثنائية النوى لجميع المتبرعين والانحراف المعياري عند كل نقطة تجريبية.

الجدول(3): متوسطات أعداد النويات الصغيرة/500 خلية ثنائية النوى لمجموعة المتبرعين عند نقاط تجريبية مختلفة.

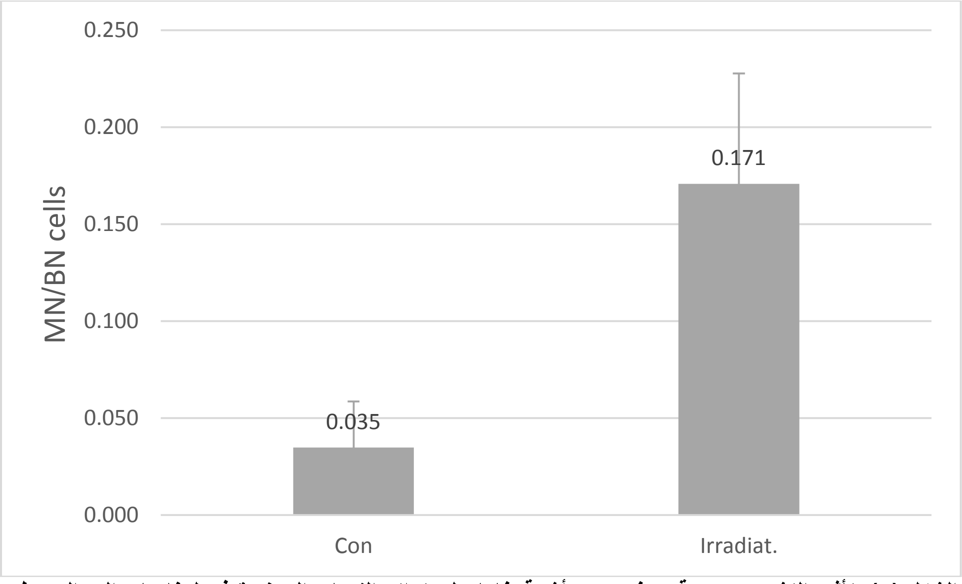
الجرعة من المستخلص	متوسط النويات الصغيرة لكل شاهد/500خلية لمفاوية ثنائية النوى/المتبرع					المتوسط	الانحراف المعياري
	A	B	C	D	E		
Con	0.061	0.023	0.000	0.046	0.044	0.035	0.024
50 µ	0.032	0.012	0.034	0.046	0.018	0.029	0.013
100 µ	0.025	0.022	0.011	0.055	0.036	0.030	0.017
Rad. only	0.227	0.100	0.131	0.227	0.169	0.171	0.057
50 µ+rad.	0.132	0.097	0.098	0.137	0.159	0.124	0.027
100 µ+rad.	0.128	0.064	0.104	0.111	0.160	0.113	0.035

يظهر الشكل (3) تمثيلا بيانيا لتواتر النويات الصغيرة في العينة الشاهدة والعينات المعالجة بالمستخلص فقط، كانت النسبة المئوية لعدد النويات الصغيرة للمجموعة الشاهدة (0.024 ± 0.035)، أدت المعالجة بالمستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس بتركيز 50 ميكروغرام/مل إلى انخفاض تواتر النويات الصغيرة بالمقارنة مع المجموعة الشاهدة (0.029±0.013)، وأدت المعالجة بالمستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس بتركيز 100ميكروغرام/مل أيضا إلى انخفاض تواتر النويات الصغيرة بالمقارنة مع المجموعة الشاهدة (0.030±0.017)، ولكن هذا الانخفاض باستخدام التركيزين السابقين لم يكن ذو مغزى إحصائي مقارنة مع المجموعة الشاهدة (P=0.3, P=0.3 على التسلسل).



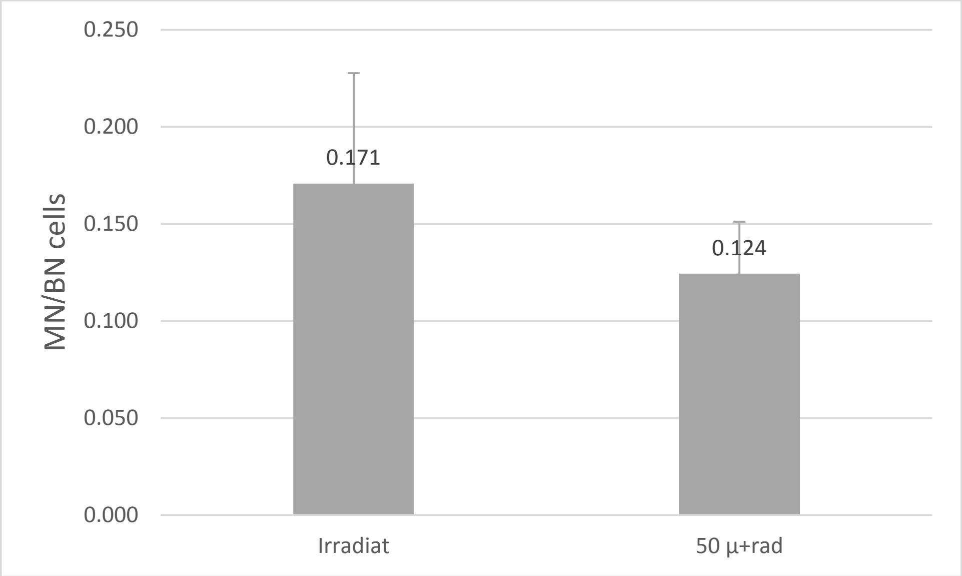
الشكل (3) :مقارنة نسب النويات الصغيرة بين المجموعة الشاهدة والمجموعات المعالجة بالمستخلص فقط بالتركيزين 50و100 ميكروغرام /مل.

أدى تشعيع اللمفاويات، كما يظهر على الشكل (4)، إلى زيادة كبيرة في تواتر النويات الصغيرة (0.171±0.057) بالمقارنة مع المجموعة الشاهدة (0.030±0.017) وكانت الزيادة ذات مغزى إحصائي (P=0.00).



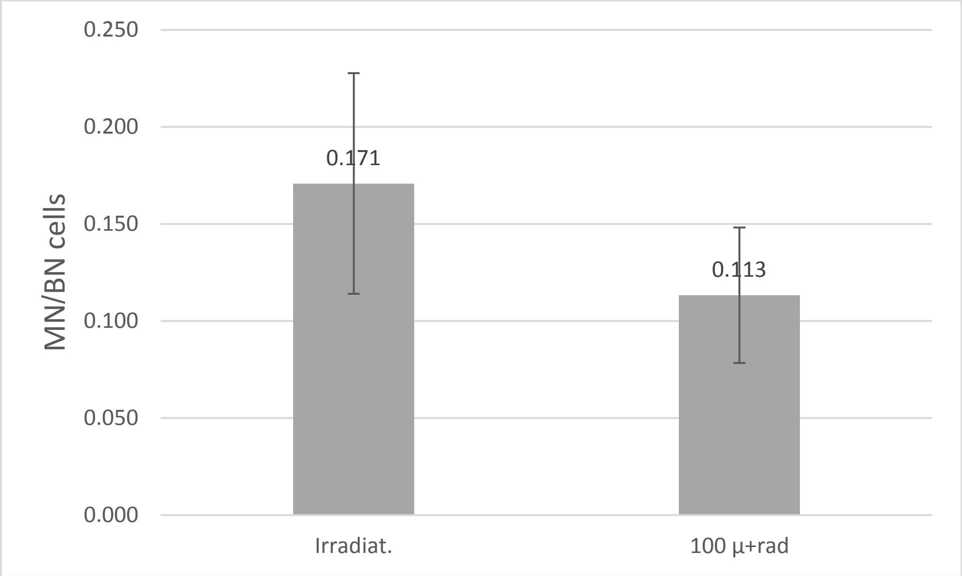
الشكل (4) :تأثير التشعيع بجرعة 2 غري من أشعة غاما على تواتر النويات الصغيرة في لمفاويات الدم المحيطي

يظهر الشكل (5) أن إضافة المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس بالتركيز 50 ميكروغرام /مل مباشرة بعد تشعيع العينات، إلى الخلايا قد أدت إلى انخفاض كبير في تواتر النويات الصغيرة (0.124±0.027) بالمقارنة مع المجموعة المشععة (0.171±0.057)، وكان الانخفاض ذو مغزى إحصائي (P=0.04)،



الشكل (5) :تأثير المعالجة بالتركيز 50 ميكروغرام /مل من المستخلص الكحولي لأوراق الأس بعد التشعيع بجرعة 2 غري من أشعة غاما على تواتر النويات الصغيرة في لمفاويات الدم المحيطي.

كما يظهر الشكل (6) أن إضافة المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس إلى الخلايا بالتركيز 100ميكروغرام /مل مباشرة بعد التشعيع قد أدت إلى انخفاض كبير في تواتر النويات الصغيرة (0.113±0.035) بالمقارنة مع المجموعة المشععة (0.171±0.057) وكان هذا الانخفاض ذو مغزى إحصائي (P=0.03)



الشكل (6) :تأثير المعالجة بالتركيز 100 ميكروغرام /مل من المستخلص الكحولي لأوراق الأس بعد التشعيع بجرعة 2 غري من أشعة غاما على تواتر النويات الصغيرة في لمفاويات الدم المحيطي.

وكما هو واضح على الشكلين 5 و6 فإن إضافة المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس إلى الخلايا اللمفاوية بالتركيزين 50 و100 ميكروغرام/مل أدى إلى انخفاض كبير ($P<0.05$) في تواتر النويات الصغيرة المحرضة بأشعة

غاما بالمقارنة مع المجموعة المشععة. كما يلاحظ أيضا أن إضافة المستخلص إلى المستنبتات الخلوية بالتركيز 100 ميكروغرام/مل أدى إلى انخفاض أكبر في تواتر النويات الصغيرة بالمقارنة مع التركيز 50 ميكروغرام /مل، مما يشير إلى ارتباط الأثر المدروس (تواتر MN) بالجرعة (تركيز المستخلص) على الرغم من أن هذه الفرق لم يكن معنويا (P= 0.22).

المناقشة:

يسبب الإشعاع المؤين الإجهاد التأكسدي في الخلايا من خلال تعزيز تشكيل Ros، وقد بدأ الاهتمام بمضادات الأكسدة الطبيعية كمعدلات لتأثير الإشعاع وعلى الرغم من ذلك، معظم النتائج التي تم الحصول عليها من دراسات مختلفة على المركبات المضادة للأكسدة كانت غير حاسمة (Lee *et al.*,2009). تم تقييم العديد من المركبات من أصل نباتي كعوامل واقية من الإشعاع في الحيوانات، لكن هنالك أمثلة قليلة من التجارب لإثبات فعالية هذه المركبات عند الإنسان (Davari *et al.*,2012). وقد اعتمدنا في هذه الدراسة طريقة مقايسة النوى الصغيرة التي تعتبر واحدة من أكثر المقايسات نجاحا والموثوق فيها في اختبار السمية الجينية وقد استخدمت على نطاق واسع للتحقيق في مختلف الآثار المحتملة للمواد الواقية من الإشعاع (Rostami et al.,2016). قمنا بمقايسة النويات الصغيرة المحرضة بجرعة 2 Gy من أشعة غاما في الدم المحيطي لخمس متبرعين أصحاء وغير معرضين للأشعة المؤينة. ودرسنا تأثير إضافة تركيزين من المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس [50 ميكرو غرام /مل و100ميكروغرام/مل]، بعد التشعيع مباشرة، على تعديل تحريض أشعة غاما للنويات الصغيرة في لمفاويات الدم المحيطي في الزجاج. أظهرت النتائج، بشكل عام، أن المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس يقلل بشكل معنوي من الأضرار الخلوية الوراثية التي تحرضها أشعة غاما في اللمفاويات البشرية. حيث تبين أن إضافة المستخلص (سواء 50 أو 100 ميكروغرام /مل) إلى المستنبتات الخلوية يسبب انخفاضا معنويا (P=0.3) في تواتر النويات الصغيرة بالمقارنة مع المجموعة الشاهدة، مما يشير إلى أن هذا المستخلص منخفض السمية ولا يسبب أضرارا للحمض النووي وهو ما يتفق مع نتائج (Davari *et al.*,2012) حول تأثير الشاي الأخضر على تعديل تأثير أشعة غاما على اللمفاويات البشرية. حرض التشعيع زيادة كبيرة (P=0.00) في تواتر النويات الصغيرة في لمفاويات الدم المحيطي تقدر بحوالي 5 أضعاف تقريبا التواتر المسجل في المجموعة الشاهدة غير المشععة (الجدول 3). ويعود ذلك إلى تحريض الإشعاع المؤين حدوث كسور مفردة ومضاعفة في سلاسل DNA، والتي تساهم في تشكل الزيوغ الصبغية والنويات الصغيرة وهو ما يتوافق مع نتائج(Syaifudin *et al.*, 2017) و(Begum *et al.*,2012) عن تأثير الإشعاع المؤين على اللمفاويات البشرية.

أدت إضافة المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس إلى مستنبتات الخلايا اللمفاوية البشرية بالتركيز 50 ميكروغرام /مل بعد تشعيع العينات مباشرة إلى انخفاض كبير في تواتر النويات الصغيرة بالمقارنة مع المجموعة المشععة (P=0.04)، وأدت إضافة المستخلص بالتركيز 100 ميكرو غرام /مل أيضا لانخفاض كبير في تواتر النويات الصغيرة بالمقارنة مع المجموعة المشععة (P=0.03). تتفق نتائج هذه الدراسة مع الدراسات التي قام بها كل من(Begumn et al.,2012;Castillo et al.,2000;Delbano *et al.*,2006;Davari *et al.*,2012;Begum et al.,2012;Patil *et al.*,2017) حول تأثير المحتوى الفينولى لنباتي إكليل الجبل والشاي الأخضر والمواد الفينولية في المركبين Rutin و Quercetin والفلافون الغذائي Apigenin و Flavan3OLs الموجود في بذور العنب على تعديل تأثير أشعة غاما على الخلايا اللمفاوية البشرية، والتي أظهرت الإمكانيات الواقية من الأشعة والمضادة للأكسدة

والقدرة على تحييد الجذور الحرة لتلك النباتات والمركبات. كما تتفق النتائج التي حصلنا عليها مع نتائج (Jagetia and Baliga 2002,) في دراستهما على مستخلصات أوراق نبات البرقوق الأسود، الذي ينتمي إلى العائلة الآسية، والتي أظهرت أن نبات البرقوق الأسود يخفض تواتر النوى الصغيرة وتضرر DNA الذي يسببه الإشعاع في الخلايا اللمفاوية البشرية، ومع نتائج (kim *et al.*,2017) في دراستهم حول تأثير العديد من المستخلصات النباتية الغنية من بمركبات البوليفينول. أظهرت هذه الدراسة أن إضافة المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس إلى الخلايا اللمفاوية بالتركيز 50 و 100 ميكرو غرام/مل أدى إلى انخفاض معنوي في عدد النويات الصغيرة المحرضة بأشعة غاما بالمقارنة مع المجموعة المشععة ($P<0.05$)، وعلى الرغم من عدم وجود فروق معنوية في تردد النويات الصغيرة بين التركيزين 50 و 100 ميكروغرام /مل ($P=0.22$) لوحظ ان المستخلص بالتركيز 100 ميكروغرام /مل سبب انخفاض أكبر في تردد النويات الصغيرة من التركيز 50 ميكروغرام /مل كما هو ظاهر من انخفاض السمية الجينية في هذا التركيز لذلك، فان التركيز الأمثل من المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس في هذه الدراسة كان 100ميكروغرام /مل. تتوافق هذه النتائج مع نتائج دراسات أخرى (Szejk *et al.* 2017; Londhe *et al.* 2009)، التي أظهرت ارتبط الأثر الواقي للبوليفينولات بالتركيز المستخدم. نعتقد بان الخصائص الواقية من الاشعة لنبات الآس الشائع تعود إلى القدرة المضادة للأكسدة العالية للنبات فهو قادر بواسطة المحتوى العالي من مركبات البوليفينول Polyphenols على تحييد الجذور الحرة التفاعلية الناتجة عن الإشعاع من خلال منحها الالكترونات والهيدروجين (Mirzaee and Najafian,2015;Bouaziz *et al.*,2015;Kanoun *et al.*,2014) وتبين أن الجزء الفينولي للنبات كان له تأثير مضاد للأكسدة عن طريق تنشيط الأنزيمات المضادة للأكسدة وتثبيط نشاط الأنزيمات المؤيدة للأكسدة وتنشيط انزيمات ترميم الDNA وخفض بيروكسيد الدهون،(MEDHAT *et al.*,2017;KIM*et al.*,2017;Ines *et al.*, 2012)

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات:

- لم يسبب المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس وحده بالتركيزين 50 و100 ميكروغرام /مل أضراراً للحمض النووي فهو لم يسبب زيادة في تشكل النويات الصغيرة مقارنة مع المجموعة الشاهدة مما يؤكد أن المستخلص غير سام جينيا.
- يحرض الإشعاع سمية جينية للخلايا الليمفاوية تظهر من الزيادة الكبيرة في تواتر النويات الصغيرة.
- أظهر للمستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس بالتركيزين 50و100 ميكروغرام/مل خصائص واقية من أشعة غاما، حيث خفض تواتر النوى الصغيرة ونجح في التخفيف من التأثيرات السامة للخلايا والضرر الجيني الناتج عن أشعة غاما من خلال خفض تواتر النوى الصغيرة في الخلايا اللمفاوية.

2. التوصيات:

- إجراء مزيد من الدراسات المعمقة على المستخلصات المختلفة لنبات الأس، في الزجاج وفي الحي، لتحديد الآليات الجزيئية للوقاية الإشعاعية قبل النظر في إمكانية استخدامه كأحد الموقيات الإشعاعية سواء للعاملين المعرضين مهنيا للإشعاع المؤين أو لتخفيف الآثار الجانبية المعالجة الإشعاعية، بما ينعكس على الصحة العامة.

- البحث في التأثير الواقي من الأشعة لنباتات أخرى ذات خصائص مضادة للأكسدة ومحتوى عالي من المركبات الفينولية.

References:

Ahmadi, B.B ; Bahmani, M ; Naghdi, N ; Saks, K ; Ahmadi, S.B ; Kopaei, M.R. *Review on phytochemistry, therapeutic and pharmacological effects of myrtus (Myrtus communis).* Der Pharmacia Lettre , vol. 7, N .11 , 2015, 160-165.

Aleksic, V ; Knezevic, P. *Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of Myrtus communis L.* Microbiological Research, vol.169, N.4, 2014, 240-254.

Allen, C ; Borak, T. B; Tsujii, H; Nickoloff, J.*A .Heavy charged particle radiobiology: Using enhanced biological effectiveness and improved beam focusing to advance cancer therapy.* Mutation Research /fundamental and molecular mechanisms of mutagennssis, vol. 711, N. 1-2, 2011, 150–157.

Balasundram, N; Sundram, K; Samman, S. *Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses.* Food chemistry, vol. 99, N.1, 2006, 191-203.

Begum, N; Prasad, N. R; Kanimozhi, G; Hasan, A. Q. *Apigenin ameliorates gamma radiation-induced cytogenetic alterations in cultured human blood lymphocytes.* Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, vol. 747, N. 1, 2012, 71-76.

Begumn, N ; Prasad, R. *Apigenin, a dietary antioxidant, modulates gamma radiation-induced oxidative damages in human peripheral blood lymphocytes*. Biomedicine & Preventive Nutrition , Vol. 2, N .1, 2012 , 16-24.

Beni, A.S; Shahmokhtar, M. K; Masoumias, A; Khajehsharifi, H. *Phytochemical and Biological Studies of Some Myrtus (Myrtus communis L.) Populations of South West Region of Zagros (Iran).* Nat Prod Chem Res, vol. 5, N.290, 2017, 2329-6836.

Bouaziz, A; Abdalla, S; Baghiani, A; Charef, N. *Phytochemical analysis, hypotensive effect and antioxidant properties of Myrtus communis L. growing in Algeria.* Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, vol. 5, N.1, 2015, 19-28.

Bradesi, P; Tomi, F; Casanova, J; Costa, J; Bernardini, A. F. *Chemical composition of myrtle leaf essential oil from Corsica (France).* Journal of essential oil Research, vol. 9, N.3, 1997, 283-288.

Cannas, S; Molicotti, P; Ruggeri, M; Cubeddu, M; Sanguinetti, M; Marongiu, B; Zanetti, S. *Antimycotic activity of Myrtus communis L. towards Candida spp. from clinical isolates.* The Journal of Infection in Developing Countries, vol. 7, N.3, 2013, 295-298.

Castillo, J ; Garcia,O.B ; Lorente, J. *Antioxidant Activity and Radioprotective Effects against Chromosomal Damage Induced in Vivo by X-rays of Flavan-3-ols (Procyanidins) from Grape Seeds (Vitisvinifera): Comparative Study versus Other Phenolic and Organic Compounds.* J. Agric. Food Chem, vol .48 , N .5, 2000, 1738–1745.

Davari, H; Haddad, F; Moghimi, A; Rahimi, M. F; Ghavamnasiri, M. R. *Study of radioprotective effect of green tea against gamma irradiation using micronucleus assay on binucleated human lymphocytes.* Iranian journal of basic medical sciences, vol. 15, N.5, 2012, 1026–1031.

Del Bano, M. J; Castillo, J; Benavente-García, O; Lorente, J; Martín-Gil, R; Acevedo, C; Alcaraz, M. *Radioprotective− antimutagenic effects of rosemary phenolics against chromosomal damage induced in human lymphocytes by γ-rays.* Journal of agricultural and food chemistry, vol. 54, N.6, 2006, 2064-2068.

Dincel,A.S ; Acikgoz,S ; Cevik,C ; Sengelen,M ; Yesilada,E. *Effects of in vivo antioxidant enzyme activities of myrtle oil in normoglycaemic and alloxan diabetic rabbits.* Journal of Ethnopharmacology , vol. 110, 2007,498–503.

Feibt,C ; Franke,L ; Appendino,G ; Werz,O. *Identification of Molecular Targets of the Oligomeric Nonprenylated Acylphloroglucinols from Myrtus communis and Their Implication as Anti-Inflammatory Compounds.* The journal of pharmacology and experimental therapeutics , vol. 315, N. 1, 2005, 389–396.

Gardeli, C; Vassiliki, P; Athanasios, M; Kibouris, T; Komaitis, M. *Essential oil composition of Pistacia lentiscus L. and Myrtus communis L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts.* Food chemistry, vol. 107, N.3, 2008, 1120-1130.

Goudarzi,M ; Samiei,I ; Nanekaran,S ; Nasrolahi,F. *The Effect of Myrtus Communis Oil Extract on Growth Performance and Immune Responses in Ross and Cobb Strain Broilers.* Journal of Advanced Agricultural Technologies , vol. 3, N. 1 , 2016, 10-14.

Grandjenette, C ; Schnekenburger, M ; Morceau, F ; Mack, F ; Wiechmann, K ; Werz, O ; Dicato, M; Diederich, M. *Dual Induction of Mitochondrial Apoptosis and Senescence in Chronic Myelogenous Leukemia by Myrtucommulone A.* Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry , vol. 15 , N. 3, 2015, 363-373.

Gunyakti,A ; Ozusaglam,M.S ; Mujtaba,M. *Assessment of Biological and Antioxidant Capacities of Myrtuscommunis L. Leaf and Fruit Extracts from Mediterranean Region of Turkey.* J Microbiol Biotech Res, vol. 7, N .3 , 2017, 16-24.

Haron, N. W; Moore, D. M; Harborne, J. B. *Distribution and taxonomic significance of flavonoids in the genus Eugenia (Myrtaceae).*Biochemical systematics and ecology, vol. 20, N. 3, 1992, 266-268

Houbairi,S ; Elmiziani,I ; Lamiri,A ; Essahli,M. *Comparison of the Antioxidant Activity of Aromatic Medicinal Plants of Moroccan Origin*. EJMP, vol. 10, N .4 , 2015, 1-10.

Hutchinson, F. *Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation.* In Progress in nucleic acid research and molecular biology vol.32, 1985, 115-154.

Ines, S; Ines, B; Wissem, B; Mohamed, B. S; Nawel, H; Dijoux-Franca, M. G; Leïla, C. G. *In vitro antioxidant and antigenotoxic potentials of 3, 5-O-di-galloylquinic acid extracted from Myrtus communis leaves and modulation of cell gene expression by H2O2.* Journal of Applied Toxicology, vol. 32, N.5, 2012, 333-341.

Iskender,B ; Izgi,K ; Karaca, H ; Canatan,H. *Myrtucommulone-A treatment decreases pluripotency- and multipotency-associated marker expression in bladder cancer cell line HTB-9.* Journal of Natural Medicines, vol. 69, N. 4, 2015, 543 –554.

Iskender,B ; Izgi,K ; Sacalar,C ; Canatan,H. *Priming hMSCs with a putative anti-cancer compound, myrtucommulone-a: a way to harness hMSC cytokine expression via modulating PI3K/Akt pathway?* . Tumor Biology, vol. 37, N .2, 2016, 1967-1981.

Jagetia, G.C and Baliga M.S. *Syzygium cumini (Jamun) reduces the radiation-induced DNA damage in the cultured human peripheral blood lymphocytes: A preliminary study*. Toxicology Letters, vol. 132, N.1, 2002, 19–25.

Kanoun, K; Belyagoubi-Benhammou, N; Ghembaza, N; Bekkara, F. A. *Comparative studies on antioxidant activities of extracts from the leaf stem and berry of Myrtus communis L.* International Food Research Journal, vol. 21, N.5, 2014, 1957-1962.

Kaur,R ; Kaur, H. *Plant Derived Antimalarial Agents.* Journal of Medicinal Plants Studies, vol. 5, N. 1, 2017, 346-363.
Kim, W; Kang, J; Lee, S; Youn, B. *Effects of traditional oriental medicines as anti-cytotoxic agents in radiotherapy.* Oncology letters, vol. 13, N.6, 2017, 4593-4601.
Koukos, P. K; Papadopoulou, K. I; Papagiannopoulos, A. D; Patiaka, D. T. *Chemicals from Greek forestry Biomass: Constituents of the leaf Oil of Myrtus communis L. Grown in Greece.* Journal of Essential Oil Research, vol. 13, N.4, 2001, 245-246.
Kravtsov,V ; Livanova, A ; Starcova,Y. *Nuclear Abnormalities of Lymphocytes as the Simplest Markers for Bioindication Test in Case of Mass Casualty Events Involving Radiation Exposure.* Emerg Med (Los Angel) , vol.7, N.4 , 2017.
Lee, T. K; O'Brien, K. F; Wang, W; Sheng, C; Wang, T; Johnke, R. M; Allison, R. R. *American ginseng modifies 137Cs-induced DNA damage and oxidative stress in human lymphocytes.* The open nuclear medicine journal, vol. 1, N.1, 2009, 1-8.
Medhat, D; El-Bana, M. A; Ashour, M. N; Badawy, E; Diab, Y; Hussein, J. *New approaches in protecting against atherosclerosis in experimental model of postmenopause.* Journal of Applied Pharmaceutical Science, vol. 7, N.11, 2017, 090-096.
Miraj, S ; Kiani, S. *A review study of therapeutic effects of Myrtus communis.* Der Pharmacia Lettre, vol .8 , N .9, 2016 , 281-285.
Mirzaee, R; Najafian, S. *The Seasonal Variation of Polyphenolic Compounds and Antioxidant activity of Myrtus communis L. in Iran.* International Journal of Farming and Allied Sciences vol.4, N.3, 2015, 226-231.
Ogur, R. *Studies with Myrtus communis L.: Anticancer properties.* J Intercult Ethnopharmacol, vol. 3, N .4, 2014 ,135–137.
Özek, T; Demirci, B; Baser, K. H. C. *Chemical composition of Turkish myrtle oil.* Journal of Essential Oil Research, vol .12, N.5, 2000, 541-544.
Patil, S. L; Swaroop, K; Kakde, N; Somashekarappa, H. M. *In vitro protective effect of rutin and quercetin against radiation-induced genetic damage in human lymphocytes. Indian journal of nuclear medicine*. IJNM: the official journal of the Society of Nuclear Medicine, India, vol .32, N.4, 2017, 289-295.
Pereira, P; Cebola, M. J; Bernardo-Gil, M. G. *Comparison of antioxidant activity in extracts of Myrtus communis L. obtained by SFE vs. solvent extraction.* Journal of Environmental Science and Engineering. A, vol. 1, N.1, 2012, 115-120.
Romani, A; Pinelli, P; Mulinacci, N; Vincieri, F. F; Tattini, M. *Identification and quantitation of polyphenols in leaves ofMyrtus communis L.* Chromatographia, vol. 49, N.1-2, 1999, 17-20.
Rostami, A; Moosavi, S. A; Changizi, V; Ardakani, A. A. *Radioprotective effects of selenium and vitamin-E against 6MV X-rays in human blood lymphocytes by micronucleus assay.* Medical journal of the Islamic Republic of Iran, vol.30, N. 367, 2016.
Snow, N; Guymer, G. P. *Revision of Australian species of Uromyrtus (Myrtaceae) and two new combinations for New Caledonia.* Systematic Botany, vol. 26, N.4, 2001, 733-742.
Syaifudin, M; Lusiyanti, Y; Purnami, S; Lee, Y. S; Kang, C. M. *Assessment of ionizing radiation induced dicentric chromosome and micronuclei in human peripheral blood lymphocytes for preliminary reconstruction of cytogenetic biodosimetry.* Atom Indonesia, vol. 43, N.1, 2017, 47-54.

Szejk, M., Poplawski, T., Sarnik, J., Pawlaczyk-Graja, I., Czechowski, F., Olejnik, A.K., Gancarz, R. and Zbikowska, H.M. *Polyphenolic glycoconjugates from medical plants of Rosaceae/Asteraceae Family protect human lymphocytes against γ-radiation-induced damage*. International journal of biological macromolecules, vol.94, 2017, 585-593.
Touaibia, M;Chaouch, F. Z. *Anti-inflammatory effect of Myrtus nivellei Batt & Trab (Myrtaceae) methanolic extract.* Journal of Fundamental and Applied Sciences, vol. 7, N.1, 2015, 77-82.
Tumen, I; Senol, F. S; Orhan, I. E. *Inhibitory potential of the leaves and berries of Myrtus communis L. (myrtle) against enzymes linked to neurodegenerative diseases and their antioxidant actions.* International journal of food sciences and nutrition, vol. 63, N.4, 2012, 387-392.
Yamini, K; Gopal, V. *Natural radioprotective agents against ionizing radiation–an overview.* International Journal of PharmTech Research, vol. 2, N.2, 2010, 1421-1426.
Yoshimura, M; Amakura, Y; Tokuhara, M; Yoshida, T. *Polyphenolic compounds isolated from the leaves of Myrtus communis.* Journal of natural medicines, vol. 62, N.3, 2008, 366-368.