



Analysis of the protective effect of EGCG against chromosomal damages induced by Nickel treatment of HFF cell line using micronucleus assay on binucleated cells

Niknaz Shahraki¹ | Farhang Haddad²

1. Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran. E-mail: niknaz.shahraki9700@gmail.com

2. Corresponding Author, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail: haddad@um.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received 23 October 2022

Received in revised form 18

February 2023

Accepted 25 February 2023

Published online 23 September

2023

ABSTRACT

Nickel is a heavy metal, which due to its wide use in industries, found all around our habitat. Nickel-induced chromosomal abnormalities are related to its ability in producing reactive oxygen species (ROS). Use of herbal ingredients in preventing chromosomal abnormalities induced by such elements has become widely common. Green tea with its polyphenols especially Epigallocatechin gallate (EGCG) which could be used as a common drink is a suitable choice for protecting against heavy metals including Nickel. In this study, effect of three doses of 10, 20 and 30 mM of EGCG on chromosomal abnormalities induced by 0.2, 0.5 and 0.7 mM of Nickel in HFF cell line was investigated using micronucleus assay on Binucleated cells. In different doses, Nickel was able to increase the frequency of Micronucleated Binucleates (MnBi) significantly, which represents chromosomal abnormalities, in comparison to control. While, in all doses mentioned earlier, EGCG was able to dose dependently decrease the frequency of this cells. The results showed that EGCG is able to reduce clastogenic effect of Nickel *in vitro*. This ability increases in higher doses. Considering the antioxidant ability of EGCG, it could be concluded that Nickel induces most of its chromosomal abnormalities by increasing ROS.

Keywords:

HFF cell line,

Nickel,

HFF cell line.

Cite this article: Shahraki, N., & Haddad, F. (2023). Analysis of the protective effect of EGCG against chromosomal damages induced by Nickel treatment of HFF cell line using micronucleus assay on binucleated cells. *Journal of Natural Environment*, 76 (3), 391-398. DOI: <http://doi.org/10.22059/jne.2023.350599.2487>



© The Author(s).

Publisher: University of Tehran Press.

DOI: <http://doi.org/10.22059/jne.2023.350599.2487>



بررسی تأثیر حفاظتی EGCG بر صدمات کروموزومی ناشی از تیمار با نیکل بر رده سلولی HFF انسانی با استفاده از آزمون میکرونوکلئوس در سلول‌های دو هسته‌ای

نیکناز شهرکی^۱ | فرهنگ حداد^۲✉

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: niknaz.shahraki9700@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: haddad@um.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی	نیکل از جمله فلزات سنگینی است که به دلیل کاربرد وسیع در صنایع به طور گسترده در طبیعت پیرامون ما یافت می‌شود. صدمات کروموزومی ناشی از نیکل به توانایی آن در ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن نسبت داده می‌شود. امروزه استفاده از ترکیبات گیاهی جهت جلوگیری از صدمات کروموزومی ناشی از این عوامل به طور گسترده‌ای رایج شده است. چای سبز با داشتن انواعی از ترکیبات پلی فنول خصوصاً اپیگالوکاتچینگالات (EGCG) که می‌تواند به عنوان یک نوشیدنی رایج استفاده روزمره داشته باشد، گزینه مناسبی برای محافظت در برابر فلزات سنگین از جمله نیکل است. در این تحقیق تأثیر سه غلظت ۰/۲، ۰/۵ و ۰/۷ میلی مولار از نیکل با کمک آزمون میکرونوکلئوس در سلول تیمار رده سلولی HFF با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۵ و ۰/۷ میلی مولار از نیکل با کمک آزمون میکرونوکلئوس در سلول‌های دو هسته‌ای مورد بررسی قرار گرفت. در غلظت‌های مختلف، نیکل توانست فراوانی سلول‌های دو هسته‌ای دارای میکرونوکلئوس که بیانگر صدمات کروموزومی هستند، را به شکل معنی‌داری نسبت به تیمار کنترل افزایش دهد. در حالی که، در تمام غلظت‌های ذکر شده، EGCG توانست به شکل وابسته به غلظت، باعث کاهش فراوانی این سلول‌ها گردد. نتایج نشان داد که EGCG قادر به کاهش اثرات کلاستوزنتیک نیکل در شرایط برون تنی است. در غلظت‌های بالاتر این توانایی افزایش می‌یابد. با توجه به توانایی آنتی‌اکسیدانی EGCG می‌توان نتیجه گرفت که نیکل بیشتر صدمات کروموزومی خود را با افزایش میزان گونه‌های فعال اکسیژن القاء می‌کند.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۱۰	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۱۱/۲۹	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۰۶	
تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۷/۰۱	
کلیدواژه‌ها: آزمون میکرونوکلئوس، رده سلولی HFF نیکل.	

استناد: شهرکی، نیکناز؛ و حداد، فرهنگ (۱۴۰۲). بررسی تأثیر حفاظتی EGCG بر صدمات کروموزومی ناشی از تیمار با نیکل بر رده سلولی HFF انسانی با استفاده از آزمون میکرونوکلئوس در سلول‌های دو هسته‌ای. *مجله زیست طبیعی*، ۷۶ (۳)، ۳۹۸-۳۹۱.

DOI: <http://doi.org/10.22059/jne.2023.350599.2487>



مقدمه

فلزات سنگین و صدمات ناشی از آن بر سیستم ژنتیکی و کروموزومی یکی از موارد نگرانی در خصوص حفظ سلامت جوامع انسانی است. با توجه به گسترش فعالیت‌های صنعتی و آلودگی‌های محیطی از منابع مختلف که باعث آزاد شدن هر چه بیشتر این نوع فلزات در طبیعت می‌گردند، این نگرانی نیز روز به روز رو به افزایش است. از جمله این فلزات که استفاده گسترده‌ای در صنایع متالورژی و تولید باتری‌های نیکل-کادمیوم دارد، نیکل است. در صنایع افراد در زمان پالایش، الکتروپلیت کردن و جوشکاری نیکل، بیشترین میزان از این فلز را دریافت می‌کنند. نیکل به شکل ذرات فلزی، سولفید نیکل و اکسید نیکل معلق در هوا ممکن است در صنایع از طریق استنشاق وارد بدن افراد گردد (Zhao et al., 2009). اما تنها صنعت کاران و افراد شاغل در صنایعی که با نیکل در ارتباط هستند در معرض آن قرار ندارند. افراد عادی نیز به دلایل مختلف ممکن است تحت تأثیر نیکل قرار گیرند. گسترده‌ترین روشی که توسط آن افراد مختلف در معرض این فلز سنگین قرار می‌گیرند از طریق خوراکی و غذاهایی مانند انواع مغزها، غذاهای دریایی و سبزیجات است (Genchi et al., 2020).

نیکل می‌تواند طیف وسیعی از مشکلات از جمله آلرژی، بیماری‌های قلبی عروقی و کلیوی، فیبروز ریه، سرطان ریه و بینی را ایجاد کند (Genchi et al., 2020). در سال ۲۰۱۲ سازمان IARC نیکل را به‌عنوان یک کارسینوژن دسته‌بندی نموده است (IARC, 2012). با وجود اطلاع دقیق از مشکلات ایجاد شده برای سلامت افراد، هنوز مکانیسم دقیقی از نحوه عملکرد این فلز برای ایجاد صدمات ژنتیکی و القای سرطان پیشنهاد نشده است. مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهند که نیکل با تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) قادر به القای صدمه به ملکول DNA بوده و همچنین با اختلال در مکانیسم‌های تعمیر DNA و غیر فعال کردن ژن مهار کنندهٔ توموری p16^{Ink4a}، تأثیر کارسینوژنی خود را اعمال می‌کند (Henkler et al., 2010). علی‌رغم توسعهٔ روش‌های فیزیکی و شیمیایی مختلف برای حذف نیکل از هوا، خاک و آب، این رویکردها اغلب با محدودیت‌هایی مواجه هستند. از این‌رو، توسعهٔ راه‌حل‌های پزشکی مبتنی بر پیشگیری، به‌عنوان مسأله‌ای اساسی در زمینهٔ کنترل عوارض جانبی ناشی از سمیت نیکل تلقی می‌شود. از جمله این روش‌ها استفاده و کاشت گیاهان جهت جذب فلزات سنگین از خاک است (Ali et al., 2013). اما به دلیل رشد کند و اینکه در مناطقی با غلظت بالای فلزات سنگین ممکن است همیشه امکان کشت این گونهٔ گیاهان وجود نداشته باشد، بنابراین این روش نیز با محدودیت‌هایی همراه است. استفاده از ترکیبات گیاهی جهت جلوگیری از صدمات عوامل مخرب ژنتیکی موجود در محیط اطراف انسان، از جمله فلزات سنگین، در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. عصاره‌های طبیعی گیاهان به علت داشتن ترکیبات زیست‌فعال نظیر پلی‌فنول‌ها، ویتامین‌ها و پروتئین‌ها می‌توانند به‌عنوان عوامل محافظتی در مقابل تأثیر گونه‌های فعال اکسیژن باشند. از مهم‌ترین پلی‌فنول‌ها فلاونوئیدها هستند که مسئول رنگ، طعم و فعالیت‌های دارویی گیاهان هستند. این ترکیبات آنتی‌اکسیدان‌هایی بالقوه هستند که گیاهان را از شرایط محیطی نامطلوب مصون می‌دارند (Kopustinskiene et al., 2020). از جمله این ترکیبات Epigallocatechin gallate (EGCG) است که ترکیب اصلی موجود در چای سبز است (Rady et al., 2018). EGCG با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ربایش گونه‌های فعال اکسیژن قادر به محافظت سلول و بافت از تأثیر مخرب این عناصر است (Costa et al., 2007; Zhong et al., 2012). در مطالعه حاضر از آزمون میکرونوکلتوس در سلول‌های دو هسته‌ای جهت بررسی ناهنجاری‌های کروموزومی القایی استفاده گردید. از این روش به‌عنوان یک روش قابل اعتماد، سریع و راحت در مطالعات بررسی القای ناهنجاری‌های کروموزومی توسط عوامل مختلف اکسیدکننده و یا مانند اشعهٔ یونیزان بسیار استفاده شده است (Ghelishli et al., 2019; Kazemet et al., 2021). در این آزمون با استفاده از Cytochalasin-b که مهار کنندهٔ مرحلهٔ سیتوکینز از چرخهٔ سلولی ست سلول‌های دو هسته‌ای ایجاد خواهند شد. صدمات کروموزومی به صورت قطعات شکسته شده و یا یک کروموزوم کامل که در مرحلهٔ آنافاز از مهاجرت کروموزومی جا مانده‌اند به شکل ریزهسته‌هایی در سیتوپلاسم این سلول‌های دو هسته‌ای قابل مشاهده خواهند بود. افزایش فراوانی سلول‌های دو هسته‌ای دارای میکرونوکلتوس بیانگر افزایش صدمات کروموزومی خواهد بود (Fenech, 2000). در این مطالعه با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی EGCG، تأثیر محافظتی آن بر القای ناهنجاری‌های کروموزومی ناشی از تیمار رده سلولی HFF با فلز سنگین نیکل مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌شناسی پژوهش

کشت سلول: در این آزمایش از رده سلولی نرمال انسانی (Normal Human Foreskin Fibroblast) که به اختصار HFF گفته می‌شود، استفاده شد. رده سلولی HFF مورد استفاده در این مطالعه در محیط DMEM با ۱۰٪ FBS و ۱٪ پنی‌سیلین/استرپتومایسین در انکوباتور با میزان ۵٪ CO₂ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت گردید. پاساژ سلولی در هر ۷۲ ساعت به صورت تقسیم ۳:۱ انجام شد.

تیمار EGCG: تیمار سلول‌ها با EGCG ۲۴ ساعت پس از شروع کشت انجام شد. غلظت‌های مورد استفاده از این ماده ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌مولار بود که براساس مطالعات قبلی به دست آمد.

تیمار نیکل: نیکل با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۰/۷ میلی‌مولار به محیط کشت اضافه شد. زمان اضافه کردن نیکل در تیمارهای تنها و همزمان با EGCG، ۴۸ ساعت پس از آغاز کشت سلولی بود. غلظت‌های مختلف نیکل از مطالعات قبلی انجام شده به دست آمد (Ghorbani et al. 2022).

برداشت سلولی: جهت برداشت سلولی در آزمون میکرونوکلئوس، ۲۴ ساعت قبل از برداشت Cytochalasin-b با غلظت نهایی ۰/۴ میکروگرم در میلی‌لیتر به محیط‌های کشت اضافه شد. برداشت سلولی با کمک تریپسین انجام شد. پس از سانتریفوژ سلول‌ها و دور ریختن محیط کشت، به آن‌ها محلول هایپوتونیک KCl اضافه شد. با دور ریختن این محلول و دو بار شستشوی سلول‌ها در محلول فیکساتور متانول:اسید استیک (۳:۱) سلول‌ها بر روی لام‌های تمیز و سرد تثبیت شدند.

رنگ‌آمیزی و شمارش سلولی: رنگ‌آمیزی سلول‌ها با کمک گیمسای ۱۰٪ برای مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. لام‌های شسته شده و خشک زیر میکروسکوپ نوری با درشت‌نمایی ۱۰۰۰X مورد بررسی قرار گرفتند. در هر لام تعداد حداقل ۴۰۰ سلول دو هسته‌ای بررسی دقیق شد. سلول‌های دو هسته‌ای دارای ریزهسته‌های درون سیتوپلاسم که از هسته‌های اصلی کاملاً جدا بودند، به‌عنوان سلول‌های دو هسته‌ای دارای میکرونوکلئوس شمارش شدند. برای هر لام فراوانی سلول‌های دو هسته‌ای دارای میکرونوکلئوس در کل سلول‌های دو هسته‌ای شمارش شده، محاسبه گردید.

تحلیل آماری: نتایج حاصل با کمک نرم‌افزارهای Minitab نسخه 21.4.1 و SPSS نسخه 27 و آزمون t و آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) با سطح احتمال ۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

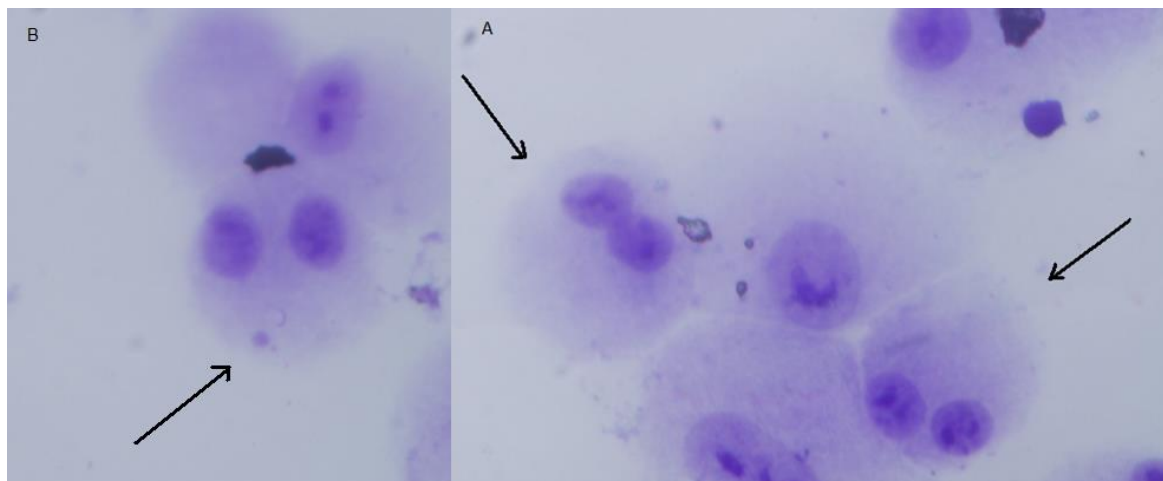
یافته‌های پژوهش

در این پژوهش از آزمون میکرونوکلئوس در سلول‌های دو هسته‌ای استفاده شد. نتیجه تیمار سلول‌ها با Cytochalasin-b که از تقسیم سیتوپلاسمی جلوگیری می‌کند، ایجاد سلول‌های دو هسته‌ای (شکل ۱A) است. هر گونه صدمه کروموزومی شامل شکستگی‌ها و جاماندن‌های کروموزومی در این روش به شکل ریزهسته‌هایی در سیتوپلاسم سلول‌های دو هسته‌ای (شکل ۱B) مشاهده خواهد شد.

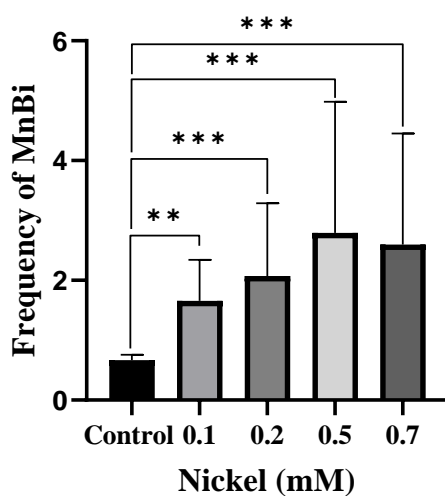
تیمار با نیکل: سلول‌های رده HFF با چهار غلظت مختلف نیکل تیمار شدند. در بررسی فراوانی سلول‌های دو هسته‌ای دارای میکرونوکلئوس (MnBi) در نمونه‌های تیمار شده، نتایج نشان داد که نیکل در غلظت‌های بکار رفته به شکل معنی‌داری قادر به افزایش فراوانی میکرونوکلئوس بوده است ($P < 0/05$ و $P < 0/01$). نتایج تیمار با نیکل در شکل ۲ ارائه شده است.

تیمار با EGCG: سلول‌های رده HFF با سه غلظت مختلف EGCG تیمار شدند. همانطور که در شک ۳ مشاهده می‌شود، تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌مولار بکار رفته از این ماده، باعث افزایش در فراوانی MnBi نشده است.

تیمار همزمان نیکل و EGCG: شکل ۴ نتایج حاصل از تیمار همزمان رده سلولی HFF با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۵ و ۰/۷ میلی‌مولار نیکل و سه غلظت ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌مولار EGCG را نشان می‌دهد. براساس نتایج، EGCG در غلظت‌های بکار رفته در تمام تیمارهای نیکل قادر به کاهش معنی‌دار فراوانی MnBi بوده است ($P < 0/05$). بیشترین کاهش در فراوانی میکرونوکلئوس‌های القایی با نیکل در غلظت ۳۰ میلی‌مولار EGCG مشاهده شد.

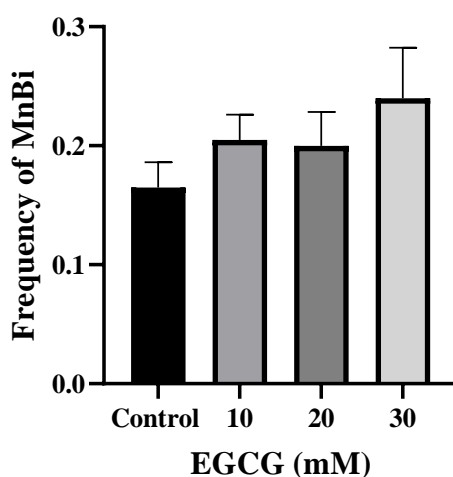


شکل ۱. A: سلول دو هسته‌ای بدون میکرونوکلیوس (نوک پیکان) B: سلول دو هسته‌ای دارای میکرونوکلیوس (نوک پیکان)

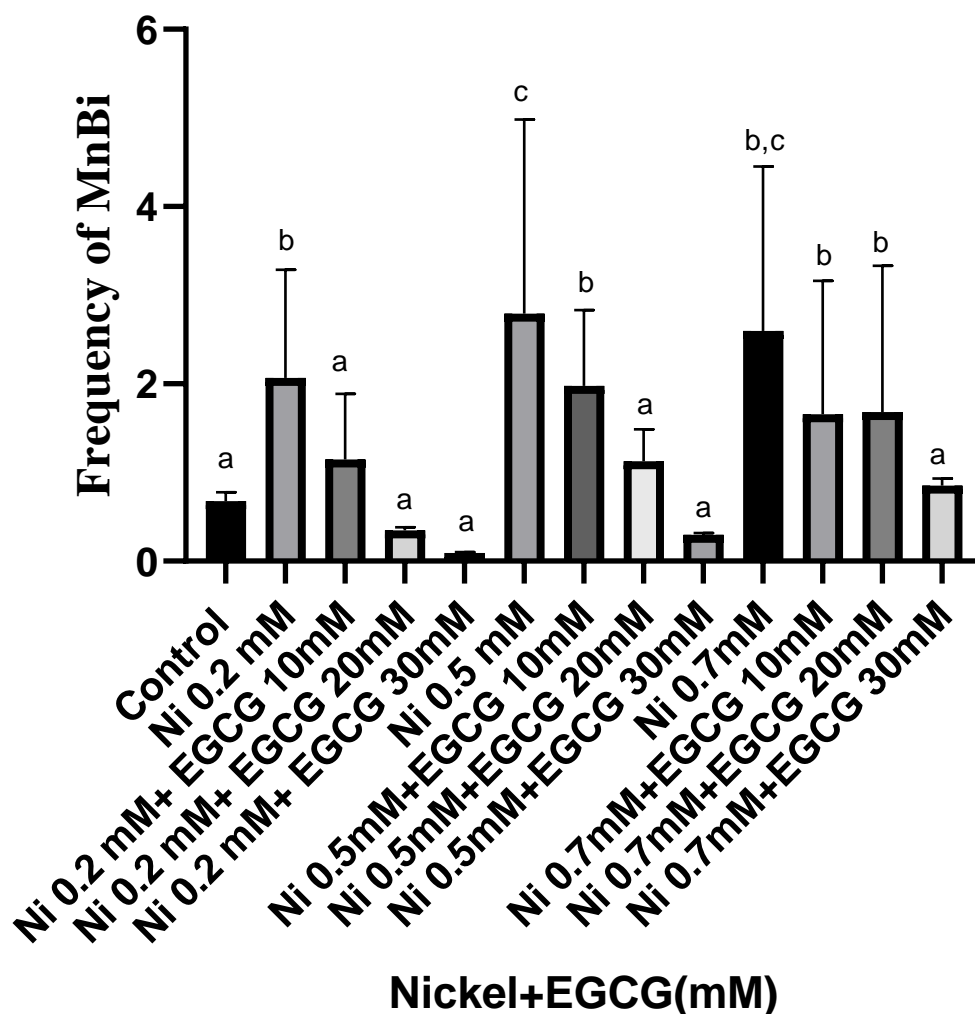


شکل ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف نیکل بر فراوانی سلول‌های دو هسته‌ای دارای میکرونوکلیوس (MnBi).

*** معنی‌داری در سطح $P < 0.05$, ** معنی‌داری در سطح $P < 0.01$



شکل ۳. تأثیر غلظت‌های مختلف نیکل بر فراوانی سلول‌های دو هسته‌ای دارای میکرونوکلیوس (MnBi)



شکل ۴. تأثیر همزمان غلظت‌های مختلف نیکل و EGCG بر فراوانی سلول‌های دو هسته‌ای دارای میکرونوکلیوس (MnBi).
حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی‌دار بین گروه‌هاست ($P < 0.05$)

بحث

با توجه به صنعتی شدن جوامع انسانی، تهدید سلامت انسان‌ها توسط فلزات سنگین مسئله مهمی تلقی می‌شود. از جمله این فلزات که استفاده گسترده‌ای در صنایع مختلف دارد، نیکل است. مطالعات مختلف نشان داده است که نیکل قادر به القای صدمات ژنتیکی و کروموزومی به سلول‌ها در محیط کشت و بدن موجودات زنده است (Cameron *et al.*, 2011, Buxton *et al.*, 2020; Naset *et al.*, 2020). در مطالعه حاضر نیز استفاده از چهار غلظت ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۰/۷ میلی‌مولار از این فلز سنگین به شکل معنی‌داری باعث افزایش فراوانی سلول‌های دو هسته‌ای دارای میکرونوکلیوس شد. افزایش در فراوانی این نوع سلول بیانگر افزایش صدمات کروموزومی می‌باشد. در خصوص نحوه عملکرد نیکل در القای صدمات ژنتیکی نظرات مختلفی وجود دارد. مطالعات نشان داده است که نیکل با اختلال در سیستم تعمیر DNA و کاهش کارایی آن می‌تواند سبب افزایش صدمات ژنتیکی و کروموزومی گردد. همچنین نیکل قادر به افزایش میزان گونه‌های فعال اکسیژن بوده که این عوامل با توانایی بالای اکسیدانی که دارند می‌توانند به ملکول DNA صدمات جدی وارد نمایند که این صدمات در نهایت به شکل صدمات کروموزومی مشاهده خواهند شد. مطالعات زیادی بر اثرات سودمند چای سبز در حفظ سلامتی انسان تأکید داشته‌اند و نشان داده‌اند که مصرف این ماده می‌تواند انسان و بافت‌های مختلف بدن را در مقابل صدمات محیطی محافظت نماید (Xie *et al.*, 2022; Farhan, 2022; Tanaka *et*

(*al.*, 2022). چای سبز با داشتن ترکیبات پلی فنلی که مهمترین آن‌ها EGCG است اثرات سودمند خود را القا می‌کند. یکی از مهمترین دلایل در توان محافظتی این ماده قابلیت بالای آن در جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد و افزایش توان آنتی‌اکسیدانی سلول است (Zhang *et al.*, 2022). بنابراین تأثیر حفاظتی آن در مقابل تابش پرتوهای یونیزان نیز اثبات شده است (Xie *et al.*, 2021; Yi *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020). غلظت‌های مورد استفاده در این بررسی در مقایسه با گروه کنترل هیچ گونه افزایش معنی‌داری در فراوانی سلول‌های دو هسته‌ای دارای میکرونوکلئوس ایجاد نکرد که این امر بیانگر این است که این ماده در غلظت‌های استفاده شده صدمه ژنتیکی را به سلول وارد نمی‌کند. مطالعات مختلف در شرایط درون و برون تنی نیز بیانگر عدم القای صدمات کروموزومی و ژنتیکی به سلول‌ها بوده است (Garcia-Rodriguez Mdel *et al.*, 2014; Garcia-Rodriguez Mdel *et al.*, 2018).

تیمار همزمان سلول‌ها با نیکل و EGCG نشان داد که EGCG قادر به کاهش صدمات ژنتیکی وارده به سلول‌ها در اثر تیمار با نیکل است. در تمام غلظت‌های مورد استفاده از نیکل، EGCG سبب کاهش معنی‌دار فراوانی سلول‌های دو هسته‌ای گردید که بیانگر کاهش صدمات کروموزومی القایی با نیکل است. در مطالعات مشابهی که در شرایط درون تنی و با فلز سنگین کروم انجام شده است نیز، EGCG قادر به کاهش فراوانی میکرونوکلئوس شده است (Garcia-Rodriguez Mdel *et al.*, 2014; Garcia-Rodriguez Mdel *et al.*, 2016). از آنجا که یکی از مکانیسم‌های عملکردی فلزات سنگین از جمله نیکل القای صدمات کروموزومی با افزایش سطح گونه‌های فعال اکسیژن است، به نظر می‌رسد EGCG با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و توانایی جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد قادر است این گونه صدمات را کاهش دهد. ژن‌های کلیدی در مسیر تعمیر DNA در نتیجه تیمار سلول‌ها با EGCG افزایش بیان چشمگیری را نشان می‌دهند (Ni *et al.*, 2018). بنابراین تیمار سلول‌ها در مطالعه حاضر با EGCG، با افزایش توان تعمیر DNA، باعث کاهش صدمات کروموزومی القایی با نیکل شده است. سلول‌های تیمار شده با EGCG توسط یک یا هر دو مکانیسم مورد بحث در بالا که کاملاً در مقابل مکانیسم‌های القای صدمات کروموزومی توسط فلز سنگین نیکل قرار دارند، توان دفاعی بهتری را به سلول جهت کاهش این گونه صدمات داده است.

نتیجه‌گیری

EGCG با توان آنتی‌اکسیدانی و قدرت افزایش توان تعمیر DNA سلولی باعث کاهش صدمات کروموزومی ناشی از تیمار با فلز سنگین نیکل می‌گردد. این کاهش در تمامی غلظت‌های بکار رفته از این فلز در مطالعه حاضر به‌وضوح مشاهده شد. به نظر می‌رسد استفاده از این ماده چه به‌صورت خالص یا به‌صورت نوشیدنی رایج از جمله چای سبز، قادر است افرادی که به‌دلایل مختلف در معرض نیکل قرار می‌گیرند را در برابر صدمات کروموزومی القایی توسط این فلز محافظت کند.

References

- Ali, H., Khan, E., Sajad, M.A., 2013. Phytoremediation of heavy metals--concepts and applications. *Chemosphere* 91(7), 869-881.
- Buxton, S., Voges, Y., Donath, C., Oller, A., 2020. Gene (HPRT) and chromosomal (MN) mutations of nickel metal powder in V79 Chinese hamster cells. *Mutation Research* 819-820, 111688.
- Cameron, K.S., Buchner, V., Tchounwou, P.B., 2011. Exploring the molecular mechanisms of nickel-induced genotoxicity and carcinogenicity: a literature review. *Reviews on Environmental Health* 26(2), 81-92.
- Costa, S., Utan, A., Cervellati, R., Speroni, E., Guerra, M.C., 2007. Catechins: natural free-radical scavengers against ochratoxinA-induced cell damage in a pig kidney cell line (LLC-PK1). *Food and Chemical Toxicology* 45(10), 1910-1917.
- Farhan, M., 2022. Green Tea Catechins: Nature's Way of Preventing and Treating Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 23(18), 10713.
- Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research* 455(1-2), 81-95.
- Garcia-Rodriguez Mdel, C., Montano-Rodriguez, A.R., Altamirano-Lozano, M.A., 2016. Modulation of hexavalent chromium-induced genotoxic damage in peripheral blood of mice by epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and its relationship to the apoptotic activity. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 79(1), 28-38.

- Garcia-Rodriguez Mdel, C., Nicolas-Mendez, T., Montano-Rodriguez, A.R., Altamirano-Lozano, M.A., 2014. Antigenotoxic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), quercetin, and rutin on chromium trioxide-induced micronuclei in the polychromatic erythrocytes of mouse peripheral blood. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 77(6), 324-336.
- Genchi, G., Carocci, A., Lauria, G., Sinicropi, M.S., Catalano, A., 2020. Nickel: Human Health and Environmental Toxicology. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17(3), 679.
- Ghelishli, N., Ghasemi, A., Hosseinimehr, S.J., 2019. The Influence of Piperine on the Radioprotective Effect of Curcumin in Irradiated Human Lymphocytes. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* 16, 366-370.
- Ghorbani M, Haddad F, Shahrokhbadi K., 2022. Nickel Increases Chromosomal Abnormalities by Interfering With the Initiation of DNA Repair Pathways. *Iranian Journal of Toxicology* 16(3):229-236.
- Henkler, F., Brinkmann, J., Luch, A., 2010. The role of oxidative stress in carcinogenesis induced by metals and xenobiotics. *Cancers (Basel)* 2(2), 376-396.
- IARC, 2012. Nickel and nickel compounds. IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Human. 100C, 49.
- Kazemi, R., Hosseinimehr, S.J., 2021. Radioprotective Effect of Pioglitazone Against Genotoxicity Induced by Ionizing Radiation in Healthy Human Lymphocytes. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry* 19(1), 72-75.
- Kopustinskiene, D.M., Jakstas, V., Savickas, A., Bernatoniene, J., 2020. Flavonoids as Anticancer Agents. *Nutrients* 12(2), 457.
- Nas, B., Colak, D.A., 2020. Genotoxic analysis of nickel-iron oxide in *Drosophila*. *Toxicology and Industrial Health* 36(11), 835-843.
- Ni, J., Guo, X., Wang, H., Zhou, T., Wang, X., 2018. Differences in the Effects of EGCG on Chromosomal Stability and Cell Growth between Normal and Colon Cancer Cells. *Molecules* 23(4), 788.
- Rady, I., Mohamed, H., Rady, M., Siddiqui, I.A., Mukhtar, M., 2018. Cancer preventive and therapeutic effects of EGCG, the major polyphenol in green tea. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences* 5(1), 1-23.
- Tanaka, K.I., Nakaguchi, S., Shiota, S., Nakada, Y., Oyama, K., Sakakibara, O., Shimoda, M., Sugimoto, A., Ichitani, M., Takihara, T., Kinugasa, H., Kawahara, M., 2022. Preventive Effect of Epigallocatechin Gallate, the Main Component of Green Tea, on Acute Lung Injury Caused by Air Pollutants. *Biomolecules* 12(9), 1196.
- Xie, L.W., Cai, S., Zhao, T.S., Li, M., Tian, Y., 2020. Green tea derivative (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) confers protection against ionizing radiation-induced intestinal epithelial cell death both in vitro and in vivo. *Free Radical Biology & Medicine* 161, 175-186.
- Xie, X., Wan, J., Zheng, X., Pan, W., Yuan, J., Hu, B., Feng, M., Liu, Z., Cai, S., 2022. Synergistic effects of epigallocatechin gallate and l-theanine in nerve repair and regeneration by anti-amyloid damage, promoting metabolism, and nourishing nerve cells. *Frontiers in Nutrition* 9, 951415.
- Yi, J., Chen, C., Liu, X., Kang, Q., Hao, L., Huang, J., Lu, J., 2020. Radioprotection of EGCG based on immunoregulatory effect and antioxidant activity against (60)Cobalt radiation-induced injury in mice. *Food and Chemical Toxicology* 135, 111051.
- Zhang, S., Duangjan, C., Tencomnao, T., Wu, L., Wink, M., Lin, J., 2022. Oolonghomobisflavans exert neuroprotective activities in cultured neuronal cells and anti-aging effects in *Caenorhabditis elegans*. *Frontiers in Aging Neuroscience* 14, 967316.
- Zhao, J., Shi, X., Castranova, V., Ding, M., 2009. Occupational toxicology of nickel and nickel compounds. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 28(3), 177-208.
- Zhong, Y., Ma, C.M., Shahidi, F., 2012. Antioxidant and antiviral activities of lipophilic epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives. *Journal of Functional Foods* 4(1), 87-93.
- Zhu, W., Zhao, Y., Zhang, S., Li, X., Xing, L., Zhao, H., Yu, J., 2021. Evaluation of Epigallocatechin-3-Gallate as a Radioprotective Agent During Radiotherapy of Lung Cancer Patients: A 5-Year Survival Analysis of a Phase 2 Study. *Frontiers in Oncology* 11, 686950.