

## *Cellular Effects of Naringin in Prevention of Genotoxicity Caused by Mifepristone on Human Blood Lymphocytes*

Mohammad Shokrzadeh<sup>1</sup>,  
Mahboube Rahmati Kukandeh<sup>2</sup>,  
Narges Kargar Darabi<sup>2</sup>,  
Mona Modanloo<sup>3</sup>,  
Marjan Fallah<sup>4</sup>,  
Abass Mohammadpour<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>2</sup> MSc Student in Genetics, Sana Institute of Higher Education, Sari, Iran

<sup>3</sup> PhD in Pharmaceutical Sciences, Pharmaceutical Sciences Research Center, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>4</sup> PhD Student in Toxicology, Pharmaceutical Sciences Research Center, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>5</sup> PhD Student in Cellular and Molecular Biology, Pharmaceutical Sciences Research Center, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received October 15, 2017 ; Accepted February 15, 2018)

### **Abstract**

**Background and purpose:** Mifepristone is an oral synthetic steroid with antigluco-corticoid and anti-progesterone activities. Therefore, it could be dangerous during pregnancy since it causes cytogenetic damage and, consequently, abortion. Flavonoid compounds such as naringin have antioxidant properties and eliminate various free radicals. Naringin is abundantly found in Iran, so, we investigated its cellular effects against cytogenetic damage caused by mifepristone on blood lymphocyte using micronucleus method.

**Materials and Methods:** In this experimental study, 5ml Venous blood were collected from 5 healthy and non-smokers using heparin syringe. Different naringin concentrations followed by 43µg/ml damage dose of mifepristone were injected to the cells. To evaluate the production of micronucleus in restrained binucleated lymphocytes in cytokine, the slides were prepared and evaluated by optical microscopy. The mean values were compared applying ANOVA test (posttest: Tukey) in SPSS and  $p < 0.05$  was regarded significant.

**Results:** The highest frequency of micronucleus was observed in the positive control group ( $17.67 \pm 1.528$ ) and the lowest was seen in the naringin group at 232µg/ml ( $1.33 \pm 0.5774$ ) ( $P < 0.05$ ). Naringin (232µg/ml) with mifepristone led to significant changes in the number of micronucleus nuclei compared to the sample without naringin.

**Conclusion:** Naringin is a potent antigenotoxin against the damage caused by mifepristone, therefore, it could be used as a protective agent against the toxic effects of mifepristone.

**Keywords:** mifepristone, naringin, genotoxicity, micronucleus

## بررسی اثرات سلولی نارنجین بر پیشگیری از سمیت ژنتیکی ناشی از میفه پریتون بر روی لنفوسیت های خون محیطی انسان

محمدشکرزاده<sup>۱</sup>

محبوبه رحمتی کوکنده<sup>۲</sup>

نرگس کارگردارابی<sup>۲</sup>

منا مدانلو<sup>۳</sup>

مرجان فلاح<sup>۴</sup>

عباس محمدپور<sup>۵</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** میفه پریتون یک استروئید صناعی خوراکی با فعالیت های آنتی گلوکوکورتیکوئیدی و آنتی پروژسترونی است. لذا استفاده از میفه پریتون در طی دوران بارداری می تواند برای خانم های باردار خطرناک باشد چرا که منجر به آسیب های سیتوژنتیکی و در نتیجه سقط جنین می شود. ترکیبات فلاونوئیدی مثل نارنجین دارای خاصیت آنتی اکسیدانی هستند و سبب از بین بردن رادیکال های آزاد مختلف می شوند و از آنجایی که این ترکیب در ایران فراوان است، این مطالعه با هدف بررسی اثرات سلولی نارنجین در برابر آسیب های سیتوژنتیکی ناشی از میفه پریتون بر روی لنفوسیت های خونی با روش میکرونوکلئوس انجام شد.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی با استفاده از سرنگ آغشته به هیپارین ۵ ml از نمونه خون وریدی از ۵ داوطلب مرد سالم و غیرسیگاری تهیه گردید. غلظت های مختلف نارنجین و بعد از آن ۴۳ μg/ml از دوز آسیب زای میفه پریتون به سلول تزریق شدند. جهت ارزیابی تولید میکرونوکلئوس در لنفوسیت های دو هفته ای مهار شده در سیتو کینز، لام تهیه و با میکروسکوپ نوری بررسی شد. با استفاده از نرم افزار Spss و آزمون (Anova (posttest: Tukey، مقادیر مختلف میانگین ها با هم مقایسه شد که  $p < 0.05$  به عنوان معنی داری در کار آمده است.

**یافته ها:** بالاترین میزان میکرونوکلئوس مربوط به گروه کنترل مثبت به مقدار  $17/67 \pm 1/528$  و کم ترین میزان میکرونوکلئوس مربوط به گروه نارنجین با دوز ۲۳۲ μg/ml به مقدار  $1/333 \pm 0/5774$  می باشد ( $p < 0.05$ ). دوز ۲۳۲ μg/ml نارنجین به همراه میفه پریتون باعث تغییرات قابل ملاحظه ای در تعداد هسته های میکرونوکلئوس در مقایسه با نمونه بدون نارنجین شده است.

**استنتناج:** نارنجین یک آنتی ژنوتوکسیک قوی در برابر آسیب های ناشی از میفه پریتون می باشد. بنابراین احتمالاً می توان از آن به عنوان یک عامل محافظتی در برابر اثرات سمی میفه پریتون استفاده کرد.

**واژه های کلیدی:** میفه پریتون، نارنجین، سمیت ژنتیکی، میکرونوکلئوس

### مقدمه

سقط جنین می تواند یکی از شایع ترین مشکلاتی باشد که در طول دوران بارداری در گونه های انسانی اتفاق

می افتد (۱). دلایل سقط جنین بسیار زیاد است، که یکی از دلایل آن داروهای مانند میفه پریتون میزوپروستول،

مؤلف مسئول: محبوبه رحمتی کوکنده - ساری: موسسه آموزش عالی سنا

E-mail: Mahboube.Rahmati@gmail.com

۱. استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی، گروه سم شناسی / داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، موسسه آموزش عالی سنا، ساری، ایران

۳. دکتری علوم دارویی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. دانشجوی دکتری سم شناسی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۵. دانشجوی دکتری سلولی و ملکولی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۲۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۶/۷/۲۵ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۱۱/۲۵

آزاد می‌شود و دارای فلزشلاته‌کننده و خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی است (۱۱). لذا به سبب حضور ترکیبات فلاونوئیدی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا مثل نارنجین و نیز فراوانی وجود این ترکیب در ایران در این مطالعه بر آن شدیم اثرات سلولی نارنجین را در برابر آسیب‌های سیتوژنتیکی ناشی از میفه پرستون که باعث سقط جنین و ناهنجاری‌های ژنتیکی می‌شود، بررسی نماییم.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، نارنجین و میفه پرستون از شرکت سیگما تهیه شد. با استفاده از سرنگ هپارینه ۵ml از نمونه خون وریدی از ۵ داوطلب مرد سالم و غیرسیگاری تهیه گردید (۱۲). نارنجین توسط حلال حل شد و نمونه‌های خونی به ۵ گروه مجزای ۱ml تقسیم گردید: گروه کنترل (حلال)، گروه میفه پرستون با دوز آسیب‌زای  $43 \mu\text{g/ml}$  به همراه نارنجین با دوزهای مختلف ( $58 \mu\text{g/ml}$  و  $232 \mu\text{g/ml}$ )، گروه نارنجین ( $232 \mu\text{g/ml}$ ) و  $43 \mu\text{g/ml}$  دوز میفه پرستون (کنترل مثبت) (جدول شماره ۱). تمامی دوزهای مورد استفاده بر اساس مطالعات گذشته انتخاب گردید و دوز  $43 \mu\text{g/ml}$  میفه پرستون بهترین و ایتموم دوز ایجادکننده سمیت ژنتیکی در *invitro* می‌باشد. تکنیک آزمون میکرونوکلئوس طبق روش شکرزاده و همکاران انجام شد (۱۳، ۱۴).

## یافته‌ها و بحث

با توجه به جدول شماره ۱ بالاترین میزان میکرونوکلئوس مربوط به گروه میفه پرستون به مقدار  $1/528 \pm 17/67$  و کمترین میزان میکرونوکلئوس مربوط به گروه نارنجین با دوز  $232 \mu\text{g/ml}$  به مقدار  $1/577 \pm 0/333$  می‌باشد. دوز  $232 \mu\text{g/ml}$  نارنجین به همراه میفه پرستون باعث تغییرات قابل ملاحظه‌ای در تعداد هسته‌های میکرونوکلئوس در مقایسه با نمونه بدون نارنجین شده است. بیش‌ترین اثر محافظتی میفه

متوترکسات ... می‌باشد (۲، ۳). میفه پرستون یک آنتاگونیست گیرنده پروژسترون است (۴) اقدامات آنتی‌پروژسترونی میفه پرستون می‌تواند در دو سطح عمل کند، هم آندومتر را از پشتیبانی مورد نیاز پروژسترون برای حفظ اوایل حاملگی محروم کند و هم محور هیپوفیز و تخمدان را قطع کند. اثرات ضد باروری می‌تواند در سه دوره زمانی مختلف استفاده شود در مرحله فولیکولی با اختلال در فولیکولوژن، در مرحله لوتئال به عنوان یک داروی ازدیاد قاعدگی، پس از یک دوره قاعدگی از دست رفته، زمانی که بارداری مشکوک است و یا تشخیص داده می‌شود (۵). تا به امروز، میفه پرستون برای استفاده در چهار مورد تایید شد: پایان سریع بارداری (TOP)، اتساع دهانه رحم قبل از TOP، آماده سازی برای TOP ناشی از پروستاگلاندین در طول سه ماهه دوم و خروج یک جنین مرده در طول سه ماهه سوم (۶، ۷). دوز مناسب استفاده از این دارو به‌طور گسترده‌ای از ۶۰۰-۲۰۰ میلی‌گرم می‌باشد و برای تاثیر بیش‌تر ۸۰۰-۴۰۰ میکروگرم از میزوپرستول ۴۸-۲۴ ساعت بعد از دریافت میفه پرستون داده می‌شود (۸). اگر چه ممکن است که هر کدام از داروها بتوانند اثرات تراژژنتیکی بر جنین داشته باشند، اما تا به حال تنها یک مورد از اثرات تراژژن در ارتباط با استفاده از میفه پرستون کشف شده است (۹). موارد دیگر از اثرات تراژژنی این دارو در ارتباط با ترکیب آن با میزوپرستول است که می‌تواند منجر به سندرم مویوس شود (۱۰). تراژژن بودن یک نگرانی برای هر داروی پیشگیری از بارداری است تا به امروز، هیچ نقص مادرزادی در میان چند کودک متولد شده پس از درمان ناموفق با میفه پرستون در سه ماهه اول دیده نشده است. با این حال، یک جنین سقط شده پس از درمان با میفه پرستون دچار کاهش اندام بود، واقعی است که اعلام می‌کند میفه پرستون تالیدومید دیگری است (۵). نارنجین جز ترکیبات فلاونوئیدی است که در گریپ فروت و سایر مرکبات یافت می‌شود. نارنجین سبب حذف رادیکال‌های

پرستون در نمونه حاوی  $232 \mu\text{g/ml}$  نارنجین ملاحظه شد و هیچ گونه اثرات ژنوتوکسیک در کشت لئوسیت‌ها با غلظت  $232 \mu\text{g/ml}$  نارنجین به تنهایی مشاهده نشد. بنابراین نارنجین به تنهایی اثرات سلولی نداشته و خود به تنهایی عاملی برای سمیت ژنتیکی تلقی نمی‌شود و می‌توان از آن به عنوان یک عامل محافظتی در برابر اثرات سمی میفه پرستون استفاده کرد.

جدول شماره ۱: میانگین تعداد میکرونوکلئوس‌های شمارش شده به ازای ۱۰۰۰ لئوسیت دو هفته‌ای گرفته شده از نمونه‌های خونی داوطلبان در شرایط *invitro* به تفکیک گروه‌های مختلف مورد مطالعه

شماره گروه	Mean±SD
کنترل (منفی)	$1.333 \pm 0.5774$
میفه پرستون (کنترل مثبت)	$17.67 \pm 1.528$
میفه پرستون + نارنجین ۵۸	$11.33 \pm 1.528$
میفه پرستون + نارنجین ۲۳۲	$3.000 \pm 1.000$
نارنجین ۲۳۲	$1.333 \pm 0.5774$

در بررسی‌های مربوط به تکنیک میکرونوکلئوس درصد بروز ریز هسته (میکرونوکلئوس) نشان‌دهنده میزان آسیب ژنتیکی و میزان کاهش آن معیار کاهش آسیب ژنتیکی گروه‌های محافظت‌کننده است. مطالعه حاضر نشان داد که درصد میکرونوکلئوس لئوسیت‌هایی که تحت میفه پرستون (کنترل مثبت) قرار گرفتند به طور قابل ملاحظه‌ای ( $p < 0.05$ ) بیش تر از سلول‌های کنترل منفی است. بنابراین می‌توان اظهار داشت که استفاده از میفه پرستون در کم‌ترین دوز در طی دوران بارداری می‌تواند برای خانم‌های باردار خطرناک باشد چرا که منجر به آسیب‌های سیتوژنتیکی و در نتیجه سقط جنین می‌شود و یا ممکن است سبب ناهنجاری‌های ژنتیکی و مادرزادی شود که با مطالعات Nawaz و Nikolaos همخوانی دارد که طی این مطالعات امکان سقط ناشی از مصرف میفه پرستون را حتی با دوز کم در اوایل بارداری تایید کردند که به منظور افزایش سرعت موفقیت در این عمل مصرف میزوپروستول را پس از میفه پرستون تجویز می‌کنند (۱۴۸). بررسی‌های Coles نیز نشان دهنده اولین

مورد از تاثیرات تراژوژنی در ارتباط با استفاده از میفه پرستون بوده است (۱۵). طبق مطالعات انجام شده یک ناهنجاری بعد از استفاده از میفه پرستون گزارش شد که این مورد، به عنوان sirenornelia (سندرم پری دریایی) توصیف شده است (۱۶). هم‌چنین در این مطالعه مشخص شد که نارنجین موجب کاهش آسیب وارده ناشی از میفه پرستون بر لئوسیت‌ها گشته است و با افزایش غلظت نارنجین اثرات محافظتی آن در برابر میفه پرستون بیش تر شده است. از طرفی نارنجین یک نوع فلاونوئید است و فلاونوئیدها دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند و سبب از بین بردن رادیکال‌های آزاد مختلف می‌شوند بنابراین نارنجین به علت خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود می‌تواند از اثرات سمی میفه پرستون که منجر به تشکیل رادیکال‌های آزاد روی لئوسیت‌ها می‌شود جلوگیری نماید که با مطالعات Behar و همکارانش در سال ۱۹۹۷ همخوانی دارد که طی این مطالعات اثرات برخی از فلاونوئیدها از جمله نارنجین را در درمان سرطان سینه طی آزمایشات بالینی به اثبات رساند و هم‌چنین بیان کرد نارنجین نیز مانند بسیاری از فلاونوئیدها، به عنوان آنتی‌اکسیدان اهمیت فراوانی دارد (۱۷). بررسی‌هایی که Bors انجام داد نشان می‌دهد که خاصیت قوی آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدها می‌تواند بدن انسان را در برابر رادیکال‌های آزاد واسترس اکسیداتیو محافظت کند (۱۸). لذا طی آزمایشات انجام شده در این مطالعه مشخص شد که نارنجین با دوز  $232 \mu\text{g/ml}$  دارای اثرات محافظتی بالاتری در برابر میفه پرستون است. بنابراین احتمالاً می‌توان از نارنجین برای تولید دارو استفاده کرد و با توجه به یافته‌های به‌دست آمده نارنجین احتمالاً می‌تواند گزینه مناسبی برای پیشگیری از آسیب‌های ایجاد شده ناشی از میفه پرستون در تمامی افرادی که به نوعی از این دارو برای درمان بیماری فعلی خود استفاده می‌کنند از جمله زنان بارداری که مجبورند در طول بارداری از این دارو استفاده کنند باشد.

## سپاسگزاری

می‌باشد. لذا محققین از تمام کسانی که در این پروژه تحقیقاتی و رسیدن به نتیجه مطلوب یاری گر بودند نهایت تشکر را دارند.

این مقاله استخراج شده از بخشی از پایان نامه سرکارخانم محبوبه رحمتی کوکنده دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک در موسسه آموزش عالی سنا در سال ۱۳۹۶

## References

- Garcia-Engudanos A, Calle ME, Valero J, Luna S, Dominguez-Rojas V. Risk factors in miscarriage: a review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; 102(2): 111-119.
- Griebel CP, Halvorsen J, Golemon T, Day A. Management of Spontaneous Abortion. *Am Fam Physician* 2005; 72(2): 1243-1250.
- Ayati S, VahidRoodsari F, Banoy M, Shakeri MT, Barhamat A. Comparison of rectal and vaginal misoprostol in termination of first trimester pregnancies in patients with previous history of uterine surgery. *The Iranian J of Obst, Gyneco and Infertil* 2013; 15(42): 1-6 (Persian).
- Spitz IM, Grunberg SM, Chabbert-Buffet N, Lindenberg T, Gelber H, Sitruk-Ware R. Management of patients receiving long-term treatment with mifepristone. *Fertil Steril* 2005; 84(6): 1719-1726.
- Woolley RJ. Contraception-A Look Forward, Part II: Mifepristone and Gossypol. *J Am Board Fam Med* 1991; 4(2): 103-113.
- Searle L, Tait J, Langdana F, Maharaj D. Efficacy of mifepristone for cervical priming for second-trimester surgical termination of pregnancy. *Inter J of Gynand Obst* 2013; 1-4.
- Sitruk-Ware R. Mifepristone and misoprostol sequential regimen side effects, complications and safety. *Contracept* 2006; 74(1): 48-55.
- Nikolaos V, Dimitrios Z, Markos L, Alexandra D, Nikolaos S. First trimester medical abortion: The several merits of combination mifepristone-misoprostol. *An Obst and Gyneco Inter J* 2016; 15: 26-30.
- Aznar J, Navarro P. Medical abortion: Teratogenic effects of misoprostol. *Case Reports Gyneco* 2015; 323-324.
- Bos-Thompson MA, Hillaise-Buys D, Roux C, Faille JL, Amram D. Mobius syndrome in a neonate after mifepristone and misoprostol elective abortion failure. *Annal of Pharm* 2008; 42(6): 888-892.
- Alam A, Kauter K, Brown L. Naringin Improves Diet-Induced Cardiovascular Dysfunction and Obesity in High Carbohydrate High Fat Diet-Fed Rats. *Nutrient* 2013; 5(3): 637-650.
- Shokrzadeh M, Habibi E, Modanloo M. Cytotoxic and genotoxic studies of essential oil from Rosa damascene Mill. *Med Glas* 2017; 14(2): 152-157.
- Shokrzadeh M, Ahangar N, Abdollahi M, Shadboorestan A, Omidi M, Payam SH. Potential chemoprotective effects of selenium on diazinon-induced DNA damage in rat peripheral blood lymphocyte. *Hum & Exper Toxic* 2013; 32: 759-765.
- Shokrzadeh M, Azadbakht M, Ahangar N, Hashemi A, Saeedi Saravi SS. Cytotoxicity of hydro-alcoholic extracts of Cucurbita pepo and Solanum nigrum on HepG2 and CT26 cancer cell lines. *Pharmacognosy Magazine* 2010; 6(23): 176-179.
- Nawaz R, Saha K. Early Pregnancy Termination with Oral Mifepristone and Vaginal Misoprostol.

- 
- Bangladesh J ObstetGynaeco 2012; 27(2): 44-49.
16. Coles P. French government approves abortion pill for cammerical. Nature 1988; 335: 486.
17. Sitruk-Ware R, M.Spitz I.M. Pharmacological properties of mifepristone: toxicology and safety in animal and human studies. Contraception 2003; 68: 409-420.
18. Behar A, Laurain E, Maurel A, Brun MD, Chauvin L. The pathophysiological mechanism of fluid retention in advanced cancer patient treated docetaxel. J of Clin Pharm 1997; 43(6): 53-58.
19. Bors W, Heller W, Michel C, StettmaierK. Flavonoids and polyphenols: chemistry and biology. In: Handbook of Antioxidants (Cadenas E, Paker L, eds.). New York: Marcel Dekker Inc; 1996. p. 409-466.