BRIEF REPORT

Chemoprotective Effects of Myristin against Genotoxicity Induced by Endosulfan on Human Blood Lymphocyte

Mohammad Shokrzadeh[1],
Emran Habibi[2],
Anahita Zamani[3],
Mona Modanloo[4],
Maryam Alizadeh[5]

[1] Associate Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Pharmacognosy, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Pharmacy Student, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] PhD Student in Toxicology, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] BS of Toxicology Laboratory, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received February 29, 2016 ; Accepted September 17, 2016)

Abstract

Background and purpose: Myricetin as a natural flavonoids in tea and coffee, has extensive pharmacological effects. Endosulfan is mutagenic and is capable of inducing genetic damage in human blood cells. The aim of this study was to investigate the protective effect of myricetin against DNA damage caused by endosulfan on human blood lymphocytes.

Materials and methods: Blood samples after 3 hours of incubation with different concentrations of myricetin, were incubated with Mμ10 endosulfan for 24 hours. Then, to evaluate the production of micronucleus in binucleated lymphocytes, the slides were prepared and were evaluated by light microscopy. The mean values were compared using PRISM and ANOVA (posttest: Tukey).

Results: The incubation of blood samples with Endosulfan induced additional genotoxicity in lymphocytes, and Myristin pretreatment significantly reduced the micronucleus frequency ($P<0.01$). The results showed the effective role of Myristin as protective agent in reducing the genotoxicity of the pesticide Endosulfan.

Conclusion: Myristin appeared to scavenge and trap free radicals to prevent the damage induced by ROS. It is a natural compound and is considered to be safe, therefore, it can be used as a supplement to protect people exposed to chemical or environmental hazards.

Keywords: endosulfan, myristin, genotoxicity, human lymphocyte, micronucleus test

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26 (141): 143-148 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۴۱ مهر سال ۱۳۹۵ (۱۴۸-۱۴۳)

بررسی اثر محافظتی میریستین در ژنوتوکسیسیته ناشی از اندوسولفان بر لنفوسیت های خونی انسان

محمد شکرزاده[۱]
عمران حبیبی[۲]
آناهیتا زمانی[۳]
منا مدانلو[۴]
مریم علیزاده[۵]

چکیده

سابقه و هدف: میریستین به عنوان یک فلاونوئید طبیعی در چای و قهوه، اثرات فارماکولوژیک وسیعی دارد. اندوسولفان موتاژن بوده و توانایی القای آسیب‌های ژنتیکی در سلول‌های خونی انسان را دارد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر محافظتی میریستین در برابر آسیب DNA ناشی از اندوسولفان در لنفوسیت‌های خون انسان می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، نمونه‌های خونی پس از ۳ ساعت انکوباسیون با غلظت‌های مختلف میریستین، با ۱۰μM اندوسولفان برای ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس جهت ارزیابی تولید میکرونوکلئوس در لنفوسیت‌های دو هسته‌ای مهار شده در سیتوکینز، لام تهیه شد و با میکروسکوپ نوری بررسی شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار PRISM و آزمون ANOVA (posttest: Tukey)، مقادیر مختلف میانگین‌ها با هم مقایسه شد.

یافته‌ها: انکوبه کردن نمونه‌های خونی با اندوسولفان موجب القای ژنوتوکسیسیته در لنفوسیت‌ها شده و مجاور نمودن سلول‌ها از قبل با میریستین به مقدار قابل توجهی تعداد میکرونوکلئوس‌ها را کاهش می‌دهد ($p<۰/۰۱$). نتایج این مطالعه نقش موثر میریستین به عنوان عامل محافظتی در برابر ژنوتوکسیسیته حشره‌کش اندوسولفان را نشان می‌دهد.

استنتاج: میریستین به عنوان آنتی ژنوتوکسیک قوی در برابر آسیب‌های DNA ناشی از اندوسولفان آشکار شد که می‌تواند حاصل مکانیسم به دام اندازی و اسکاونجری رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از اثرات مخرب آن‌ها باشد. از آن‌جا که میریستین یک ترکیب طبیعی و بدون خطر می‌باشد، از آن می‌توان به عنوان یک مکمل جهت محافظت افراد در برابر مخاطرات شیمیایی و محیطی سود جست.

واژه های کلیدی: اندوسولفان، میریستین، ژنوتوکسیسیته، لنفوسیت انسانی، تست میکرونوکلئوس

مقدمه

بسیاری از ترکیبات شیمیایی و عوامل محیطی قادر به ایجاد سمیت ژنتیکی روی سلول‌های بدن می‌باشند. در مقابل اثرات سمی، بدن انسان نیز به سیستم‌های دفاعی مجهز شده است که می‌توان به انواع آنزیم‌ها با خاصیت سم دایی اشاره کرد. با افزایش عوامل سمی و کاهش توان دفاعی بدن، شاهد انواع عوارض موتاژنی

مولف مسئول:منا مدانلو– ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مرکز تحقیقات علوم دارویی E-mail: dr_modanloo@yahoo.com
۱. دانشیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی، گروه سم شناسی داروشناسی، دانشکده داروسازی ، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. استادیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی، گروه گیاهان دارویی، دانشکده داروسازی ، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. دانشجوی دکترای داروسازی، مرکز تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی ، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. دانشجوی دکترای پژوهشی ، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. کارشناس آزمایشگاه سم شناسی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۱۲/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۱۲/۱۸ تاریخ تصویب : ۱۳۹۵/۶/۲۷

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

کارسینوژنی و انواع سرطان هستیم(۲،۱). در معرض قرارگیری عوامل محیطی و شیمیایی موجب تولید رادیکال آزاد در محیط داخل سلولی می‌شود که این رادیکال‌های آزاد می‌توانند با ماکرومولکول‌های حیاتی مانند DNA برخورد کنند و شکست‌های کروموزومی ایجاد کنند و منجر به آسیب ژنتیکی شوند که به مرور زمان ممکن است بیماری‌های مزمن مانند سرطان ایجاد کنند(۱). تقریباً از ۱۹۴۵ تا ۱۹۶۵ ارگانوکلره‌ها در طیف وسیعی شامل کشاورزی و جنگلداری به کار رفته‌اند(۳). خواص فیزیکی و شیمیایی سموم آلی کلردار و متابولیت‌های آن‌ها سبب می‌شود که این ترکیبات به سهولت وارد بدن موجودات شوند(۴). اندوسولفان یک حشره‌کش ارگانوکلره است که توانایی ایجاد تغییر در ماده ژنی به ویژه کروموزوم‌ها را در محیط‌های کشت سلولی دارد(۳). با توجه به این که مکانیسم اصلی در ژنوتوکسیسیتی اندوسولفان، افزایش رادیکال‌های آزاد می‌باشد، لذا به نظر می‌رسد ترکیبات مهارکننده رادیکال‌های آزاد موجب خنثی کردن اثرات مخرب رادیکال‌ها و کاهش عوارض برخورد این رادیکال‌های آزاد با ماکرومولکول‌های حیاتی مانند DNA می‌شوند. امروزه ترکیبات پلی‌فنلی از جهت دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی، مورد توجه قرار گرفته‌اند. این ترکیبات می‌توانند به‌طور مستقیم، موجب از بین رفتن رادیکال‌های آزاد و مهار آنزیم‌های موثر در مسیرهای احیای اکسیژن شوند(۶،۵). از جمله این ترکیبات، میریستین (فلاونوئید موجود در چای سیاه) است که با داشتن ساختار فنولی خود می‌تواند با به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد، آسیب‌های ناشی از آن را کاهش دهند. در این مقاله به بررسی اثر محافظتی میریستین بر سمیت ژنتیکی ناشی از اندوسولفان بر روی لنفوسیت‌های خونی انسان پرداخته شد.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، پس از دریافت مجوز از کمیته اخلاق دانشگاه و با رضایت آگاهانه داوطلبین، ۷ سی‌سی خون از پنج داوطلب سالم و غیر سیگاری که در ۶ ماه اخیر تحت رادیوتراپی و درمان آنتی بیوتیکی نبوده اند، دریافت گردید. نمونه‌های خونی به ۷ گروه مجزای ۱ میلی‌لیتری تقسیم گردید: کنترل (حلال)، اندوسولفان با دوز آسیب زا (۱۰μM)، محلول میریستین با دوزهای مختلف (۵۰۰ و ۱۰۰ و ۱۰ میکرومول) به همراه ۱۰μM اندوسولفان و میریستین تنها با دوز ۵۰۰ میکرومول جهت بررسی عدم آسیب احتمالی توسط دوز بالای میریستین.

در ابتدا نمونه‌های خونی به همراه غلظت‌های مختلف محلول میریستین، به مدت ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس اندوسولفان به نمونه‌ها اضافه گردید و با محیط کشت RPMI (حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک) به حجم نهایی ۵ mL رسید و ۰/۱ mL ماده میتوژن PHA (جهت تحریک رشد لنفوسیت‌ها) افزوده شد. ظرف‌های کشت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و بعد از ۴۴ ساعت، میزان ۳μg/ml سیتوکلازین B (جهت جلوگیری از تقسیم سیتوپلاسم طی میتوز) به آن‌ها افزوده شد(۷). ۷۲ ساعت پس از کشت لنفوسیت‌ها، محصول‌برداری صورت گرفت(۷). محتویات ظروف کشت به مدت ۸ دقیقه با دور ۸۰۰rpm سانتریفوژ گردید. بعد مایع فوقانی به آرامی خارج شده و به محتویات ته لوله، ۶ میلی‌لیتر محلول هیپوتونیک پتاسیم کلراید افزوده شد و بلافاصله نمونه‌ها با دور ۱۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس مایع فوقانی برداشته شده و برای ثابت کردن سلول‌ها، محلول ثابت‌کننده شامل یک قسمت اسید استیک گلاسیال و ۶ قسمت متانول به نمونه افزوده شد. سپس نمونه‌ها سانتریفوژ شد و این عمل به‌صورت پیاپی (حداقل۳ بار) و تا زمانی که محلول روئی سلول‌ها شفاف و بیرنگ نماید، ادامه یافت و در آخرین مرحله پس از سانتریفوژ، محلول بالائی به میزانی برداشته شد که ته مانده لوله سانتریفوژ فقط ۰/۵ میلی‌لیتر باشد(۷). پس از تهیه لام‌ها، رنگ‌آمیزی گیمسا صورت گرفت. لام‌ها با میکروسکوپ نوری و

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

بزرگ‌نمائی ۴۰× و سپس ۱۰۰×مورد بررسی قرار گرفتند و به ازای هر نمونه، حداقل ۱۰۰۰ لنفوسیت دو هسته‌ای و تعداد ریزهسته های موجود در آن بررسی شد(۸).

در این مطالعه پس از تعیین میانگین نمونه‌ها، با استفاده از نرم‌افزار PRISM و آزمون ANOVA (posttest: Tukey)، مقادیر مختلف میانگین‌ها با هم مقایسه شد. $p < ۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها و بحث

در سال‌های اخیر، روش MN assay یکی از بهترین روش‌های پایه‌گذاری شده برای ارزیابی سیتوژنیک in vivo و in vitro در ژنوتوکسیسیته می‌باشد و به صورت گسترده‌ای جهت ارزیابی آسیب‌های سیتوژنیک ناشی از مواد شیمیایی و تابش‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. با پیشرفت‌های انجام شده توسط Fenech و Morley، این روش ارزیابی، بسیار حساس، ساده و سریع برای تشخیص عوامل القا کننده آسیب کروموزومی است(۷).

اندوسولفان با غلظت ۱۰μM به میزان قابل ملاحظه‌ای باعث افزایش تعداد میکرونوکلئوس ها نسبت به گروه کنترل شد که با نتایج مطالعه انجام شده توسط Lajmanovich و همکاران در سال ۲۰۰۵ هم خوانی دارد. Lajmanovich و همکاران نشان دادند که اندوسولفان با دوزهای ۱۰g/l و ۵ و ۲/۵، در اریتروسیت سمیت ژنتیکی ایجاد می‌کند. آن‌ها در این مطالعه خود از روش میکرونوکلئوس استفاده کردند. اندوسولفان در دوزهای ۵ و ۱۰ g/l نسبت به گروه کنترل، تعداد ریز هسته را به طور معنی‌داری افزایش داد که این نتیجه همسو با مطالعه ما بوده که شکست تک رشته ای و دو رشته ای DNA را نشان می‌دهد(۹).

اندوسولفان مانند دیگر آفت‌کش‌ها قادر به تولید رادیکال‌های آزاد است. در مطالعه‌ای که به بررسی اثرات حفاظتی ویتامین E بر روی سمیت اندوسولفان در رت انجام شد، به این نتیجه رسیدند که اندوسولفان (۲ mg/kg در روز) فعالیت SOD و GPx و CAT و MDA را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش می‌دهد(۱۰). اندوسولفان در گیاهان قادر به ایجاد ژنوتوکسیسیتی است.

Perez و همکاران با استفاده از متد میکرونوکلئوس نشان دادند که اندوسولفان با دوز ۵ μg/l به طور معنی‌داری تعداد ریز هسته را در گیاه Bidens laevis افزایش می‌دهد(۱۱). نتایج بسیاری از مطالعات دیگر هم سو با نتایج ما بوده و آسیب‌های ژنتیکی ناشی از مواجه با اندوسولفان را به اثبات رسانده است.

داده‌ها در جدول شماره ۱ نشان می‌دهد که درصد میکرونکلئوس لنفوسیت‌هایی که تحت اندوسولفان (کنترل مثبت) قرارگرفتند، به صورت قابل ملاحظه‌ای ($p<۰/۰۰۱$) بیش‌تر از سلول‌های کنترل منفی است. هم‌چنین در مقایسه نمونه خونی مواجه شده با اندوسولفان و نمونه میریستین ۵۰۰ با اندوسولفان، تفاوت معنی داری وجود دارد ($p<۰/۰۰۱$).

جدول شماره۱: تعدادمیکرونوکلئوس‌های ایجادشده در لنفوسیت‌های نمونه خونی گرفته شده از داوطلبان در شرایط in vitro پس از مواجه با اندوسولفان و اثر محافظتی میرستین در غلظت های مختلف

شماره گروه	کنترل	اندوسولفان	میریستین + اندوسولفان ۱۰	میریستین + اندوسولفان ۱۰۰	میریستین + اندوسولفان ۵۰۰	میریستین
۱	۵	۱۴۰	۱۱۰	۷۰	۵۰	۶
۲	۵	۱۸۰	۱۰۰	۶۵	۴۵	۵
۳	۴	۱۶۰	۸۰	۶۸	۴۰	۶
۴	۳	۱۴۸	۸۰	۶۰	۴۰	۳
۵	۴	۱۵۴	۹۰	۷۲	۳۸	۴
Mean±SD	۴/۲±۰/۸۳	۱۵۶/۴±۱۵/۱۲	۹۲±۱۳/۰۳	۶۷±۴/۶۹	۴۲/۶±۴/۸۷۸	۴/۸±۱/۳
	****		**	**	****	****

* سطح معناداری نسبت به گروه تحت تاثیر اندوسولفان

بر اساس نتایج این مطالعه، مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت میریستین، اثرات محافظتی آن در برابر سم اندوسولفان بیش‌تر شده و بیش‌ترین اثر محافظتی در غلظت ۵۰۰ میکرومولار میریستین در برابر اندوسولفان ایجاد می‌شود، به طوری که در مقایسه با کنترل، میزان میکرونوکلئوس‌ها به میزان ۴۱ درصد، ۵۷ درصد و ۷۲ درصد در سلول‌های قرار گرفته تحت ۱۰ μM، ۱۰۰ μM و ۵۰۰ μM میریستین کاهش یافته است. هم‌چنین

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

هیچ‌گونه اثرات ژنوتوکسیک در کشت لنفوسیت‌ها با غلظت ۵۰۰µM میریستین به تنهایی مشاهده نشد. هیسپریدین یک فلاونوئید گلیکوزیدی است که اثر محافظتی آن بر روی آسیب DNA به علت خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی آن می‌باشد(۱۲).

نتایج مطالعه حاضر همسو با نتایج مطالعه شکرزاده و همکاران در خصوص بررسی اثر محافظتی هسپریدین بر سمیت ژنتیکی ناشی از دیازینون روی لنفوسیت‌های خون محیطی انسان می‌باشد. در این مطالعه آسیب‌های ژنتیکی با تست میکرونوکلئوس ارزیابی شده است. تجویز دیازینون منجر به آسیب ژنتیکی DNA و القای تولید میکرونوکلئوس در لنفوسیت‌های خونی شده است. انکوبه کرده سلول‌ها با هسپریدین از ایجاد آسیب ژنتیکی لنفوسیت‌ها جلوگیری کرده و همه‌ی دوزهای مصرفی آن اثر محافظتی قوی را نشان داده است که نشان‌دهنده اثر محافظتی خوب فلاونوئیدها در برابر سمیت ژنتیکی سموم ارگانوفسفره و کلره می‌باشد(۱۳). هم‌چنین در مطالعه دیگری که توسط Sahu و همکارانش در ۲۰۱۳ انجام شد، نتایج حاکی از اثرات محافظتی هسپریدین بر روی سمیت کلیوی ناشی از سیس پلاتین بود(۱۴).

از آن‌جاکه میریستین‌ترکیب مطمئنی است و هیچ‌گونه اثرات سمی در دوزهای بالای آن دیده نشده است، می‌تواند به عنوان مکمل موجب ارتقا توانایی سیستم ایمنی در برابر آسیب‌های ژنتیکی و سایر مخاطرات ناشی از رادیکال‌ها باشد.

References

1. Tiwari AK. Imbalance in antioxidant defense and human diseases: multiple approach of natural antioxidants therapy. Curr Sci India 2001; 81(9): 1179-1178.
2. Ahmadi A, Hosseinimehr SJ, Naghshvar F, Hajir E, Ghahremani M. Chemoprotective effects of hesperidin against genotoxicity induced by cyclophosphamide in mice bone marrow cells. Arch Pharm Res 2008; 31(6): 794-797.
3. Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, FernandezMF, Olea N, Serrano FO. The E-SCREEN assay asa tool to identify estrogens: an update on estrogenicenvironmental pollutants. Environ Health Perspect 1995; 103 (Suppl 7): 113-122.
4. Hela DG, Lambropoulou DA, Konstantinou IK, Al-banis TA. Environmental monitoring and ecologicalrisk assessment for pesticide contamination andeffects in Lake Pamvotis, northwestern Greece. Environ Toxicol Chem 2005; 24(6):1548-1556.
5. Hosseinimehr SJ, Ahmadi A, Beiki D, Habibi E, Mahmoudzadeh A. Protective effects of hesperidin against genotoxicity induced by (99m)Tc-MIBI in human cultured lymphocyte cells. Nucl Med Biol 2009; 36(7): 863-867.
6. Hosseinimehr SJ, Karami M. Citrus extract modulates genotoxicity induced by cyclophosphamide in mice bone marrow cells. J Pharm Pharmacol 2005; 57(4): 505-509.
7. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mutat Res 1985; 147(1-2): 29-36.
8. 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. Human & Experimental Toxicology 2013; 32(7): 759-765.
9. Lajmanovich RC, Cabagna M, Peltzer PM, Stringhini GA, Attademo AM. Micronucleus induction in erythrocytes of the Hyla

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

pulchella tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. Mutat Res 2005; 587(1-2): 67-72.

10. Kalender S, Kalender Y, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Durak D, Açikgoz F. Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: the protective effect of vitamin E. Toxicology 2004; 202(3): 227-235.
11. Perez DJ, Menone ML, Camadro EL, Moreno VJ. Genotoxicity evaluation of the insecticide endosulfan in the wetland macrophyte Bidens laevis L. Environ Pollut 2008; 153(3): 695-698.
12. Balakrishnan A, Menon VP. Antioxidant properties of hesperidin in nicotine-induced lung toxicity. Fundam Clin Pharmacol 2007; 21(5): 535-546.
13. Shokrzadeh M, Ahmadi A. The chemoprotective effects of hesperidin lymphocyte, against genotoxicity induced by diazinon on human blood. Drug Res 2014; 504: 75-85.
14. Sahu BD, Kuncha M, Sindhura GJ, Sistla R. Hesperidin attenuates cisplatin-induced acute renal injury by decreasing oxidative stress, inflammation and DNA damage. Phytomedicine 2013; 20(5): 453-460.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]