

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

Mohammad Shokrzadeh¹,
Emran Habibi²,
Anahita Zamani³,
Mona Modanloo⁴,
Maryam Alizadeh⁵

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 $M\mu 10$ 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).

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

محمد شکرزاده^۱عمران حبیبی^۲آناهیتا زمانی^۳منا مدانلو^۴مریم 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 آسیب های ژنتیکی در سلول های خونی انسان را دارد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر محافظتی میریستین در برابر آسیب DNA ناشی از اندوسولفان در لنفوسیت های خون انسان می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، نمونه های خونی پس از ۳ ساعت انکوباسیون با غلظت های مختلف میریستین، با $10 \mu\text{M}$ اندوسولفان برای ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس جهت ارزیابی تولید میکرونوکلئوس در لنفوسیت های دو هسته ای مهار شده در سیتو کینز، لام تهیه شد و با میکروسکوپ نوری بررسی شد. سپس با استفاده از نرم افزار PRISM و آزمون ANOVA (posttest: Tukey)، مقادیر مختلف میانگین ها با هم مقایسه شد.

یافته ها: انکوبه کردن نمونه های خونی با اندوسولفان موجب القای ژنوتوکسیسیته در لنفوسیت ها شده و مجاور نمودن سلول ها از قبل با میریستین به مقدار قابل توجهی تعداد میکرونوکلئوس ها را کاهش می دهد ($p < 0/01$). نتایج این مطالعه نقش موثر میریستین به عنوان عامل محافظتی در برابر ژنوتوکسیسیته حشره کش اندوسولفان را نشان می دهد.

استنتاج: میریستین به عنوان آنتی ژنوتوکسیک قوی در برابر آسیب های DNA ناشی از اندوسولفان آشکار شد که می تواند حاصل مکانیسم به دام اندازی و اسکاوتجری رادیکال های آزاد و جلوگیری از اثرات مخرب آن ها باشد. از آن جا که میریستین یک ترکیب طبیعی و بدون خطر می باشد، از آن می توان 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 سلول های بدن می باشند. در مقابل اثرات سمی، بدن انسان نیز به سیستم های دفاعی مجهز شده است که می توان به انواع آنزیم ها با خاصیت سم دایی اشاره کرد. با افزایش عوامل سمی و کاهش توان دفاعی بدن، شاهد انواع عوارض موتاژنی

E-mail: dr_modanloo@yahoo.com

مؤلف مسئول: منا مدانلو - ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مرکز تحقیقات علوم دارویی

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 دکتری داروسازی، مرکز تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. دانشجوی دکتری 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

کارسینوژنی و انواع سرطان هستیم (۲،۱). در معرض قرارگیری عوامل محیطی و شیمیایی موجب تولید رادیکال آزاد در محیط داخل سلولی می شود که این رادیکال های آزاد می توانند با ماکرومولکول های حیاتی مانند DNA برخورد کنند و شکست های کروموزومی ایجاد کنند و منجر به آسیب ژنتیکی شوند که به مرور زمان ممکن است بیماری های مزمن مانند سرطان ایجاد کنند (۱). تقریباً از ۱۹۴۵ تا ۱۹۶۵ ارگانوکلرها در طیف وسیعی شامل کشاورزی و جنگلداری به کار رفته اند (۳). خواص فیزیکی و شیمیایی سموم آلی کلردار و متابولیت های آنها سبب می شود که این ترکیبات به سهولت وارد بدن موجودات شوند (۴). اندوسولفان یک حشره کش ارگانوکلره است که توانایی ایجاد تغییر در ماده ژنی به ویژه کروموزوم ها را در محیط های کشت سلولی دارد (۳). با توجه به این که مکانیسم اصلی در ژنوتوکسیسیته اندوسولفان، افزایش رادیکال های آزاد می باشد، لذا به نظر می رسد ترکیبات مهارکننده رادیکال های آزاد موجب خنثی کردن اثرات مخرب رادیکال ها و کاهش عوارض برخورد این رادیکال های آزاد با ماکرومولکول های حیاتی مانند DNA می شوند. امروزه ترکیبات پلی فنلی از جهت دارا بودن خاصیت آنتی اکسیدانی، مورد توجه قرار گرفته اند. این ترکیبات می توانند به طور مستقیم، موجب از بین رفتن رادیکال های آزاد و مهار آنزیم های موثر در مسیرهای احیای اکسیژن شوند (۵،۶). از جمله این ترکیبات، میریستین (فلاونوئید موجود در چای سیاه) است که با داشتن ساختار فنولی خود می تواند با به دام اندازی رادیکال های آزاد، آسیب های ناشی از آن را کاهش دهند. در این مقاله به بررسی اثر محافظتی میریستین بر سمیت ژنتیکی ناشی از اندوسولفان بر روی لنفوسیت های 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 سی سی خون از پنج داوطلب سالم و غیر سیگاری که در

۶ ماه اخیر تحت رادیوتراپی و درمان آنتی بیوتیکی نبوده اند، دریافت گردید. نمونه های خونی به ۷ گروه مجزای ۱ میلی لیتری تقسیم گردید: کنترل (حلال)، اندوسولفان با دوز آسیب زا ($10 \mu\text{M}$)، محلول میریستین با دوزهای مختلف (۵۰۰ و ۱۰۰ و ۱۰ میکرومول) به همراه $10 \mu\text{M}$ اندوسولفان و میریستین تنها با دوز ۵۰۰ میکرومول جهت بررسی عدم آسیب احتمالی توسط دوز بالای میریستین.

در ابتدا نمونه های خونی به همراه غلظت های مختلف محلول میریستین، به مدت ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس اندوسولفان به نمونه ها اضافه گردید و با محیط کشت RPMI (حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد آنتی بیوتیک) به حجم نهایی ۵ mL رسید و ۰/۱ mL ماده میتوزن PHA (جهت تحریک رشد لنفوسیت ها) افزوده شد. ظرف های کشت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد و بعد از ۴۴ ساعت، میزان $3 \mu\text{g/ml}$ سیتوکلایزین B (جهت جلوگیری از تقسیم سیتوپلاسم طی میتوز) به آنها افزوده شد (۷). ۷۲ ساعت پس از کشت لنفوسیت ها، محصول برداری صورت گرفت (۷). محتویات ظروف کشت به مدت ۸ دقیقه با دور ۸۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. بعد مایع فوقانی به آرامی خارج شده و به محتویات ته لوله، ۶ میلی لیتر محلول هیپوتونیک پتاسیم کلراید افزوده شد و بلافاصله نمونه ها با دور ۱۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس مایع فوقانی برداشته شده و برای ثابت کردن سلول ها، محلول ثابت کننده شامل یک قسمت اسید استیک گلاسیال و ۶ قسمت متانول به نمونه افزوده شد. سپس نمونه ها سانتریفوژ شد و این عمل به صورت پیاپی (حداقل ۳ بار) و تا زمانی که محلول روئی سلول ها 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 میلی لیتر باشد (۷). پس از تهیه لام ها، رنگ آمیزی گیمسا صورت گرفت. لام ها با میکروسکوپ نوری و

بزرگ‌نمائی $\times 40$ و سپس $\times 100$ مورد بررسی قرار گرفتند و به ازای هر نمونه، حداقل ۱۰۰۰ لنفوسیت دو هسته‌ای و تعداد ریزهسته‌های 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. $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها 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 Morley و Fenech، این روش ارزیابی، بسیار حساس، ساده و سریع برای تشخیص عوامل القاکننده آسیب کروموزومی است (۷). اندوسولفان با غلظت $10 \mu\text{M}$ به میزان قابل ملاحظه‌ای باعث افزایش تعداد میکرونوکلئوس‌ها نسبت به گروه کنترل شد که با نتایج مطالعه انجام شده توسط Lajmanovich و همکاران در سال ۲۰۰۵ هم‌خوانی دارد. Lajmanovich و همکاران نشان دادند که اندوسولفان با دوزهای 10 g/l و $2/5$ ، در اریتروسیت سمیت ژنتیکی ایجاد می‌کند. آن‌ها در این مطالعه خود از روش میکرونوکلئوس استفاده کردند. اندوسولفان در دوزهای 5 و 10 g/l نسبت به گروه کنترل، تعداد ریزهسته را به طور معنی‌داری افزایش داد که این نتیجه همسو با مطالعه ما بوده که شکست تک رشته‌ای و دو رشته‌ای 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 2 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 ژنوتوکسیسیته است.

Perez و همکاران با استفاده از متد میکرونوکلئوس نشان دادند که اندوسولفان با دوز $5 \mu\text{g/l}$ به طور معنی‌داری تعداد ریزهسته را در گیاه *Bidens laevis* افزایش می‌دهد (۱۱). نتایج بسیاری از مطالعات دیگر هم سو با نتایج ما بوده و آسیب‌های ژنتیکی ناشی از مواجهه با اندوسولفان را به اثبات رسانده است.

داده‌ها در جدول شماره ۱ نشان می‌دهد که درصد میکرونوکلئوس لنفوسیت‌هایی که تحت اندوسولفان (کنترل مثبت) قرار گرفتند، به صورت قابل ملاحظه‌ای ($p < 0.001$) بیش‌تر از سلول‌های کنترل منفی است. هم‌چنین در مقایسه نمونه خونی مواجه شده با اندوسولفان و نمونه میریستین 500 با اندوسولفان، تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p < 0.001$).

جدول شماره ۱: تعداد میکرونوکلئوس‌های ایجاد شده در لنفوسیت‌های نمونه خونی گرفته شده از داوطلبان در شرایط in vitro پس از مواجهه با اندوسولفان و اثر محافظتی میریستین در غلظت‌های مختلف

شماره گروه	کنترل	اندوسولفان	میریستین 100 اندوسولفان	میریستین 500 اندوسولفان	میریستین
۱	۵	۱۴۰	۱۱۰	۷۰	۵۰
۲	۵	۱۸۰	۱۰۰	۶۵	۴۵
۳	۴	۱۶۰	۸۰	۶۸	۴۰
۴	۳	۱۴۸	۸۰	۶۰	۴۰
۵	۴	۱۵۴	۹۰	۷۲	۳۸
Mean $\pm$ SD	$4/2 \pm 0/3$	$156/4 \pm 15/12$	$94 \pm 13/0/3$	$67 \pm 4/69$	$42/6 \pm 4/88$
	****		**	**	****

* 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 500 میکرومولار میریستین در برابر اندوسولفان ایجاد می‌شود، به طوری که در مقایسه با کنترل، میزان میکرونوکلئوس‌ها به میزان 41 درصد، 57 درصد و 72 درصد در سلول‌های قرار گرفته تحت $10 \mu\text{M}$ ، $100 \mu\text{M}$ و $500 \mu\text{M}$ میریستین کاهش یافته است. هم‌چنین

هیچ گونه اثرات ژنوتوکسیک در کشت لنفوسیت‌ها با غلظت $500 \mu\text{M}$ میریستین به تنهایی مشاهده نشد. هسپریدین یک فلاونوئید گلیکوزیدی است که اثر محافظتی آن بر روی آسیب DNA به علت خاصیت آنتی اکسیدانی 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 میریستین ترکیب مطمئنی است و هیچ گونه 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, Hosseini-mehr 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, Fernandez MF, Olea N, Serrano FO. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 1995; 103 (Suppl 7): 113-122.
4. Hela DG, Lambropoulou DA, Konstantinou IK, Al-banis TA. Environmental monitoring and ecological risk assessment for pesticide contamination and effects in Lake Pamvotis, northwestern Greece. *Environ Toxicol Chem* 2005; 24(6): 1548-1556.
5. Hosseini-mehr 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. Hosseini-mehr 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, Omid 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

- 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.