DOI: 10.22122/jims.v39i623.13867 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و نهم/شماره‌ی ۶۲۳/هفته‌ی سوم تیر ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۳ تاریخ چاپ: ۱۴۰۰/۴/۲۱

اثرات ژنوتوکسیک احتمالی ناشی از تماس با سم فوزالون در سلول‌های مغز قرمز استخوان موش سوری

زهره خدابنده[۱]، محمود اعتباری[۲]، مهدی علی عمرانی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: فوزالون، به عنوان یک آفت‌کش ارگانوفسفره جهت کنترل آفات مورد استفاده قرار می‌گیرد. استرس اکسیداتیو، یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌هایی است که فوزالون از طریق آن باعث سمیت می‌شود. مطالعه‌ی حاضر، با هدف ارزیابی اثرات ژنوتوکسیک احتمالی به دنبال تماس با سم فوزالون در سلول‌های مغز قرمز استخوان موش سوری انجام شد.

روش‌ها: در این مطالعه، از ۶۰ سر موش سوری سالم نر بالغ (سن ۸-۶ هفته و وزن تقریبی بین ۲۵-۲۰ گرم) استفاده شد که به ۶ گروه تقسیم شدند (n = ۱۰ در هر گروه). گروه ۱، حامل سم فوزالون به مدت ۵ روز متوالی به صورت گاواژ (گروه شاهد منفی)، گروه ۲، داروی سیکلوفسفامید با دز ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت داخل صفاقی (شاهد مثبت) و گروه‌های ۳، ۴، ۵ و ۶ فوزالون را در دزهای ۴۰، ۲۰، ۱۲ و ۶ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن در ۵ روز متوالی به صورت گاواژ دریافت کردند. پس از جداسازی مغز استخوان و لنفوسیت‌ها از موش‌های سوری، آزمون Comet جهت ارزیابی اثرات ژنوتوکسیک به کار گرفته شد.

یافته‌ها: میزان Tail length در گروه‌های دریافت کننده‌ی فوزالون به مدت ۱ و ۵ روز در دزهای ۱۲، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم با گروه شاهد منفی (حامل سم فوزالون) تفاوت معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۵۰$). همچنین، عامل زمان نیز در افزایش این تخریب مؤثر است؛ به گونه‌ای که در بررسی ۵ روزه نسبت به ۱ روزه تخریب DNA بیشتری مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، اثرات ژنوتوکسیک وابسته به دز و زمان با سم فوزالون مشاهده شد. از این رو، پیشنهاد می‌گردد توجه جدی در محدودیت استفاده از این ترکیب به عنوان آفت‌کش در عرصه‌ی کشاورزی صورت پذیرد.

واژگان کلیدی: ارگانوفسفره؛ فوزالون؛ آزمون Comet؛ سیکلوفسفامید؛ زولون

ارجاع: خدابنده زهره، اعتباری محمود، علی عمرانی مهدی . **اثرات ژنوتوکسیک احتمالی ناشی از تماس با سم فوزالون در سلول‌های مغز قرمز استخوان موش سوری.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۰؛ ۳۹ (۶۲۳): ۳۰۹-۳۰۳.

مقدمه

آفت‌کش‌ها به عنوان مواد خالص یا مخلوط تعریف می‌شوند که به طور معمول، برای کنترل آفات در سیستم‌های کشاورزی، پزشکی، دامپزشکی و نظافت خانگی استفاده می‌شوند (۲-۱). آفت‌کش‌ها، شامل طیف وسعی از قارچ‌کش‌ها، حشره‌کش‌ها، علف‌کش‌ها، کرم‌کش‌ها و غیره هستند (۶-۳). این ترکیبات، ممکن است اثرات جانبی در ارگانیسم‌های غیر هدف را داشته باشند که می‌تواند آغازگر اثرات سم‌شناسی در سطوح مختلف در موجودات زنده از جمله انسان باشد (۸-۷).

آفت‌کش‌های ارگانوفسفره به دلیل استفاده گسترده نسبت به سایر آفت‌کش‌ها از جمله متداول‌ترین آلاینده‌های محیطی به شمار می‌روند (۹). فوزالون، یک عضو از خانواده‌ی آفت‌کش‌های ارگانوفسفره است و به طور معمول، به عنوان حشره‌کش و کنه‌کش مورد استفاده قرار می‌گیرد. فوزالون در محصولات آجیل، مرکبات، میوه‌های انار، میوه‌های سنگی، انگور، سیب‌زمینی و کنگر فرنگی جهت کنترل آفات استفاده می‌شود (۱۲-۱۱). باقی مانده‌ی این آفت‌کش در مواد غذایی و خوراکی توسط محققین در ایران و سایر کشورها گزارش شده است. ارزیابی مواجهه‌ی حاد و مزمن با فوزالون در امریکا، به ترتیب ۰/۰۰۰۰۴۹ میلی‌گرم/کیلوگرم/روزانه و ۰/۰۰۰۰۰۱ میلی‌گرم/کیلوگرم/روزانه گزارش شده است (۱۶-۱۳، ۱۰).

۱- دانشجوی داروسازی، گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استادیار، گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده‌ی داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: مهدی علی عمرانی؛ استادیار، گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده‌ی داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: maliomrani@pharm.mui.ac.ir

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

در سال ۲۰۱۴، در حدود ۲۴۰۰۰ تن از آفت‌کش‌ها به منظور کنترل آفات در ایران مصرف شده است (۱۷). در حال حاضر، ۳۴ درصد از فروش حشره‌کش‌ها در جهان، متعلق به حشره‌کش‌های ارگانوفسفره می‌باشد (۱۸). آفت‌کش‌ها، می‌توانند اثراتی بر سیستم‌های ایمنولوژیکی، عصبی (بیماری پارکینسون و آلزایمر)، اندوکرین و تولید مثلی داشته باشند. علاوه بر این، آفت‌کش‌ها با آسیب به DNA، سبب سقط جنین، بیماری‌های دژنراتیو و سرطان می‌شوند (۱۹، ۶-۵).

مشاهده شد که مواجهه با این سم در دزهای اندک، می‌تواند منجر به القای افسردگی وابسته به سیستم کولینرژیک در موش سوری گردد (۱۹). مشابه دیگر اعضای خانواده‌ی ارگانوفسفره، فوزالون سطح Reactive oxygen species (ROS) در بافت‌های بدن انسان را افزایش می‌دهد و بدین گونه، سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را کاهش می‌دهد. از پیامدهای نهایی ROS، می‌توان به آسیب اکسیداتیو، پیری زودرس سلول، تغییرات DNA و RNA و در نهایت، سرطان و جهش ژنی اشاره کرد (۱۳). گزارش شده است که ارتباط مثبتی بین سطوح بالای مواجهه با آفت‌کش‌ها و ژنوتوکسیسیتی وجود دارد (۲۰). از این رو، مطالعه ی حاضر با هدف بررسی اثرات ژنوتوکسیک احتمالی به دنبال تماس با سم فوزالون در سلول های مغز قرمز استخوان موش سوری انجام شد.

روش‌ها

در این مطالعه، از ۶۰ سر موش‌های سوری سالم نر بالغ (سن ۸-۶ هفته و وزن تقریبی بین ۲۵-۲۰ گرم) استفاده شد که از لانه ی حیوانات دانشکده‌ی داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان خریداری شدند. حیوانات در شرایط کنترل شده، دمای ۲ ± ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت حدود ۶۰-۵۰ درصد، نور ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با دسترسی آسان به آب و غذای کامل طبق ضوابط قانون نگهداری از حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان نگهداری شدند (IR.MUI.RESEARCH.REC.1397.405).

حیونات مورد مطالعه در ۶ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. گروه ۱، حامل سم فوزالون به مدت ۵ روز متوالی به صورت گاواژ (گروه شاهد منفی)؛ گروه ۲، داروی سیکلوفسفامید با دز ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم/روزانه به صورت داخل صفاقی (شاهد مثبت) و گروه‌های ۳، ۴، ۵ و ۶ سم فوزالون به ترتیب با دز ۴۰، ۲۰، ۱۲ و ۶ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت گاواژ به مدت ۵ روز متوالی دریافت کردند.

در هر گروه، ۲۴ ساعت پس از تجویز اولین دز از سیکلوفسفامید یا حامل سم فوزالون یا سم فوزالون نمونه گیری انجام شد؛ بدین صورت که ۵ موش از هر گروه به صورت تصادفی انتخاب و بعد از کشته شدن به کمک دی‌اتیل اتر، نمونه‌برداری شدند. از سایر موش‌ها، ۵ روز پس از آخرین تجویز نمونه برداری انجام گرفت. لازم به ذکر است انتخاب زمان و انجام این مراحل برای مغز استخوان بر اساس آخرین شیوه‌نامه‌ی تأیید شده‌ی Organisation for Economic Co-operation and Development 2016 (OCED 2016) انجام گرفت.

تمامی حیوانات ۲۴ ساعت پس از تجویز سیکلوفسفامید و سم فوزالون با استفاده از عامل بی‌هوش کننده‌ی مناسب دچار مرگ آرام شدند و سریع هر دو استخوان فمور جداسازی و با چاقوی جراحی تمیز شد. پس از قطع دو سر استخوان، با استفاده از Fetal bovine serum (FBS) به میزان ۲ سی‌سی مغز استخوان به داخل یک میکروتیوب منتقل شد. پس از انجام سانتریفیوژ با شتاب ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه پلت سلولی تهیه شد و در نهایت، پس از آماده‌سازی جهت تهیه‌ی گستره بر روی لام مورد استفاده قرار گرفت.

۱ میلی‌لیتر خون گرفته شده از هر موش در لوله‌ی آزمایش حاوی Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ریخته شد و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل گردید. در ابتدا، خون با نسبت ۱:۱ با Phosphate bufferedsaline (PBS) رقیق شد. برای جداسازی لنفوسیت از خون کامل، از فایکول استفاده گردید. بدین منظور، خون رقیق شده به صورت آرام و بدون اختلاط، روی حجمی از فایکول برابر با حجم خون گرفته شده (۱ میلی‌لیتر) ریخته شد و با شتاب ۲۸۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید (۲۲). از آن جایی که محلول فایکول سمی است، این مرحله تکرار شد تا کمترین حجمی از آن در لنفوسیت نباشد. در نهایت، لنفوسیت‌هایی که به ته فالکون چسبیده بودند، در ۱۰۰۰ میکرولیتر PBS معلق شد و ۱۰۰ میکرولیتر از آن برای آزمون Comet استفاده شد.

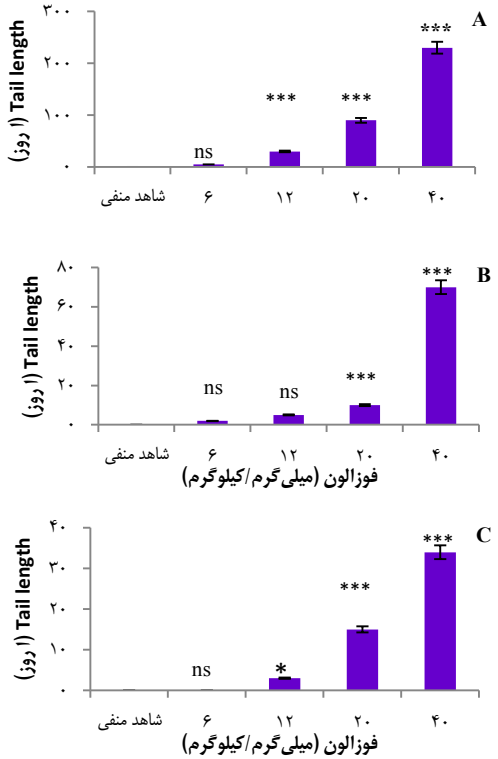
در ابتدا، لام روکش داده شده با آگارز نرمال (Normal melting agarose یا NMA) از طریق فرو بردن لام در محلول NMA با غلظت مناسب و ایجاد ژل یکنواخت تهیه شد. سپس، لنفوسیت‌های جدا شده از مغز استخوان با آگارز با ذوب پایین مخلوط شدند و سوسپانسیون سلولی یکنواختی حاصل گردید. جهت آزادسازی DNA، عمل تجزیه‌ی سلول‌ها صورت گرفت. به منظور باز شدن رشته‌های DNA و ایجاد تک رشته‌ای لام‌ها درون بافر قلیایی قرار گرفت. در مرحله‌ی بعد، عمل الکتروفورز به منظور برقراری جریان الکتریکی در سطح لام‌ها و مهاجرت DNA آسیب دیده به سمت قطب مثبت و در نهایت ایجاد Comet انجام گرفت. به منظور مشاهده‌ی Comet‌ها در زیر میکروسکوپ فلورسانس، لام‌ها با استفاده از یک رنگ فلورسانت Ethidium bromide (Et Br) رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت، تصاویر لام‌های مورد مطالعه ذخیره شدند و توسط نرم‌افزار Comet score تعداد حداقل ۵۰ سلول از هر نمونه جهت ارزیابی متغیرهایی نظیر Comet length، %DNA in Tail و Tail Moment، مورد سنجش قرار داده شد.

یافته‌ها

وزن حیوانات در گروه های مورد و شاهد در ابتدای زمان تحویل از مرکز نگهداری حیوانات دانشکده و همچنین، در روز نمونه گیری، اندازه گیری و تغییرات آن ثبت گردید. نتایج نشان داد که در طول دوره‌ی مواجهه، تغییرات معنی‌داری از نظر آماری در وزن موش‌ها وجود نداشت.

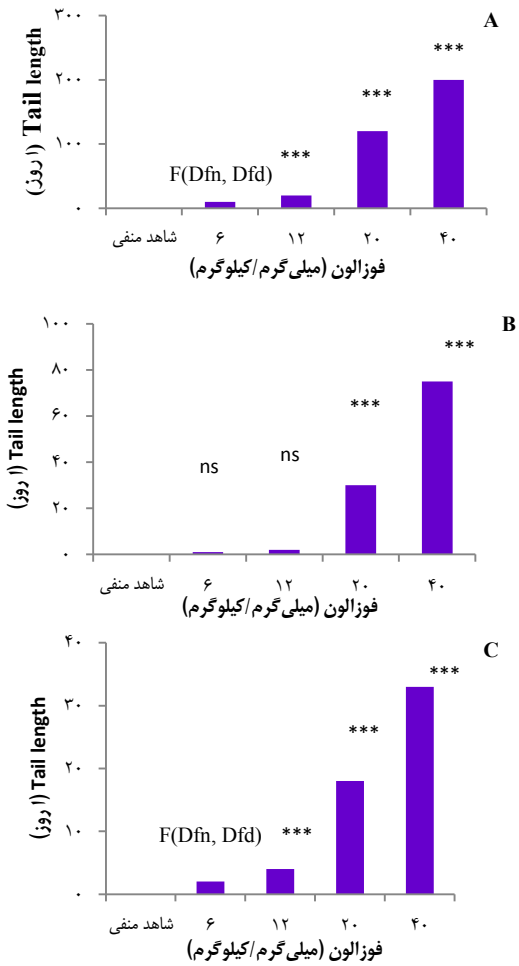
به منظور بررسی ژنوتوکسیسیتی سم فوزالون، میزان آسیب DNA در لنفوسیت‌های همه‌ی گروه‌های مورد آزمایش با استفاده از آزمون Comet در ۲۴ ساعت بعد از گاواژ، اولین دز سم به موش‌ها و بعد از ۵ روز متوالی گاواژ سم مورد مقایسه قرار گرفت. برای سنجش و مقایسه‌ی درجات تخریب، از سه عامل طول دم (Tail length)، درصد DNA در دم (%DNA in tail) و Tail moment استفاده گردید.

در شکل‌های ۱ و ۲، نتایج حاصل از آزمون Comet در گروه‌های مختلف نشان داده شده است. نتایج این مطالعه، افزایش قابل توجه تخریب را در گروه‌هایی که دز بالاتری از فوزالون دریافت کرده‌اند، نشان می‌دهد.



شکل ۱. نتایج حاصل از آزمون Comet در موش‌های سوری به دنبال ۱ روز تجویز سم فوزالون (۴۰، ۲۰، ۱۲ و ۶ میلی‌گرم/کیلوگرم). A: متغیر Tail length، B: متغیر Tail moment و C: DNA in tail. Nctrl نشان دهنده‌ی گروه شاهد منفی (حامل سم فوزالون) است.

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است. * اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد منفی ($P < ۰/۰۵۰$) *** اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد منفی ($P < ۰/۰۰۱$)



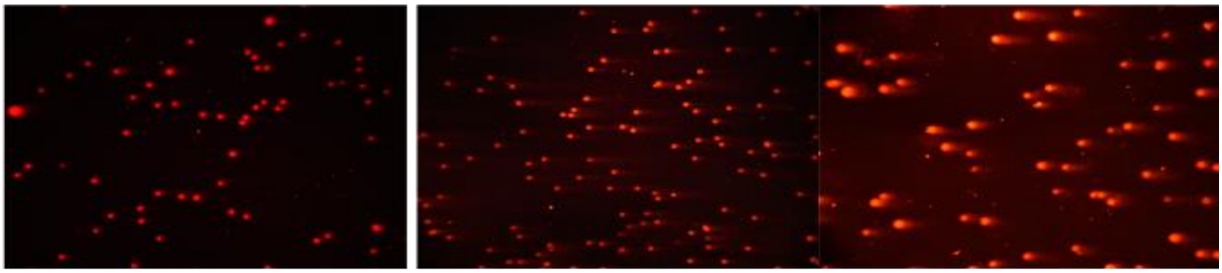
شکل ۲. نتایج حاصل از آزمون Comet در موش‌های سوری به دنبال ۵ روز تجویز سم فوزالون (۴۰، ۲۰، ۱۲ و ۶ میلی‌گرم/کیلوگرم). A: متغیر Tail length، B: متغیر Tail moment و C: DNA in Tail. Nctrl نشان دهنده‌ی گروه شاهد منفی (حامل سم فوزالون) است.

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است.

***: نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد منفی است ($P < ۰/۰۰۱$)

همچنین، عامل زمان نیز در افزایش این تخریب مؤثر بوده است؛ به گونه‌ای که در گروه‌های ۵ روزه نسبت به گروه‌های ۱ روزه، تخریب DNA بیشتری مشاهده شد.

میزان Tail length در گروه‌های دریافت کننده‌ی فوزالون به مدت ۱ روز (شکل ۱-A) و ۵ روز (شکل ۲-A) در دزهای ۱۲، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم با گروه شاهد منفی (حامل سم فوزالون) تفاوت معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۵۰$). همچنین، عامل زمان نیز در افزایش این تخریب مؤثر است؛ به گونه‌ای که در گروه‌های ۵ روزه نسبت به گروه‌های ۱ روزه، تخریب DNA بیشتری مشاهده می‌شود.



شکل ۳. عکس‌های به دست آمده در آزمون Comet A: گروه شاهد منفی، B: گروه شاهد مثبت، C: سلول‌های مواجه شده با ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم از سم فوزالون

میزان Tail moment در گروه شاهد منفی که فقط حامل سم را دریافت کرده‌اند، بسیار پایین بود. نتایج نشان داده است که دریافت سم فوزالون در دزهای ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به مدت ۱ روز در مقایسه با گروه شاهد منفی، به طور معنی‌داری باعث افزایش در Tail moment شده است ($P < ۰/۰۵۰$) (شکل ۱-B). همچنین، افزایش در Tail moment به دنبال ۵ روز تجویز سم فوزالون در تمامی دزهای مورد استفاده در مقایسه با گروه شاهد منفی گزارش شده است (شکل ۲-B). نتایج ۱ روزه (شکل ۱-C) و ۵ روزه (شکل ۲-C) نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های دریافت سم فوزوالون در تمامی دزها با شاهد منفی از نظر تغییرات در DNA in tail وجود دارد. شمایی از عکس‌های گرفته شده در آزمون Comet مربوط به گروه‌های مواجهه شده با این سم در شکل ۳ آمده است.

بحث

عوامل ژنوتوکسیک توانایی واکنش با DNA را دارا می‌باشند و مواجهه با آن‌ها، می‌تواند آسیب به DNA را به همراه داشته باشد (۲۴-۱۲). ارزیابی آسیب DNA توسط Comet assay به طور گسترده‌ای به عنوان یک نشانگر ژنوتوکسیسیتی آفت‌کش‌ها جهت ارزیابی خطر مرتبط با آفت‌کش‌ها در افراد مواجهه یافته استفاده می‌شود (۲۷-۲۶). آسیب‌های DNA اندازه‌گیری شده با استفاده از Comet assay میزان مواجهه‌ی فعلی و چند هفته قبل و همچنین، میزان آسیب‌های واقعی DNA در گروه‌های در معرض آفت‌کش‌ها را نشان می‌دهد (۲۸). ارزیابی آسیب DNA در کارگران شاغل در معرض آفت‌کش‌ها افزایش آسیب DNA در لنفوسیت‌های خون محیطی را نشان داده است (۲).

مواجهه با فوزالون به طور معنی‌داری باعث کاهش در افزایش وزن کل بدن موش‌های صحرایی شده است. این تغییرات، ممکن است با اثر فوزالون بر ساختارهای مرکزی دخیل در کنترل دریافت غذا در هیپوتالاموس مرتبط باشند. همچنین، فراگمنتاسیون شدید DNA، آسیب RNA، کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و گلوتاتیون پراکسیداز در بافت بیضه‌ی موش‌های صحرایی دریافت کننده‌ی فوزالون گزارش شده است؛ هر چند در این مطالعه، تغیرات وزنی معنی‌داری ثبت نشد. شاید دلیل این نتایج، کوتاهی زمان مواجهه با این سم باشد.

همچنین، در این مطالعه، اثرات ژنوتوکسیک احتمالی به دنبال تماس با سم فوزالون به عنوان یک آفت‌کش ارگانوفسفره در سلول‌های مغز قرمز استخوان موش سوری، مورد بررسی قرار گرفت. مشاهده شد که تخریب DNA در لنفوسیت‌های جدا شده از گروه‌هایی که دز بالاتری از فوزالون دریافت کرده بودند، بالاتر بوده و همچنین، عامل زمان نیز در افزایش این تخریب مؤثر بوده است؛ چرا که تخریب DNA در ۵ روز به مراتب بیشتر از ۱ روز بوده است. این نتایج، در توافق با مطالعات گذشته می‌باشد که نشان داده‌اند مواجهه با آفت‌کش‌ها، سبب آسیب به DNA می‌شود (۲۸).

آفت‌کش‌ها، ممکن است از طریق مسیرهای چندگانه باعث استرس اکسیداتیو شوند و از این طریق، می‌توانند موجب بر هم زدن تعادل بین ROS و مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی شوند (۳۰-۲۹). ROS در انواع مختلفی از آسیب DNA نظیر شکست در دو زنجیره و همچنین، اکسیداسیون بازهایی که به آسانی توسط Comet assay قابل تشخیص هستند، می‌تواند دخالت داشته باشد (۳۱). نشان داده شده است که فوزالون توانایی افزایش سطح ROS در بافت‌های انسان (۱۳) و همچنین، افزایش سطح Lipid peroxidation (LPO) و کاهش سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در اریتروسیت‌ها در محیط In vitro به واسطه‌ی افزایش ROS را دارا می‌باشد (۳۲). این احتمال وجود دارد که اثرات مشاهده شده از سم فوزالون در این مطالعه، به واسطه‌ی افزایش ROS در لنفوسیت‌های انسانی باشد که به دنبال آن، استرس اکسیداتیو ایجاد شده آسیب به DNA را به همراه داشته باشد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، اثرات ژنوتوکسیک وابسته به دز و زمان با سم فوزالون مشاهده شد. همچنین، نشان داده شد که دریافت سم فوزالون در دزهای ۴۰، ۲۰ و ۱۲ میلی‌گرم/کیلوگرم در مقایسه با گروه شاهد منفی به طور معنی‌داری موجب افزایش در Tail moment گردید. همچنین، افزایش در Tail moment به دنبال ۵ روز تجویز سم فوزالون در تمامی دزهای مورد

استفاده، در مقایسه با گروه شاهد منفی مشاهده شد. با توجه به وجود تفاوت چشم‌گیر بین گروه‌های دریافت کننده‌ی سم فوزوالون در تمامی دزها با گروه شاهد منفی از نظر تغییرات در DNA in tail پیشنهاد می‌گردد مطالعات دقیق تری در خصوص مکانیسم های درگیر در بروز آسیب ژنتیکی القا شده صورت پذیرد. همچنین، استفاده از این سم در صنعت کشاورزی با نظارت جدی‌تری صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

این دست‌نوشته برگرفته از پایان‌نامه‌ی مصوب با شماره‌ی ۲۹۷۱۳۳ و با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می باشد. بدین وسیله از کسانی که در اجرای این مطالعه همکاری نمودند، قدردانی می گردد.

References

1. de Morais CR, Pereira BB, Almeida Sousa PC, Vieira Santos VS, Campos CF, Carvalho SM, et al. Evaluation of the genotoxicity of neurotoxic insecticides using the micronucleus test in Tradescantia pallida. Chemosphere 2019; 227: 371-80.
2. Dhananjayan V, Ravichandran B, Panjakumar K, Kalaiselvi K, Rajasekar K, Mala A, et al. Assessment of genotoxicity and cholinesterase activity among women workers occupationally exposed to pesticides in tea garden. Mutat Res 2019; 841: 1-7.
3. Hadian Z, Samira S, Yazdanpanah H. Pesticide residues analysis in iranian fruits and vegetables by gas chromatography-mass spectrometry. Iran J Pharm Res 2019; 18(1): 275-85.
4. Sharma A, Kumar V, Shahzad B, Tanveer M, Sidhu GPS, Handa N, et al. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. SN Applied Sciences 2019; 1(11): 1446.
5. Arevalo-Jaramillo P, Idrobo A, Salcedo L, Cabrera A, Vintimilla A, Carrion M, et al. Biochemical and genotoxic effects in women exposed to pesticides in Southern Ecuador. Environ Sci Pollut Res Int 2019; 26(24): 24911-21.
6. Cepeda S, Forero-Castro M, Cardenas-Nieto D, Martinez-Aguero M, Rondon-Lagos M. Chromosomal Instability in Farmers Exposed to Pesticides: High Prevalence of Clonal and Non-Clonal Chromosomal Alterations. Risk Manag Healthc Policy 2020; 13: 97-110.
7. Dutta S, Bahadur M. Comet assay genotoxicity evaluation of occupationally exposed tea-garden workers in northern West Bengal, India. Mutat Res 2019; 844: 1-9.
8. Mostafalou S, Abdollahi M. The link of organophosphorus pesticides with neurodegenerative and neurodevelopmental diseases based on evidence and mechanisms. Toxicology 2018; 409: 44-52.
9. Pellicer-Castell E, Belenguer-Sapina C, Amoros P, El Haskouri J, Herrero-Martinez JM, Mauri-Aucejo AR. Comparison of silica-based materials for organophosphorus pesticides sampling and occupational risk assessment. Anal Chim Acta 2020; 1110: 26-34.
10. Baeeri M, Momtaz S, Navaei-Nigjeh M, Niaz K, Rahimifard M, Ghasemi-Niri SF, et al. Molecular evidence on the protective effect of ellagic acid on phosalone-induced senescence in rat embryonic fibroblast cells. Food Chem Toxicol 2017; 100: 8-23.
11. Jiang B, Zhang N, Xing Y, Lian L, Chen Y, Zhang D, et al. Microbial degradation of organophosphorus pesticides: Novel degraders, kinetics, functional genes, and genotoxicity assessment. Environ Sci Pollut Res Int 2019; 26(21): 21668-81.
12. Jokanovic M. Neurotoxic effects of organophosphorus pesticides and possible association with neurodegenerative diseases in man: A review. Toxicology 2018; 410: 125-31.
13. Ghasemi-Niri SF, Maqbool F, Baeeri M, Gholami M, Abdollahi M. Phosalone-induced inflammation and oxidative stress in the colon: Evaluation and treatment. World J Gastroenterol 2016; 22(21): 4999-5011.
14. Kaya H, Celik ES, Gurkan M, Yilmaz S, Akbulut M. Effects of subchronic exposure to phosalone on oxidative stress and histopathological alterations in common carp (Cyprinus carpio, L., 1758). J Toxicol Environ Health A 2013; 76(14): 853-64.
15. Kazemi M, Torbaghan AE, Tahmasbi AM, Valizadeh R, Naserian AA. Effects of phosalone consumption via feeding with or without sodium bentonite on performance, blood metabolites and its transition to milk of Iranian Baluchi sheep. J Anim Sci Technol 2017; 59: 10.
16. Kelageri S, Sreenivasa Rao C, Vemuri S, Reddy P. Dissipation kinetics and decontamination of phosalone residues from tomato under green house and open field conditions. J Entomol Zool Stud 2017; 5(5): 1769-72.
17. Dehghani R, Sabahi M, Takhtfiroozeh S, Razi S, Zamani H, Taghizadeh L, et al. Surveying the type and amount of pesticide use in agricultural sector of Kashan, Iran. J Entomol Res 2018; 42: 33.
18. Liu T, Xu S, Lu S, Qin P, Bi B, Ding H, et al. A review on removal of organophosphorus pesticides in constructed wetland: Performance, mechanism and influencing factors. Sci Total Environ 2019; 651(pt 2): 2247-68.
19. Aliomrani M, Mesripour A, Sayahpour Z. AChR is partly responsible in mice depressive-like behavior after Phosalone exposure. Neurotoxicol Teratol 2021; 84: 106957.
20. Barron CJ, Tirado N, Barral J, Ali I, Levi M, Stenius U, et al. Increased levels of genotoxic damage in a Bolivian agricultural population exposed to mixtures of pesticides. Sci Total Environ 2019; 695: 133942.
21. Olakkaran S, Kizhakke PA, Antony A, Mallikarjunaiah S, Hunasanahally PG. Oxidative stress-mediated genotoxicity of malathion in human lymphocytes. Mutat Res 2020; 849: 503138.

22. Bausinger J, Speit G. The impact of lymphocyte isolation on induced DNA damage in human blood samples measured by the comet assay. Mutagenesis 2016; 31(5): 567-72.
23. Kumar S, Kaushik G, Dar MA, Nimesh S, Lopez-Chuken UJ, Villarreal-Chiu JF. Microbial Degradation of organophosphate pesticides: A review. Pedosphere 2018; 28(2): 190-208.
24. Knapik LFO, Ramsdorf W. Ecotoxicity of malathion pesticide and its genotoxic effects over the biomarker comet assay in Daphnia magna. Environ Monit Assess 2020; 192(5): 264.
25. Zepeda-Arce R, Rojas-Garcia AE, Benitez-Trinidad A, Herrera-Moreno JF, Medina-Diaz IM, Barron-Vivanco BS, et al. Oxidative stress and genetic damage among workers exposed primarily to organophosphate and pyrethroid pesticides. Environ Toxicol 2017; 32(6): 1754-64.
26. Bhargavi B, Akurathi R, Vellanki R, Jagadeeswara Reddy K. Genotoxic effect of certain pesticide mixtures in CHO cell lines. Appl Ecol Environ Sci 2020; 8(4): 166-73.
27. Singh S, Kumar V, Thakur S, Banerjee BD, Rautela RS, Grover SS, et al. Paraoxonase-1 genetic polymorphisms and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. Toxicol Appl Pharmacol 2011; 252(2): 130-7.
28. Cayir A, Coskun M, Coskun M, Cobanoglu H. Comet assay for assessment of DNA damage in greenhouse workers exposed to pesticides. Biomarkers 2019; 24(6): 592-9.
29. Lopez Gonzalez EC, Siroski PA, Poletta GL. Genotoxicity induced by widely used pesticide binary mixtures on Caiman latirostris (broad-snouted caiman). Chemosphere 2019; 232: 337-44.
30. Odetti LM, Lopez Gonzalez EC, Romito ML, Simoniello MF, Poletta GL. Genotoxicity and oxidative stress in Caiman latirostris hatchlings exposed to pesticide formulations and their mixtures during incubation period. Ecotoxicol Environ Saf 2020; 193: 110312.
31. Azqueta A, Slyskova J, Langie SA, O'Neill G, I, Collins A. Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. Front Genet 2014; 5: 288.
32. Altuntas I, Delibas N, Doguc DK, Ozmen S, Gultekin F. Role of reactive oxygen species in organophosphate insecticide phosalone toxicity in erythrocytes in vitro. Toxicol in Vitro 2003; 17(2): 153-7.

DOI: *10.22122/jims.v39i623.13867* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 39, No. 623, 3rd Week, July 2021**

Received: 28.01.2021 Accepted: 09.05.2021 Published: 19.07.2021

The Probable Genotoxic Effects of Phosalone Exposure in Mice Bone Marrow Cells

Zohreh Khodabandeh[1], Mahmoud Etebari[2], Mehdi Aliomrani[3]

Original Article

Abstract

Background: Phosalone is used as a pesticide to control pests. Oxidative stress is one of the most important mechanisms by which Phosalone causes toxicity. The aim of this study was to evaluate the possible genotoxic effects following exposure to Phosalone in red bone marrow cells of mice.

Methods: In this study, 60 Syrian male mice [with 6 to 8 weeks of age and body weight (BW) of 20-25 g] were divided to 8 equal groups. Group 1 received Phosalone career by gavage for 5 days (negative control), group 2 received cyclophosphamide with the dose of 40 mg/kg by gavage for 5 days (positive control), and groups 3, 4, 5, and 6 received Phosalone at doses of 6, 12, 20, and 40 mg/kg BW for 5 consecutive days by gavage. After isolating bone marrow and lymphocytes from mice, comet test was performed to evaluate genotoxic effects 1 and 5 days following exposure to Phosalone.

Findings: Tail length in the groups receiving Phosalone for 1 day and 5 days at doses of 12, 20, and 40 mg/kg BW was significantly different from the negative control group ($P < 0.050$). The time factor was also effective in increasing this degradation; as in 5-day assessment more DNA degradation was observed than 1-day assessment.

Conclusion: In this study, dose- and time-dependent genotoxic effects with Phosalone were observed. It also highlights the need for serious attention to limiting the use of this compound as a pesticide in agriculture.

Keywords: Organophosphates; Phosalone; Comet assay; Cyclophosphamide; Zolone

Citation: Khodabandeh Z, Etebari M, Aliomrani M. **The Probable Genotoxic Effects of Phosalone Exposure in Mice Bone Marrow Cells.** J Isfahan Med Sch 2021; 39(623): 303-9.

1- Pharm D Student, Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Assistant Professor, Department of Pharmacology and Toxicology, Isfahan Pharmaceutical Sciences Research Center, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Mehdi Aliomrani, Assistant Professor, Department of Pharmacology and Toxicology, Isfahan Pharmaceutical Sciences Research Center, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: maliomrani@pharm.mui.ac.ir