ارزیابی سمیت چند حشره‌کش شبه اکدایستروئیدی با استفاده از کشت سه رده سلولی حشرات

هادی مصلی‌نژاد*

بخش تحقیقات آفت‌کش‌ها، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش وترویج کشاورزی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱/۲۰

چکیده:

ترکیبات شبه اکدایستروئیدی نظیر متوکسی فنوزاید و تبوفنوزاید گروهی از حشره‌کش‌ها هستند که با اختلال در پوست‌اندازی باعث مرگ حشرات هدف می‌شوند. این ترکیبات دارای اثر انتخابی هستند، بنابراین در برنامه های مدیریت تلفیقی آفات (IPM) جایگاه مناسبی دارند. استفاده از کشت رده‌های سلولی حشرات (لاین‌های سلولی) یکی از ابزارهای مفید آزمایشگاهی درون شیشه (*in vitro*) در پژوهش‌های فیزیولوژی، سم‌شناسی و هم‌چنین غربالگری ترکیبات محسوب می‌شوند. در این تحقیق، سمیت سلولی (بازدارندگی روی تکثیر سلول‌ها) حشره‌کش‌های شبه اکدایستروئیدی مانند تبوفنوزاید، هالوفنوزاید، متوکسی فنوزاید، 20E و RH-5849 در دو رده سلولی از بال‌پولک‌داران (CF-203 از کرم برگخوار صنوبر با نام علمی *Choristoneura fumiferana* و Bm5 از کرم ابریشم، *Bombyx mori*، و یک رده سلولی از دوبالان (*Drosophila melanogaster*) به روش کشت سلولی بررسی شد. ترتیب سمیت در هر دو رده سلولی بال‌پولک‌داران به صورت RH-5849 < هالوفنوزاید<20E <تبوفنوزاید< متوکسی فنوزاید مشخص شد به طوری که متوکسی فنوزاید بیشترین سمیت را نشان داد. در سلول دروزوفیلا، ترتیب سمیت ترکیبات به صورت RH-5849 < هالوفنوزاید<20E <تبوفنوزاید= متوکسی فنوزاید بود که در آن سمیت دو ترکیب تبوفنوزاید و متوکسی فنوزاید به یک نسبت می‌باشد. نتایج نشان داد که سمیت متوکسی فنوزاید در سلول دروزوفیلا نسبت به دو رده سلولی CF-203 و Bm5 به ترتیب ۲۴۵ و۷۷ برابر کمتر، تبوفنوزاید ۷۴ و ۵۱ برابر کمتر، 20E ۹۶ و ۸۷ برابر کمتر، هالوفنوزاید ۸۵ و ۵۸ برابر کمتر و RH-5849 ۹۵ و ۵۲ برابر بودند. با توجه به این نتایج می‌توان نتیجه‌گیری کرد که رده‌های سلولی CF-203 و Bm5 می‌تواند برای پژوهش‌های غربالگری و همچنین مطالعه نحوه عمل این ترکیبات استفاده شوند.

کلمات کلیدی: حشره‌کش‌های شبه اکدایستروئیدی، رده‌های سلولی، CF-203، کرم ابریشم (Bm5)، دروزوفیلا ملانوگاستر S2، بازدارندگی تکثیر سلول.

* **مسئول مکاتبات:** هادی مصلی‌نژاد، hmosalla@gmail.com

مقدمه:

تولید و تجاری‌سازی آفت‌کش‌های جدید از لحاظ صنعت آفت‌کش‌ها و نیز امر مبارزه شیمیایی علیه آفات، بیماری‌های گیاهی و علف‌های هرز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. قبل از تجاری‌سازی و در حین مطالعات آزمایشگاهی، معمولا تعداد زیادی ترکیب ساخته می‌شود که غربال کردن آنها از لحاظ ارزیابی سمیت و انتخاب بهترین و موثرترین ترکیبات ضروری است. برای این کار استفاده از سیستم (*in vivo*) یعنی حیوانات آزمایشگاهی مثل حشرات، نه تنها بسیار زمان بر هست بلکه غربال کردن تعداد زیادی از ترکیبات با این روش عملا امکان‌پذیر نیست. بنابراین امروزه توسعه روش‌های آزمایشگاهی درون شیشه (*in vitro*) برای ارزیابی سمیت ترکیبات مختلف شیمیایی، نظیر داروها و آفت‌کش‌ها، مورد توجه محققین قرار دارد (Fornelli *et al.*, 2004; Krewski *et al.*, 2011; Shukla *et al.*, 2010; Smagghe and Swevers, 2013).

یکی از مهم‌ترین و پرکاربردترین روش‌های آزمایشگاهی درون شیشه‌ای (*in vitro*) در دنیا، استفاده از سیستم کشت سلول (cell culture) می‌باشد. در این روش، سلول‌های جانوری و گیاهی که در محیط کشت، قابلیت بقا و تکثیر را داشته باشند، ایجاد می‌شود که در طیف وسیعی از تحقیقات، نظیر فیزیولوژی، ازدیاد و کشت ویروس‌ها و غربالگری ترکیبات شیمیایی، مورد استفاده پژوهشگران قرار می‌گیرد. این روش مزایای متعددی دارد که می‌توان به امکان تکرار پذیری بالا، زمان‌بری کمتر و هم‌چنین تولید تعداد زیادی سلول مشابه در محیطی ایزوله که به راحتی می‌توان تاثیر ترکیبات مورد نظر را بدون دخالت سایر فاکتورها مطالعه کرد، اشاره نمود.

در علم گیاه‌پزشکی، رده‌های سلولی دائمی حشرات (لاین‌های سلولی) یکی از ابزارهای مفید آزمایشگاهی هستند که در پژوهش‌های فیزیولوژی و سم‌شناسی استفاده می‌شوند (Smagghe *et al.*, 2009).

در خصوص سم‌شناسی حشره‌کش‌های شبه اکدایستروئیدی از جمله نحوه عمل و نیز به منظور غربالگری این ترکیبات برای شناسایی و انتخاب موثرترین ترکیبات، استفاده از سیستم کشت سلولی، توسط پژوهشگران استفاده شده است (Clément *et al.*, 1993; Dinan *et al.*, 1990; Spindler *et al.*, 1993).

ترکیبات شبه اکدایستروئیدی نظیر متوکسی فنوزاید، تبوفنوزاید و هالوفنوزاید گروهی از حشره‌کش‌ها هستند که با اختلال در پوست اندازی، باعث مرگ حشرات حساس می‌شوند. از آنجا که این ترکیبات دارای اثر انتخابی هستند، لذا دامنه تاثیر آنها بسیار محدود بوده و بنابراین می‌توانند در مدیریت تلفیقی آفات جایگاه مناسبی داشته باشند (Retnakaran *et al.*, 2003). اگرچه ساختمان شیمیایی آنها (غیراستروئیدی) با ساختمان شیمیایی هورمون پوست اندازی حشرات (استروئیدی) کاملا متفاوت است اما هر دو گروه از طریق پیوند با گیرنده اکدایستروئیدی حشرات (ecdysteroid receptor) نحوه عمل مشابهی دارند (Dhadialla *et al.*, 1998). محققان متعددی در دنیا با هدف ساخت مولکول‌های جدید روی این گروه از ترکیبات کار می‌کنند (Deng *et al.*, 2016; Harada *et al.*, 2011; Holmwood and Schindler, 2009; Hu *et al.*, 2016).

قدرت و فعالیت بیولوژیک این ترکیبات با استفاده از روش‌های درون شیشه‌ای مختلف، از جمله کشت جلد بدن کرم ساقه خوار ذرت (Kitahara *et al.*, 1983; Nakagawa *et al.*, 2000) و توانایی آنها برای القای پوست‌اندازی، بررسی شده است در این تحقیق، ارزیابی سمیت چند حشره‌کش شبه اکدایستروئیدی

روی بازدارندگی (توقف) تکثیر سلول‌های سه رده سلولی، شامل Cf-203 متعلق به پروانه جوانه خوار بلوط، کرم ابریشم (Bm5) و دیگری رده سلولی S2 (دروزوفیلا ملانوگاستر) بررسی شد.

مواد و روش‌ها:

ترکیبات شیمیایی: ماده تکنیکال RH-5849 (مولکول اولیه‌ای که سایر حشره‌کش‌های شبه اکدایستروئیدی از آن گرفته شده)، تبوفنوزاید، هالوفنوزاید و متوکسی فنوزاید همگی از شرکت سازنده اصلی یعنی داو آگروساینس، تهیه شدند. هورمون پوست‌اندازی حشرات که 20–hydroxyecdyson بوده و به اختصار 20E نامیده می‌شود از شرکت سیگما آلدریش تهیه شد.

رده سلولی و شرایط کشت: در این تحقیق از سه رده سلولی شامل دو رده از بال‌پولک‌داران و یک رده از دوبالان استفاده شد. رده‌های سلولی بال‌پولک‌داران شامل کرم جوانه خوار صنوبر (*Choristoneura fumiferana*) با منشا روده میانی (CF-203)، و کرم ابریشم (*Bombyx mori*) (Bm5) و رده سلولی از دوبالان به نام مگس سرکه (*Drosophila melanogaster*) با منشا سلول‌های جنینی این حشره (S2) بودند. رده سلولیCF-203 روی محیط کشت تجاری اینسکت اکسپرس (Insect-Xpress™) با ۱۰٪ سرم جنینی گاوی (FBS)، رده سلولی Bm5 روی محیط کشت تجاری IPL-41 با ۱۰٪ سرم جنینی گاوی و رده سلولی S2 روی محیط کشت تجاری اس اف ایکس (SFX-Insect™) تکثیر داده شدند. تکثیر سلول‌ها در فلاسک‌های تی شکل با سطح ۲۵ سانتی مربع، دارای فیلتر و در درون انکوباتور با دمای ۲۷ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۰ درصد انجام شد. کشت سلول‌ها هر هفته با تعویض محیط کشت، به نسبت ۹ به یک (۴/۵ میلی لیتر محیط کشت و نیم میلی لیتر محلول سلولی قدیمی) ادامه پیدا کرد.

آزمون ام تی تی (MTT assay): این آزمون یکی از روش‌های آزمایشگاهی متداول درون شیشه (in vitro) است که اثر بازدارندگی ترکیبات روی تکثیر سلول‌ها (cell proliferation inhibition) را می‌تواند اندازه‌گیری کند. پایه و اساس این آزمون آنزیمی، شکستن نمک MTT[1] توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز در میتوکندری سلول‌های زنده است. نتیجه این فعالیت ایجاد بلورهای نامحلول فورمازان ارغوانی رنگ است که توسط دی متیل سولفوکساید (DMSO) به صورت محلول در می‌آیند. هر چه سلول‌های زنده تعدادشان بیشتر باشد میزان رنگ ایجاد شده بیشتر است. MTT یک نمک تترازولیوم محلول در آب است که در محیط بافر PBS حل شده و ترکیب زرد رنگی ایجاد می کند.

برای انجام آزمایش‌ها از روش بهینه شده (Decombel *et al.*, 2005) استفاده شد. ابتدا حجم مورد نیاز از محلول سلولی با غلظت‌های ۵×۱۰^{۵} و ۲×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر، به ترتیب برای سلول‌های بالپولک داران و سلول‌های دروزوفیلا تهیه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول سلولی (معادل ۵۰ هزار سلول بال‌پولک داران و ۲۰۰ هزار سلول دروزوفیلا) به چاهک‌های میکروپلیت های ۹۶ خانه‌ای[2] منتقل شد و این توده سلولی با یک میکرولیتر از غلظت‌های موثر هر یک از حشره‌کش‌ها که بین ۱۰ تا ۹۰ درصد روی تکثیر سلول‌ها اثر بازدارندگی داشتند(100 M to 0.1 nM)، تیمار شدند (سلول‌های شاهد با اتانول تیمار شدند) و برای هر غلظت، چهار تکرار در نظر گرفته شد. پس از سپری شدن یک دوره زمانی ۵ روزه از انکوباسیون

[1] 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
[2] 96-well microtiter plate

سلول ها در دمای ۲۷ درجه سلسیوس، سلول‌های تیمار شده از هر چاهک به کمک میکروپیپت جمع‌آوری و به درون لوله‌های میکروتیوب (microtube Eppendorf) منتقل شده و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ام تی تی به غلظت (1 mg/ml) به سلول‌ها اضافه شد. بعد از سه ساعت انکوباسیون در دمای ۲۷ درجه سلسیوس، مخلوط سلول‌ها و ام تی تی، به مدت ۷ دقیقه با دور $20,000\times g$ در دمای ۴ درجه سلسیوس، سانتریفوژ شد. در طی انکوباسیون اخیر، در صورت احیا شدن MTT و تشکیل فورمازان، از طریق سانتریفوژ فورمازان جمع‌آوری و با اضافه کردن ۲۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به رنگ آبی در می آید. میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول های زنده ای که از نظر آنزیمی فعال هستند رابطه مستقیم دارد. به منظور خارج کردن مواد اضافی، محلول حاصل، دوباره سانتریفوژ (۷ دقیقه با دور $20,000\times g$ در دمای اتاق) شد و در نهایت جذب نوری محلول بدست آمده در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده و به کمک منحنی استاندارد تعداد سلول‌ها محاسبه شد. برای هر رده سلولی ارتباط خطی بین تعداد سلولها و جذب نوری محلول نهائی وجود دارد، بنابراین، جهت بررسی هر نوع سلول منحنی استاندارد مربوط به همان رده را رسم شد. برای تعیین غلظت موثر ترکیبات (EC50) روی بازدارندگی تکثیر سلول ها از نرم افزار پولوپلاس (POLO PLUS) استفاده شد.

در این برنامه، امکان مقایسه EC50ها از لحاظ آماری (معنی‌دار بودن یا نبودن) نیز وجود دارد به طوری که اگر در حد بالا و پائین فاصله اطمینان ۹۵٪ نسبت غلظت کشنده دو ترکیب (relative potency)، عدد یک وجود داشت نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار دو ترکیب است و اگر محدوده فوق دربردارنده عدد یک نبود، اختلاف معنی‌دار است (Hosseininaveh and Ghadamyari, 2014).

نتایج:

در این تحقیق، سمیت سلولی (بازدارندگی روی تکثیر سلول‌ها) حشره‌کش‌های شبه اکدایستروئیدی مانند تبوفنوزاید، هالوفنوزاید، متوکسی فنوزاید، 20E و RH-5849 روی دو رده سلولی از بال‌پولک‌داران (CF-203 و Bm5) و یک رده سلولی از دوبالان یعنی دروزوفیلا به روش کشت سلولی بررسی شد. با این هدف که بفهمیم کدام رده سلولی برای استفاده در غربال‌گری و یا سایر پژوهش های سم‌شناسی نظیر تحقیقات روی نحوه عمل این ترکیبات، مناسب‌تر است.

الف) نتایج بازدارندگی ترکیبات مورد نظر روی تکثیر رده سلولی CF-203 در جدول شماره یک آمده است. طبق این نتایج، متوکسی فنوزاید با EC50=۰/۴۸ نانومولار، سمی‌ترین ترکیب شناخته شدند که نسبت به تبوفنوزاید(EC50= ۲/۵۴ نانومولار) ۵/۲۹ برابر قوی تر می‌باشد. همچنین EC50 برای هورمون پوست اندازی حشرات (20E) نیز ۵۴/۸۶، هالوفنوزاید ۱۸۸/۴۶ و ترکیب RH-5849 معادل ۴۱۹/۵۳ نانومولار محاسبه شد. همچنین هالوفنوزاید نیز ۲/۲۳ بار نسبت به ترکیب RH-5849، قوی تر عمل کرده است.

جدول ۱- قدرت چند حشره‌کش شبه اکدایستروئیدی روی بازدارندگی تکثیر سلول‌های CF-203

Table 1. Potency of some ecdysteroid agonist insecticides on cell proliferation inhibition of the CF-203 cells.

Compounds	EC_{50}±SE (95% CL)*	R^2
methoxyfenozide	0.48±0.02 (0.19-2.23)	0.93
tebufenozide	2.54±0.1 (1.22-3.99)	0.91
20-hydroxyecdysone	54.86±2.5 (28.51-96.28)	0.94
halofenozide	188.46±3.1 (100.63-256.93)	0.92
RH-5849	419.53±5.26 (289.51-596.63)	0.92

*EC_{50} expressed as nano molar

ب) نتایج بازدارندگی ترکیبات مورد نظر روی تکثیر رده سلولی Bm5 در جدول شماره دو آمده است. بر اساس این نتایج، در مورد این رده سلولی نیز، متوکسی فنوزاید با EC_{50}=۱/۵۲ نانومولار، قوی‌ترین ترکیب بود که نسبت به تبوفنوزاید (EC_{50}= ۳/۶۸ نانومولار) تقریبا دو برابر قوی‌تر عمل کرده است. غلظت موثر هورمون پوست اندازی حشرات (20E)، روی بازدارندگی تکثیر سلول‌های Bm5، معادل ۶۰/۹۵، هالوفنوزاید ۲۷۶/۲۳ و ترکیب RH-5849 معادل ۷۶۹/۱۱ نانومولار محاسبه شد.

در مجموع نتایج گرفته شده از دو رده سلولی بالپولک داران، نشان داد که متوکسی فنوزاید سمی‌ترین ترکیب بوده و سایر ترکیبات یعنی تبوفنوزاید، 20E، هالوفنوزاید و RH-5849 به ترتیب درجایگاه‌های دوم تا پنجم قرار می‌گیرند.

جدول ۲- قدرت چند حشره‌کش شبه اکدایستروئیدی روی بازدارندگی تکثیر سلول‌های Bm5

Table 2. Potency of some ecdysteroid agonist insecticides on cell proliferation inhibition of the Bm5 cells

Compounds	EC_{50}±SE (95% CL)*	R^2
methoxyfenozide	1.52±0.03 (0.71-2.68)	0.91
tebufenozide	3.68±0.06 (2.53-4.94)	0.93
20-hydroxyecdysone	60.95±0.5 (50.19-77.59)	0.90
halofenozide	276.23±0.9 (186.36-396.12)	0.94
RH-5849	769.11±3.66 (753.83-883.93)	0.96

*EC_{50} expressed as nano molar

ج) نتایج بازدارندگی ترکیبات مورد نظر روی تکثیر رده سلولی S2 دروزوفیلا در جدول شماره سه آمده است. بر اساس این نتایج، متوکسی فنوزاید و تبوفنوزاید به ترتیب با EC50=۱۱۸ و EC50=۱۸۸ نانومولار، هر دو قدرت بازدارندگی یکسانی روی تکثیر سلول‌ها داشتند. چون نسبت EC_{50} دو ترکیب

برابر با ۰/۶۲ بوده و حد بالا و پائین فاصله اطمینان ۹۵٪ آن برابر (۱/۲-۰/۴) می‌باشد که دربرگیرنده عدد یک می‌باشد و لذا EC50 دو ترکیب از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

EC_{50} هورمون پوست اندازی حشرات نیز معادل ۵۳۱۵ نانومولار محاسبه شد و این عدد برای هالوفنوزاید و RH-5849 به ترتیب ۱۶۲۰۰ و ۴۰۱۳۰ نانومولار تعیین شد. بنابراین ترتیب سمیت این ترکیبات در سلول دروزوفیلا به قرار زیر می‌باشد:

تبوفنوزاید= متوکسی فنوزاید > 20E > هالوفنوزاید > RH-5849

جدول ۳- قدرت چند حشره‌کش شبه اکدایستروئیدی روی بازدارندگی تکثیر سلول‌های S2 دروزوفیلا

Table 3. Potency of some ecdysteroid agonist insecticides on cell proliferation inhibition of the *Drosophila* S2 cells

Compounds	**EC_{50}±SE (95% CL)***	**R^2**
methoxyfenozide	118±1.08 (55-200)	0.91
tebufenozide	188±1.1 (85-231)	0.93
20-hydroxyecdysone	5315±2.3 (4490-6689)	0.96
halofenozide	16200±3.17 (13270-17980)	0.94
RH-5849	40130±4.2 (29214-64110)	0.96

*EC_{50} expressed as nano molar

بحث:

از اثرات ترکیبات اکدایستروئیدی بر رده‌های سلولی پاسخ دهنده، توقف تکثیر سلولی می‌باشد که پیشتر به عنوان یکی از شاخص‌های مهم در ارزیابی فعالیت زیستی این ترکیبات در سطح سلولی تعیین شده است (Wing, 1988) به طوری که این خصوصیت، منجر به ابداع زیست سنجی های سلولی (cell-based bioassay) برای غربالگری این ترکیبات شده است (Dinan *et al.*, 2001; Harmatha *et al.*, 2002). در تحقیق حاضر مشخص شد که هر سه سلول استفاده شده، به ترکیبات اکدایستروئیدی پاسخ می‌دهند (ecdysteroid-responsive cell line). مقایسه سمیت سلولی (cell toxicity) ترکیبات مورد نظر در رده های سلولی CF-203 و Bm5 (هر دو از بالپولک‌داران)، نشان داد که متوکسی فنوزاید بیشترین فعالیت بازدارندگی تکثیر سلولی را داراست به طوری که این ترکیب در رده سلولی CF-203، ۵/۲۹ برابر و در رده سلولی کرم ابریشم ۲/۴۲ برابر نسبت به تبوفنوزاید قوی‌تر عمل کرده است. نتایج این تحقیق که با استفاده از سیستم کشت سلول به دست آمد با نتایجی مزرعه‌ای یا آزمایشگاهی که روی خود حشرات هدف (تحقیقات *in vivo*) گرفته شده، مطابقت دارد. به طوری که سمیت زیادتر متوکسی فنوزاید نسبت به تبوفنوزاید در بالپولک‌داران مختلف از جمله کرم جوانه‌خوار صنوبر (*Choristoneura fumiferana*) (Sundaram *et al.*, 2002)، برگخوار مصری پنبه (*Spodoptera littoralis*) (Ishaaya *et al.*, 1995)، کرم برگخوار چغندر (*Spodoptera exigua*) (Smagghe *et al.*, 1999)، ساقه‌خوار اروپایی ذرت

(*Ostrinia nubilalis*) (Trisyono and Chippendale, 1997) و ساقه‌خوار جنوب غربی ذرت (*Diatraea grandiosella*) (Trisyono and Chippendale, 1998) گزارش شده است. در این گزارش‌ها، اشاره شده است که متوکسی فنوزاید بین ۳ تا ۱۰ برابر سمی‌تر از تبوفنوزاید می باشد. نتایج این تحقیق همچنین مشخص کرد که هالوفنوزاید سمی‌تر از RH–5849 می‌باشد که با نتایج گرفته شده از مطالعات مزرعه‌ای روی حشرات هدف مطابقت دارد (Farinós *et al.*, 1999; Raina *et al.*, 2003).

نکته دیگری که از این تحقیق می‌توان استخراج کرد این است که در سلول دروزوفیلا، اولا سمیت سلولی دو ترکیب متوکسی فنوزاید و تبوفنوزاید یکسان بوده وثانیا متوکسی فنوزاید در این سلول در مقایسه با دو رده سلولی دیگر با منشا بال پولک داران یعنی CF-203 و Bm5 به ترتیب ۲۴۵ و ۷۷ برابر، ضعیف تر عمل کرده‌اند. ضمنا سمیت تبوفنوزاید روی سلول دروزوفیلا نسبت به دو سلول CF-203 و Bm5 به ترتیب ۷۴ و ۵۱ برابر کمتر، 20E ۹۶ و ۸۷ برابر کمتر، هالوفنوزاید ۸۵ و ۵۸ برابر کمتر و RH-5849 ۹۵ و ۵۲ برابر کمتر، محاسبه شد. این یافته با نتایج پژوهش های قبلی مبنی بر اینکه حشره‌کش‌های شبه اکدایستروئیدی فعالیت زیستی ضعیف‌تری روی دوبالان (در مقایسه با بالپولک‌داران) دارند، مطابقت دارد (Minakuchi *et al.*, 2005; Mosallanejad *et al.*, 2008). حساسیت کمتر دوبالان به ترکیبات اکدایستروئیدی ناشی از این نکته است که میل اتصال این ترکیبات به گیرنده اکدایستروئیدی (نقطه هدف این ترکیبات) کمتر است که خود ناشی از اختلاف‌های ساختمانی این گیرنده نسبت به بال پولک‌داران است (Hill *et al.*, 2013). لذا استفاده از رده سلولی دروزوفیلا، ممکن است کارایی و فعالیت زیستی این ترکیبات را به درستی و دقیق نشان ندهد. بنابراین استفاده از رده‌های سلولی بالپولک‌داران برای این منظور، ارجحیت بیشتری دارد.

در مجموع، نتایج این تحقیق نشان داد که قدرت و فعالیت زیستی حشره‌کش‌های شبه اکدایستروئیدی یاد شده، روی بازدارندگی تکثیر سلول های بال پولک داران نسبت به سلول دروزوفیلا به نتایج گرفته شده از مطالعات مزرعه‌ای (*in vivo*) روی حشرات آفت نزدیک‌تر بوده و لذا این رده‌های سلولی می‌تواند برای پژوهش‌های غربالگری و همچنین مطالعه نحوه عمل این ترکیبات مورد استفاده قرار گیرد.

References

Clément, C. Y., Bradbrook, D. A., Lafont, R. and Dinan, L. 1993. Assessment of a microplate-based bioassay for the detection of ecdysteroid-like or antiecdysteroid activities. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 23(1): 187-193.

Decombel, L., Tirry ,L. and Smagghe, G., 2005. Action of 24-epibrassinolide on a cell line of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 58(3): 145-156.

Deng, X. L. 2016. Design, synthesis and biological activity of novel substituted pyrazole amide derivatives targeting EcR/USP receptor. Chin. Chem. Lett., 27(4): 566-570.

Dhadialla, T. S., Carlson, G. R. and Le, D. P. 1998. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. Annual Review of Entomology, 43(1): 545-569

Dinan, L., Bourne, P., Whiting, P., Dhadialla, T. S. and Hutchinson, T. H., 2001. Screening of environmental contaminants for ecdysteroid agonist and antagonist activity using the *Drosophila melanogaster* BII cell *in vitro* assay. Environmental Toxicology and Chemistry, 20(9): 2038-2046.

Dinan, L., Spindler-Barth, M. and Spindler, K. D. 1990. Insect cell lines as tools for studying ecdysteroid action. Invertebrate Reproduction and Development, 18(1-2): 43-53.

Farinós, G. P., Smagghe, G., Tirry, L. and Castañera, P. 1999. Action and pharmacokinetics of a novel insect growth regulator, halofenozide, in adult beetles of *Aubeonymus mariaefranciscae* and *Leptinotarsa decemlineata*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 41(4): 201-213.

Fornelli, F., Minervini, F. and Logrieco, A. 2004. Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9). Journal of Invertebrate Pathology, 85(2): 74-79.

Harada, T., Nakagawa, Y., Ogurat, T., Yamada, Y., Ohe, T. and Miyagawat, H. 2011. Virtual screening for ligands of the insect molting hormone receptor. Journal of Chemical Information and Modeling, 51(2): 296-305.

Harmatha, J., Dinan, L. and Lafont, R. 2002. Biological activities of a specific ecdysteroid dimer and of selected monomeric structural analogues in the B II bioassay. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 32(2): 181-185.

Hill, R. J., Billas, I. M., Bonneton, F., Graham, L. D. and Lawrence, M.C. 2013. Ecdysone receptors: from the Ashburner model to structural biology. Annual Review of Entomology, 58: 251-271.

Holmwood, G. and Schindler, M. 2009. Protein structure based rational design of ecdysone agonists. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 17(12): 4064-4070.

Hosseininaveh, V. and Ghadamyari, M. 2014. Principles and concepts of experimental methods in insect biochemistry, physiology and toxicology. University of Tehran press.

Hu, C. B., Liu, J. H. and Du, X. H. 2016. Synthesis and Insecticidal Activities of N-(tert-Butyl)-N '-fluorobenzoyl-substitutedpyridylcarbonyl Hydrazide Derivatives. Chin. J. Org. Chem., 36(5): 105 1-159.

Ishaaya, I., Yablonski, S. and Horowitz, A. 1995. Comparative toxicity of two ecdysteroid agonists, RH-2485 and RH-5992, on susceptible and pyrethroid-resistant strains of the Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. Phytoparasitica, 23(2): 139-145.

Kitahara, K., Nakagawa, Y., Nishioka, T. and Fujita, T. 1983. Cultured integument of Chilo suppressalis as a bioassay system of insect growth regulators. Agricultural and Biological Chemistry, 47(7): 1583-1589.

Krewski, D., Westphal, M., Al-Zoughool, M., Croteau, M. C. and Andersen, M. E. 2011. New Directions in Toxicity Testing. In: J.E. Fielding, R.C. Brownson and L.W. Green (Editors), Annual Review of Public Health, Vol 32. Annual Review of Public Health. Annual Reviews, Palo Alto, pp. 161-178.

Minakuchi, C., Nakagawa, Y., Kamimura, M. and Miyagawa, H. 2005. Measurement of receptor-binding activity of non-steroidal ecdysone agonists using *in vitro* expressed receptor proteins (EcR/USP complex) of *Chilo suppressalis* and *Drosophila melanogaster*. ACS Publications.

Mosallanejad, H., Soin, T., Swevers, L., Latrou, K. and Wakagawa, Y. 2008. Non-steroidal ecdysteroid agonist chromafenozide: gene induction activity, cell proliferation inhibition and larvicidal activity. Pesticide Biochemistry and Physiology, 92(2): 70-76.

Nakagawa, Y., Hattori, K., Minakuchi, C., Kugimiya, S. and Ueno, T. 2000. Relationships between structure and molting hormonal activity of tebufenozide, methoxyfenozide, and their analogs in cultured integument system of *Chilo suppressalis* Walker. Steroids, 65(3): 117-123.

Raina, A. K., Park, Y. I. and Hruska, Z. 2003. Ecdysone agonist halofenozide affects corpora allata and reproductive physiology of the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus*. Journal of Insect Physiology, 49(7): 677-683.

Retnakaran, A., Krell, P., Feng, Q. and Arif, B. 2003. Ecdysone agonists: mechanism and importance in controlling insect pests of agriculture and forestry. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 54(4): 187-199.

Shukla, S. J., Huang, R. L., Austin, C. P. and Xia, M. H. 2010. The future of toxicity testing: a focus on *in vitro* methods using a quantitative high-throughput screening platform. Drug Discovery Today, 15(23-24): 997-1007.

Smagghe, G., Goodman, C. L. and Stanley, D. 2009. Insect cell culture and applications to research and pest management. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 45(3-4): 93-105.

Smagghe, G., Nakagawa, Y., Carton, B., Kamal Mourad, A., Fujita, T. and Tirry, L. 1999. Comparative ecdysteroid action of ring-substituted dibenzoylhydrazines in *Spodoptera exigua*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 41(1): 42-53.

Smagghe, G. and Swevers, L. 2013. Cell-based screening systems for insecticides, Advanced Technologies for Managing Insect Pests. Springer, pp. 107-134.

Spindler, K., Quack, S. and Spindler-Barth, M. 1993. Insect cell lines as tools for insecticide screening. Trends in Comparative Biochemistry & Physiology, 1: 1045-1056.

Sundaram, M. Palli, S. R., Smaggle, G. and Ishaaya, H. 2002. Effect of RH-5992 on adult development in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 3, 2(2): 225-231.

Trisyono, A. and Chippendale, M. G. 1997. Effect of the nonsteroidal ecdysone agonists, methoxyfenozide and tebufenozide, on the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Economic Entomology, 90(6): 1486-1492.

Trisyono, A. and Chippendale, M. G. 1998. Effect of the ecdysone agonists, RH-2485 and tebufenozide, on the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*. Pest Management Science, 53(2): 177-185.

Wing, K. D. 1988. RH 5849, a nonsteroidal ecdysone agonist: effects on a *Drosophila* cell line. Science, 241(4864): 467-469.

Cell Toxicity Evaluation of Some Ecdysteroid Agonist Insecticides Using Three Different Cell Lines

Mosalla nezhad, H. *

Department of Pesticide Research, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

Received: Sep, 25, 2017 Accepted: Apr, 9, 2018

Abstract:

Ecdysteroid agonist insecticides, such as methoxyfenozide and tebufenozide are a group of insecticides that provoke a precocious and lethal larval molting in susceptible insects. As these compounds have selective properties, they can be used in integrated pest management (IPM) programs. Insect cell lines are useful *in vitro* laboratory tools which are exploited in physiology, toxicology and screening research of these compounds. In the present research, cell proliferation inhibition activity of methoxyfenozide, tebufenozide, halofenozide and RH-5849 was evaluated using three different cell lines, two lepidopteran cells (*Choristoneura fumiferana*, CF-203 of the spruce budworm and *Bombyx mori*, Bm5) and one dipteran cell, *Drosophila melanogaster*, S2. The order of toxicity of the compounds in both lepidopteran cell lines was methoxyfenozide>tebufenozide>20E>halofenozide>RH 5849, while methoxyfenozide and tebufenozide showed similar toxicity in S2 cells. Moreover, in S2 cells, all compounds exhibited lower biological activity with higher EC_{50} values. For example, methoxyfenozide showed 245 and 77-fold lower toxicity in CF-203 and Bm5 cells, respectively. As lepidopteran cell lines exhibit better biological potency than dipteran S2 cell, therefore it could be suggested that CF-203 and Bm5 cell lines are suitable for screening programs and also for mode of action research of these compounds.

Key words: ecdysteroid agonist insecticides, cell culture, *Choristoneura fumiferana* (CF-203), *Bombyx mori* (Bm5), *Drosophila melanogaster* (S2), cell lines, cell proliferation inhibition

* **Corresponding author:** Hadi Mosalla Nezhad, Email: hmosalla@gmail.com