

بررسی اثر هورمون هیدروکورتیزون بر آسیب‌های کلاستوزنیک کروموزومی القایی در رده سلولی L929 با استفاده از آزمون میکرونوکلئوس در سلول‌های دو هسته‌ای

یلدا صمصامی^۱، فرهنگ حداد^{۲*}، مریم مقدم متین^۳، شکوه الزمان سلیمانی فرد^۴،
حسین عباسپور^۱ Ph.D.

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، دامغان، ایران

۲- دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، مشهد، ایران

۳- دانشگاه فردوسی مشهد، پژوهشکده فناوری زیستی، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی سلولی و مولکولی، مشهد، ایران

۴- دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده پزشکی، گروه فیزیکی پزشکی، مشهد، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: haddad@um.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۴/۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۶

چکیده

هدف: در این مطالعه، تاثیر استرس بر القای آسیب‌های ساختاری کروموزومی در شرایط *in vitro* در رده سلولی L929 با استفاده از آزمون میکرونوکلئوس در سلول‌های دو هسته‌ای مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: رده سلولی L929 در محیط DMEM، حاوی ۱۰ درصد FBS کشت داده شد. سلول‌ها به چهار گروه آزمایشی شامل کنترل، گروه تیمار با ۲ Gy اشعه گاما، گروه تیمار با غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر هیدروکورتیزون و گروه تیمار با سه غلظت مختلف هیدروکورتیزون همراه با اشعه گاما تقسیم بندی شدند. سلول‌های تیمار شده، برداشت و رنگ آمیزی شدند و شمارش صدمات کروموزومی با استفاده از آزمون میکرونوکلئوس انجام شد.

نتایج: نتایج نشان داد که هیدروکورتیزون در مقایسه با گروه کنترل سبب القای میکرونوکلئوس نشده است. اگر چه فراوانی میکرونوکلئوس در سلول‌های تیمار شده هم‌زمان با غلظت‌های مختلف هیدروکورتیزون و اشعه به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از سلول‌های فقط اشعه دیده بود ($p < 0/05$).

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های این مطالعه، هورمون‌های استرس‌زا به‌تنهایی قادر به القای آسیب کروموزومی نیستند، اما می‌توانند سلول‌ها را نسبت به اثرات کلاستوزنیک اشعه آسیب پذیرتر نمایند.

واژگان کلیدی: استرس، هیدروکورتیزون، L929، اشعه گاما، میکرونوکلئوس

دور ۱۰۰۰rpm، فیکساتور (متانول ۸: ۱ اسید استیک) به رسوب سلولی اضافه شد. پس از شستشوی مجدد سلول‌ها با فیکساتور، در نهایت رسوب سلولی در مقدار کمی فیکساتور معلق شد. سوسپانسیون حاصل بر روی لام گسترش داده شد و در دمای اتاق خشک گردید.

رنگ آمیزی و شمارش سلولی: رنگ آمیزی لام‌ها با رنگ گیمسای ۱۰ درصد و به مدت ۷ دقیقه انجام شد. شمارش سلولی توسط میکروسکوپ Olympus BH2 با بزرگنمایی ۱۰۰۰ انجام شد. در هر لام حدود ۳۰۰ تا ۷۰۰ سلول دو هسته‌ای (شکل ۱، الف) شمارش شد و درصد سلول‌های دو هسته‌ای دارای میکرونوکلئوس (شکل ۱، ب) محاسبه شد. همچنین تعداد کل سلول‌های دو هسته‌ای و تعداد کل سلول‌های تک هسته‌ای نیز به منظور محاسبه شاخص تقسیم بر اساس فرمول‌های زیر شمارش شد.

آنالیزهای آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) توسط نرم افزار MINITAB انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از تست آماری Tukey در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ استفاده شد. گروه‌های تیمار شده، با گروه کنترل و همین‌طور با یکدیگر مقایسه شدند و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel رسم شدند. در نمودارها تفاوت آماری بین گروه‌ها با حروف a و b مشخص شد، حروف یکسان به معنی عدم تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها است.

نتایج

بررسی اثرات هیدروکورتیزون بر القا صدمات کروموزومی و ایجاد میکرونوکلئوس

به منظور بررسی تاثیر هیدروکورتیزون بر ایجاد آسیب کروموزومی، میانگین درصد میکرونوکلئوس در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف هورمون، با کنترل مقایسه شد. نتایج نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین درصد میکرونوکلئوس ایجاد شده در گروه کنترل و سه غلظت مختلف هورمون (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بود. به عبارتی میزان آسیب ایجاد شده در گروه کنترل و تیمارها مشابه و حدود ۲ تا ۳ درصد بود (شکل ۲، الف). همچنین هیچ تفاوت معنی‌داری بین فراوانی میکرونوکلئوس در غلظت‌های مختلف هورمون با یکدیگر مشاهده نشد. لذا

در باره ارتباط بین استرس و افزایش احتمال ابتلا به انواع بدخیمی‌ها در اثر عوامل محیطی به وجود آورد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر به صورت *in vitro* بر روی رده سلولی L929 موشی در محیط کشت انجام شد. روش بررسی، آزمون میکرونوکلئوس در سلول‌های دو هسته‌ای متوقف در مرحله سیتوکینز بر اساس روش پیشنهادی Fenech بود (۳۶).

رده سلولی: در این تحقیق رده سلولی L929 فریز شده، از انستیتو پاستور تهران خریداری شد. این سلول‌ها در محیط کشت DMEM (bioidea) بافری شده با بافر HEPES و کامل شده با گلوکز، گلوتاماکس و NaHCO_3 همراه با ۱۰ درصد سرم جنینی گاو و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند.

تیمار هیدروکورتیزون: سلول‌های گروه‌های تیمار با غلظت‌های نهایی ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از هورمون به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. پس از ۲۴ ساعت، سیتوکالازین B (Sigma) با غلظت نهایی ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر به محیط کشت اضافه گردید تا تقسیم سیتوپلاسمی جهت ایجاد سلول‌های دو هسته‌ای متوقف شود.

تیمار با اشعه: در این مرحله سه گروه سلولی شامل کنترل، گروه تیمار با اشعه گاما و گروه‌های تیمار با سه غلظت مختلف هیدروکورتیزون همراه با اشعه گاما در نظر گرفته شدند.

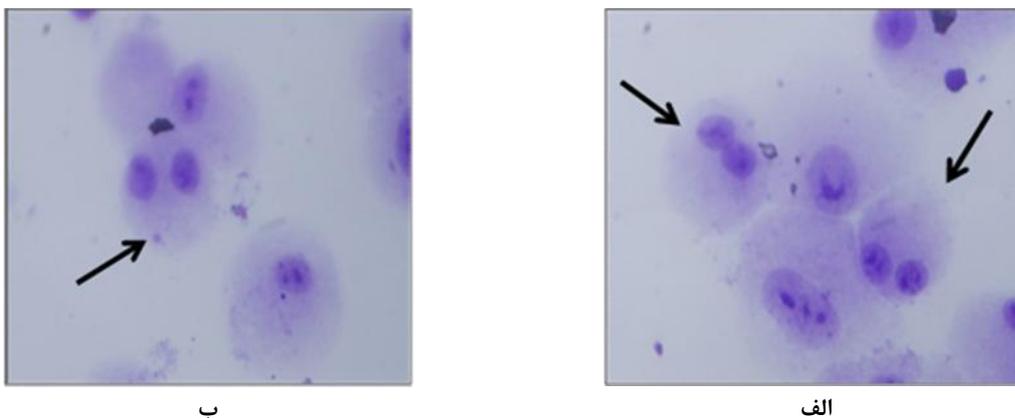
فلاسک‌های سلولی تحت تاثیر اشعه گاما با دوز ۲ Gy ساطع شده از دستگاه 60CO (تراتون مدل فونیکس، ساخت کانادا) تولید اشعه موجود در بیمارستان امید مشهد، به مدت ۳ دقیقه، قرار گرفتند. برای سلول‌های تیمار شده با هیدروکورتیزون تابش اشعه ۲۴ ساعت پس از شروع تیمار هورمونی انجام شد. پس از گذشت ۳ ساعت از تابش اشعه، سیتوکالازین B با غلظت نهایی ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر سلول‌ها اثر داده شد.

برداشت سلولی: پس از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار با سیتوکالازین B، برداشت سلولی انجام شد. برداشت سلولی بر اساس روش پیشنهادی توسط Fenech و همکاران صورت پذیرفت (۳۶). بدین منظور پس از جدا کردن سلول‌ها با تریپسین ۲۵ درصد و سانتریفیوژ آن‌ها با دستگاه سانتریفیوژ مدل Universal centrifuge SH12، به مدت ۱۰ دقیقه در

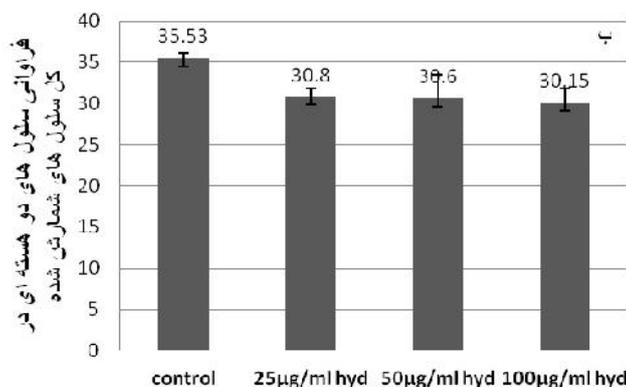
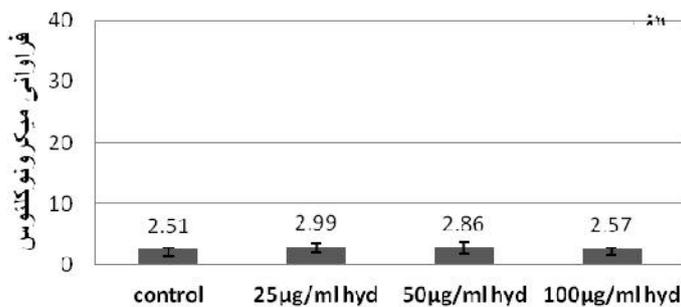
می توان نتیجه گرفت افزایش غلظت هورمون به تنهایی آسیب کروموزومی را ایجاد نکرده است. در بررسی شاخص تقسیم (binary index) نیز تفاوت معنی داری بین گروه کنترل و تیمارها مشاهده نشد (شکل ۲، ب) که نشان دهنده عدم تاثیر هورمون بر آهنگ تقسیمات سلولی است.

$$\text{در صد میکرونوکلئوس} = \frac{\text{تعداد سلول های دو هسته ای دارای میکرونوکلئوس}}{\text{تعداد کل سلول های دو هسته ای}} \times 100$$

$$\text{شاخص تقسیم} = \frac{\text{تعداد سلول های دو هسته ای}}{\text{تعداد کل سلول های دو هسته ای و تک هسته ای}} \times 100$$



شکل ۱: ریخت شناسی سلول های مورد بررسی. الف: سلول های دو هسته ای بدون میکرونوکلئوس (با فلش نشان داده شده). ب: سلول دو هسته ای دارای میکرونوکلئوس (نوکل فلش میکرونوکلئوس را نشان می دهد).



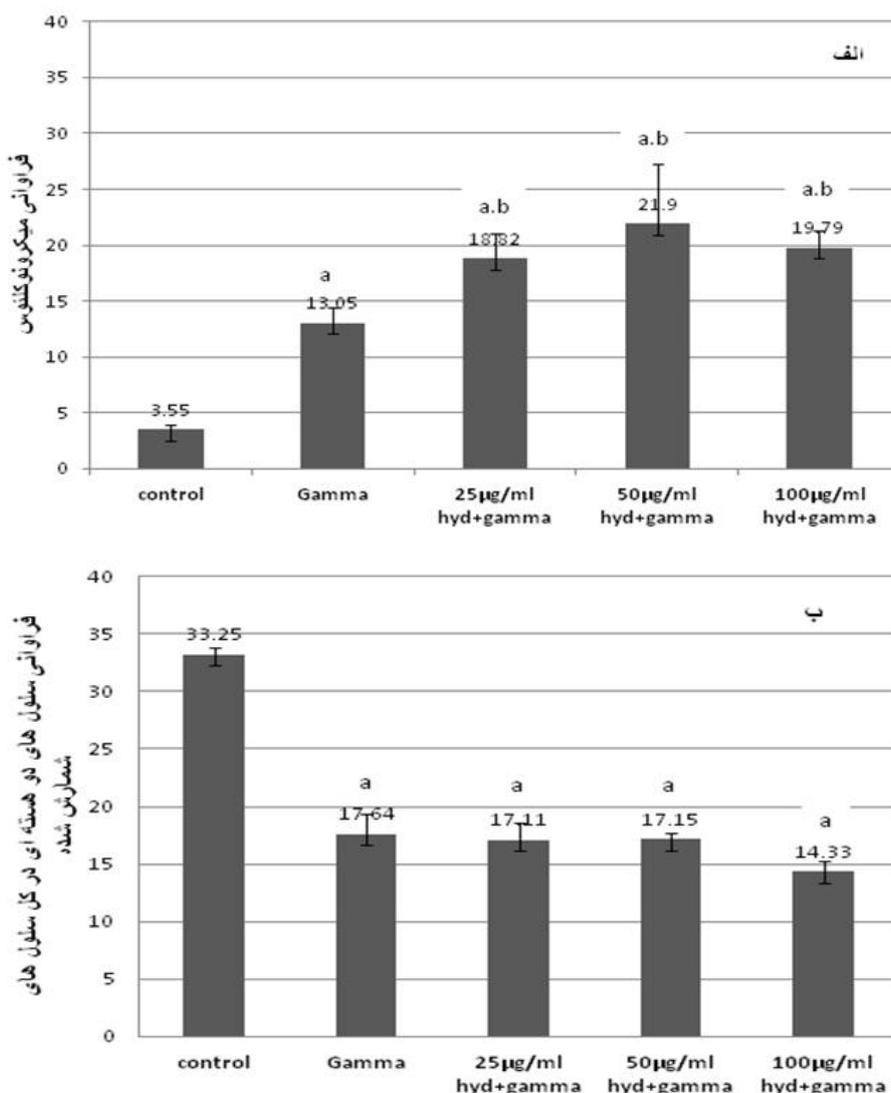
شکل ۲: مقایسه درصد میکرونوکلئوس (الف) و شاخص تقسیم (ب)، بین سه غلظت مختلف هیدروکورتیزون و کنترل.

بررسی اثر توام اشعه و غلظت های مختلف هیدروکورتیزون

مقایسه درصد میکرونوکلئوس و شاخص تقسیم بین گروه های کنترل، اشعه دیده، غلظت های مختلف هیدروکورتیزون+اشعه، با هدف بررسی اثر هیدروکورتیزون بر القای آسیب های ایجاد شده توسط تابش گاما انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری نشان دهنده تفاوت قابل ملاحظه در فراوانی میکرونوکلئوس بین گروه تیمار با اشعه و گروه کنترل می باشد که حاکی از آسیب ایجاد شده توسط اشعه است ($p < 0/05$). همچنین بین درصد میکرونوکلئوس ایجاد شده در غلظت های مختلف هیدروکورتیزون+اشعه با گروه کنترل تفاوت معنی داری وجود دارد ($p < 0/05$) (شکل ۳، الف).

شاخص تقسیم نیز در گروه اشعه دیده و گروه های تیمار هیدروکورتیزون + اشعه نسبت به کنترل کاهش پیدا کرد (شکل ۳، ب) که نشان دهنده تاثیر منفی اشعه بر تکثیر سلولی می باشد.

مقایسه درصد میکرونوکلئوس بین غلظت های مختلف هیدروکورتیزون+اشعه با گروه تیمار شده با اشعه نشان دهنده افزایش معنی دار در فراوانی میکرونوکلئوس در غلظت های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از تیمار هیدروکورتیزون+اشعه نسبت به گروه تیمار شده با اشعه بود ($p < 0/05$) (شکل ۳، الف). این افزایش منعکس کننده افزایش میزان آسیب کروموزومی ناشی از تیمار با هورمون پیش از تابش اشعه در این سلول ها در مقایسه با سلول های فقط تابش دیده می باشد.



شکل ۳: مقایسه درصد میکرونوکلئوس (الف) و شاخص تقسیم (ب) در سه غلظت مختلف هیدروکورتیزون- اشعه با گروه کنترل و اشعه. a تفاوت معنی دار با گروه کنترل ($p < 0/05$). b تفاوت معنی دار با گروه اشعه دیده ($p < 0/05$).

بحث

آن در مطالعات متعددی به صورت *in vivo* و *in vitro* به اثبات رسیده است (۳۱ و ۲۸). در بررسی حاضر نیز تابش اشعه گاما بر سلول های L929 باعث افزایش در فراوانی میکرونوکلئوس در سلول های دو هسته ای گردید. تابش گاما به عنوان یک اشعه یونیزان بیشترین صدمه را از طریق آسیب مستقیم و غیر مستقیم، با تولید رادیکال های آزاد واکنش گر (ROS)، به مولکول DNA وارد می کند (۲۹ و ۳۰). این آسیب ها در صورتی که تعمیر نشوند خود منجر به صدمات ژنتیکی به صورت شکستگی های کروموزومی و کروماتیدی می شوند (۳۱). در آزمون میکرونوکلئوس قطعات کروموزومی و کروماتیدی حاصله به صورت هسته های کوچک در سیتوپلاسم سلول قابل مشاهده خواهند بود (۳۶). افزایش فراوانی میکرونوکلئوس در این مطالعه پس از تابش اشعه نیز بار دیگر بیانگر همین موضوع می باشد.

در مطالعه حاضر تیمار سلول های L929 با هیدروکورتیزون، به عنوان یکی از هورمون های گلوکوکورتیکوئیدی که در هنگام پاسخ به استرس ساخته می شوند، نشان داد که این هورمون می تواند زمینه ساز آسیب رسانی بیشتر کروموزومی توسط تابش اشعه گاما شود. این افزایش صدمات به صورت افزایش در فراوانی میکرونوکلئوس در سلول های دو هسته ای نمایان شد. از جمله تاثیرات هورمون های استرس، توانایی آن ها بر ممانعت از عمل کرد صحیح سیستم های تعمیر DNA می باشد (۲۱). لذا افزایش صدمات مشاهده شده در این بررسی می تواند به دلیل ممانعت تعمیر صدمات ناشی از تابش گاما باشد.

در مطالعه حاضر هورمون به تنهایی هیچ گونه صدمه کروموزومی قابل مشاهده ای به صورت افزایش در فراوانی میکرونوکلئوس ایجاد نکرد. این در حالی است که در مطالعه Flint و همکاران (۲۱) تیمار سلولی توسط هورمون های استرس باعث افزایش صدمات DNA شد. عدم مشاهده صدمات کروموزومی در این مطالعه پس از تیمار با هیدروکورتیزون، ممکن است به دلیل تفاوت در نوع سلول مورد استفاده و یا زمان کوتاه برداشت سلولی پس از تیمار با هورمون در این آزمایش باشد. صدمات به DNA برای تبدیل به ناهنجاری های ساختاری قابل مشاهده در آزمون میکرونوکلئوس نیاز به زمان بیشتری دارند (۴۳ و ۴۴). لذا ممکن است با افزایش زمان بین تیمار هورمونی و برداشت شاهد افزایش فراوانی در صدمات کروموزومی بود.

نتایج این بررسی نشان داد که هورمون استرس به تنهایی باعث ایجاد صدمات کروموزومی در شرایط آزمایشگاهی نمی شود، اما

هر تغییری در محیط موجود زنده می تواند به عنوان عامل ایجاد کننده استرس تلقی شود که در صورت عدم پاسخگویی صحیح می تواند به تهدیدی برای زندگی موجود تبدیل شود (۳۷). در پرستانداران، این پاسخ شامل تغییراتی است که منجر به افزایش انتقال اکسیژن و گلوکز به قلب و ماهیچه های اسکلتی می شود. تغییرات ناشی از استرس در سیستم ایمنی بدن می تواند منجر به سرعت بخشیدن به فرآیند ترمیم زخم شده و به جلوگیری از عفونت های احتمالی کمک کند (۳۸). در مهره داران و انسان استرس منجر به آزاد شدن هورمون های گلوکوکورتیکوئیدی مثل کورتیزول و کاتکول آمین ها مثل اپی نفرین و نور اپی نفرین می شود که می توانند اثر خود را بر روی سلول های ایمنی و سلول های غیر ایمنی از طریق اتصال مستقیم به گیرنده های سطح سلول اعمال کنند (۱۳).

بدن با تولید هورمون های استرس به شخص کمک می کند که نسبت به یک موقعیت استرس زا با سرعت و شدت بیشتری واکنش نشان دهد (۳۹). با این حال، قرار گرفتن در معرض استرس به مدت طولانی عواقب زیان آوری به دنبال خواهد داشت که از آن جمله می توان به اختلالات در غدد درون ریز، سیستم عصبی و همچنین آسیب های دائمی به DNA، که ممکن است منجر به ترانسفورماسیون و تومورزایی شوند، اشاره نمود. استرس ممکن است در شروع سرطان از طریق آسیب به DNA در داخل سلول، یا از طریق تغییر قابلیت در ترمیم DNA و یا از طریق محدودیت در القای آپوپتوزیس در سلول هایی که دارای DNA آسیب دیده هستند، نقش داشته باشد (۲۱).

در مطالعات قبلی تاثیر توام استرس به همراه القای وین بلاستین در شرایط *in vivo* بررسی شد که نتایج نشان دهنده تاثیر افزایشی استرس بر صدمات کروموزومی القایی توسط وین بلاستین بود (۲۷). توانایی استرس در ایجاد صدمات کروموزومی در مطالعات دیگری نیز گزارش شده است (۴۰، ۴۱ و ۴۲). در جهت یافتن پاسخ اینکه آیا این تاثیر، اختصاصی و فقط باعث افزایش صدمات آنیوژنیک بوده و یا به شکل گسترده سیستم های دفاعی و کنترلی سلول در حفظ تمامیت ژنتیکی را بر هم می زند، در مطالعه حاضر تاثیر تابش اشعه گاما به عنوان عامل کلاستوژنیک شناخته شده مورد بررسی قرار گرفت.

تاثیر مخرب تابش اشعه یونیزان بر سلول و مجموعه کروموزومی

5. Marketon JIW And Glaser R. Stress hormones and immune function. *Cellular Immunology*. 2008; 252(1-2): 16-26.
6. Pizarro JM, Lumley LA, Medina W, Robison CL, et al. Acute social defeat reduces neurotrophin expression in brain cortical and subcortical areas in mice. *Brain Res*. 2004; 1025(1-2): 10-20.
7. Bauer ME, Perks P, Lightman SL, Shanks N. Restraint stress is associated with changes in glucocorticoid immunoregulation. *Physiol Behav*. 2001; 73(4): 525-32.
8. Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5(3): 243-51.
9. Herringa RJ, Nanda SA, Hsu DT, Roseboom PH, et al. The effects of acute stress on the regulation of central and basolateral amygdala CRF-binding protein gene expression. *Brain Res Mol Brain Res*. 2004; 131(1-2): 17-25.
10. Phillips JE, Gersbach CA, Wojtowicz AM, Garcia AJ. Glucocorticoid-induced osteogenesis is negatively regulated by Runx2/Cbfa1 serine phosphorylation. *J Cell Sci*. 2006; 119(Pt 3): 581-91.
11. Ranabir S, Reetu K. Stress and hormones. *Indian J Endocrinol Metab*. 2011; 15 (1): 18-22.
12. Saklatvala J. Glucocorticoids: do we know how they work? *Arthritis Res*. 2002; 4(3): 146-50.
13. Dhabhar FS, McEwen BS. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96 (3): 1059-64.
14. McEwen BS, Stellar E. Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med*. 1993; 153(18): 2093-101.
15. McEwen B. Protective and damaging effects of stress mediators. *The New Engl J Med*. 1998; 338(3): 171-178.
16. Mason JW. A review of psychoendocrine research on the pituitary-adrenal cortical system. *Psychosom Med*. 1968; 30(5): 576-607.
17. Lundberg U. Stress hormones in health and illness: the roles of work and gender. *Psychoneuroendocrinology*. 2005; 30(10): 1017-21.
18. Reiche EM, Nunes SO, Morimoto HK. Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol*. 2004; 5(10): 617-625.
19. Cohen L, Marshall GD Jr, Cheng L, Agarwal SK, et al. DNA repair capacity in healthy medical students during and after exam stress. *J Behav Med*. 2000; 23(6): 531-44.

احتمالا با ایجاد اختلال در مکانیسم های کنترل تمامیت ژنتیکی سلول، القای صدمه به DNA و اختلال در سیستم های تعمیر DNA (۲۱ و ۲۵)، زمینه ساز افزایش صدمات القایی اشعه گاما به کروموزوم ها خواهد شد.

نتیجه گیری

بررسی اثرات هورمون هیدروکورتیزون بر روی سلول های L929 در این مطالعه نشان داد که این هورمون به تنهایی آسیب کروموزومی نسبت به گروه کنترل ایجاد نکرد، اما هنگامی که سلول ها تحت تاثیر یک عامل کلاستوژن (اشعه) قرار می گیرند، هورمون می تواند اثرات آن عامل را در ایجاد آسیب به طور قابل ملاحظه ای افزایش دهد. افزایش اثرات در هر سه دوز هورمون، ۱/۵ برابر گروهی بود که تنها اشعه بر آن اثر داده شده بود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در محل آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه فردوسی مشهد انجام گردید که نویسندگان مقاله بر خود لازم دانسته تا از مسئولین محترم دانشگاه فردوسی مشهد، مدیریت دانشکده علوم و کارشناس و تکنسین این آزمایشگاه مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام نمایند. همچنین از زحمات پرسنل بخش رادیوتراپی بیمارستان امید که در انجام این تحقیق یاری مان کردند تشکر می شود. نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان نیز اعلام می دارند.

منابع

1. Levine, S, Ursin, H. What is stress? In "Stress: Neurobiology and Neuroendocrinology" (M. R. Brown, G. F. Koob, and C. Rivier. (eds. Marcell Dekker, New York; 1991; pp. 3-21.
2. Chrousos GP, Gold PW. Emotional stress and eyewitness memory: A critical review. *Psychol Bull*. 1992; 112(2): 284-309.
3. Carrasco GA and Van de Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol*. 2003; 463(1-3): 235-72.
4. Sabban EL, Kvetnansky R. Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events. *Trends Neurosci*. 2001; 24(2): 91-98.

20. Irie M, Asami S, Nagata S, Miyata Met al. Relationships between perceived workload stress and oxidative DNA damage. *Int Arch Occup Environ Health*. 2001; 74(2): 153-7.
21. Flint MS, Baum A, Chambers WH, Jenkins FJ. Induction of DNA damage, alteration of DNA repair and transcriptional activation by stress hormones. *Psychoneuroendocrinology*. 2007; 32(5): 470-479.
22. Hasegawa H, Saiki I. Psychosocial stress augments tumor development through betaadrenergic activation in mice. *Jpn J Cancer Res*. 2002; 93(7):729-35 .
23. Hara MR KJ, Kovacs JJ, Whalen EJ, Rajagopal S, et al. A stress response pathway regulates DNA damage through beta2-adrenoreceptors and beta-arrestin-1. *Nature*. 2011; 477(7364): 349-353.
24. Mizuno S, Kato K, Asai S, Takahashi Y, et al. Gene expression analysis in the stomachs of water immersion-restraint stress rats using high-density oligonucleotide array. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2004; 19(11): 1264.
25. Gorlov IP, Borodin PM. Effect of emotional stress on the frequency of meiotic abnormalities in male mice. *Genetika*. 1986; 22(6):1019-1024.
26. Nersesyan AK, Boffetta P, Sarkisyan TF, Zalinian GG, et al. Chromosome aberrations in lymphocytes of persons exposed to an earthquake in Armenia. *Scand J Work Environ Health*. 2001; 27(2):120-124.
27. Malvandi A, Haddad F, Moghimi A. Acute restraint stress increases the frequency of vinblastine-induced micronuclei in mouse bone marrow cells. *Stress*. 2010; 13(3): 276-280.
28. Jagetia, GC, Reddy TK. Modulation of radiation-induced alteration in the antioxidant status of mice by naringin. *Life Sci*. 2005; 77(7): 780-94.
29. Park JW, Floyd RA. Lipid peroxidation products mediate the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA. *Free Radic Biol Med*. 1992; 12(4): 245-50.
30. Halliwell B. Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker? *Free Radic Biol Med*. 2002; 32(10): 968-74.
31. Prasad NR, Srinivasan M, Pugalendi KV, Menon VP. Protective effect of ferulic acid on gamma-radiation-induced micronuclei, dicentric aberration and lipid peroxidation in human lymphocytes. *Mutat Res*. 2006; 603(2): 129-34.
32. Zimonjic D, Brooks MW, Popescu N, Weinberg RA, et al. Derivation of human tumor cells in vitro without widespread genomic instability. *Cancer Res*. 2001; 61(24): 8838-44.
33. Stewenius Y, Gorunova L, Jonson T, Larsson N, et al. Structural and numerical chromosome changes in colon cancer develop through telomere-mediated anaphase bridges, not through mitotic multipolarity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(15): 5541-6.
34. Mohr B, Illmer T. Structural chromosomal aberrations in the colon cancer cell line HCT 116 – results of investigations based on spectral karyotyping. *Cytogenet Genome Res*. 2005; 108: 359-361.
35. Panani AD, Ferti AD, Raptis SA, Roussos C. Novel recurrent structural chromosomal aberrations in primary bladder cancer. *Anticancer Res*. 2004; 24(5A): 2967-74.
36. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res*. 2000; 455(1-2): 81-95.
37. Fink G(eds). *Stress science: neuroendocrinology*. Pp 829. San Diego, Academic Press, Elsevier Ltd; 2009b.
38. Williams N.A, Leaper D.J. *Infection*. In D. J. Leaper & K. G. Harding (eds), *Wounds: Biology and management* (pp. 71– 87). New York: Oxford University Press.s; 1998.
39. Segerstrom S, Miller G. Psychological stress and the human immune system: A metaanalytic study of 30 years of inquiry. *Psychological Bulletin*. 2004; 130(4): 601-630.
40. Flint MS, Baum A, Episcopo B, Knickelbein KZ, et al. Chronic exposure to stress hormones promotes transformation and tumorigenicity of 3T3 mouse fibroblasts. *Stress*. 2013; 16(1): 114-121.
41. Flint MS, Carroll JE, Jenkins FJ, Chambers WH, et al. Genomic profiling of restraint stress-induced alterations in mouse T lymphocytes. *J Neuroimmunol*. 2005; 167(1-2):34-44.
42. Vostrikova TV, Butorina AK. Cytogenetic responses of birch to stress factors. *Izv Akad Nauk Ser Biol*. 2006; 2: 232-238.
43. Mughal A, Vikram A, Ramarao P, Jena GB. Micronucleus and comet assay in the peripheral blood of juvenile rat: establishment of assay feasibility, time of sampling and the induction of DNA damage. *Mutat Res*. 2010; 700(1-2): 86-94.
44. Haddad F, Moghimi A, Salmani A, Rahimi MF, et al. Analysing the Radioprotective Effect of *Cotoneaster Nummularia* in Mouse Bone Marrow Cells Using Micronucleus Assay. *J of Cell and Mol Res*. 2009; 1(2):77-83.

Investigating the Effects of Hydrocortisone Hormone on Induced Clastogenical Chromosomal Abnormalities on L929 Cell Line Using Micronucleus Assay on Binucleated Cells

Samsami Y, M.Sc.¹, Haddad F, Ph.D.^{2*}, Moghadam Matin M, Ph.D.², Soleymanifard Sh, Ph.D.⁴, Abbaspour H, Ph.D.¹

1. Department of Biology, Faculty of Science, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.
2. Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3. Cell and molecular Biotechnology Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
4. Department of Medical Physics, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

* Email corresponding author: haddad@um.ac.ir

Received: 27 Dec. 2014

Accepted: 23 Jun. 2015

Abstract

Aim: In this study the effects of stress on induction of structural chromosomal abnormalities on L929 cell line using micronucleus assay on cytokinesis-blocked binucleated cells were investigated *in vitro*.

Material and methods: L929 cells were cultured in DMEM containing 10% FBS. The cells were divided into four groups including; control, 2Gy gamma-irradiated cells, and cells treated with doses of 25, 50 and 100 µg/ml hydrocortisone, and cells co-treated with these three doses of hydrocortisone and irradiation. The treated cells were harvested, stained and chromosome abnormalities were scored using micronucleus assay.

Results: Results showed that hydrocortisone did not induce micronuclei as compared to the control group. However, the frequency of micronuclei in cells co-treated with doses of hydrocortisone and irradiation was significantly higher than cells treated only with gamma irradiation ($P < 0.05$).

Conclusion: According to the data of this study, stress hormones are not able to induce any chromosomal abnormalities; however, they are able to increase the cell susceptibility to clastogenic effects of irradiation.

Key words: Stress, Hydrocortisone, L929, Gamma ray, Micronucleus