مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۸، شماره ٤، زمستان ۱۳۹٦

بررسی تاثیر امواج الکترومغناطیس با فرکانس پایین به‌همراه وین بلاستین در القای ناهنجاری‌های کروموزومی در سلول‌های L929 با استفاده از روش آزمون میکرونوکلئوس در سلول‌های دو هسته ای

مینا وفائی راد .M.Sc[1]، فرهنگ حداد .Ph.D[2]*، مریم مقدم متین .Ph.D [2و3]

۱- کارشناسی ارشد سلولی و ملکولی، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، مشهد، ایران

۲- دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، مشهد، ایران

۳- دانشگاه فردوسی مشهد، پژوهشکده فناوری زیستی، گروه تحقیقیاتی سلولی و ملکولی

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۹

چکیده

هدف: در این مطالعه تاثیر ژنوتوکسیک امواج الکترومغناطیس در طول موج مشابه امواج تلفن همراه به‌عنوان یک منبع رایج در تولید این امواج به‌همراه یک آنیوژن شناخته شده (وین بلاستین) در سلول‌های در محیط کشت بررسی شد.

مواد و روش‌ها: سلول‌های L929 به‌مدت ۲ ساعت تحت تاثیر میدان الکترومغناطیس به‌دو شکل ثابت و منقطع با طول موج تقریبی ۹۰۰MGh در حضور و عدم حضور ۱/۵ ng/ml وین بلاستین قرار گرفتند. بررسی صدمات کروموزومی با استفاده از آزمون میکرونوکلئوس در سلول‌های دو هسته ای و توانایی زنده ماندن سلول‌ها در تمامی تیمارها توسط آزمون MTT انجام شد.

نتایج: فراوانی میکرونوکلئوس در سلول‌های تحت تاثیر میدان الکترومغناطیسی منقطع و پیوسته در مقایسه با میدان خاموش و گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد. تیمار هم‌زمان سلول‌ها با وین بلاستین باعث افزایش بیشتر این فراوانی نگردید. بررسی‌ها نشان داد که در هیچ یک از گروه‌های تیمارشده، کاهش قدرت زندگی رخ نداده است.

نتیجه‌گیری: نتایج بیانگر توانایی میدان الکترومغناطیس، به‌خصوص به‌صورت منقطع، در ایجاد صدمات کروموزومی است. تیمار هم‌زمان میدان الکترومغناطیس و وین بلاستین، باعث افزایش بیشتر این صدمات نشد.

واژگان کلیدی: آزمون میکرونوکلئوس در سلول‌های دو هسته‌ای، امواج الکترومغناطیس، وین بلاستین، سلول L929

مقدمه

صحت تمامیت ژنتیکی سلول‌ها از جمله دلایل اصلی سلامت انسان است. ناهنجاری‌های کروموزومی به اشکال تعدادی و ساختاری به درجات مختلف زندگی ما را تحت تاثیر مخرب خود قرار می‌دهند. جدا از تاثیر آن‌ها در تولد نوزادان ناهنجار می‌توان به تاثیر عمیق آن‌ها در ایجاد سرطان اشاره کرد. امروزه ارتباط بین صدمات کروموزمی و سرطان در مطالعات متعددی بررسی و پیشنهاد شده است (۱). بیشتر سلول‌های سرطانی حاوی انواعی از ناهنجاری‌های کروموزومی اعم از ساختاری و تعدادی از نوع آنیوپلوئیدی بوده که در سلول‌های طبیعی بسیار نادرند (۲ و ۳). سیر تکوینی سلول‌های سرطانی از حالت خوش خیم به‌حالت تهاجمی با افزایش آنیوپلوئیدی ارتباط دارد (۴). به‌هم خوردن تعادل کروموزمی با تاثیر عمیق خود بر نظم بیان ژنی سلول باعث تغییراتی در زمان و میزان ساخت پروتئین های دخیل در کنترل تقسیمات سلولی و همچنین پروتئین‌های مرتبط با تعمیر DNA می‌شود که نتیجه آن با گذشت زمان عدم کنترل صحیح سلول بر تقسیمات و ایجاد سلول‌های سرطانی خواهد بود (۵).

جهت شناخت و مبارزه بهتر با سرطان، امروزه تمرکز بر یافتن عواملی ست که در ایجاد صدمات کروموزومی نقش اساسی ایفا می کنند. از این میان، تاثیر شرایط محیطی و نقش آن بر روند سلامت جسمی و کروموزومی انسان موضوعی غیر قابل انکار است (۶). از جمله عوامل محیطی که تاثیرات مخرب سلولی و بافتی آن مورد شک و بررسی است می‌توان به امواج الکترومغناطیسی که ما را به اشکال مختلف احاطه کرده‌اند، اشاره نمود.

طیف امواج الکترومغناطیس (0 Hz - 300 GHz) به‌دو دسته تقسیم می‌شوند: پرتوهای یونیزه کننده، مانند پرتو x، اشعه گاما و فرابنفش و پرتوهای غیر یونیزه کننده، مانند فرکانس‌های رادیویی مربوط به تلفن‌های همراه، تجهیزات وایرلس و امواج با فرکانس بسیار پایین (۷) مطالعات متعددی تاثیر میدان‌های الکترومغناطیس را بر ایجاد صدمات کروموزومی از نوع ساختاری و تعدادی نشان می‌دهند. سلول‌های در معرض میدان‌های الکترومغناطیس تابش شده از منابعی مانند نمایش‌گرهای رایانه‌ای و یا تلفن‌های همراه افزایش معنی‌داری از صدمات کروموزومی را نشان داده اند (۸-۱۱)

اگرچه تاثیر مستقیم میدان های الکترومغناطیس بر ایجاد صدمات کروموزومی بررسی شده، اما تاکنون نقش آن‌ها در ایجاد شرایط مناسب برای تاثیر عمیق تر سایر عوامل با توانایی القای صدمات به سیستم کروموزومی سلول‌ها به‌درستی مورد مطالعه قرار نگرفته است. در این مطالعه تاثیر هم‌زمان امواج الکترومغناطیس غیر یونیزان در محدوده امواج تلفن‌های همراه و یک عامل آنیوژن شناخته شده به‌نام وین بلاستین در ایجاد و یا ترغیب سلول به آنیوپلوئیدی بر روی سلول‌های L929 بررسی شد.

در انجام این مطالعه جهت بررسی صدمات کروموزومی احتمالی از آزمون میکرونوکلئوس در سلول‌های دو هسته‌ای استفاده شد. این آزمون از روش‌های بسیار رایج در مطالعات بررسی صدمات القایی کروموزومی می‌باشد. برای انجام آن، سلول‌های در محیط کشت با استفاده از سایتوکالاسین-b در مرحله سیتوکینز از تقسیم سلولی متوقف می شوند که نتیجه آن سلول‌های دارای دو هسته مستقل در یک سیتوپلاسم مشترک می‌باشد. تاثیر عامل مورد مطالعه بر جاماندن یک کروموزوم کامل یا شکستن و جاماندن بخشی از کروموزوم از محاسبه فراوانی سلول‌های دو هسته ای دارای هسته‌های کوچک در کل سلول‌های دو هسته ای براحتی قابل بررسی خواهد بود (۱۲).

مواد و روش‌ها

کشت سلولی: در این پژوهش از رده سلولی L929 خریداری شده از انستیتو پاستور تهران استفاده شد. سلول‌ها در محیط DMEM LG با ۱۰ درصد FBS و در

دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 کشت شدند (۱۳).

تیمار با وین‌بلاستین: جهت تعیین غلظت مناسب وین‌بلاستین، سه غلظت نهایی ۰/۵، ۱/۵ و ۲ ng/ml از وین‌بلاستین به‌مدت ۲۴ ساعت در دو محیط کشت موازی به محیط سلولی اضافه شدند. محاسبه صدمات کروموزومی ناشی از تمیار با وین بلاستین با روش آزمون میکرونوکلئوس و سمیت ناشی از تیمار با وین بلاستین با استفاده از روش MTT صورت پذیرفت.

تیمار سلول‌ها با میدان الکترومغناطیسی و وین‌بلاستین: جهت تولید میدان الکترومغناطیس از دستگاه ایجاد میدان ساخت دانشکده مهندسی دانشگاه فردوسی مشهد، گروه برق و الکترونیک استفاده شد. امواج الکترومغناطیس در این دستگاه توسط دو آنتن به ارتفاع پنج سانتیمتر و فاصله ده سانتیمتر از یکدیگر تولید می‌شود. برای بررسی تاثیر میدان الکترومغناطیس فلاسک‌های سلولی T25 در میدانی با طول موج MHz ۹۰۰ با فاصله مساوی از هر دو آنتن قرار گرفتند.

سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار ۱/۵ ng/ml از وین بلاستین قرار گرفتند. سلول‌های تیمار شده در دو ساعت پایانی به‌همراه سلول‌های تیمار نشده، تحت تاثیر میدان الکترومغناطیس ثابت و منقطع قرارداده شدند. جهت تولید میدان منقطع دستگاه در فواصل ۱۵ دقیقه‌ای روشن و خاموش گردید. در پایان این زمان محیط آن‌ها با محیط کشت حاوی سایتوکالاسین-b با غلظت نهایی ۴μg/ml تعویض شد.

برداشت سلولی: برداشت سلولی ۲۴ ساعت پس از افزودن سایتوکالاسین-b و بر اساس روش پیشنهادی Fenech با کمی تغییر صورت پذیرفت. سلول‌های برداشت شده پس از تیمار با محلول هایپوتونیک KCL(۰/۵۶ درصد) دو بار با فیکساتور متانول: اسید استیک (۱:۹) شستشو شده و سپس قطراتی از سوسپانسیون سلولی بر روی لام‌های تمیز چکانده شد. لام‌های آماده و خشک در محلول ۱۰ درصد گیمسا برای مدت ۱۰ دقیقه رنگ آمیزی شده و سپس آبکشی شدند.

شمارش میکرونوکلئوس‌ها: لام‌های تهیه شده، زیر میکروسکوپ نوری Olympus BH-2 با بزرگ‌نمایی 1000X بررسی شدند. بر روی هر لام سلول‌های تک هسته (Mono)، دو هسته (Bi) و دو هسته‌ای دارای میکرونوکلئوس(MnBi) شمارش شدند. در این مطالعه از هر محیط کشت تعداد حداقل دو لام، و از هر لام حداقل ۳۰۰ سلول دوهسته‌ای شمارش شد. فراوانی سلول‌های دو هسته‌ای (Binary index) در کل سلول‌های شمارش شده (Mono+Bi)، و فراوانی سلول‌های دو هسته‌ای دارای میکرونوکلئوس(MnBi%) در کل سلول‌های دوهسته ای (Bi) محاسبه شد.

آزمون MTT پس از تیمار سلول‌ها با میدان الکترومغناطیسی و وین‌بلاستین: سلول‌های تیمار شده با وین بلاستین و سه حالت میدان منقطع، پیوسته و خاموش، در ظروف کشت ۹۶ خانه‌ای در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت، کشت داده شدند. در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از پایان هر تیمار به‌هر یک چاهک‌های کشت نمک تترازولیوم با غلظت نهایی ۵۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر اضافه شد. سلول‌ها ی زنده این نمک بی‌رنگ را به مشتقات آبی رنگ فورمازان احیا کرده که نمایانگر حیات سلولی است. پس از گذشت ۴ تا ۶ ساعت محیط کشت تخلیه و به سلول‌ها معادل حجم محیط کشت، محلول DMSO اضافه شد. جذب نوری هر یک از چاهک ها در طول موج ۵۴۵nm نانومتر دستگاه ELISA reader خوانده شد و با حالت غیر تیمار مقایسه شد.

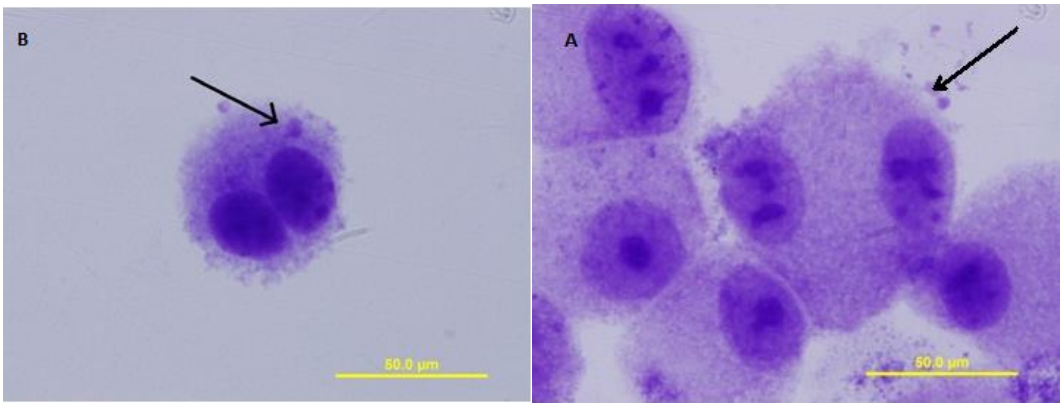
آنالیز آماری

نتایج این آزمایش با استفاده از نرم افزار Minitab 14 برای آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) بررسی شد. مقایسه میانگین‌ها در نرم افزار SPSS 11 و توسط تست آماری Tucky در سطح معنی‌داری $p<0.05$ انجام

شد. نتایج حاصل از آزمون MTT با استفاده از برنامه Excel 2013 بررسی و نمودارهای مربوط به سه بازه زمانی رسم و انحراف از معیار (SD) آن‌ها محاسبه شد.

نتایج

استفاده از سیتوکالازین-b با جلوگیری از تقسیم سیتوپلاسم در سلول‌های در حال تقسیم، سبب ایجاد سلول‌های دو هسته‌ای می‌شود (شکل ۱:A). هر گونه صدمه کروموزومی اعم از جاماندن و یا شکستگی‌های کروموزومی در این سلول‌ها به‌صورت میکرونوکلئوس درون سیتوپلاسم قابل مشاهده خواهد بود (شکل ۱:B).



شکل ۱: A) سلول دو هسته‌ای نتیجه تیمار با سیتوکالازین-b، B) سلول دو هسته‌ای دارای میکرونوکلئوس

بررسی اثر وین‌بلاستین بر روی سلول‌های L929

نتایج حاصل از شمارش سلولی در تیمارهای با غلظت‌های مختلف وین بلاستین در جدول ۱ آمده است. تیمار سلول‌ها با وین بلاستین در غلظت های مختلف در این آزمایش فقط در بالاترین غلظت به‌کار رفته (۲ ng/ml)، باعث کاهش معنی‌دار در شاخص تقسیم سلولی شده است ($p<0.05$). همچنین نتایج بیانگر افزایش معنی‌دار ($p<0.05$) در فراوانی میکرونوکلئوس در سلول‌های دو هسته‌ای در دو غلظت ۱/۵ ng/ml و ۲ وین بلاستین است که بیانگر افزایش صدمات کروموزومی در این سلول‌ها است.

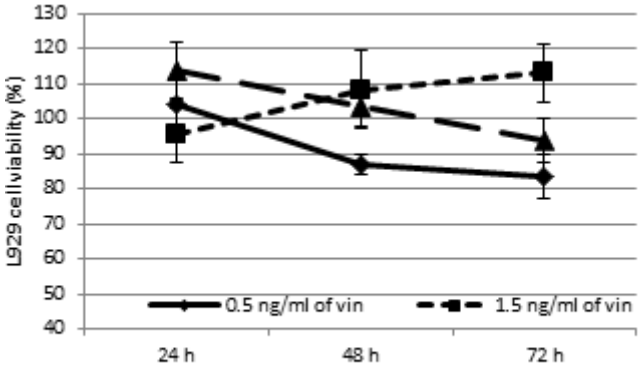
جدول ۱: فراوانی میکرونوکلئوس و شاخص تقسیم (BI) کنترل و گروه‌های تیمار شده با وین‌بلاستین.

		شاخص تقسیم ± SD	فراوانی MnBi ± SD
کنترل		۴۵/۲۳۴±۳/۸۷۲	۱/۶۵±۱/۱۴
وین بلاستین (ng/ml)	۰/۵	۴۲/۳۹±۳/۲۰۴	۵/۴۵±۴/۵۴
	۱/۵	۳۸/۵۰±۴/۷۲۸	۱۲/۸۸±۸/۳۵[a]
	۲	۳۱/۰۱±۱۱/۹۷[a]	۱۰/۵۸±۰/۸۴[a]

[a]: تفاوت معنی دار با کنترل ($p<0.05$)

نتایج حاصل از آزمون MTT پس از تیمار با غلظت‌های مختلف وین‌بلاستین

جهت نشان دادن تاثیر کشندگی احتمالی تیمار ۲۴ ساعته وین بلاستین در سه غلظت ۰/۵، ۱/۵ و ۲ ng/ml، و در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از پایان تیمار از آزمون MTT استفاده شد. نتایج (شکل ۲) نشان می‌دهد که وین بلاستین در ۳ غلظت مورد بررسی تاثیری معنی‌داری بر روی بقا سلول‌ها ندارد که بیانگر عدم سمیت وین بلاستین در این سه غلظت است. جهت انجام مراحل بعدی آزمایش از کمترین غلظت وین بلاستین که توانایی ایجاد آسیب کروموزومی را نشان داد (۱/۵ ng/ml) استفاده شد.



شکل ۲: تاثیر غلظت‌های مختلف وین‌بلاستین بر روی بقا سلولی. داده‌ها نشان‌دهنده میانگین ۳ بار تکرار به همراه SD می‌باشند.

نتایج حاصل از تیمار سلولی با میدان الکترومغناطیسی ثابت و منقطع

نتایج حاصل از بررسی سلولی پس از تیمار با میدان الکترومغناطیس ثابت و منقطع به‌مدت دو ساعت، در جدول ۲ آمده است. نتایج نشان می‌دهد که تیمار سلول‌ها با میدان الکترومغناطیس در هر دو حالت ثابت و منقطع تاثیرمعنی‌داری در میزان تقسیم سلولی نداشته است. درحالی‌که فراوانی میکرونوکلئوس در سلول‌های دو هسته‌ای تحت تاثیر میدان الکترومغناطیس به‌طور معنی‌داری بیشتر از کنترل و سلول‌های میدان خاموش است ($p<0.05$). همچنین نتایج نشان می‌دهند که تیمار سلول‌ها با میدان الکترومغناطیس منقطع باعث افزایش بیشتری در فراوانی میگرونوکلئوس در مقایسه با میدان ثابت شده است ($p<0.05$).

نتایج حاصل از تیمار سلولی با میدان الکترومغناطیسی و وین‌بلاستین

تیمار هم‌زمان سلول‌های L929 با وین بلاستین به‌همراه میدان الکترومغناطیس ثابت و منقطع باعث افزایش معنی‌دار فراوانی میکرونوکلئوس در مقایسه با کنترل شده است($p<0.05$). مقایسه تمام حالات تیمار شده با میدان الکترومغناطیس به‌دو شکل منقطع و ثابت و همچنین حالات تیمار شده هم‌زمان میدان و وین بلاستین نشان می دهد که در تمامی حالات فراوانی میکرونوکلئوس القا شده تفاوت معنی‌داری با حالت تیمار با وین بلاستین به‌تنهایی ندارند (جدول ۲).

جدول۲: نتایج حاصل از تاثیر میدان های الکترومغناطیس منقطع و ثابت در حضور و عدم حضور وین بلاسیتن با غلظت ۱/۵ ng/ml

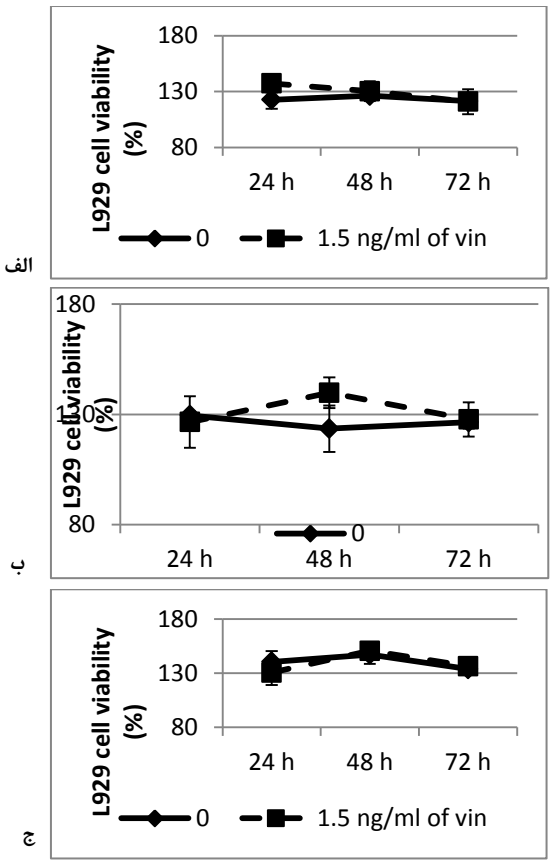
		شاخص تقسیم±SD	فراوانی SD±MnBi
	کنترل	۴۰/۵۰±۹/۵۱	۲/۶۴±۱/۱۴
	وین بلاستین(۱/۵ ng/ml)	۳۸/۵۰±۴/۷۲۸	۱۲/۸۸±۸/۳۵[a]
میدان خاموش	- وین بلاستین(۱/۵ ng/ml)	۴۲/۳۲±۷/۷۹	۲/۵۱±۰/۸۴
	+ وین بلاستین(۱/۵ ng/ml)	۴۲/۳۵±۷/۳۱	۱۳/۴۶±۳/۴۲[a]
میدان پیوسته	- وین بلاستین(۱/۵ ng/ml)	۳۰/۶۱±۲/۱۷	۸/۷۲±۲/۰۸[a,b]
	+ وین بلاستین(۱/۵ ng/ml)	۳۴/۱۲±۳/۴۴	۱۴/۰۲±۲/۹۰[a]
میدان منقطع	- وین بلاستین(۱/۵ ng/ml)	۴۰/۸۴±۱۱/۵۹	۱۳/۳۶±۱/۷۷[a]
	+ وین بلاستین(۱/۵ ng/ml)	۴۷/۹۰±۴/۲۸	۱۳/۹۳±۲/۱۷[a]

[a]: تفاوت معنی دار با کنترل($p<0.05$). [b]: تفاوت با سایر گروه های تیمار شده ($p<0.05$)

در حالی‌که سلول‌های تحت تاثیر میدان الکترومغناطیس ثابت به‌تنهایی فراوانی کمتری از میکرونوکلئوس را در مقایسه با سایر تیمارها نشان می‌دهند ($p<0.05$). در تمامی حالات شاخص تقسیم تغییر معنی‌داری را با کنترل نشان نمی‌دهد.

نتایج حاصل از آزمون MTT پس از تیمار با میدان الکترومغناطیسی و وین‌بلاستین

جهت بررسی اثر سمی میدان الکترومغناطیس و وین بلاستین با غلظت ۱/۵ ng/ml بر روی سلول‌های L929، در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت آزمون MTT انجام شد. نتایج این آزمون در تیمارهای مختلف با وین بلاستین و میدان الکترومغناطیس در شکل ۳ آمده است. نتایج نشان می‌دهد تیمارهای منفرد و ترکیبی تغییری در توان زندگی سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های کنترل ایجاد نکرده است.



شکل۳: نمودار بقای سلولی الف) پس از تیمار با میدان الکترومغناطیسی خاموش و وین‌بلاستین، ب) پس از تیمار با میدان الکترومغناطیسی پیوسته و وین‌بلاستین و ج) پس از تیمار با میدان الکترومغناطیسی منقطع و وین‌بلاستین در بازه‌های زمانی ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت. (داده‌ها نشان دهنده میانگین ۳ بار تکرار در هر تیمار به‌همراه SD است).

بحث

امروزه سرطان به‌عنوان یک بیماری با منشا ژنتیکی، از جمله مشکلات جدی است که سلامت بشر را به‌شدت تهدید می‌کند (۱۴). مطالعات متعددی، نقش مهم آنیوپلوئیدی را در سرطانی شدن سلول‌های سالم پیشنهاد می‌کنند (۱۵ و ۱۶) آنیوپلوئیدی نتیجه عدم تفکیک صحیح کروموزومی در تقسیمات سلولی است. با توجه به نقش و اهمیتی که آنیوپلوئیدی در بیماری سرطان دارد شناسایی عوامل موثر در شروع و پیشرفت آن نیز امری ضروری است. در مطالعه حاضر رابطه میدان الکترومغناطیسی با طول موج نزدیک به امواج تلفن‌های همراه(MHz 900) در ایجاد شرایط مناسب جهت وقوع آنیوپلوئیدی، به‌همراه تیمار با وین بلاستین بر روی سلول‌های L929 مورد مطالعه قرار گرفت.

وین بلاستین از جمله آلکالوئیدهای وینکا بوده که خاصیت آنیوژنیک آن با مطالعات متعدد مورد تایید و بررسی قرار گرفته است. در مطالعات صورت پذیرفته تیمار سلول‌های در محیط کشت با دوزهای حتی پایین این دارو باعث افزایش صدمات تعدادی کروموزومی از قبیل جاماندن و یا مهاجرت همزمان کروموزومی شده است (۱۷ و ۱۸). در مطالعه حاضر نیز تیمار سلول‌های L929 با دوزهای غیر کشنده وین بلاستین باعث افزایش فراوانی میکرونوکلئوس در سلول‌های تیمار شده شد. با توجه به توانایی آنیوژنیک قوی وین بلاستین، می‌توان انتظار داشت که این افزایش فراوانی به‌دلیل اختلال در مهاجرت کروموزوم‌ها در هنگام تقسیمات سلولی بوده و نتیجه جاماندن کروموزوم کامل است. تیمار رده سلولی Luc2 با غلظت‌های مختلف وین بلاستین باعث افزایش فراوانی میکرونوکلئوس‌های دارای کینه توکور می‌شود که نشان‌دهنده افزایش جاماندن کروموزوم ها در هنگام تقسیم سلولی است (۱۹). وین بلاستین با ایجاد اختلال در ساختار میکروتیوبول‌های دوک تقسیم باعث قطع ارتباط کروموزوم ها با رشته های دوک و افزایش صدمات تعدادی کروموزومی در سلول می‌شود (۲۰).

در ارتباط با توانایی میدان های الکترومغناطیس با طول موج پایین ساطع شده توسط تلفن‌های همراه در ایجاد صدمات کروموزومی نتایج متفاوتی وجود دارد (۲۱ و ۲۲). در مطالعه حاضر تیمار سلول‌های L929 در میدان الکترومغناطیس با طول موج مشابه طول موج تلفن‌های همراه سبب افزایش صدمات کروموزومی به‌صورت افزایش فراوانی میکرونوکلئوس شد. این امواج اثرات تخریبی خود را به کروموزوم‌ها از سه طریق: تاثیرات حرارتی، تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و تغییر فرآیند ترمیم DNA به‌جا می‌گذارند (۲۳). در این بررسی، میدان الکترومغناطیس منقطع باعث افزایش فراوانی میکرونوکلئوس‌های القایی در مقایسه با میدان الکترومغناطیس ثابت با شدت و طول موج مشابه شد. تاثیر جدی تر میدان الکترومغناطیس منقطع بر تمامیت ژنتیکی سلول می‌تواند به‌دلیل ایجاد نوسانات بسیار کوچک القایی بر DNA که سبب از هم گسیختگی ساختاری آن می‌شود و یا بر اثر القای تغییرات بر محیط اطراف ماده ژنتیکی با تاثیر مخرب بر روی ملکول DNA باشد (۲۴).

هم‌چنان‌که از نتایج مشخص است، تیمار هم‌زمان سلول‌ها با وین بلاستین در میدان الکترومغناطیس منقطع باعث افزایش بیشتر فراوانی صدمات کروموزومی نسبت به سلول‌های تیمار شده فقط با وین بلاستین، نشده است. بررسی ها نشان می‌دهد سلول‌های تیمار شده در میدان

الکترومغناطیس به‌دلیل القای صدمات سلولی در مرحله S از چرخه سلولی، متوقف می‌شوند (۲۵) این توقف ممکن است ناشی از صدمه به سیستم سنتزی DNA و یا تعمیری آن باشد و یا در اثر اختلال در حرکت چنگال همانند سازی به‌دلیل بریدگی‌های در رشته‌های DNA ایجاد شده باشد (۲۵). توقف و یا اختلال در حرکت سلول درون چرخه سلولی غیر مستقیم باعث عدم توانایی وین بلاستین در ایجاد صدمات اختصاصی خود که القای آنیوپلوئیدی است خواهد شد. لازمه مشاهده میکرونوکلئوس های ناشی از جاماندن کروموزومی حرکت و عبور سلول از فاز تقسیم است. اختلال و توقف در مرحله S باعث کاهش در فراوانی میکرونوکلئوس‌های القایی توسط وین بلاستین می‌شود. به‌نظر می رسد تاخیر حرکت سلول‌ها در چرخه سلولی در آن‌هایی که با میدان الکترومغناطیس منقطع تیمار شده اند بیشتر از سلول‌های تیمار شده با میدان الکترومغناطیس ثابت باشد. چراکه گروه دوم سلولی تیمار شده با وین بلاستین افزایش معنی‌داری در فراوانی میکرونوکلئوس نسبت به‌حالتی که فقط تحت تاثیر میدان الکترومغناطیس قرار گرفته اند را نشان می‌دهد. مشابه این نتیجه در کشت لنفوسیت‌های انسانی و یا در اووسیت‌های موشی نیز مشاهده شده و نشان داده شده است که تیمار با وین‌بلاستین اثر میدان الکترومغناطیسی پیوسته را تقویت کرده و باعث افزایش میکرونوکلئوس‌ها می‌شود (۲۶ و ۲۷).

براساس نتایج حاضر به نظر می‌رسد میدان‌های الکترومغناطیس با فرکانس معادل امواج موبایل قابلیت ایجاد صدمات کروموزومی را به سلول در شرایط آزمایش شده دارا می‌باشند. نتایج حاضر توسط مطالعات مشابه دیگری در شرایط *in vitro* و *in vivo* تایید شده‌اند (۲۲ و ۲۵). اگرچه خلاف این نتایج نیز گزارش شده است (۲۸). تفاوت‌ها ممکن است به‌دلیل تفاوت در نحوه انجام آزمایش و یا نوع سلول‌های به‌کار رفته باشد.

نتیجه گیری

میدان الکترومغناطیس با شدت مشابه امواج تلفن‌های همراه، در شرایط آزمایشگاهی طراحی شده، توانایی القای صدمات کروموزومی به رده سلولی L929 را دارد. از دو میدان الکترومغناطیس منقطع و پیوسته، میدان منقطع صدمات بیشتری را به مجموعه کروموزومی سلول‌های مورد بررسی وارد نموده است. تیمار هم‌زمان سلول‌های تحت تاثیر میدان الکترومغناطیس با وین بلاستین باعث افزایش صدمات کروموزومی القایی نشده است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه با عنوان "بررسی تاثیر امواج الکترومغناطیس با فرکانس پایین در ایجاد آنیوپلوئیدی القایی با وین بلاستین در سلول‌های L929 با استفاده از روش آزمون میکرونوکلئوس در سلول‌های دو هسته ای" در مقطع کارشناسی ارشد با کد ۳/۳۱۵۱۵ است که با حمایت دانشگاه فردوسی مشهد اجرا شده است.

منابع

1. Grade M, Difilippantonio MJ, Camps J. Patterns of chromosomal aberrations in solid tumors, in Chromosomal Instability in Cancer Cells. 2015; Springer. p. 115-142.

2. Mandrioli, D, et al. Aneuploidy: a common and early evidence-based biomarker for carcinogens and reproductive toxicants. Environ Health, 2016. 15(1): 97.

3. Pihan GA. Centrosome dysfunction contributes to chromosome instability, chromoanagenesis, and genome reprograming in cancer. Frontiers in oncology. 2013; 3: 277.

4. Siegel JJ, Amon A. New insights into the troubles of aneuploidy. Annual review of cell and developmental biology. 2012; 28(1): 189-214.

5. Nicholson JM, Duesberg P. On the karyotypic origin and evolution of cancer cells. Cancer genetics and cytogenetics, 2009; 194(2): 96-110.

6. Hassold T, Hall H, Hunt P. The origin of human aneuploidy: where we have National Academy of Sciences. 2000; 97(7): 3236-3241.

16. Duesberg P, et al. Aneuploidy and cancer: from correlation to causation, in Infection and inflammation: impacts on oncogenesis. 2006; Karger Publishers. 16-44.

17. Huber R, et al. Detection of centromeres in vinblastine and radiation induced micronuclei of human lymphocytes using FISH with an α satellite pancentromeric DNA probe. Environmental and molecular mutagenesis. 1996; 27(2): 105-109.

18. Marshall RR, et al. Fluorescence in situ hybridisation with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 1996; 372(2): 233-245.

19. Lynch A, Parry J. The cytochalasin-B micronucleus/kinetochore assay in vitro: studies with 10 suspected aneugens. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 1993; 287(1): 71-86.

20. Wendell KL, Wilson L, Jordan MA. Mitotic block in HeLa cells by vinblastine: ultrastructural changes in kinetochore-microtubule attachment and in centrosomes. Journal of Cell Science. 1993; 104(2): 261-274.

21. RosLlor I, et al. Effect of mobile phones on micronucleus frequency in human exfoliated oral mucosal cells. Oral diseases. 2012; 18(8): 786-792.

22. Daroit NB, et al. Cell phone radiation effects on cytogenetic abnormalities of oral mucosal cells. Brazilian oral research. 2015; 29(1): 1-8.

been, where we are going. Human molecular genetics, 2007; 16(R2): R203-R208.

7. Elwood JM. A critical review of epidemiologic studies of radiofrequency exposure and human cancers.

Environmental Health Perspectives. 1999;107(Suppl 1): 155.

8. Crumpton MJ, Collins AR. Are environmental electromagnetic fields genotoxic? DNA repair, 2004; 3(10): 1385-1387.

9 .Carbonari K, et al. Increased micronucleated cell frequency related to exposure to radiation emitted by computer cathode ray tube video display monitors. Genetics and Molecular Biology. 2005; 28(3): 469-474.

10. Mashevich M, et al. Exposure of human peripheral blood lymphocytes to electromagnetic fields associated with cellular phones leads to chromosomal instability. Bioelectromagnetics. 2003; 24(2): 82-90.

11. Mazor R, et al. Increased levels of numerical chromosome aberrations after in vitro exposure of human peripheral blood lymphocytes to radiofrequency electromagnetic fields for 72 hours. Radiation research. 2008; 169(1): 28-37.

12. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2000; 455(1): 81-95.

13. Ozdemir KG, Yılmaz H, Yılmaz S. In vitro evaluation of cytotoxicity of soft lining materials on L929 cells by MTT assay. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. 2009; 90(1): 82-86.

14. Jemal A, et al. Global cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians. 2011; 61(2): 69-90.

15. Li R, et al. Aneuploidy vs. gene mutation hypothesis of cancer: recent study claims mutation but is found to support aneuploidy. Proceedings of the

23. Ruediger HW. Genotoxic effects of radiofrequency electromagnetic fields. Pathophysiology. 2009; 16(2): 89-102.

24. Davies E, et al. A weak pulsed magnetic field affects adenine nucleotide oscillations, and related parameters in aggregating Dictyostelium discoideum amoebae. Bioelectrochemistry and bioenergetics. 1999; 48(1): 149-162.

25. Mihai CT, et al. Extremely low-frequency electromagnetic fields cause DNA strand breaks in normal cells. Journal of Environmental Health Science and Engineering. 2014; 12(1): 15.

26. Mailhes JB, et al. Electromagnetic fields enhance chemically-induced hyperploidy in mammalian oocytes. Mutagenesis. 1997; 12(5): 347-351.

27. Verheyen G, et al. Effect of coexposure to 50 Hz magnetic fields and an aneugen on human lymphocytes, determined by the cytokinesis block micronucleus assay. Bioelectromagnetics. 2003; 24(3): 160-164.

28. Bourthoumieu S, et al. Aneuploidy studies in human cells exposed in vitro to GSM-900 MHz radiofrequency radiation using FISH. Int J Radiat Biol. 2011; 87(4) : 400-8.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Winter 2018; 8(4) *Original Article*

Analysis the effect of low frequency Electromagnetic wave on vinblastine-induced chromosomal abnormalities in L929 cells using Micronucleus assay on Binucleated cells

Vafaeerad M, MSc.[1], Haddad F, PhD. [2*], Moghadam Matin M, PhD. [2,3]

1. MSc. in Cell and Molecular Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3. Cell and Molecular Biotechnology Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

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

Received: 17 Sep. 2017 Accepted: 29 Apr. 2018

Abstract

Aim: In this study, the genotoxic effect of low frequency electromagnetic wave that is similar to mobile phones in wavelength, as a main source of producing this waves, in combination with a known aneugen (vinblastine) was investigated on the cultured cells.

Material and Methods: L929 cells were exposed to two forms of continues and discontinues electromagnetic waves with wave length of 900MGh in absence and presence of 1.5 ng/ml of vinblastine for 2 h. Investigation of induced chromosomal abnormalities and cell viability in all treated groups were performed by micronucleus assay on binucleated cells and MTT assay, respectively.

Results: The frequency of micronuclei of cells in continuous and discontinuous electromagnetic fields was significantly higher in comparison with control and cells in turned off electromagnetic field, which represented higher chromosomal aberrations. Co-treatment of the cells with vinblastine did not increase this frequency. Analysis of toxicity showed no decrease in cell viability in all treated groups.

Conclusion: findings represented the ability of electromagnetic field, especially in form of discontinues, in inducing chromosomal abnormality. Also, co-treatment of cells with electromagnetic filed and vinblastine did not elevate the level of chromosome abnormality.

Key words: Micronucleus assay in Binucleated cells, Electromagnetic waves, Vinblastine, L929 cells