Journal of Cell and Tissue 16(2), Summer (2025) 156-169

Journal of Cell and Tissue
https://jct.araku.ac.ir
ISSN: 2345-3567

Investigating the synergistic effect of chromosomal damage caused by the co-treatment with Vinblastine and Arsenic on HDF cell line using Micronucleus assay on Binucleated cells

Abdi Velmi Kh[a], Haddad F[b]*, Moghadam-Matin M[c]

[a] M.Sc, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[b] Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[c] Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online

Citation: Abdi Velmi Kh, Haddad F, Moghadam-Matin M. Investigating the synergistic effect of chromosomal damage caused by the co-treatment with Vinblastine and Arsenic on HDF cell line using Micronucleus assay on Binucleated cells. Journal of Cell and Tissue. 2025; 16 (2):156-169.

https://doi.org/10.61882/JCT.156

KEYWORDS

Arsenic, heavy metal, vinblastine, micronucleus, HDF cell line

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: Heavy metal refers to any metal with relatively high density, with toxic effects even at ppb levels. Heavy metals are one of the main threats to human health. Arsenic (*As*) is a heavy metal found in our living environment due to its widespread use in industrial activities. Exposure to *As* and its absorption by different tissues may lead to damage to cardiovascular function, skin lesions, high blood pressure, and diabetes. *As* harmful effects on chromosome integrity have been proven a long time ago. It has also been classified as a potent carcinogen by the Environmental Protection Agency (EPA) and the International Agency for Research on Cancer (IARC). One of the damages caused by *As* is chromosome breakages. These damages are the result of this heavy metal's ability in producing free radicals and their interaction with the DNA molecule. The role of aneuploidy in cancer induction has been suggested in several investigations. Aneuploidy can lead to drastic changes in the genetic balance of normal cells, potentially forcing them towards cancer formation.

Aims: Due to the close relation between chromosome instability and cancer induction and the ability of *As* to induce cancer, the question arises whether As can also play a role in chromosome instability? The design of this study is based on answering this question.

Materials and methods: In this study, to analyze potential cell toxicity and chromosome abnormalities induced in different *treatments*, MTT and Micronucleus assay on Binucleated cells were used, respectively. Cell toxicity of different doses of *As* was investigated on HDF cells. According to the results of MTT, three non-toxic

* Corresponding author: Tel: 05138805590
E-mail address: haddad@um.ac.ir
DOI: https://doi.org/10.61882/JCT.156
Received: 13 Feb. 2025; Received in revised form: 20 May. 2025; Accepted: 24 May. 2025
Original Article
© Author

doses of 100, 200, and 300 ng/ml were selected. To be able to understand the effect of *As* treatment on chromosome instability induced by aneugenic agent, vinblastine was used. Vinblastine is classified as an aneugen in several studies. Co-treatment of three doses of *As* and three doses of 0.75, 1.00, and 2.00 ng/ml of vinblastine (Vin) on the induction of chromosome abnormalities was investigated on the HDF cell line using the Micronucleus assay on Binucleated cells.

Results: According to the results of the MTT assay, cell toxicity induced by *As* at 24, 48, and 72 hours was at doses of 604.3, 397.3, and 228.6, respectively. *As* also led to chromosomal abnormalities. Mean frequency of micronucleated binucleates (BiMn) was 0.296, 0497, and 7.270 for 100, 200, and 300 ng/ml, respectively, compared to the frequency of BiMn in the control (0.078). Vinblastine treatment also significantly increased the frequency of BiMn in all doses used compared to the control. Finally, Co-treatment with three doses of vinblastine and three doses of *As* significantly increased chromosomal abnormalities to almost three to seven times compared to solo vinblastine treatment.

Discussion: Results indicate that *As* can induce chromosomal abnormalities, which is represented by an increase in BiMn frequency. In addition, co-treatment with vinblastine and *As* leads to higher chromosomal abnormalities compared to solo treatment with vinblastine. Significant increase in frequency of BiMn in the later experiment suggests that *As* provides a suitable ground for chromosomal abnormalities induced by other aneugenic agents, here, vinblastine. This effect might be the result of direct interference of *As* with mechanisms of cell division control or inducing mutation in genes involved in such mechanisms through oxidative species, which leads to an increase in their errors. In both cases, the results of this study reveal an alternative mechanism for *As*-induced tumor formation.

Conclusion: *As* not only involves cancer formation by direct damage to chromosomes but also provides a suitable ground for chromosomal mis-segregation in cell divisions, which is believed to be a main step towards cancer formation.

سلول و بافت، دوره ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۴، صفحات ۱۵۶ تا ۱۶۹

سلول و بافت

شاپا الکترونیکی: ۳۵۶۷-۲۳۴۵

بررسی تاثیر هم افزایی صدمات کروموزومی ناشی از تیمار هم‌زمان وین بلاستین و آرسنیک بر رده سلولی HDF با استفاده از آزمون میکرونوکلئوس در سلول‌های دو هسته‌ای

خدیجه عبدی ولمی[۱]، فرهنگ حداد[۲*]، مریم مقدم متین[۳]

[۱] کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، کدپستی ۰۹۱۷۷۹۴۸۹۷۴ azadeh.abdi1991@gmail.com

[۲] دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، کدپستی ۰۹۱۷۷۹۴۸۹۷۴، haddad@um.ac.ir

[۳] استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، کدپستی ۰۹۱۷۷۹۴۸۹۷۴، matin@um.ac.ir

واژگان کلیدی

آرسنیک، فلز سنگین، وین بلاستین، میکرونوکلئوس، رده سلولی HDF

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۲۵

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۲/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۰۳

چکیده

هدف: آرسنیک یکی از فلزات سنگین موجود در محیط زندگی انسان است که تاثیرات خطرناک آن بر سلامت کروموزوم‌ها و همچنین القای سرطان مدت‌هاست که اثبات شده است. عمده صدمات آرسنیک به‌شکل شکستگی‌های کروموزومی می‌باشد. این صدمات ناشی از توان این فلز سنگین در ایجاد رادیکال‌های آزاد و به‌دنبال آن واکنش آن‌ها با مولکول DNA، است. به‌دلیل ارتباط نزدیک بین ناپایداری‌های تعدادی کروموزومی و سرطان، این سوال مطرح است که آیا القای سرطان توسط آرسنیک می‌تواند از طریق القای این نوع ناهنجاری‌ها نیز باشد؟ **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تاثیر کروموزومی هم‌زمان سه غلظت ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ ng/ml از آرسنیک به‌همراه سه غلظت ۰/۷۵، ۱ و ۲ ng/ml از وین بلاستین، یک آنیوژن شناخته شده، بر القای صدمات کروموزومی در رده سلولی HDF با استفاده از آزمون میکرونوکلئوس در سلول‌های دو هسته‌ای مورد بررسی قرار گرفت. **نتایج:** تیمار با آرسنیک ضمن کاهش قدرت زیستایی سلول، باعث ایجاد صدمات کروموزومی شد. همچنین تیمار هم‌زمان با وین بلاستین میزان صدمات کروموزومی را به شکل معنی‌داری بین حدود سه تا هفت برابر در مقایسه با تیمار با وین بلاستین به‌تنهایی، افزایش داد. **نتیجه‌گیری:** نتایج بیانگر این است که تیمار با آرسنیک زمینه مناسب ایجاد اختلالات کروموزومی القایی با وین بلاستین را فراهم می‌نماید. این تاثیر ممکن است از طریق تداخل مستقیم آرسنیک با مکانیسم‌های کنترل صحت تقسیم سلولی بوده یا با ایجاد جهش در ژن‌های دخیل در این فرآیندها باشد.

۱- مقدمه:

فلزات سنگین و تاثیرات مضر آن‌ها بر سلامت انسان مدت‌هاست که مورد توجه محققین قرار دارد. انسان از طرق مختلف از جمله روش‌های طبیعی مثل آب‌های آشامیدنی و یا انجام فعالیت‌های صنعتی مانند ساخت ظروف شیشه‌ای، آلیاژهای فلزی، صنایع میکروالکتریک، آفت‌کش‌های کشاورزی و نگه‌دارنده‌های چوب به‌طور مستمر در معرض این فلزات قرار می‌گیرد (۱). یکی از انواع فلزات سنگین آرسنیک است که در فعالیت‌های صنعتی کاربرد گسترده‌ای دارد. قرار گرفتن در معرض آرسنیک و تجمع

* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۵۱۳۸۸۰۵۵۹۰

آدرس پست الکترونیک: haddad@um.ac.ir

آن در بافت‌ها منجر به اختلالاتی در عملکرد قلب، ایجاد زخم‌های پوستی، القای بیماری‌های عروق محیطی، فشار خون، بیماری پای سیاه، دیابت، نوروتوکسیسیتی و سرطان می‌شود (۲). آرسنیک توسط EPA و IARC از جمله سرطان‌زاهای گروه یک دسته بندی شده است (۳). تخمین زده می‌شود که بیش از ۵۸ میلیون نفر در سراسر جهان در معرض سطوح سرطان‌زا از آرسنیک قرار دارند (۴). افزایش غلظت آرسنیک در محیط زیست تهدید عمده‌ای برای سلامتی انسان به‌شمار می‌رود. این فلز می‌تواند از طریق استنشاق، بلع و تماس پوستی جذب بافت‌ها شده و منجر به اثرات ژنتیکی و سرطانی مثل سرطان پوست شود. علاوه بر این، این عنصر ممکن است از جفت عبور کرده و منجر به افزایش میزان سقط خودبه‌خودی، وزن کم هنگام تولد و مشکلات دیگر در جنین شود (۵). افراد ازنظر زیست محیطی به‌طور عمده از طریق آب آشامیدنی در معرض آرسنیک قرار می‌گیرند. قرار گرفتن طولانی‌مدت در معرض این فلز سنگین یکی از دلایل اصلی ایجاد سرطان است (۶). آرسنیک همچنین در درمان افراد مبتلا به سرطان به‌عنوان یک داروی شیمی درمانی استفاده می‌شود (۷).

سرطان بیماری است که سالانه باعث مرگ و میر هزاران انسان در سراسر جهان می‌شود. میزان مرگ ومیر ناشی از سرطان به مراتب بیشتر از مرگ به‌علت سکته مغزی و سایر بیماری‌های قلبی و عروقی است (۸). یکی از عوامل مهم دخیل در ایجاد سلول‌های سرطانی، آنیوپلوئیدی است (۹, ۱۰). بیش از ۳۰ درصد از تومورهای بافت‌های جامد و ۱۵ درصد از سرطآن‌های خون درجاتی از آنیوپلوئیدی را نشان می‌دهند (۱۱). شواهد حاکی از این است که سیر تکاملی سلول‌های سرطانی از حالت خوش‌خیم به‌حالت تهاجمی و بدخیم با افزایش آنیوپلوئیدی مرتبط است (۱۲).

وین بلاستین اولین آلکالوئید طبیعی با عملکرد ضد تکثیری است که در سال ۱۹۵۸در عصاره برگ‌های گیاه *Vinca rosea* کشف شد. این ماده یک داروی ضد توموری قوی است که کاربرد گسترده‌ای در شیمی‌درمانی سرطان دارد. وین بلاستین با توانایی ایجاد اختلال در عملکرد رشته‌های توبولینی دوک تقسیم، آنیوپلوئیدی را القا می کند (۱۳, ۱۴). این ماده امروزه به‌عنوان یک آنیوژن قدرتمند شناخته شده و در مطالعات متعددی به‌منظور القای آنیوپلوئیدی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۵, ۱۶).

آزمون میکرونوکلئوس روشی بسیار کارآمد، سریع و قابل اعتماد جهت بررسی صدمات کروموزومی است (۱۷). در این روش صدمات ساختاری مانند شکستگی‌های کروموزومی و یا کروماتیدی و صدمات تعدادی مانند جاماندگی کروموزومی در حین مهاجرت قابل بررسی است. قطعات کروموزومی یا کروموزوم‌های کامل جامانده در مرحله آنافاز و مهاجرت کروموزوم‌ها به قطبین به‌صورت ریز هسته‌هایی (میکرونوکلئوس) در کنار هسته‌های اصلی مشاهده می شوند. افزایش در فراوانی میکرونوکلئوس‌ها بیانگر افزایش صدمات کروموزومی است. استفاده از مهار کننده سیتوکینز (cytochalasin-b) باعث ایجاد سلول‌های دو هسته‌ای در پایان تقسیم می‌شود. جهت اطمینان از بررسی صدمات کروموزومی در سلول‌هایی که در طول آزمایش تیمار و تقسیم شده‌اند، شمارش میکرونوکلئوس‌ها در سلول‌های دو هسته‌ای انجام می‌شود (۱۸).

با توجه به نقش دوگانه آرسنیک در درمان و القای سرطان و همچنین ارتباط نزدیک آنیوپلوئیدی و سرطان، مناسب است که توانایی القا یا زمینه سازی ایجاد آنیوپلوئیدی توسط این فلز بررسی شود. در مطالعه حاضر تاثیر افزایش آسیب پذیری سلولی به وین بلاستین پس از تیمار با غلظت‌های مختلف آرسنیک مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی صدمات کروموزمی القایی از آزمون میکرونوکلئوس در سلول‌های دو هسته‌ای استفاده شد.

۲- مواد و روش‌ها:

پژوهش حاضر تحت نظارت کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه فردوسی مشهد و با کد IR.UM.REC.1400.070 صورت پذیرفت.

رده سلولی: در مطالعه حاضر از رده سلولی فیبروبلاستی طبیعی انسان (HDF)که از بانک سلولی آزمایشگاه کشت سلول گروه زیست شناسی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شده بود، استفاده شد. محیط کشت مورد استفاده high glucose DMEM کامل شده با ۱۵ درصد FBS بود. سلول‌ها در این محیط در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با میزان ۵ درصد CO_2 قرار داده شدند. پاساژ سلولی هر ۷۲ ساعت و با رسیدن سلول‌ها به ۹۰ درصد هم‌پوشی انجام شد.

بررسی زنده مانی: جهت بررسی زنده مانی سلول‌ها از روش MTT استفاده شد.

سلول‌ها با تراکم ۸۰۰۰ در چاهک‌های ظرف ۹۶ خانه با میزان ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت، کشت شدند. پس از ۲۴ ساعت چهار غلظت ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ ng/ml از آرسنیک و چهار غلظت ۰/۵، ۱/۰۰، ۱/۵۰ و ۲/۰۰ ng/ml از وین بلاستین به چاهک‌ها اضافه شد. همچنین سلول‌ها تحت تاثیر تیمار هم‌زمان این دو ماده قرار گرفتند. برای این منظور، به چاهک‌ها چهار غلظت آرسنیک و چهار غلظت وین بلاستین به‌طور هم‌زمان افزوده شد. برای هر غلظت/زمان سه تکرار در نظر گرفته شد. پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از تیمار، محیط کشت حاوی ۱۰ درصد رنگ MTT جایگزین محیط قبلی شد. پس از گذشت ۴ ساعت محلول DMSO به چاهک‌ها اضافه و در نهایت توسط دستگاه ELISA reader (Awareness) در طول موج nm۵۴۵ خوانش میزان رنگ انجام شد.

آزمون میکرونوکلئوس: سلول‌ها در فلاسک‌های کشت T25 با میزان هم‌پوشی ۶۰ درصد تحت تیمار چهار غلظت۲۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ ng/ml آرسنیک و چهار غلظت ۰/۷۵، ۱/۰۰، ۱/۵۰ و ۲/۰۰ ng/ml از وین بلاستین قرار گرفتند. جهت تیمار هم‌زمان ابتدا در فلاسک‌های جداگانه غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ ng/ml از آرسنیک اضافه و پس از گذشت ۲ ساعت غلظت‌های ۰/۷۵، ۱/۵۰ و ۲/۰۰ ng/ml از وین بلاستین به‌طور مجزا افزوده شد. هر تیمار در دو محیط کشت موازی انجام شد.

آزمون میکرونوکلئوس بر اساس روش پیشنهادی Fenech با کمی تغییر صورت پذیرفت (۱۸). بدین شکل که، پس از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار ها cyto-b با غلظت نهایی ۴ µg/ml به محیط‌های کشت اضافه شد. سلول‌های تیمار شده با cyto-b پس از گذشت ۲۴ ساعت با کمک تریپسین برداشت شده و به لوله‌ی سانتریفوژ منتقل شدند. پس از سانتریفوژ در دور ۱۰۰۰ و زمان ۱۰ دقیقه و دور ریختن محلول رویی سلول‌ها توسط محلول هایپوتونیک KCl (۰/۰۷۵ مولار) به‌مدت ۱۰ دقیقه مجاورشدند. دو بار شستشو با محلول فیکساتور متانول: اسید استیک (۱:۳) و سپس معلق سازی سلول‌ها در مقدار اندکی از فیکساتور مراحل بعدی کار بودند. از سوسپانسیون سلولی تعداد ۵-۶ قطره بر روی لام‌های میکروسکوپی تمیز و سرد ریخته و گسترش داده شد. پس از خشک شدن لام‌ها در محیط، رنگ آمیزی آن‌ها با کمک گیمسا ۱۰ درصد به‌مدت ۱۸ دقیقه انجام شد.

شمارش سلولی: شمارش سلولی بر روی سلول‌های دو هسته‌ای (Binucleated cells) (Bi) انجام شد. بر روی هر لام حداقل ۴۰۰ سلول دو هسته‌ای بررسی و تعداد سلول‌های دو هسته‌ای دارای میکرونوکلئوس (Micronucleated Binucleated cells) (BiMn) شمارش شدند. فراوانی BiMn از فرمول زیر به‌دست آمد:

٪ of BiMn= (BiMn)/ (Total Bi scored) x 100

۳- آنالیز آماری

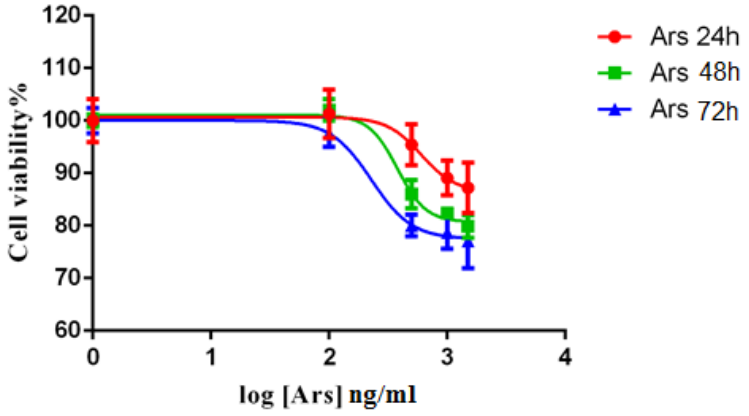
آنالیز آماری نتایج MTT با کمک نرم افزار Graph Pad Prism6 انجام شد. نتایج حاصل از این بررسی با کمک نرم افزار Sigmaplot به‌صورت نمودار ترسیم شد.

آنالیز آماری داده‌های آزمون میکرونوکلئوس توسط نرم افزار MINITAB نسخه ۱۹ صورت پذیرفت. در بررسی این داده‌ها از آزمون واریانس یک‌طرفه و آزمون t با سطح معنی‌داری $p<0.05$ استفاده شد. نمودارها با کمک نرم افزار GraphPad Prism 8 و Excel رسم شد.

۴- نتایج:

بررسی زیستایی سلول‌ها پس از تیمار با آرسنیک

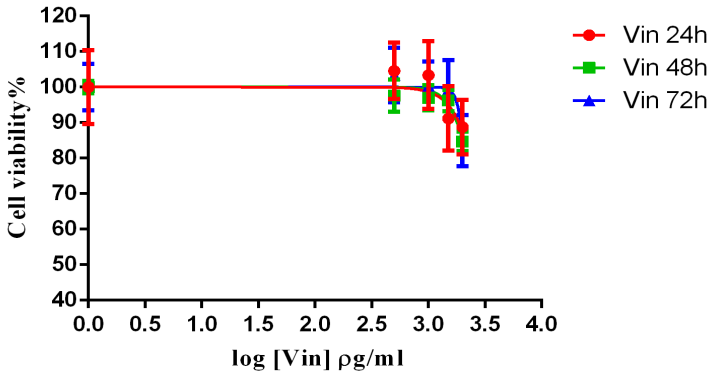
نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک (۱۰۰ ng/ml -۱۵۰۰) بر زیستایی سلول‌های HDF نشان داد که آرسنیک به‌صورت وابسته به غلظت موجب کاهش درصد زیستایی در آن‌ها می‌شود (نمودار۱). مقادیر IC50 در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار با آرسنیک ، به‌ترتیب ۳/۶۰۴، ۳/۳۷۹ و ۶/۲۲۸ ng/ml به‌دست آمد.



نمودار۱: تاثیر تیمار با غلظت‌های مختلف آرسنیک بر توان زیستی سلول‌های HDF

بررسی زیستایی سلول‌ها پس از تیمار با وین بلاستین

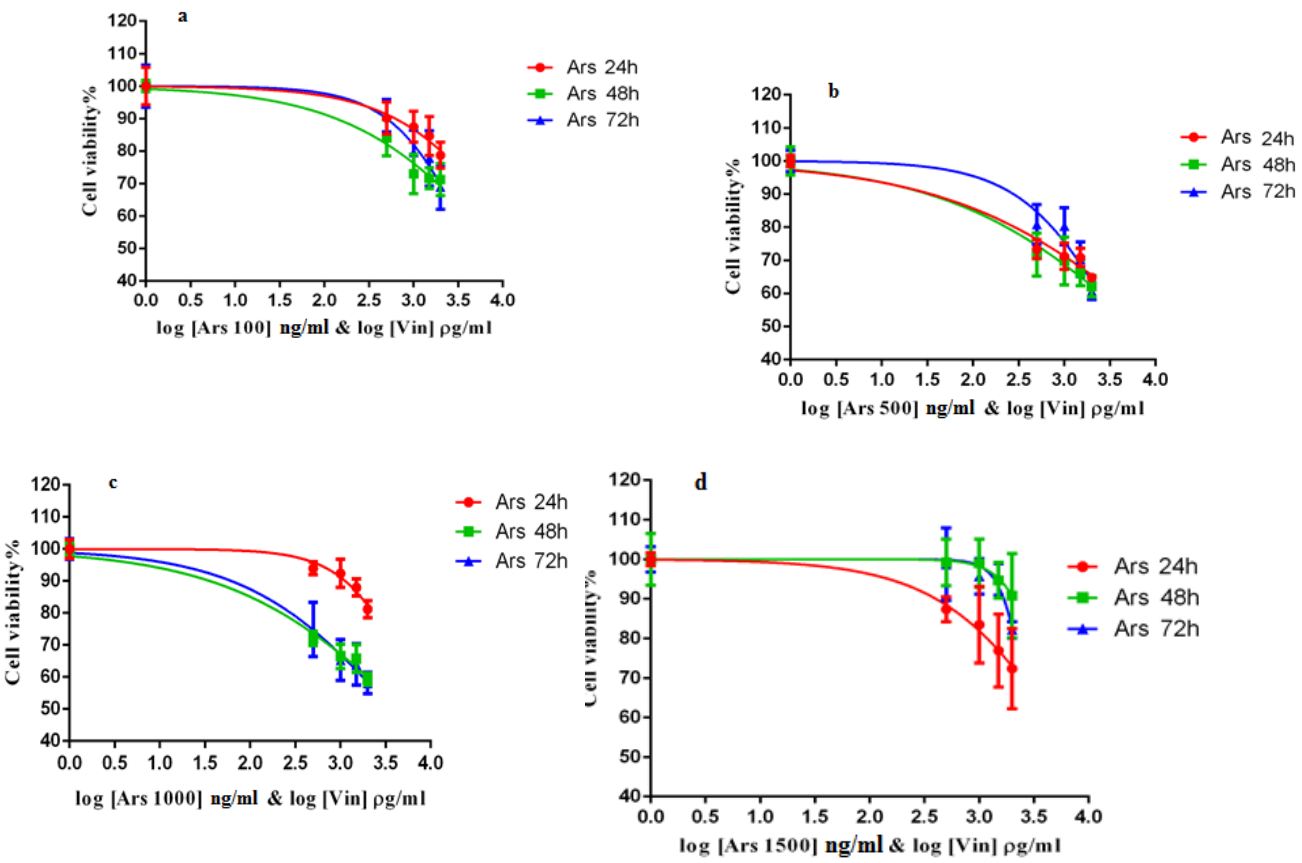
بررسی زیستایی سلول‌ها پس از تیمار با غلظت‌های مختلف وین بلاستین (ng/ml ۲- ۰/۵) در مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بیانگر کاهش زیستایی آن‌ها است (نمودار۲). مقادیر IC50 محاسبه شده در مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ، به‌ترتیب ۳/۶، ۳/۰ و ۲/۳ ng/ml می‌باشد.



نمودار۲: تاثیر تیمار با غلظت‌های مختلف وین بلاستین بر توان زیستی سلول‌های HDF

تیمار هم‌زمان با وین بلاستین و آرسنیک

نتایج حاصل از بررسی اثر توامان غلظت‌های مختلف آرسنیک (ng/ml ۱۰۰- ۱۵۰۰) و غلظت‌های مختلف وین بلاستین (ng/ml ۲- ۰/۵) در مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر زیستایی سلول‌های HDF نشان داد که تیمارتوام آرسنیک و وین بلاستین به‌صورت وابسته به غلظت موجب کاهش معنی‌داری در درصد زیستایی سلول‌ها تا ۶۰ درصد می‌شود (نمودار ۳).



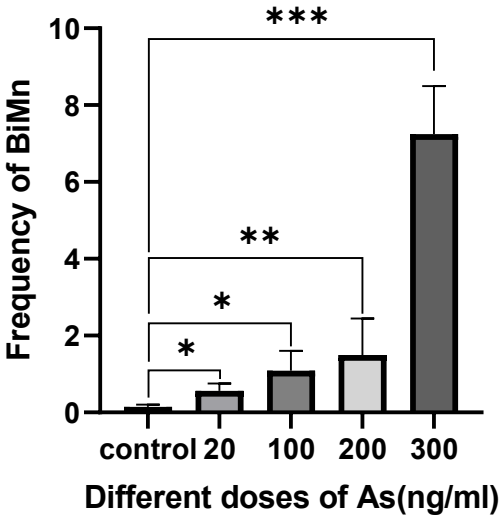
نمودار۳: تاثیر تیمار هم‌زمان غلظت‌های مختلف وین بلاستین و a) غلظت ng/ml ۱۰۰ آرسنیک، b) غلظت n g/ml ۵۰۰ آرسنیک، c) غلظت ng/ml ۱۰۰۰ آرسنیک و d) غلظت ng/ml ۱۵۰۰ آرسنیک بر توان زیستی سلول‌های HDF

بررسی صدمات کروموزومی با استفاده از آزمون میکرونوکلئوس

با توجه به کشنده بودن آرسنیک در غلظت‌های بالای ng/ml ۳۰۰ و نیاز به سلول‌های زنده در حال تقسیم برای انجام آزمون میکرونوکلئوس، در بخش دوم کار و برای بررسی صدمات کروموزومی ناشی از تیمار با آرسنیک، از غلظت‌های زیر ng/ml ۳۰۰ استفاده شد.

تیمار آرسنیک

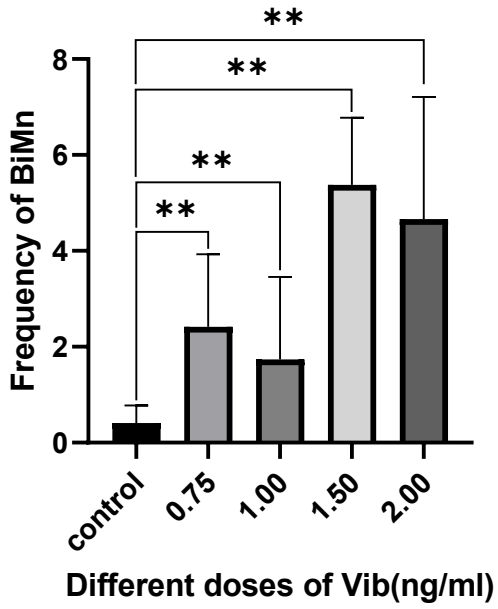
تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۲۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ng/ml ۳۰۰ آرسنیک منجر به افزایش معنی‌دار و وابسته به غلظت در فروانی سلول‌های دو هسته‌ای دارای میکرونوکلئوس شد ($p<0.05$). نتایج این تیمار و تاثیر آن در افزایش فراوانی BiMn در نمودار ۴ آمده است.



نمودار۴: فراوانی سلول‌های دو هسته‌ای دارای میکرونوکلئوس (BiMn) در نتیجه تیمار با غلظت‌های مختلف آرسنیک (ng/ml). * p<0.05، ** p<0.01، *** p<0.001

تیمار با وین بلاستین

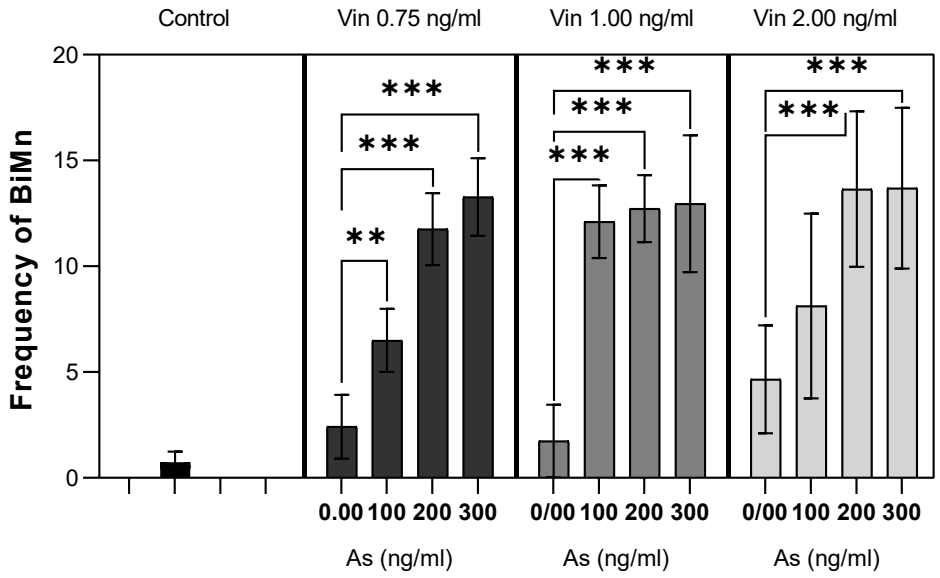
نمودار ۵ نتیجه تیمار سلول‌های HDF با چهار غلظت ۰/۷۵، ۱/۰۰، ۱/۵۰ و ۲/۰۰ ng/ml وین بلاستین را نشان می‌دهد. تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف وین بلاستین باعث افزایش معنی‌دار فراوانی BiMn در همه غلظت‌ها شده است (p<0.01).



نمودار ۵: فراوانی سلول‌های دو هسته‌ای دارای میکرونوکلئوس (BiMn) در نتیجه تیمار با غلظت‌های مختلف وین بلاستین. ** p<0.01

تیمار هم‌زمان آرسنیک و وین بلاستین

نمودار ۶ نتایج حاصل از تیمار سلول‌ها با سه غلظت ۰/۷۵، ۱/۰۰ و ۲/۰۰ ng/ml وین بلاستین را پس از تمیار با سه غلظت ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ ng/ml آرسنیک نشان می‌دهد. در تمام موارد، تیمار هم‌زمان سلول‌ها با آرسنیک و وین بلاستین باعث افزایش معنی‌دار در فراوانی BiMn در مقایسه با کنترل شده است ($p<0.01$). افزایش فراوانی BiMn وابسته به افزایش غلظت آرسنیک در تیمارهای مختلف با وین بلاستین است.



نمودار ۶: فراوانی سلول‌های دو هسته‌ای دارای میکرونوکلئوس (BiMn) در نتیجه تیمار با غلظت‌های مختلف آرسنیک پس از تیمار با ۰/۷۵ ng/ml، ۱/۰۰ ng/ml و ۲/۰۰ ng/ml وین بلاستین. ** $p<0.01$، *** $p<0.001$

همچنین در این نمودار فراوانی BiMn در سلول‌های تیمار شده با وین بلاستین به‌تنهایی با سلول‌های تیمار شده به‌شکل هم‌زمان با غلظت‌های مختلف آرسنیک و وین بلاستین مقایسه شده است. چنان‌که مشخص است، تیمار با آرسنیک سبب افزایش معنی‌دار در فراوانی BiMn در مقایسه با غلظت‌های نظیر از وین بلاستین بدون آرسنیک شده است ($p<0.01$). بیشترین تفاوت مربوط به غلظت‌های بالای آرسنیک استفاده شده در این آزمایش بوده است.

۵- بحث

در مطالعه حاضر تاثیر کشندگی آرسنیک بر سلول‌های HDF مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات انجام شده بر روی آرسنیک طیف وسیعی از غلظت را مورد بررسی قرار داده اند (۱۹-۲۱). بسته به نوع و شرایط آزمایش غلظت کشنده آرسنیک از مقادیر پایین معادل ۱۰۰ تا غلظت‌های بالای حدود ۱۰۰۰ ng/ml متغیر بوده است. جهت پوشش این طیف وسیع غلظتی جهت یافتن غلظت کشنده در این آزمایش، چهار غلظت ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ ng/ml از آرسنیک مورد استفاده قرار گرفت.

تیمار سلول‌ها با آرسنیک در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف باعث کاهش قدرت زیستایی سلول‌ها شد. این کاهش در تیمار همزمان با وین بلاستین نیز مشاهده شد. به‌طور کلی با افزایش زمان تیمار، قدرت زیستایی نیز کاهش بیشتری را نشان داد. سایر مطالعات نیز تاثیر کشنده بودن تیمار با غلظت‌های مختلف آرسنیک را در دوره‌های زمانی مختلف نشان داده اند (۱۹-۲۱). آرسنیک با افزایش سطح گونه‌های فعال اکسیژن، کاهش پتانسیل غشای میتوکندری و فعال کردن مسیرهای متعدد استرس و مرگ سلولی باعث کاهش توانایی زنده ماندن سلول‌های تیمار شده می‌شود (۷). سلول‌های تیمار شده با آرسنیک و ترکیبات معدنی آن به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش بیان پروتئین سکیورین را نشان دادند. کاهش سکیورین به‌نوبه خود باعث القای آپوپتوزیس از مسیر غیر P53 می‌شود (۲۲).

بررسی صدمات کروموزومی القایی توسط آرسنیک و وین بلاستین توسط آزمون میکرونوکلئوس انجام پذیرفت. از آن‌جایی‌که انجام این آزمون بر اساس توانایی تقسیم سلولی است، غلظت‌های انتخاب شده در این بخش زیر غلظت کشنده آرسنیک و وین بلاستین بود. تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف آرسنیک باعث افزایش فراوانی میکرونوکلئوس شد. تشکیل میکرونوکلئوس بیانگر شکستگی یا جاماندن کروموزوم‌ها در حین تقسیم سلولی ست. لذا افزایش فراوانی میکرونوکلئوس نشان دهنده افزایش صدمات کروموزومی است. تاثیر آرسنیک بر افزایش فراوانی میکرونوکلئوس در سایر مطالعات برون و درون تنی نیز گزارش شده است (۲۳, ۲۴). آرسنیک با افزایش سطح رادیکال‌های آزاد در سلول‌های تیمار شده می‌تواند آسیب‌های کروموزومی را افزایش دهد. شواهد نشان می‌دهند که اگرچه آرسنیک با مولکول DNA ارتباط مستقیم برقرار نمی‌کند اما با افزایش سطح رادیکال‌های آزاد باعث القای شکستگی‌های تک و دو رشته‌ای در DNA می‌شود (۲۵). سلول‌های تیمار شده با آرسنیک میزان بیان و فعالیت کم‌تری در پروتئین های OGG1 و APE1 که در تعمیر BER نقش کلیدی دارند را نشان داده اند. آرسنیک همچنین می‌تواند با کاهش یا توقف بیان پروتئین‌های موثر در تعمیر از نوع NER مانند ERCC1، XPB و XPF باعث توقف این نوع تعمیر نیز شود (۲۶). لذا سلول‌هایی که در معرض این فلز قرار گرفته اند هم از طریق حمله رادیکال‌های آزاد به مولکول DNA و هم توقف سیستم های تعمیر DNA آسیب پذیری بالایی را به شکستگی‌های کروموزومی نشان خواهند داد.

بررسی‌ها نشان می‌دهد که آرسنیک نه تنها باعث افزایش صدمات کروموزومی می‌شود، بلکه می‌تواند زمینه ساز تاثیر سایر عوامل صدمه زننده به سیستم ژنتیکی و کروموزومی سلول‌ها نیز باشد. استرس اکسیداتیو ناشی از تیمار با آرسنیک سبب تشکیل باز آلی تغییر شکل یافته oxoguanine-8 می‌شود. تشکیل این باز تغییر شکل یافته احتمال جهش G:C به A:T را افزایش می‌دهد. لذا افزایش آسیب پذیری سلول‌های تیمار شده با آرسنیک به سایر عوامل صدمه زننده ژنتیکی می‌تواند نتیجه جهش‌های متعدد ژنومی و از کار افتادن یا کاهش کارایی سیستم‌های کنترلی و تعمیری سلول باشد (۲۷, ۲۸).

وین بلاستین به‌عنوان یک آنیوژن شناخته شده می‌تواند فراوانی میکرونوکلئوس را در سلول‌های تیمار شده افزایش دهد (۲۹). با توجه به ماهیت این ماده انتظار می‌رود این افزایش به‌دلیل اختلالات تعدادی کروموزومی و به‌طور خاص جاماندن کروموزوم‌ها در تقسیم سلولی باشد (۳۰). در مطالعه حاضر تیمار با وین بلاستین باعث افزایش فراوانی میکرونوکلئوس شد که این افزایش مرتبط با توانایی آنیوژنیک وین بلاستین تفسیر می‌شود.

قابل توجه است که وین بلاستین در سلول‌هایی که با غلظت‌های مختلف آرسنیک تیمار شده بودند باعث افزایش بیشتری در فراوانی میکرونوکلئوس در مقایسه با تیمار با وین بلاستین به تنهایی شد. مطالعات نشان داده اند که آرسنیک و ترکیبات مختلف آن می‌توانند باعث تاخیر میتوزی و اختلال در تشکیل دوک تقسیم که منجر به ناپایداری های کروموزومی شوند (۲۰, ۳۱).

همچنین تیمار سلول‌ها با آرسنیک باعث اختلال در چرخه سلول و عملکرد نقاط کنترلی در تقسیم سلول می‌شود (۲۶). سلول‌های تیمار شده با آرسنیک در چرخه سلولی پاسخ درستی به صدمات کروموزومی و DNA نمی‌دهند. به‌طوری‌که سلول‌های صدمه دیده از نقاط کنترلی عبور کرده و در مسیر چرخه سلولی بدون توقف به پیش می‌روند. آرسنیک باعث افزایش بیان cyclin D و cyclin E شده و در همین حال کاهش بیان cyclin F را به‌دنبال دارد. نتیجه این تغییرات در سطوح cyclinهای مختلف فشار به سلول جهت عبور از G1/S به G2/M خواهد بود (۲۶). لذا سلول‌های تیمار شده با آرسنیک بسیار مستعد اختلالات کروموزومی ناشی از خطا در تقسیم سلولی خواهند بود. تیمار هم‌زمان سلول‌ها با آرسنیک و وین بلاستین که القای آنیوپلوئیدی می‌کند، باعث افزایش چشم‌گیر فراوانی میکرونوکلئوس شده است. با توجه به نحوه عمل وین بلاستین و این افزایش در فراوانی میکرونوکلئوس در تیمار هم‌زمان با وین بلاستین و آرسنیک در مقایسه با تیمار وین بلاستین به‌تنهایی، می‌توان نتیجه گرفت که آرسنیک زمینه ساز موثری در افزایش نابسامانی میتوزی و به طبع آن فراوانی اختلالات تعدادی کروموزومی در هنگام تقسیم است.

آرسنیک در بحث سرطان دارای نقشی دوگانه است. این فلز سنگین نه تنها به‌عنوان داروی درمان سرطان استفاده می‌شود بلکه خود می‌تواند یک عامل سرطان‌زا نیز باشد. در نتیجه مطالعه حاضر تا حدودی می‌توان این نقش دوگانه را توضیح داد.

آرسنیک نقش ضد سرطانی خود را از طریق تجمع رادیکال‌های آزاد در سلول‌های سرطانی و در نتیجه مرگ سلولی ایفا می‌کند (۳۲). از طرفی با توجه به نقش تاثیرگذار و مهم آنیوپلوئیدی در القای سرطان می‌توان قدرت آرسنیک در القای سرطان را نه تنها در توان اکسیدانی و اختلال در فرآیند تعمیر DNA دانست، بلکه در ارتباط به توان این ماده در ایجاد نابهنجاری در مهاجرت کروموزومی در میتوز مرتبط نمود (۲۰, ۳۱).

۶- نتیجه‌گیری

آرسنیک به‌عنوان یک فلز سنگین که به‌طور گسترده در زندگی بشر حاضر است، قادر به ایجاد صدمات کروموزومی و ژنتیکی مستقیم از طریق ایجاد رادیکال‌های آزاد است. مطالعه حاضر نشان می‌دهد که این فلز همچنین با زمینه سازی مناسب می‌تواند عامل اصلی در القای آنیوپلوئیدی از طریق سایر عوامل صدمه زننده نیز باشد. این موضوع می‌تواند به‌عنوان پاسخ مناسبی در خصوص تاثیر مثبت این فلز در القای سرطان مورد توجه قرار گیرد.

۷- تشکر و قدردانی

این کار پژوهشی در قالب پایان نامه دانشجویی به شماره ۳/۵۵۲۳۵ در دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. نویسندگان تشکر و قدردانی خود را نسبت به دانشگاه فردوسی مشهد و معاونت پژوهشی آن دانشگاه اعلام می‌دارند. همچنین از همکاری و راهنمایی‌های ارزنده جناب آقای ابراهیم ملکی در روند انجام این پژوهش، تقدیر و تشکر می‌شود.

۸- منابع

1. Stankovic S KP, Stankovic AR. Biota as toxic metal indicators. Environ Chem Lett. 2014; 12:21.

2. Ganie SY, Javaid D, Hajam YA, Reshi MS. Arsenic toxicity: sources, pathophysiology and mechanism. Toxicol Res (Camb). 2024; 13(1): tfad111.

3. Humans IWGotEoCRt. Arsenic, metals, fibres, and dusts. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 2012; 100 (PT C):454.

4. Zhou Q, Xi S. A review on arsenic carcinogenesis: Epidemiology, metabolism, genotoxicity and epigenetic changes. Regul Toxicol Pharmacol. 2018; 99: 78-88.

5. Milton AH, Hussain S, Akter S, Rahman M, Mouly TA, Mitchell K. A Review of the Effects of Chronic Arsenic Exposure on Adverse Pregnancy Outcomes. Int J Environ Res Public Health. 2017; 14.

6. Ahmad SA, Khan MH, Haque M. Arsenic contamination in groundwater in Bangladesh: implications and challenges for healthcare policy. Risk Manag Healthc Policy. 2018; 11: 251-61.

7. Vineetha VP, Raghu KG. An Overview on Arsenic Trioxide-Induced Cardiotoxicity. Cardiovasc Toxicol. 2019; 19(2): 105-19.

8. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer. 2015; 136(5): E359-86.

9. Zasadil LM, Britigan EM, Weaver BA. 2n or not 2n: Aneuploidy, polyploidy and chromosomal instability in primary and tumor cells. Semin Cell Dev Biol. 2013; 24 (4): 370-9.

10. Duesberg P, Li R, Fabarius A, Hehlmann R. Aneuploidy and cancer: from correlation to causation. Contrib Microbiol. 2006; 13:16-44.

11. Holland AJ, Cleveland DW. Losing balance: the origin and impact of aneuploidy in cancer. EMBO Rep. 2012; 13(6): 501-14.

12. Siegel JJ, Amon A. New insights into the troubles of aneuploidy. Annu Rev Cell Dev Biol. 2012; 28: 189-214.

13. Dhamodharan R, Jordan MA, Thrower D, Wilson L, Wadsworth P. Vinblastine suppresses dynamics of individual microtubules in living interphase cells. Mol Biol Cell. 1995; 6(9): 1215-29.

14. Krishan A. Fine structure of the kinetochores in vinblastine sulfate-treated cells. J Ultrastruct Res. 1968; 23(1): 134-43.

15. Cammerer Z, Schumacher MM, Kirsch-Volders M, Suter W, Elhajouji A. Flow cytometry peripheral blood micronucleus test in vivo: determination of potential thresholds for aneuploidy induced by spindle poisons. Environ Mol Mutagen. 2010; 51(4): 278-84.

16. Leopardi P, Marcon F, Dobrowolny G, Zijno A, Crebelli R. Influence of donor age on vinblastine-induced chromosome malsegregation in cultured peripheral lymphocytes. Mutagenesis. 2002; 17(1): 83-8.

17. Kuo B, Beal MA, Wills JW, White PA, Marchetti F, Nong A, et al. Comprehensive interpretation of in vitro micronucleus test results for 292 chemicals: from hazard identification to risk assessment application. Arch Toxicol. 2022; 96(7): 2067-85.

18. Fenech M, Morley AA. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. Mutat Res. 1986; 161(2):193-8.

19. Zhong G, Wan F, Ning Z, Wu S, Jiang X, Tang Z, et al. The protective role of autophagy against arsenic trioxide-induced cytotoxicity and ROS-dependent pyroptosis in NCTC-1469 cells. J Inorg Biochem. 2021; 217: 111396.

20. Zhao Y, Toselli P, Li W. Microtubules as a critical target for arsenic toxicity in lung cells in vitro and in vivo. Int J Environ Res Public Health. 2012; 9(2): 474-95.

21. Shafiee F, Safaeian L, Gorbani F. Protective effects of protocatechuic acid against doxorubicin- and arsenic trioxide-induced toxicity in cardiomyocytes. Res Pharm Sci. 2023; 18 (2): 149-58.

22. Chao JI, Hsu SH, Tsou TC. Depletion of securin increases arsenite-induced chromosome instability and apoptosis via a p53-independent pathway. Toxicol Sci. 2006;90(1): 73-86.

23. Dong J, Wang JQ, Qian Q, Li GC, Yang DQ, Jiang C. Micronucleus assay for monitoring the genotoxic effects of arsenic in human populations :A systematic review of the literature and meta-analysis. Mutat Res Rev Mutat Res. 2019; 780: 1-10.

24. Navasumrit P, Chaisatra K, Promvijit J, Parnlob V, Waraprasit S, Chompoobut C, et al. Exposure to arsenic in utero is associated with various types of DNA damage and micronuclei in newborns: a birth cohort study. Environ Health. 2019; 18(1): 51.

25. Kumar M, Lalit M, Thakur R. Natural Antioxidants Against Arsenic-Induced Genotoxicity. Biol Trace Elem Res. 2016; 170(1): 84-93.

26. Tam LM, Price NE, Wang Y. Molecular Mechanisms of Arsenic-Induced Disruption of DNA Repair. Chem Res Toxicol. 2020; 33(3): 709-26.

27. Das S, Upadhaya P, Barhoi D, Nath Barbhuiya S, Langthasa P, Giri S. GCMS analysis of sadagura (smokeless tobacco), its enhanced genomic instability causing potential due to arsenic co-exposure, and vitamin-C supplementation as a possible remedial measure: a study involving multiple model test systems. Drug Chem Toxicol. 2022; 45(1): 185-96.

28. Faita F, Cori L, Bianchi F, Andreassi MG. Arsenic-induced genotoxicity and genetic susceptibility to arsenic-related pathologies. Int J Environ Res Public Health. 2013; 10(4): 1527-46.

29. Mohammadi Z, Haddad F, M MM, Soleymanifard S. Investigating the Vinblastine Induced-Chromosomal Abnormality in the Already Gamma Irradiated L929 Cell Line Using Micronucleus Assay in Cytokinesis Blocked Binucleated Cells. Asian Pac J Cancer Prev. 2019; 20(4): 1045-50.

30. Gonzalez-Cid M, Cuello MT, Larripa I. Comparison of the aneugenic effect of vinorelbine and vincristine in cultured human lymphocytes. Mutagenesis. 1999; 14(1): 63-6.

31. Ganapathy S, Liu J, Xiong R, Yu T, Makriyannis A, Chen C. Chronic low dose arsenic exposure preferentially perturbs mitotic phase of the cell cycle. Genes Cancer. 2019; 10(1-2): 39-51.

32. Skoczynska A ,Skoczynska M. Breast Cancer and Arsenic Anticancer Effects: Systematic Review of the Experimental Data from In Vitro Studies. Biomed Res Int. 2022; 2022: 8030931.