● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ یازدهم، شمارهٔ ۲، ص۶۹-۶۵، ۱۳۸۳

مقالهٔ پژوهشی

بررسی تأثیر میتومایسین C بر میزان بروز تبادلات کروماتید خواهری در سلول‌های لنفوسیتی انسان

سیامک اکبری کامران‌ور[۱] دکتر حسین مزدارانی[۲] و دکتر محمدحسن روستائی[۳]

خلاصه

برخی از عوامل محیطی موتاژن، موجب ناپایداری ژنومی شده و افزایش استعداد آسیب‌پذیری DNA سلولی را موجب می‌شوند. نمونه‌ای از این موتاژن‌ها، میتومایسین C (MMC-Mitomycin C) است که به عنوان یک آلکیل‌کننده، به DNA متصل شده و سلول‌های حساس به واکنش‌های احیاء را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این دارو در شیمی درمانی کاربرد وسیعی داشته و در درمان برخی از تومورها، مؤثر شناخته شده است. مطالعه ناپایداری ژنومی سلول‌های طبیعی در حضور غلظت‌های پایین MMC، علاوه بر تعیین میزان آسیب‌پذیری DNA، نشان‌دهنده میزان اثرات احتمالی این دارو بر سلول‌های طبیعی، در بیماران شیمی درمانی شده است. بدین منظور، استفاده از SCE (Sister chromatid exchange) که تعداد تعویض‌های کروماتید خواهری را در کروموزوم های متافازی نشان می‌دهد، روش قابل قبولی برای بررسی ناپایداری ژنومی است. در عمل، تعداد 10^5 سلول لنفوسیتی جداسازی شده با فایکول (Ficol) را، در هر یک از ۵ml محیط کشت کامل F12 (۲۰-۱۵ درصد FCS) حاوی میتوژن PHA (فیتوهماگلوتنین)، که دارای غلظت‌های ۳ng/ml، ۶ng/ml و ۹ng/ml MMC بودند، به همراه یک نمونه بدون MMC به عنوان شاهد، کشت داده و بعد از ۲۴ ساعت، محلول BrdU (Bromodeoxy uridine) در غلظت‌های خاص، به محیط‌های کشت اضافه شده و پس از ۴۸ ساعت، سلول‌های میتوزی در مرحله متافاز با استفاده ازکلشی‌سین متوقف گردید و با روش SCE رنگ‌آمیزی شده و از نظر تعداد تبادلات کروماتید خواهری مورد ارزیابی قرار گرفت. مطالعه صد پلاک متافازی تهیه شده، میانگین درصد SCE را در سلول‌های شاهد ۳/۳۵ درصد و در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۳ng/ml، ۶ng/ml و ۹ng/ml MMC به ترتیب ۵/۴۳، ۷/۱ و ۸/۱۳ نشان داد. آنالیز نتایج حاصله با روش‌های آماری، معنی‌دار بودن اختلاف بین گروه مورد و شاهد را نشان داد ($p<0/001$). با توجه به نتایج حاصل، MMC در غلظت‌های پایین نیز موجب ناپایداری ژنومی و افزایش SCE گردیده، که در این میان، غلظت ۳ng/ml کمترین و غلظت ۹ng/ml بیشترین میزان SCE را باعث شده است. با توجه به ارتباط بین میزان SCE و آسیب‌پذیری DNA، می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که قرارگیری سلول‌های سالم در معرض MMC زمینه را برای افزایش آسیب‌پذیری DNA مساعدتر می‌سازد یعنی ژنوم سلول‌های طبیعی در بیماران شیمی درمانی شده با MMC، بسیار مستعد آسیب‌ها و جهش‌های احتمالی ژن ها است. با توجه به نتایج، برای تقلیل اثرات کارسینوژنی MMC در سلول‌های طبیعی، استفاده ازغلظت‌های پایین‌تر از ۳ng/ml مناسب تر به نظر می‌رسد.

واژه های کلیدی : میتومایسینC ، تبادل کروماتید خواهری،Cancer

۱ـ مربی دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز ۲- استاد گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس ۳- دانشیار ویروس‌شناسی، دانشگاه تربیت مدرس

دریافت مقاله:۱۳۸۱/۱۱/۱۴ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۸۲/۱۲/۹ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۲/۱۲/۲۰

مقدمه

برخی از عوامل محیطی فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک باعث آسیب DNA می‌شوند. این عوامل شامل انواع کلاستوژن، موتاژن، تراتوژن و کارسینوژن هستند که توانایی آنها بر حسب میزان آسیب‌هایی که بر کروموزوم وارد می‌سازند، قابل تعیین است (۲،۱۲). این عوامل، از طریق ناپایدارکردن ژنوم و افزایش استعداد آسیب‌پذیری DNA، عوارض جبران‌ناپذیری را در ژنوم سلول‌ها سبب می‌شوند (۳). ناپایداری ژنومی، اولین گام در ایجاد یک سلول نئوپلاستیک بوده و بررسی میزان القاء ناپایداری ژنومی با عوامل مختلف، می‌تواند میزان سرطان‌زایی آنها را نشان دهد (۱۰).

برخی از عوامل موتاژن، کاربردهای درمانی داشته و در سطح وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرند. نمونه بارز آن میتومایسین C است که نه تنها در شیمی درمانی کاربرد وسیعی داشته و در درمان سرطان‌های سرویکس، آدنوکارسینومای معده، پانکراس و ریه تجویز می‌شود، بلکه به عنوان یک آنتی متابولیت، در پیشگیری از عوارض برخی از جراحی‌های خاص مورد استفاده قرار می گیرد(۷،۱۵). این دارو به عنوان یک موتاژن، مطرح بوده و باعث عوارض جانبی بسیاری شده که نمونه بارز آن کاهش رده‌های سلول خونی می‌باشد(۱۴).

میتومایسین C یک آنتی بیوتیک از منشاء قارچ Caespitosus–Streptomyces بوده که یک کلاستوژن حاوی کینون، کربومات و گروه‌های آزیدرین است. این ترکیب یک عامل آلکیل‌کننده ایجاد می‌کند که به‌صورت متقاطع به DNA متصل می‌گردد. سلول‌های ریشه‌ای هیپوکسیک تومورهای جامد، در محیطی قرار دارند که مستعد انجام واکنش‌های احیاء بوده و به اثرات سیتوتوکسیکی میتومایسین C حساس‌تر از سلول‌های نرمال و اکسیژن‌دار هستند. میتومایسین C آلکیل‌کننده در چرخه غیر اختصاصی سلول و وابسته به S بوده و پیوندهای متقاطع با DNA تشکیل می‌دهد (۹).

جهت بررسی آسیب‌پذیری ژنوم در مقابل یک عامل محیطی، می‌توان از روش SCE که نمایان‌کننده قدرت ترمیم طبیعی DNA است، استفاده کرد (۱). SCE جایگاه خاص موتاسیون را بهتر نمایان می‌سازد و بوسیله موتاژن‌های شیمیایی بهتر از عوامل فیزیکی القا می‌گردد (۱۱). در این روش تعداد تعویض‌های کروماتید خواهری در کروموزوم سلول‌ها، به عنوان شاخصی برای ناپایداری ژنومی و به عنوان یک روش حساس سیتوژنتیکی کاربرد وسیعی دارد (۵).

MMC با دوزهای مختلف در درمان سرطان‌های گوناگون استفاده می‌گردد که معمولاً مقدار آن در دوزهای پایین همراه با سایر داروها به‌صورت ۴mg/w، ۴mg/۲W می‌باشد (۴). در سرطان‌های خاص دوزهای بالای ۲۰ mg–۷ نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (۸).

مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر نشان می‌دهد که MMC برخی از اثرات نامطلوب سیتوژنتیک را می‌تواند القاء نماید که نمونه‌ای از آن القا میکرونوکلئو در سلول‌های لنفوسیتی در معرض با این دارو است (۱۳). با توجه به اهمیت MMC در شیمی درمانی و کاربردهای درمانی آن، بایست میزان آسیب‌پذیری ژنوم سلول‌های غیر توموری در برابر غلظت‌های مختلف این دارو مورد بررسی قرار گیرد تا علاوه بر مشخص شدن میزان آسیب‌پذیری DNA در مقابل غلظت‌های مختلف آن، از کاربرد غلظت‌های پر خطر حتی الامکان جلوگیری شود.

مواد و روش کار

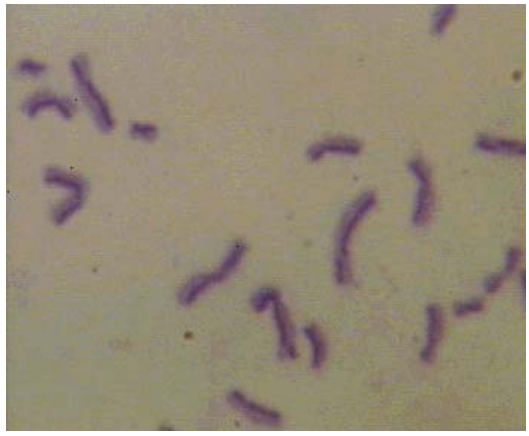
تهیه پلاک های کروموزومی به روش SCE

SCE اثرات سیتوژنیکی موتاژن‌ها را بهتر نشان می‌دهد و یکی از حساس‌ترین روش‌های مطالعه ناپایداری ژنومی است. مقدار غلظت ها بر اساس میزان شاخص میتوزی انتخاب گردیده است. به این صورت که تعداد سلول‌های میتوزی در حضور غلظت‌های مختلف MMC[1] به دنبال کشت سلولی شمارش شده و با نمونه شاهد مقایسه گردید و مشخص شد که MMC در غلظت‌های پایین‌تر از ۱۰ng/ml شاخص میتوزی تقریباً مشابه با نمونه شاهد دارد، لذا سه غلظت ۳ng/ml، ۶ng/ml و ۹ng/ml جهت آزمون مورد استفاده قرار گرفت.

به این منظور، تعداد 10^5 سلول لنفوسیتی جدا سازی شده با محلول فایکول در ۵ml محیط کشت کامل F12 (۲۰ الی ۱۵ درصدFCS) حاوی میتوژن فیتوهماگلوتنین (PHA)، برای تحریک سلول‌های لنفوسیتی(۱/۵ میلی‌لیتر درصد) کشت داده شد، که یکی از محیط‌ها به عنوان شاهد و سه محیط دیگر که دارای غلظت‌های ۳ng/ml ، ۶ng/ml و ۹ng/ml MMC بود به عنوان نمونه آزمون انتخاب شدند. ۲۴ ساعت بعد از انتقال سلول‌ها، در هریک از محیط‌ها، BrdU در غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر اضافه شده و بعد از ۴۸ ساعت دیگر، با افزودن محلول کلشی‌سین با غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، عمل محصول برداری سلول‌های متافازی انجام گردید. لام‌های تهیه شده حاوی پلاک‌های متافازی، به مدت ۱۵دقیقه در محلول آماده رنگ

هوخست (Hoechst 33258) با غلظت۱۰۰میکروگرم در میلی‌لیتر قرار گرفته و بعد از شستشو، لام‌ها در محلول بافری SCC ×۲ (۰/۳ مولار کلرید سدیم + ۰/۰۳مولار سیترات سدیم) غوطه‌ور شده و در زیر نور لامپ UV (ماوراء بنفش) به‌مدت ۲۰ دقیقه در فاصله ۴cm قرار داده شد. سپس، لام‌ها شستشو و در محلول بافری، در دمای۶۵°C به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت و بعد با رنگ گیمسای یک درصد به مدت دو تا سه دقیقه، عمل رنگ‌آمیزی انجام شد.پلاک‌های متافازی تهیه شده و با استفاده از میکروسکوپ نوری با درشتنمائی ۱۰۰۰ × مورد بررسی قرار گرفت (۶).

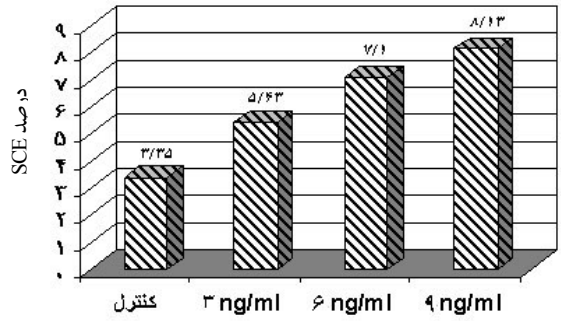
آنالیز SCE با شمارش تعداد تعویض‌های کروماتیدی، که از روی ناپیوستگی رنگ شدگی کروماتیدها مشخص می‌شود، بررسی می‌گردد. هر نقطه ای از کروماتید که حاوی ناپیوستگی رنگی باشد، به عنوان یک تعویض کروماتید خواهری شناخته می‌شود (شکل۱) (۱۱). فراوانیSCE های مشاهده شده، در گروه‌های مورد بررسی و شاهد با استفاده از روش آماری ویلکاکسون، بررسی شده و تفاوت بین گروهی تعیین گردید.



شکل ۱ : *تصویر یک پلاک کروموزومی تهیه شده با روش SCE دارای تعویض کروماتید خواهری*

نتایج

نتایج حاصل از مطالعه پلاک‌های متافازی تهیه شده با روش SCE ، در شمارش مجموعاً صد پلاک متافازی به‌دست آمده است. مطالعه پلاک‌های متافازی تهیه شده با تکنیک SCE ، در دو گروه کنترل و تیمار شده با سه غلظت MMC ، نشان داد که میانگین درصد SCE در سلول‌های لنفوسیت طبیعی ۳/۳۵ درصد بوده، در حالی که این مقدار در همان نوع سلول و با همان ژنوتیپ ولی تیمار شده با سه غلظت ۳، ۶ و ۹ MMC ng/ml به ترتیب به ۵/۴۳، ۷/۱ و ۸/۱۳ درصد افزایش پیدا کرده بود. آنالیز آماری، با روش ناپارامتری ویلکاکسون، معنی‌دار بودن نتایج حاصل را نشان داد (P<۰/۰۰۱) (نمودار۱).



نمودار ۱ : *میانگین میزان درصد SCE در سلول‌های لنفوسیتی شاهد و تیمار شده*

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از SCE در سلول‌های شاهد و سلول‌های تیمار شده با سه غلظت MMC، نشان از افزایش SCE در تمامی تیمارها دارد، به‌طوری که SCE در سلول‌های طبیعی شاهد ۳/۳۵ درصد بوده اما در سلول‌های تیمارشده با غلظت ۳ng/ml MMC این میزان به۵/۴۳ درصد و در غلظت‌های ۶ng/ml و ۹ng/ml MMC به ترتیب به۷/۱ و۸/۱۳ درصد افزایش یافته است. نتایج حاصل، تائید کننده این واقعیت است که رابطه مستقیمی بین میزان غلظت MMC و میزان ناپایداری ژنومی وجود دارد که تائیدکننده اثرات سیتوژنتیکی این دارو در مطالعات قبلی است (۱۳). اما غلظت۳ng/ml از نظر SCE به میزان قابل توجهی به نمونه شاهد نزدیک است.

با توجه به اینکه دوزهای تجویزی این دارو در حد میلی‌گرم می‌باشد، لذا احتمال در معرض قرارگرفتن سلول‌های طبیعی با غلظت‌های بالاتر وجود دارد بنابراین چنین قابل تصور است که با کاهش غلظت و پایین آوردن دوز مصرفی می‌توان به میزان قابل توجهی اثرات سوء این دارو بر ژنوم سلول میزبان را کاهش داد به‌ویژه زمانی که این دارو در پرتودرمانی به منظور رادیوتراپی مورد استفاده قرار می گیرد، اتخاذ این مهم حائز اهمیت است. در نهایت با توجه به کاربردهای درمانی وسیع این دارو به‌ویژه در شیمی درمانی، باید در نظر داشت که علاوه بر تأثیرات درمانی مؤثر آن بر سلول‌های توموری، سلول‌های

غیرتوموری نیز، متأثر شده و بواسطه ناپایداری ژنومی ایجاد شده، زمینه برای آسیب‌پذیری DNA در این سلول‌ها فراهم می‌شود. لذا بیماران شیمی درمانی شده با MMC، دارای ژنوم‌های ناپایدار بوده و مستعد جهش‌های ژنتیکی هستند.

اما توجه به این نکته حائز اهمیت است که در غلظت ۳ng/ml میزان درصد SCE نسبت به نوع شاهد به اندازه ۲/۰۸ درصد افزایش یافته است در حالی‌که در غلظت‌های بالاتر، این افزایش بیشتر بارز است. بنابراین می‌توان چنین فرض نمود که غلظت حداقل جهت تقلیل اثرات سوء این دارو در سلول‌های طبیعی، کمتر از ۳ng/ml باید در نظر گرفته شود. لذا بدین منظور بایست میزان مصرفی آن طوری تنظیم شود که سلول‌های سالم، در معرض غلظت‌های پایین تر قرار گیرند و تنها سلول‌های توموری در معرض غلظت‌های بالا باشند.

Summary

Study of the Effect of MMC on the Sister Chromatid Exchange in the Human Lymphocytes

Akbari-Kamranvar S, MSc.[1], Mozdaranie H, PhD.[2], Roostaie M.H, PhD.[3]

1. Faculty Member, Department of Biology, Tabriz University, Tabriz, Iran. 2. Professor, Department of Medical Genetics, Tarbiat Modares University, 3. Associate Professor of Virology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Some environmental mutagenic agents cause genomic instability and increase susceptibility of DNA damage. One of them is mitomycin C which is connected to DNA as an alkylating factor and affects susceptible cells to reduction reactions. This drug is used in chemotherapy and treatment of tumors. Study of genomic instability in the presence of different concentrations of MMC can show susceptibility of DNA damage in the patients who are under chemotherapy with this drug. For this purpose, SCE is a qualified method that shows the number of sister chromatid exchanges in the metaphasic chromosomes. The number of 10^5 lymphocytic cells which were separated with ficol, were cultured in media (5ml, F12 15%-20%FCS) that contains mitogen of PHA (phytohemagglutinin) and MMC in the concentrations of 3ng/ml, 6ng/ml and 9ng/ml and a control sample without MMC. The specific concentration of BrdU was added after 24 hours to cell cultures. Then metaphasic cells were halted in the metaphasic stage with colchicine after 48 hours and were stained with SCE method and were studied for the number of sister chromatid exchanges in each metaphasic plaques. Evaluation of 100 metaphasic plates showed that SCE was %3.35 in the control cells while it was %5.43, %7.1 and %8.13 in the treated cells with MMC in the concentrations of 3ng/ml, 6ng/ml and 9ng/ml. In view of the results, it is clear that MMC can cause genomic instability even in the low concentrations and it can increase SCE so that the level of SCE is become the most with the concentration of 9ng/ml and the least with the concentration of 3ng/ml. In view of relation between SCE and DNA damage, we can conclude that the genome of normal cells will be damaged in the presence of MMC and in the patients who are under chemotherapy with this drug. It means that the genome of cells will become sensitive to mutation in the presence of low concentrations of MMC. Therefore we can postulate that we should use the concentrations of less than 3 ng/ml in order to decrease mutagenic effects of MMC in normal cells.

Key Words: *MMC, SCE, Cancer, Sister chromatid exchange*

Journal of Kerman University of Medical Sciences,2004; 11(2): 65-69

References

1. Aghamohammadi SZ and Savage JR. A pulse Brd U method for SCE. *Mutat Res* 1989; 216(5): 259-265.
2. Adhvaryu SG, Rawal UM and Patel JV. Elevated sister chromatid exchange frequencies in the lymphocytes of esophageal cancer patients. *Cancer* 1988; 61(9): 1867-1871.
3. Adhvaryu SG, Rawal UM, Patel JV, Patel DD and Balar DB. Increased frequency of sister chromatid

exchanges in lymphocytes of breast cancer patients. *Int J cancer* 1988; 41(3): 394-398.
4. Arai Y and Kido C. Low-dose intermittent intra-arterial infusion chemotherapy. *Gan To Kagaku Ryoho* 1985; 12(10): 1922-1929.
5. Arvind B and Ram SV: Human chromosome. NewYork, MacGraw Hill, 1995; PP143-155.
6. Conner MK and Wald N. Chromosomal methods in population studies. *Environ Health Perspect* 1981; 42: 107-113.
7. Ishioka M, Shimazaki J, Yamagami J, Fujishima H, Shimmura S and Tsubota K. Trabeculectomy with mitomycin C for post-keratoplasty glaucoma. *Br J Ophthalmol* 2000; 84(7): 714-717.
8. Kato T, Sato K, Sasaki R, Kakinuma H and Moriyama M. Targeted cancer chemotherapy with arterial microcapsule chemoembolization: review of 1013 patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996; 37(4): 289-296.
9. Katzvng BQ: Basic and clinical pharmacology. NewYork, McGraw Hi11, 1998; PP286-304.
10. Schmutte C and Fishel R. Genomic instability: First step to carcinogenesis. *Anticancer Res* 1999; 19(6A): 4665-4696.
11. Schwartz S, Astemborski JA, Budacz AP, Boughman JA, Wasserman SS and Cohen MM. Repeated measurement of spontaneous and clastogen-induced sister-chromatid exchange. *Mutat Res* 1990; 234(2): 51-59.
12. Troilo P, Strong LC, Little JB and Nichols WW. Spontaneous and induced levels of chromosomal aberration and sister chromatid exchange in neurfibromatosis: No evidence of chromosomal hypersensitivity. *Mutat Res* 1992; 283(4): 237-242.
13. Van Pelt FN, Haring RM, Overkamp MJ and Weterings PJ. Micronucleus formation in cultured human keratinocytes following exposure to mitomycin C and cyclophosphamide. *Mutat Res* 1991; 252(1): 45-50.
14. Verweij J and Pinedo HM. Mitomycin C: Mechanism of action, usefulness and limitations. *Anticancer Drugs* 1990; 1(1): 5-13.
15. Wilkins M, Indar A and Wormold R: Intra-operative Mitomycin C for glaucoma surgery. The Cochrane Library, Oxford, 2002; PP124-128.