Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی- پژوهشی)
جلد ٦، شماره ٣، پاییز ١٣٩٤، ٢٥٦-٢٤٩

بررسی اثر هورمون هیدروکورتیزون بر آسیب‌های کلاستوژنیک کروموزومی القایی در رده سلولی L929 با استفاده از آزمون میکرونوکلئوس در سلول‌های دو هسته ای

یلدا صمصامی .M.Sc[1]، فرهنگ حداد .Ph.D[2*]، مریم مقدم متین .Ph.D[2و3]، شکوه الزمان سلیمانی فرد .Ph.D[3]، حسین عباسپور .Ph.D[1]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، دامغان، ایران
۲- دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، 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 فیزیک پزشکی، مشهد، ایران

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۴/۲

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 سلولیL929 در محیط DMEM، حاوی ۱۰ درصد FBS کشت داده شد. سلول‌ها به چهار گروه آزمایشی شامل کنترل، گروه تیمار با ۲Gy 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 ($p<0/05$).

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

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

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

موجودات زنده در حال تلاش جهت رسیدن به تعادل پویایی هستند که هوموستازی نامیده می‌شود. این تعادل به‌وسیله وقایع فیزیکی و فیزیولوژیکی به‌نام استرس، تهدید می‌شود (۱و۲). مواجه شدن با عوامل استرس زا منجر به پاسخ‌هایی در جهت سازگاری موجود شده و او را قادر می‌سازد تا با یک محیط درحال تغییر مقابله کند (۳و۴). استرس چه فیزیکی و چه روان شناختی منجر به سیگنال‌هایی می‌شود که باعث القای فعالیت اندوکرینی مغز شده و بر عمل‌کرد سیستم‌های مختلف بدن از جمله سیستم ایمنی اثر می‌گذارد (۵). پاسخ فیزیولوژیک که با استرس القا می‌شود بر روی سیستم عصبی مرکزی تاثیر گذاشته و منجر به فعال سازی محور آدرنال-هیپوفیز-هیپوتالاموس (HPA) (Hypothalamus-pituitary adrenal axis) و سیستم عصبی خود مختار می‌گردد و در نتیجه باعث ایجاد تغییراتی در سیستم غدد درون ریز بدن می‌شود (۶). این تغییرات می‌تواند منجر به اختلالاتی در سیستم ایمنی (۷و۸) و همچنین فرآیندهای سلولی گردد (۹و۱۰). در مهره داران و از جمله انسان، استرس منجر به تولید هورمون‌های مربوط به پاسخ به استرس از جمله گلوکوکورتیکوئیدها و کاتکول آمین‌ها و همچنین هورمون رشد و پرولاکتین می‌شود که موجب افزایش انرژی قابل دسترس و سازگاری فرد با محیط جدید می‌گردد (۱۱). کورتیزول، اپی‌نفرین و نوراپی‌نفرین که در طی استرس آزاد می‌شوند، به‌طور مستقیم بسیاری از سلول‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند (۱۲و۱۳). این اثرات ممکن است موقتی بوده، مثلا باعث افزایش ضربان قلب شوند (۱۷-۱۴) و یا پیامدهای طولانی مدت، مثل آسیب‌های دائمی به DNA را به‌دنبال داشته باشند (۲۰-۱۷). این گونه صدمات به‌نوبه خود ممکن است منجر به ترانسفورم شدن سلول و تومورزایی شوند. مطالعات نشان داده که استرس کوتاه مدت القایی (کمتر از ۳۰ دقیقه) با هورمون‌های استرس منجر به اثرات مولکولی از قبیل القای آسیب به DNA و همچنین تداخل با فرآیند ترمیم آن شده است (۲۱). هورمون‌های استرس با افزایش فعالیت بتا آدرنرژیک، به پیشرفت تومور در بافت‌هایی مانند بافت اندوتلیال و پستان که حاوی گیرنده‌های هورمون‌های استرسی هستند، کمک می‌کنند (۲۲و۲۳).

تاثیرات مضر استرس تنها محدود به DNA نمی‌شود، بلکه تحقیقات نشان داده که استرس می‌تواند بیان ژن‌های تنظیم کننده چرخه سلولی، پروتئین‌های شوک حرارتی، پروتوانکوژن‌ها و آنزیم‌های متابولیکی را نیز تغییر دهد (۲۴). با توجه به طیف وسیع تاثیرات استرس بر فعالیت‌های سلولی می‌توان انتظار داشت که استرس توانایی ایجاد صدمه به تمامیت ژنتیکی سلول از طریق القای صدمات کروموزومی را داشته باشد. در همین راستا تاثیر استرس بر القای صدمات کروموزومی نیز به‌طور گسترده در شرایط *in vivo* مطالعه شده است. بررسی‌ها بیانگر توانایی استرس بر ایجاد آسیب‌های مستقیم و یا غیر مستقیم بر مجموعه کروموزومی سلول می‌باشد (۲۵، ۲۶ و ۲۷).

از جمله عوامل دیگر ایجاد کننده صدمات ساختاری به کروموزوم‌ها می‌توان به تابش‌های یونیزان از جمله x و گاما اشاره نمود. تابش پرتوهای یونیزان به بافت‌ها و سلول‌های زنده سبب ایجاد صدمات فراوانی به این ساختارها می‌گردد. عبور اشعه از بافت و سلول به‌دلیل حضور مولکول‌های آب، به‌طور عمده باعث تولید رادیکال‌های آزاد (ROS) (reactive oxygen species) خواهد شد (۲۸). پراکسیداسیون لیپیدها و شکستن مولکول DNA نتیجه افزایش سطح ROS در سلول و واکنش آن با مولکول‌های زیستی می‌باشد (۲۹و۳۰). شکستگی‌های DNA ناشی از تابش، به‌نوبه خود در نهایت منجر به ناهنجاری‌های ساختاری کروموزومی از قبیل شکستگی‌های کروماتیدی و کروموزومی می‌گردند (۳۱).

اختلالات ژنتیکی در سطوح مختلف، زندگی انسان را تحت تاثیر قرار می‌دهند، از جمله می‌توان به نقش آن‌ها در اختلالات مادرزادی نوزادان، عقیمی و حتی ایجاد سرطان اشاره نمود. نقش صدمات به ماده ژنتیکی و کروموزوم‌ها در ایجاد سرطان موضوعی است که مطالعات زیادی را به‌خود اختصاص داده است (۳۲). برای مثال وجود چندین ناهنجاری ساختاری کروموزومی در تومورهای جامد از جمله سرطان کولون (۳۳و۳۴) و سرطان مثانه (۳۵) مشاهده شده است.

نظر به اهمیت و تاثیرات کوتاه و بلند مدت استرس بر سیستم‌های زیستی و سلولی و توانایی آن در ایجاد صدمات کروموزومی و همچنین تاثیرات شناخته شده تابش اشعه یونیزان در اینگونه صدمات و در کنار آن ارتباط ناهنجاری‌های کروموزومی با تشکیل تومورهای سرطانی، در این پژوهش به بررسی اثر استرس بر القای آسیب‌های ساختاری در کروموزوم‌ها در شرایط *in vitro* و پس از القای اثرات کلاستوژنیک تابش اشعه گاما، پرداخته شده است. روشن نمودن ارتباط بین این دو، می‌تواند چشم انداز جدیدی را

www.SID.ir

Archive of SID

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

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر به‌صورت *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 باگلوکز، گلوتاماکس و NaHCO3 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 به‌مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. پس از ۲۴ ساعت، سیتوکالازینB (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 نظرگرفته شدند.

فلاسک‌های سلولی تحت تاثیر اشعه گاما با دوز Gy ۲ ساطع شده از دستگاه 60CO (تراتون مدل فونیکس، ساخت کانادا) تولید اشعه موجود در بیمارستان امید مشهد، به‌مدت 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 سانتریفوژ مدل Universal centrifuge SH12، به‌مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰rpm، فیکساتور (متانول۸ : 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 به‌مدت 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 به‌منظور 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

به‌منظور 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. به‌عبارتی میزان آسیب ایجاد شده در گروه کنترل و تیمارها مشابه وحدود ۲ تا ۳ درصد بود (شکل ۲، الف). همچنین هیچ تفاوت معنی‌داری بین فراوانی میکرونوکلئوس در غلظت‌های مختلف هورمون با یکدیگر مشاهده نشد. لذا

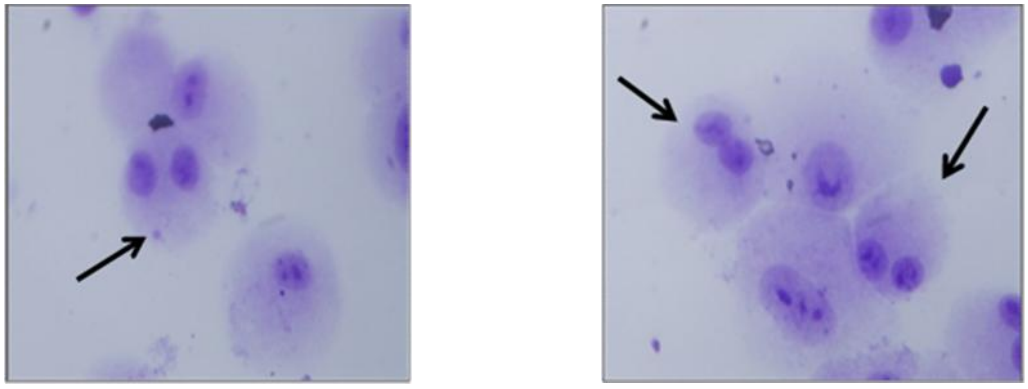
www.SID.ir

Archive of SID

می‌توان نتیجه گرفت افزایش غلظت هورمون به تنهایی آسیب کروموزمی را ایجاد نکرده است. در بررسی شاخص تقسیم (binary index) نیز تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و تیمارها مشاهده نشد (شکل۲، ب) که نشان دهنده عدم تاثیر هورمون بر آهنگ تقسیمات سلولی است.

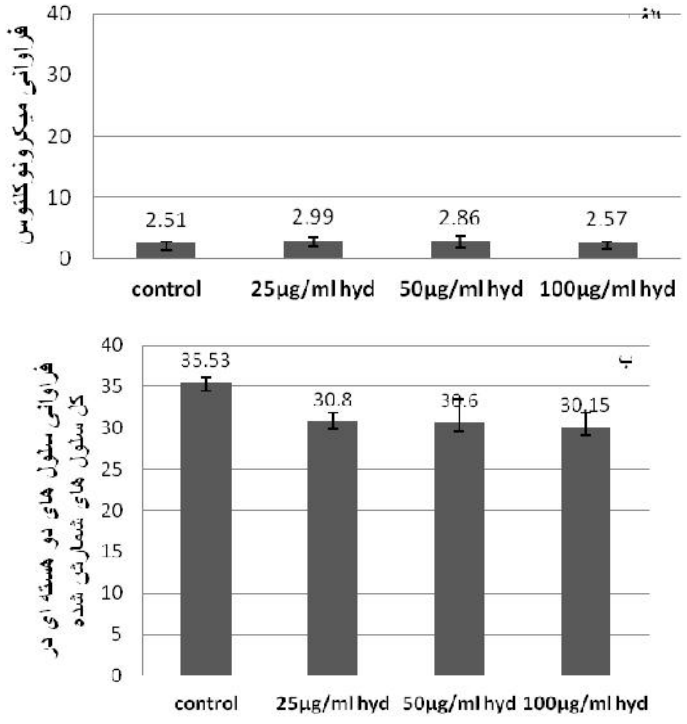
$$\text{درصد میکرونوکلئوس} = \frac{\text{تعداد سلول های دو هسته ای دارای میکرونوکلئوس}}{\text{تعداد کل سلول های دو هسته ای}} \times ۱۰۰$$

$$\text{شاخص تقسیم} = \frac{\text{تعداد سلول های دو هسته ای}}{\text{تعداد کل سلول های دو هسته ای و تک هسته ای}} \times ۱۰۰$$



الف ب

شکل۱: ریخت شناسی سلول‌های مورد بررسی. الف: سلول‌های دو هسته‌ای بدون میکرونوکلئوس (با فلش نشان داده شده). ب: سلول دو هسته‌ای دارای میکرونوکلئوس (نوک فلش میکرونوکلئوس را نشان می‌دهد).



شکل۲: مقایسه درصد میکرونوکلئوس(الف) و شاخص تقسیم (ب)، بین سه غلظت مختلف هیدروکورتیزون و کنترل.

www.SID.ir

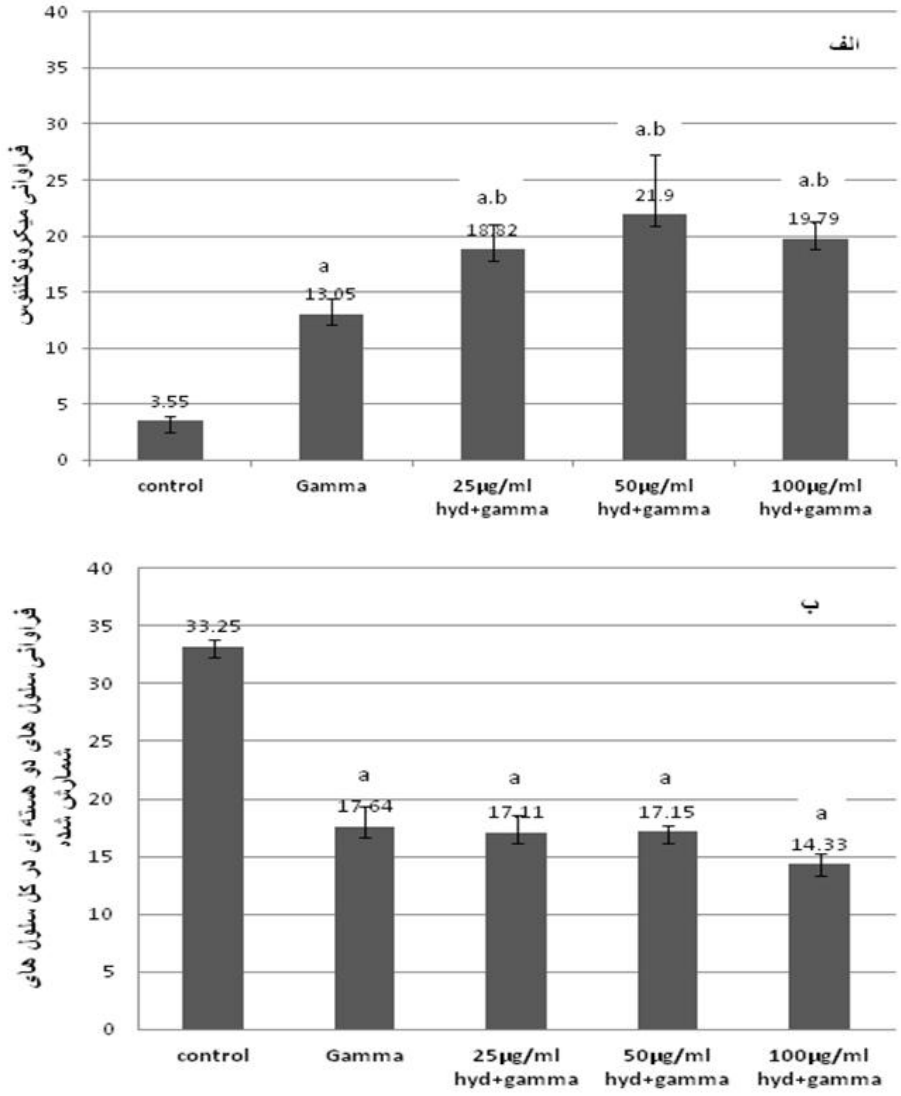
Archive of SID

بررسی اثر توام اشعه و غلظت‌های مختلف هیدروکورتیزون

مقایسه درصد میکرونوکلئوس و شاخص تقسیم بین گروه‌های کنترل، اشعه دیده، غلظت‌های مختلف هیدروکورتیزون+اشعه، با هدف بررسی اثر هیدروکورتیزون بر القای آسیب‌های 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 می‌باشد 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 معنی‌داری وجود دارد ($p<0/05$) (شکل۳، الف).

شاخص تقسیم نیز در گروه اشعه دیده و گروه‌های تیمار هیدروکورتیزون + اشعه نسبت به کنترل کاهش پیدا کرد (شکل۳، ب) که نشان دهنده تاثیر منفی اشعه بر تکثیر سلولی می‌باشد.

مقایسه درصد میکرونوکلئوس بین غلظت‌های مختلف هیدروکورتیزون+اشعه با گروه تیمار شده با اشعه نشان دهنده افزایش معنی‌دار در فراوانی میکرونوکلئوس در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از تیمارهیدروکورتیزون+اشعه نسبت به گروه تیمار شده با اشعه بود ($p<0/05$) (شکل۳، الف). این افزایش منعکس کننده افزایش میزان آسیب کروموزمی ناشی از تیمار با هورمون پیش از تابش اشعه در این سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های فقط تابش دیده می‌باشد.



شکل۳: مقایسه درصد میکرونوکلئوس (الف) و شاخص تقسیم (ب) در سه غلظت مختلف هیدروکورتیزون- اشعه با گروه کنترل و اشعه.
a: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل ($p<0/05$). b: تفاوت معنی‌دار با گروه اشعه دیده ($p<0/05$).

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

هر تغییری در محیط موجود زنده می‌تواند به‌عنوان عامل ایجاد کننده استرس تلقی شود که در صورت عدم پاسخگویی صحیح می‌تواند به تهدیدی برای زندگی موجود تبدیل شود (۳۷). درپستانداران، این پاسخ شامل تغییراتی است که منجر به افزایش انتقال اکسیژن وگلوکز به قلب و ماهیچه های اسکلتی می‌شود. تغییرات ناشی از استرس در سیستم ایمنی بدن می‌تواند منجر به سرعت بخشیدن به فرآیند ترمیم زخم شده و به جلوگیری از عفونت‌های احتمالی کمک کند (۳۸). در مهره داران و انسان استرس منجر به آزاد شدن هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی مثل کورتیزول و کاتکول آمین‌ها مثل اپی نفرین و نور اپی نفرین می‌شود که می‌توانند اثر خود را بر روی سلول‌های ایمنی و سلول‌های غیر ایمنی از طریق اتصال مستقیم به گیرنده‌های سطح سلول اعمال کنند (۱۳).

بدن با تولید هورمون‌های استرس به شخص کمک می‌کند که نسبت به یک موقعیت استرس‌زا با سرعت و شدت بیشتری واکنش نشان دهد (۳۹). با این‌حال، قرار گرفتن در معرض استرس به‌مدت طولانی عواقب زیان آوری به‌دنبال خواهد داشت که از آن جمله می‌توان به اختلالات در غدد درون ریز، سیستم عصبی و همچنین آسیب‌های 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 سلول‌هایی که دارای DNA آسیب دیده هستند، نقش داشته باشد (۲۱).

در مطالعات قبلی تاثیر توام استرس به‌همراه 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،۴۱و۴۲). 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 می‌زند، در مطالعه حاضر تاثیر تابش اشعه گاما به‌عنوان عامل کلاستوژنیک شناخته شده مورد بررسی قرار گرفت.

تاثیر مخرب تابش اشعه یونیزان بر سلول و مجموعه کروموزومی آن در مطالعات متعددی به‌صورت *in vivo* و *in vitro* به اثبات رسیده است (۲۸و۳۱). در بررسی حاضر نیز تابش اشعه گاما بر سلول‌های L929 باعث افزایش در فراوانی میکرونوکلئوس در سلول‌های دو هسته‌ای گردید. تابش گاما به‌عنوان یک اشعه یونیزان بیشترین صدمه را از طریق آسیب مستقیم و غیر مستقیم، با تولید رادیکال‌های آزاد واکنش‌گر (ROS)، به مولکول DNA وارد می‌کند (۲۹و۳۰). این آسیب‌ها در صورتی‌که تعمیر نشوند خود منجر به صدمات ژنتیکی به‌صورت شکستگی‌های کروموزومی و کروماتیدی می‌شوند (۳۱). در آزمون میکرونوکلئوس قطعات کروموزومی و کروماتیدی حاصله به‌صورت هسته‌های 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 می‌باشد.

در مطالعه حاضر تیمار سلول‌های L929 با هیدروکورتیزون، به‌عنوان یکی از هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی که در هنگام پاسخ به استرس ساخته می‌شوند، نشان داد که این هورمون می‌تواند زمینه ساز آسیب رسانی بیشتر کروموزومی توسط تابش اشعه گاما شود. این افزایش صدمات به‌صورت افزایش در فراوانی میکرونوکلئوس در سلول‌های دو هسته‌ای نمایان شد. از جمله تاثیرات هورمون‌های استرس، توانایی آن‌ها بر ممانعت از عمل‌کرد صحیح سیستم‌های تعمیر DNA می‌باشد (۲۱). لذا افزایش صدمات مشاهده شده در این بررسی می‌تواند به‌دلیل ممانعت تعمیر صدمات ناشی از تابش گاما باشد.

در مطالعه حاضر هورمون به‌تنهایی هیچ‌گونه صدمه کروموزومی قابل مشاهده‌ای به‌صورت افزایش در فروانی میکرونوکلئوس ایجاد نکرد. این در حالی‌است که در مطالعه Flint و همکاران (۲۱) تیمار سلولی توسط هورمون‌های استرس باعث افزایش صدمات DNA شد. عدم مشاهده صدمات کروموزومی در این مطالعه پس از تیمار با هیدروکورتیزون، ممکن است به‌دلیل 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 ناهنجاری‌های ساختاری قابل مشاهده در آزمون میکرونوکلئوس نیاز به زمان بیشتری دارند (۴۳و۴۴). 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 به‌تنهایی باعث ایجاد صدمات کروموزومی در شرایط آزمایشگاهی نمی‌شود، اما

www.SID.ir

Archive of SID

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

نتیجه گیری

بررسی اثرات هورمون هیدروکورتیزون بر روی سلول‌های L929 در این مطالعه نشان داد که این هورمون به‌تنهایی آسیب کروموزومی نسبت به گروه کنترل ایجاد نکرد، اما هنگامی‌که سلول‌ها تحت تاثیر یک عامل کلاستوژن (اشعه) قرار می‌گیرند، هورمون می‌تواند اثرات آن عامل را در ایجاد آسیب به‌طور قابل ملاحظه‌ای 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 یاری‌مان کردند تشکر می‌شود. نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان نیز اعلام می‌دارند.

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, Kvetnanský R. Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events. Trends Neurosci. 2001; 24(2): 91-98.

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.

www.SID.ir

Archive of SID

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, Zalinyan 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 miclronucleus 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 Bullet international. 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.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Autumn 2015; 6(3): 249-256

Original Article

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

www.SID.ir