

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

سیامک اکبری کامران^۱، دکتر حسین مزدارانی^۲ و دکتر محمدحسن روستانی^۳

خلاصه

برخی از عوامل محیطی موتاژن، موجب ناپایداری ژنومی شده و افزایش استعداد آسیب‌پذیری DNA سلولی را موجب می‌شوند. نمونه‌ای از این موتاژن‌ها، میتومايسين 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 کروموزوم‌های 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 (Bromodeoxy uridine) در غلظت‌های خاص، به محیط‌های کشت اضافه شده و پس از ۴۸ ساعت، سلول‌های میتوزی در مرحله متافاز با استفاده از کلتی سین 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 ژن‌ها است. با توجه به نتایج، برای تقلیل اثرات کارسینوژنی MMC در سلول‌های طبیعی، استفاده از غلظت‌های پایین‌تر از ۳ng/ml مناسب‌تر به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: میتومايسين C، تبادل کروماتید خواهری، Cancer

۱- مری 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

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 به صورت ۴mg/w، ۴mg/2w می‌باشد (۴). در سرطان‌های خاص دوزهای بالای ۲۰-۷ mg 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 پلاک‌های کروموزومی به روش SCE

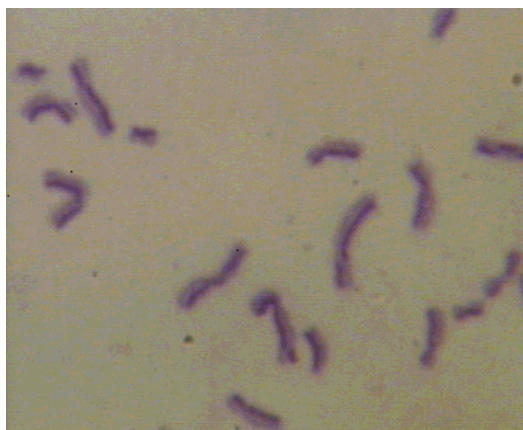
SCE اثرات سیتوژنتیکی موتاژن‌ها را بهتر نشان می‌دهد و یکی از حساس‌ترین روش‌های مطالعه ناپایداری ژنومی است. مقدار غلظت‌ها بر اساس میزان شاخص میتوزی انتخاب گردیده

برخی از عوامل محیطی فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک باعث آسیب DNA می‌شوند. این عوامل شامل انواع کلاستوژن، موتاژن، تراژن و کارسینوژن هستند که توانایی آنها بر حسب میزان آسیب‌هایی که بر کروموزوم وارد می‌سازند، قابل تعیین است (۲،۱۲). این عوامل، از طریق ناپایدار کردن 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 میتومايسين 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 می‌گیرد (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).

میتومايسين C یک آنتی بیوتیک از منشأ قارچ *Caespitosus-Streptomyces* بوده که یک کلاستوژن حاوی کینون، کربومات و گروه‌های آزیدرین است. این ترکیب یک عامل آلکیل‌کننده ایجاد می‌کند که به صورت متقاطع به DNA متصل می‌گردد. سلول‌های ریشه‌ای هیپوکسیک تومورهای جامد، در محیطی قرار دارند که مستعد انجام واکنش‌های احیاء بوده و به اثرات سیتوتوکسیکی میتومايسين C حساس‌تر از سلول‌های نرمال و اکسیژن‌دار هستند. میتومايسين C آلکیل‌کننده

آنالیز SCE با شمارش تعداد تعویض‌های کروماتیدی، که از روی ناپیوستگی رنگ شدگی کروماتیدها مشخص می‌شود، بررسی می‌گردد. هر نقطه‌ای از کروماتید که حاوی ناپیوستگی رنگی باشد، به عنوان یک تعویض کروماتید خواهری شناخته می‌شود (شکل ۱) (۱۱). فراوانی SCE 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

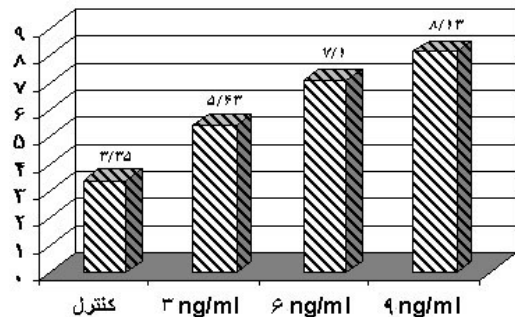
نتایج حاصل از مطالعه پلاک‌های متافازی تهیه شده با روش SCE، در شمارش مجموعاً صد پلاک متافازی به دست آمده است. مطالعه پلاک‌های متافازی تهیه شده با تکنیک SCE، در دو گروه کنترل و تیمار شده با سه غلظت MMC، نشان داد که میانگین درصد SCE در سلول‌های لنفوسیت طبیعی ۳/۳۵ درصد بوده، در حالی که این مقدار در همان نوع سلول و با همان ژنوتیپ ولی تیمار شده با سه غلظت ۳، ۶ و ۹ ng/ml MMC 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 ($P < 0.001$) (نمودار ۱).

است. به این صورت که تعداد سلول‌های میتوزی در حضور غلظت‌های مختلف^۱ MMC به دنبال کشت سلولی شمارش شده و با نمونه شاهد مقایسه گردید و مشخص شد که MMC در غلظت‌های پایین‌تر از ۱۰ ng/ml شاخص میتوزی تقریباً مشابه با نمونه شاهد دارد، لذا سه غلظت ۳ ng/ml، ۶ ng/ml و ۹ ng/ml جهت آزمون مورد استفاده قرار گرفت.

به این منظور، تعداد ۱۰^۵ سلول لنفوسیتی جدا سازی شده با محلول فایکول در ۵ ml محیط کشت کامل F12 (۲۰ الی ۱۵ درصد FCS) حاوی میتوزن فیتوهماگلوئین (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 ۳ ng/ml، ۶ ng/ml و ۹ ng/ml MMC بود به عنوان نمونه آزمون انتخاب شدند. ۲۴ ساعت بعد از انتقال سلول‌ها، در هر یک 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 ۱۵ دقیقه در محلول آماده رنگ هوخست (Hoechst 33258) با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر قرار گرفته و بعد از شستشو، لام‌ها در محلول بافری SCC ۲× (۰/۳ مولار کلرید سدیم + ۰/۰۳ مولار سترات سدیم) غوطه‌ور شده و در زیر نور لامپ UV (ماوراء بنفش) به مدت ۲۰ دقیقه در فاصله ۴ cm قرار داده شد. سپس، لام‌ها شستشو و در محلول بافری، در دمای ۶۵°C به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت و بعد با رنگ گیمسای یک درصد به مدت دو تا سه دقیقه، عمل رنگ آمیزی انجام شد. پلاک‌های متافازی تهیه شده و با استفاده از میکروسکوپ نوری با درشتنمایی ۱۰۰۰× مورد بررسی قرار گرفت (۶).

با توجه به اینکه دوزهای تجویزی این دارو در حد میلی‌گرم می‌باشد، لذا احتمال در معرض قرار گرفتن 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 می‌گیرد، 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 حالی که 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.



گروه

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، به طوری که SCE در سلول‌های طبیعی شاهد ۳/۳۵ درصد بوده اما در سلول‌های تیمار شده با غلظت ۳ng/ml MMC این میزان به ۵/۴۳ درصد و در غلظت‌های ۶ng/ml و ۹ng/ml MMC به ترتیب به ۷/۱ و ۸/۱۳ درصد افزایش یافته است. نتایج حاصل، تأیید کننده این واقعیت است که رابطه مستقیمی بین میزان غلظت MMC و میزان ناپایداری ژنومی وجود دارد که تأیید کننده اثرات سیتوژنتیکی این دارو در مطالعات قبلی است (۱۳). اما غلظت ۳ng/ml از نظر SCE به میزان قابل توجهی به نمونه شاهد نزدیک است.

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.