تغییرات میکرونوکلئوس درلنفولسیت های موش ناشی ازامواج مایکروویو

علی صفری واریانی[۱]، دکترسیدباقرمرتضوی[۲]، دکترعلی خوانین[۲]، دکتر سید محمد مودنی[۲]، دکترانوشیروان کاظم نژاد [۲]
[۱] دانشجوی دکتری بهداشت حرفه ای دانشگاه تربیت مدرس
[۲] عضو هیئت علمی دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

افزایش روزافزون کاربردهای امواج مایکروویو سبب شده است مطالعات زیادی درمورد اثرات این امواج برسلامت موجودات زنده انجام گیرد.بخشی ازاین مطالعات درمورد اثرات سیتوژنتیکی این امواج می باشد. باتوجه به نتایج بدست آمده ازاین تحقیقات هنوز پاسخ قطعی درمورد اثرات مزبورارائه نشده است. میکرونوکلئوس یکی ازروش های مناسب جهت تعیین آسیب های سیتوژنیتیکی عوامل زیان آورفیزیکی (پرتوها) وعوامل زیان آور شیمیایی می باشد. دراین مطالعه ازروش یادشده جهت بررسی آثارسیتوژنیتیکی امواج مایکروویوبافرکانس های ۸۹۰و۹۵۰ مگاهرتز باتوان های ۳ و۵ وات برلنفولسیت های موش Balb c استفاده شد. نتایج بدست آمده ازاین مطالعه نشان داد، امواج مایکروویوسبب تغییردرمیزان میکرونوکلئوس درلنفولسیت های دوهسته ای درگروه‌های مورد نسبت گروه به شاهد شده است امااین تغییرات ازنظرآماری معنی دارنبودند.

کلمات کلیدی : *لنفولسیت، موش، مایکروویو، میکرونوکلنوس، امواج غیریونساز*

مقدمه

کاربرد امواج مایکروویو در سیستم های مخابراتی، رادار، تجهیزات پزشکی، گرم کننده های خانگی وغیره در سال های اخیر افزایش یافته است و این امواج بعنوان یکی ازآلاینده های محیط زیست و محیط کار محسوب می شوند و بخش وسیعی از افراد جامعه بصورت حرفه ای و غیرحرفه ای درمعرض این امواج قراردارند. بعضی ازاثرات سوء این امواج برموجودات همانند اثر بر چشم ، تخمدان و غیره شناخته شده است و همچنین اثرات سیتوژنتیکی این امواج درتوانهای بالابه اثبات رسیده است اما اثرات امواج مایکروویو در توانهای پایین در فرکانس های مختلف کاملاً شناخته شده نمی باشد و در حال حاضر تحقیقات بسیار وسیعی در این زمینه بر روی حیوانات آزمایشگاهی وانسان انجام یافته است دراین مطالعات از سلول های مختلف به صورت invitro,invivo استفاده شده است یکی ازروش های بررسی اثرات سیتوژنیتیکی عوامل زیان آورفیزیکی وشیمیایی روش میکرونوکلنوس می باشددراین روش کروموزمها و یا بخش هایی ازکروموزمها در اثر عامل سیتوژن از هسته اصلی جدا شده و بصورت هستک(micronuclei) در می آیندکه شمارش این هستک می تواند بعنوان شاخص برای اثرات سوء پرتوهای یویساز و غیر یونساز در نظرگرفته شود.(۱و۲)

دراین مطالعه ازروش fenech-morly جهت تعیین تغییرات میکرونوکلئوس استفاده شده است. دراین روش لنفولسیت های کشت داده شده درمرحله قبل ازتقسیم کامل (دوهسته ای) متوقف می شوند و آنگاه

لنفولسیت های دوهسته ای دارای میکرونوکلئوس مطابق روش شمارش می شوند. Cytokineesis-block (micronucleus assay)

مواد و روش ها

برای انجام این تحقیق مراحل اساسی ساخت دستگاه مولد امواج مایکروویوبامشخصات موردنیاز تحقیق، ساخت اطاقک پرتودهی، انتخاب حیوان، درمعرض قراردادن حیوان، کشتن حیوان وجداسازی لنفوسیت، کشت لنفولسیت وتعیین تغییرات میکرونوکلئوس به شرح ذیل انجام شد.

دستگاه مولد امواج ساخته شده دارای توان خروجی ۵و۴و۳ وات، باندفرکانسی ۹۶۰-۸۶۰ مگاهرتز، فرکانس پالس ۲۱۷ هرتزومدلاسیون فرکانس ۱۰۰ و۲۰۰ کیلوهرتزبوده است.که دراین تحقیق فقط ازفرکانس های ۸۹۰و۹۵۰ مگاهرتزباتوانهای ۳ و ۵ وات مورد استفاده قرارگرفت. دراین مطالعه برای اینکه هنگام پرتودهی حیوانات ازشرایط میدان آزاد قرارگیرند. اقدام به ساخت وطراحی اطاقک پرتودهی شدکه این اطاقک اساس محاسبات انجام شده قادربه ایجاد شرایط مناسب و بوجود آوردن افت حدود ۲۰ dB دراموج تابش یافته می باشد. پس ازساخت دستگاه مزبوروآماده شدن مجموعه پرتودهی، موش balbc ،دوماهه برای انجام مطالعه انتخاب شدوبرای انجام این تحقیق ۴ گروه موش که هرگروه شامل ۶ سرموش بودند بعنوان گروههای مورد بترتیب درمعرض امواج مایکروویو بافرکانس ۸۹۰و۹۵۰ مگاهرتز درتوانهای ۳ و۵ وات به مدت دو هفته و هرروز ۸ ساعت قرارگرفتند. درطول مدت پرتودهی دمای اطاقک پرتودهی بین ۲۸-۲۷ درجه سانتیگراد ثابت نگهداشته شد.

پس ازاتمام زمان پرتودهی هر گروه آنها راجهت انجام آزمایشات میکرونوکلنوس به روش قطع نخاع کشته وآنگاه زیرهود لامینار به شرح ذیل اقدام به جداسازی لنفولیست ها ازطحال، کشت آنها وشمارش میکرونوکلنوس ها شد :

۱- برداشتن طحال موش زیرهودلامیناروقراردادن آنها درمحیط کشت
۲- تزریق حدود۲cc محیط کشت دردرون طحال
۳- محیط کشت حاوی سلول های جداشده ازطحال به آرامی درلوله فالکون. حاوی۳cc-۲ فایکول می ریزیم بطوری که دوفازکاملاً جدادرلوله تشکیل شود.
۴- دراین مرحله لوله ها رادرمیکروسانتری فوژ با شتاب ۷۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه قرارمی‌دهیم.
۵- لایه تشکیل شده بین فایکول ومحیط کشت یعنی(لنفوسیت ها)راتوسط پیت پاستوربه آرامی برداشته ودرون لوله فایکول دیگری که حاوی ۴cc محیط کشت است می ریزیم.
۶- لوله های حاوی محیط کشت ولنفوسیت راکه ازمرحله پنجم بدست آمده برای شستشوی لنفوسیت ها درمیکروسانتری فوژ باشتاب ۳۵۰g برای مدت ۵ دقیقه قرارمی دهیم.
۷- پس ازانجام مرحله ۶ درانتهای لوله ها پلاک سلولی تشکیل می یابد که لنفوسیت ها هستندحال محیط کشت روی آنرا تخلیه کرده وآنگاه مجدداً روی آن ۳cc-۲ محیط کشت قرارداده پلاک مذبور را درداخل آن حل نموده وسپس بازبرای شستشوی مجدد لوله هاراداخل میکروسانتری فوژ باشتاب ۳۵۰g وزمان ۵ دقیقه قرار می دهیم.
۸- پس ازاتمام زمان ۵ دقیقه مرحله ۷ محلول روی پلاک سلولی تشکیل شده را بیرون می‌ریزیم وروی این پلاک سلولی ۱cc محیط کشت می ریزیم وپلاک سلولی رادرآن حل می کنیم.
۹- حال بااستفاده ازلام نئوبارسلول های داخل لوله فالکون راشمارش می کنیم

۱۰- دراین مرحله بااستفاده ازرقیق سازی تعداد سلول های موجوددر داخل لوله هارابه یک میلیون درهرcc می رسانیم.

۱۱- دراین مرحله ازهرنمونه، μl ۲۰۰ درپلیت های مخصوص کشت لنفوسیت می ریزیم (برای هرنمونه ۳ خانه از پلیت مورد استفاده قرارمی گیرد.)

۱۲- به هرخانه حاوی محیط کشت وسلول μl ۲۰ محلول fcs و μl ۵ محلول PHA اضافه می کنیم .

۱۳- پلیت حاوی نمونه هارادرداخل انکوباتور CO_2 قرارمی دهیم (CO_2 پنج درصد ودمای $37^{C.}$)

۱۴- پس ازگذشت ۱۷/۵ ساعت واطمینان ازاینکه لنفوسست ها شروع تکثیرنموده اندبه نمونه μL ۱۱ محلول کلشسین اضافه می کنیم تاسلول ها درمرحله قبل ازتقسیم (دوهسته‌ای) متوقف شوند.

۱۵- پس ازحداقل ۲۴ ساعت ازاضافه کردن کلشسین اقدام به برداشت سلول ها خواهیم نمود

۱۶- حال بااستفاده دستگاه سایتواسپن اقدام به پاشیدن سلول ها روی لام می نمایم برای این منظور μl ۱۰۰ ازمحلول داخل هرخانه پلیت کشت سلول راروی لامی پاشیم ولام تهیه شده رابرای خشک شدن درمعرض هوا قرارمی دهیم

۱۷- بااستفاده ازمتانول مطلق اقدام به فیکس کردن سلول ها می نمایم وآنگاه توسط رنگ گیمساسلول ها رارنگ آمیزی می کنیم

۱۸- دراین مرحله بااستفاده ازمیکروسکوپ بابزرگ نمایی ۱۰۰۰ اقدام به شمارش ۱۰۰۰ سلول لنفوسیت دوهسته ای می کنیم وتعداد سلول های دوهسته ای که دارای میکرونوکلئوس هستندتعیین شده وبعنوان شاخص سیتوژنتیک مورد ارزیابی قرار می‌گیرند.

نتایج

نتایج به دست آمده نشان داد، امواج مایکروویو قادر به تغییر میزان میکرونوکلئوس در لنفوسیت ها می باشند. و این تغییرات وابسته به توان بوده و با افزایش توان این تغییرات نیز افزایش می یابند. همچنین در این مطالعه مشاهده شد با افزایش فرکانس تغییرات میکرونوکلئوس نیز افزایش می یابد. تست های آماری نشان داد این تغییرات از نظر آماری معنی دا رنبودند.

«لازم به ذکر است نتایج و جداول هنگام برگزاری هایش ارائه خواهند شد.»

بحث و نتیجه گیری

این موضوع که امواج مایکروویو می توانند بر مکانیزم های عمل کرد بیولوژیکی در موجودات زنده اثر گذار باشند، ثابت شده است. این اثرات در سطح سلول و مولکول موجودات زنده نیز در مطالعات بسیاری مورد تایید قرار گرفته است. اما اثرات حرارتی هنوز به صورت قاعده مشخصی در نیامده است. (۵ و ۴) با افزایش بسیار وسیع منابع مایکروویو در سال های اخیر باعث شده است که افراد جامعه به صورت طبیعی در معرض این امواج باشند. لذا نیاز به مطالعات بسیار در این مورد الزامی باشند. (۶)

مطالعه ما نشان داد پس در معرض قرار گرفتن موش balbc و انجام آزمایشات MN (میکرونوکلئوس) تعداد سلول های دو هسته ای دارای میکرونوکلئوس در مقایسه با گروه شاهد افزایش می یابند. و این افزایش وابسته به توان و فرکانس امواج مورد استفاده می باشد. یعنی با افزایش توان و فرکانس تعداد سلول های دو هسته ای دارای میکرونوکلئوس افزایش می یابد؛ مطالعه دیگری که درآن ازروش MN جهت بررسی آسیب های پرتوهای مایکروویو در لنفوسیت های خون انسان در آن استفاده شده است نشان داد امواج پیوسته با فرکانس

۲/۴۵ و ۷/۷ گیگا هرتز وقتی با تون mw/cm^2 ۳۰ در مدت زمان ۳۰ و ۶۰ ثانیه به صورت invitro بر لنفوسیت های انسان تابیده می شود. باعث ایجاد تغییرات معنی داری در میزان میکرونوکلئوس می گردد. (۷) مطالعه دیگری که توسط Garaj- vrhovac و غیره انجام شد نشان داد که امواج غیر یوساز با فرکانس ۷/۷ گیگاهرتزمی توانند سبب صدمه به کروموزمها شوند و ایجاد تغییر معنی دار در میزان MN در لنفوسیت های خون انسان شوند(۲) امامطالعه دیگری نشان داد امواج مایکروویو با فرکانس های ۸۰۰ ، ۹۰۰ ، مگاهرتز با مدولاسیون دامنه ۳/۱- ۰/۷۳ مگاهرتز قادر به ایجاد تغییرات معنی دار در سطح تغییرات SCE نبودند (۸)

لازم به ذکر است در مطالعه ما تغییرات معنی دار بین MN در گروه های مورد و شاهد، مشاهده نشده و این نتیجه با نتایج مطالعه فوق الذکر مطابقت دارد. لذا با توجه به مقایسه نتایج مطالعات انجام شده در مورد اثرات سیتوژنتیکی امواج مایکروویو باتوان بالاموثر بودن این امواج در ایجاد آسیب های مزبور قطعی شده است اما در توان ها و فرکانس های پایین باید تحقیقات بیشتری انجام گیرد. امابعلت توان ایجاد تغییرات در MN به وسیله امواج یونساز و غیر یونساز در لنفوسیت ها در توان ها و فرکانس های مختلف می توان از این روش به عنوان روشی جهت دوزیمتری بیولوژیک استفاده نمود. با توجه به اثراتی همانند خستگی روانی و اثرات عصبی عروقی ایجاد شده (۱۰ و ۹) در افراد شاغل در رادارها لزوم استفاده از این روش دوزیمتری ضروری به نظر می رسد.

از طرف دیگر مطالعات دیگری نشان داده اند این امواج می توانند اثر بعضی از عوامل شیمیایی را تشدید نمایند (۱۱) لذا لزوم بررسی اثرات توام این امواج و عوامل زیان آور شیمیائی بدیهی است.

منابع

1) Streffer, W.-U. Muller, A. Kryscio, W. Bocker, Micronuclei biological indicator for retrospective dosimetry after exposure to ionizing radiation, Mut. Res. 404 (1998) 101-104.
2) Garaj-Vrhovac, A. Fucic, D. Horval, The correlation between the ferequency of micronuclei and specific chromosome aberration in vitro, Mut. Res. 281 (1992) 181-186.
3) French, The cytokinsis-block micromuleus technique: to detailed description of the method and its application to genotocicity studies in human populations. Mut. Res. 285 (1993) 35-44.
4) Moriyama, M. Salcman, R.D. Broiadwell, Blood- brain barrier alteration after microwave- induced hyperthermia is purely a thermal effect: I. Temperature and power mesurements, surg. Neurol. 35 (3) (1991) 177-182.
5) Brusick , R. Alberini, D. McRee, D. Peterson, G. Williams, P. Hanawalt, J. Preson, Genotoxicity of radiofrequency radiation, Environ. Mutagen. 32 (1998) 1-16.
6) M.Grandolfo, La protezions da campi elettromagnetici non ionizzanti, ISPRA Courses, Ispra, 1986.
7) Laura zotti- Martelli, Mario PeccaTari.Roberto Scarpato , Lucia Migliore.Induction of micronuclei in human lymphocytes exposed invitro to microwave radiation.Mutation Rescareh 472 (2000) 91-58.
8) Antonopoulos,H. Eisenbrandt,G. obe , Effedts of high frequency electromagnetic fields on human lymphocytes in vitro, Mut. Res . 395 (1997) 209-214 .

9) Chou, H.Bassen , j.osephuk, Q. Balzano, R.petersen, M. Meltz, R cleveland,j.c.lin, l. Heynick, Radiofrequency electromagnetic exposure: tutorial review on expeimental dosimetry, Bioelectromagnetics 17 (1996) 195-208.

10) Mann, j. Roschke, Effects of pulsed high-frequency electromagnetic fields on human sleep, Neuropsychobiogy 33 (1996) 41-47.

11) Maes, m. collier, u. can Gorp, s. vandoninck, l. verschaeve, cytogenetic effects of 935.2 MHz (GSM) microwaves alone and in combination with mitomycin C, Mut. Res.393(1997)151-156