

# فراوانی آسیب‌های کروموزومی ناشی از داروی بلئومایسین سولفات در سلول‌های هیبریدومای F3B6 و HF2x653 در مقایسه با سلول‌های غیرهیبرید والدی

نویسندگان: نجمه جویان<sup>۱</sup>، حسین مزدارانی<sup>۲\*</sup>، محمد علی شکرگزار<sup>۳</sup> و وحیده فراحت<sup>۴</sup>

۱. کارشناس ارشد گروه زیست‌شناسی - ژنتیک دانشکده علوم دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات
۲. استاد گروه ژنتیک پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۳. دانشیار بانک سلولی انستیتو پاستور ایران
۴. کارشناس بانک سلولی انستیتو پاستور ایران

\*E-Mail: Mozdarah@modares.ac.ir

نویسنده مسئول:

دوماهنامه علمی -

پژوهشی

دانشگاه شاهد

سال شانزدهم - شماره ۸۱

تیر ۱۳۸۸

### چکیده

مقدمه و هدف: هیبریدهای سلول‌های سوماتیک از تلفیق دو یا چند سلول سوماتیک به دست می‌آیند که پس از تشکیل، کروموزوم‌های سلول‌ها در یک غشا قرار می‌گیرند. به این ترتیب محیط هسته‌ای هر کدام از سلول‌های ادغام یافته تغییر کرده، ژن‌ها و کروموزوم‌های دو سلول در معرض واکنش با یکدیگر قرار می‌گیرند. قرار گرفتن کروموزوم‌ها در شرایط سیتوپلاسمی و هسته‌ای جدید و نوآرایی‌های وسیع کروموزومی که در این سلول‌ها پس تشکیل رخ می‌دهد، می‌تواند بر حساسیت آن‌ها به داروهای مختلف اثر بگذارد. در این مطالعه اثر داروی بلئومایسین سولفات (BLM) بر دو سلول هیبرید F3B6 و HF2x653 در مقایسه با سلول‌های غیر هیبرید والدی شان، WIL2 و NS1، با تمرکز بر آسیب‌های کروموزومی در مرحله G<sub>1</sub> چرخه سلولی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: چهار رده سلولی، NS1، HF2x653، WIL2 و F3B6 از انجماد خارج شده و به طور جداگانه در فلاسک حاوی محیط کشت RPMI همراه با ۱۵-۱۰ درصد FBS کشت شدند. سپس در مرحله رشد لگاریتمی در فاز G<sub>1</sub> چرخه سلولی با دزهای ۵۰۰ pg/ml و ۱۰۰ pg/ml BLM تیمار شدند. پس از محصول برداری، تثبیت، تهیه گستره‌های متافازی و رنگ‌آمیزی با گیمسا، سلول‌های آسیب دیده و انواع آسیب‌های کروموزومی در آن‌ها بررسی شد.

نتایج: نتایج نشان داد که فراوانی این آسیب‌ها در سلول‌های هیبرید و غیر هیبرید والدی آن‌ها مشابه است. سلول‌های واجد کروموزوم بیش‌تر یعنی دو سلول NS1 و F3B6 آسیب‌های کروموزومی بیش‌تری نسبت به دو رده سلول واجد کروموزوم کم‌تر نشان دادند. بررسی فراوانی آسیب‌ها به ازاء کروموزوم نیز مؤید این نتیجه است، فراوانی آسیب‌ها به ازاء کروموزوم در دو سلول NS1 و F3B6 مشابه و بیش‌تر از دو سلول HF2x653 و WIL2 بود. گرچه گاهی سلول‌های هیبرید نسبت به سلول‌های والدی خود حساسیت متفاوتی نشان دادند اما پاسخی وابسته به دز در این مرحله مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: سلول‌های هیبرید مطالعه شده در تحقیق از نظر حساسیت به داروی بلئومایسین در مرحله G<sub>1</sub> چرخه سلولی، به یکی از رده‌های سلولی والدی خود شبیه بوده و نسبت به والد دیگر حساسیت کم‌تر یا بیش‌تری نشان می‌دهند.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های هیبریدوما، آسیب‌های کروموزومی، بلئومایسین سولفات

وصول: ۸۸/۱/۲۱

اصلاحات: ۸۸/۳/۳۱

پذیرش: ۸۸/۴/۷

## مقدمه

سلول‌های هیبرید (دورگه) معمولاً از ادغام سلول‌های لنفوسیت B با سلول‌های میلومایی حاصل می‌شوند. در این فرایند غشای سلول‌های نامیرای میلوما با غشای لنفوسیت‌های تولیدکننده آنتی‌بادی ادغام شده و سلولی چند هسته‌ای که هتروکاریون (heterokaryon) نام دارد ایجاد می‌شود. پس از چند روز هسته‌ها نیز با همدیگر امتزاج یافته سلول سین کاریون (synkaryon) بوجود می‌آید و کروموزوم‌ها در یک غشا قرار می‌گیرند [۱]. شمار کلی کروموزوم‌های درون سلول‌های هیبرید غالباً معادل با جمع کروموزوم‌های سلول‌های والد نیست. هیبریدهای سلول سوماتیک به تدریج کروموزوم‌هایشان را بیش‌تر از یک والد از دست می‌دهند. با افزایش تعداد پاساژ سلول‌ها، نوآرایی‌های کروموزومی قابل توجهی رخ می‌دهد که از یک سو باعث سازگار شدن آن‌ها با محیط کشت می‌شود، اما از سویی منجر به از دست رفتن یک سری فعالیت‌های عملکردی این سلول‌ها می‌گردد [۲].

در این مطالعه سلول‌های هیبرید F3B6 و HF2X653 مورد بررسی قرار گرفت که والد آن‌ها سلول‌های WIL2 و NS1 می‌باشند. WIL2 سلول لنفوسیت B انسانی است که جهت نامیرا شدن با سلول‌های میلومایی موش - در اینجا NS1 - بعد از تغییراتی ادغام شده است. این سلول‌های میلومایی از مدل‌های موشی میلوما گرفته می‌شوند. میلوما نئوپلاسم سلول B است که با توسعه کلونال سلول‌های پلاسمایی بدخیم در مغز استخوان مشخص می‌شود. سلول‌های میلومایی واجد نقص‌های ژنومیکی پیچیده و فراوانی هستند. جابجایی‌های کروموزومی دیگر که هر کدام ژن‌های خاصی را درگیر می‌کنند نیز گزارش شده است، همچنین حذف‌های کروموزومی، که از جمله مهم‌ترین آن می‌توان به حذف کروموزوم 17p حاوی ژن P53 اشاره کرد [۳]. p53 نقش مرکزی در حفظ پایداری ژنوم دارد به حدی که جهت توصیف این نقش عنوان محافظ ژنوم (Guardian of the Genome) به آن داده شده است. p53 در ترمیم آسیب DNA ایجاد شده توسط BLM شرکت دارد. نشان داده شد که جهش یافته‌های p53 در ترمیم NER (nucleotide excision repair) ناتوان‌اند و در حساسیت بالا به شکست‌های رشته‌ای و آسیب بازی و در

نتیجه آسیب‌های کروموزومی دارند [۴]. آسیب‌های کروموزومی (CA) تغییراتی در ساختار یا تعداد کروموزوم‌های نرمال هستند که می‌توانند به طور خود بخود یا در نتیجه تیمار با مواد رادیواکتیو یا مواد شیمیایی رخ دهند [۵]. CA یکی از مهم‌ترین عواقب بیولوژیکی مواجه انسان عوامل ژنوتوکسیک است که بخش قابل مشاهده میکروسکوپی طیف وسیعی از تغییرات ایجاد شده با مکانیسم‌های ترمیمی متفاوت شکست‌های DNA است [۶].

نقشه کشی ژن‌ها بر اساس حذف یا باقی ماندن کروموزوم‌ها و بررسی دو ژنوم موجود در سلول‌های هیبریدوما از جمله مواردی هستند که سلول‌های هیبرید را بسیار ارزشمند می‌سازد [۷]، اما این پدیده حذف کروموزوم‌ها که همراه با حذف ژن‌های موجود در آن است، بر همکنش دو ژنوم و قرار گرفتن آن‌ها در شرایط سیتوپلاسمی متفاوت، می‌تواند این سؤال را در ذهن ایجاد کند که آیا در ویژگی‌های دیگر سلول‌های هیبرید نسبت به سلول‌های والدی تغییری ایجاد می‌شود یا نه، از جمله این تغییرات می‌تواند چگونگی پاسخ آن‌ها به مواد شیمیایی از جمله داروهای شیمی درمانی باشد.

به‌طور کلی عوامل شیمیایی و فیزیکی ایجادکننده ناهنجاری‌های کروموزومی را می‌توان بر اساس دو روش اصلی عملکرد به دو گروه عمده تقسیم کرد: عوامل وابسته به مرحله سنتز (S) و عوامل مستقل از مرحله سنتز. عوامل وابسته به مرحله سنتز مانند بلنوماپسین، نور فرابنفش یا مواد الکیله‌کننده، نقص‌ها را از طریق همانندسازی نادرست ایجاد می‌کنند، برای مثال هنگامی که DNA دارای نقص، یک همانندسازی را پشت سر می‌گذراند، آسیب شکل می‌گیرد. این عوامل را وابسته به مرحله S می‌نامند زیرا آسیب‌های ناشی از آن‌ها فقط پس از گذر از مرحله S بیان می‌شود و ممکن است آسیب‌های کروماتیدی را در هر مرحله سلول ایجاد کند

BLM که به‌صورت وابسته به مرحله S آسیب کروموزومی ایجاد می‌کند، از ترکیبی از آنتی‌بیوتیک‌های آنتی‌نئوپلاستیک مشابه جدا شده است که در کنار ارزش آن در شیمی درمانی سرطان‌ها از جمله درمان تومورهای سلول اسکواموس سر و گردن، پوست، ریه و بیضه، به

F3B6 (ATCC HB-8785) نیز یک هتروهیبرید است که از ادغام سلول‌های میلومایی NS1 با لنفوسیت‌های B خون محیطی انسان به دست آمده است. WIL2.NS.6TG (ECACC No. 93031001) رده سلولی لنفوسیت B انسانی غیر ترشح‌کننده است که والد آن WIL2 بوده و به محیط HAT حساس و به ۶- تیوگوانین مقاوم است. (NS1 یا P3/NS1/1-AG4-1 یا NS1/1-AG4-1) (ATCC TIB-18) رده سلولی میلومای موشی غیر ترشح‌کننده است که در مطالعات ادغام سلولی بسیار از آن استفاده می‌شود. این رده سلولی به آزاگوانین مقاوم است و در محیط HAT رشد نمی‌کند. کلیه سلول‌ها از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند.

#### دارو

بلئومایسین سولفات (Sigma. Bleomycin sulfate. BLM) (USA). به صورت پودر سفید رنگ لیوفیلیزه استریل شده در ویال‌های ۱۰ mg و ۵۰ mg وجود دارد. داروی مزبور در مراحل مختلف در شرایط استریل با آب مقطر رقیق شد و رقت‌های ۱۰۰ μg/ml و ۵۰ μg/ml از آن تهیه شد. این دارو به مدت ۳ ماه در دمای ۴ °C قابل نگهداری است [۱۰].

#### کشت سلول، تیمار و تهیه گستره‌های متافازی:

سلول‌ها پس از دیفریز و رشد در چاهکهای پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای در محیط کشت RPMI\_1640 (Sigma) همراه با ۱۰-۱۵ درصد سرم جنین گوساله (Fetal Bovine serum, Gibco) (FBS)، آنتی‌بیوتیک (۱۰۰ IU/ml پنی‌سیلین (Sigma)، ۱۰۰ μg/ml استرپتومایسین (Sigma)) و ۰/۲ ml L- گلوتامین در ۳۷°C کشت شدند. پس از رسیدن سلول‌ها به مرحله رشد لگاریتمی هر فلاسک حاوی حدود ۱۰<sup>۶</sup> سلول توسط داروی بلئومایسین سولفات (BLM-S) با غلظت‌های ۵۰ μg/ml و ۱۰۰ μg/ml. در فاز سلولی G<sub>1</sub> چرخه سلولی تیمار شدند. سلول‌ها ۳ ساعت در معرض دارو قرار گرفتند، بعد از پایان این زمان سلول‌ها شستشو و دارو از محیط حذف شد و سلول‌ها مجدداً با محیط کشت تازه همراه با ۱۰-۱۵ درصد FBS به مدت ۲۴ ساعت کشت شدند. ۱/۵ ساعت قبل از محصول برداری کلشی سین

خاطر خاصیت واکنش مشخص آن با DNA خالص مورد توجه است. مکانیزم عمل BLM در بین مواد ضدسرطان منحصر به فرد است، این آنتی‌بیوتیک یک ماده آنتی‌تومور رادیومیمتیک (Radiomimetic antitumoral agent) است که می‌تواند رفتار اشعه را تقلید کرده و اثرات سمی خود را از طریق تشکیل رادیکال‌های آزاد و ایجاد آسیب‌های اکسیداتیو به DNA اعمال کند [۸]. این آنتی‌بیوتیک به طور وسیع قادر به ایجاد شکست‌ها و تبادل‌های کروموزومی است. ناهنجاری‌های کروموزومی می‌توانند ناهنجاری‌های عددی یا ساختاری باشند. ناهنجاری‌های ساختاری کروموزومی را می‌توان به انواع آسیب‌های کروموزومی و کروماتیدی تقسیم کرد. در این مطالعه در همین ارتباط تأثیر داروی بلئومایسین سولفات بر فراوانی آسیب‌های کروموزومی در سلول‌های هیبرید F3B6 و HF2X در مرحله G<sub>1</sub> چرخه سلولی در مقایسه با سلول‌های غیر هیبرید مورد ارزیابی قرار گرفت. این آسیب‌ها شامل، شکاف، شکست‌های کروموزومی (انتهایی و داخلی)، تبادلات کروموزومی، دی سانتریکها و کروموزوم‌های حلقه است [۹].

هدف از انجام این مطالعه بررسی تأثیر بلئومایسین سولفات در ایجاد آسیب‌ها ب کروموزومی در مرحله G<sub>1</sub> چرخه سلولی سلول‌های هیبریدوما و مقایسه آن با سلول‌های غیر هیبرید (والدی) بوده است.

#### مواد و روش‌ها

##### رده‌های سلولی

چهار رده سلولی HF2X653، F3B6، WIL2.NS.6TG و NS1 در این مطالعه بررسی شدند. دو سلول اول رده هیبریدوما و دو سلول بعدی رده سلول‌های غیر هیبریداند که به عنوان سلول‌های والدی انتخاب شده‌اند. HF2X653 (ECACC No. 90012609)، یک هتروهیبریدوما انسان-موش است که از ادغام الکتروآکوستیکی سلول میلومای موشی P3X63/AG8.653 با لنفوسیت B انسانی WIL2-729-HF2 به دست آمده و به محیط Hypoxanthine Aminopterin Thymidine (HAT) حساس است.

استفاده از برنامه SPSS (نسخه ۱۲) با آنالیز واریانس و تست Kruskal-Wallis مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.  $p < 0/05$  برای معنادار بودن تفاوت بین نتایج حاصل از آزمایش‌های مختلف مد نظر قرار گرفت.

### نتایج

آسیب‌هایی که در این مطالعه مورد شمارش قرار گرفته است شامل شکاف (gap) شکست یا حذف (break یا deletion) و تبادل (exchange) است. در مورد هر یک از این متغیرها آنالیز آماری مجزا صورت گرفته است، اما آنچه مبنای مقایسه قرار گرفته مجموع آسیب (total aberration) است که مجموع فراوانی شکست و تبادل است. نتایج در جدول ۱ خلاصه شده است.

### تأثیر تیمار و افزایش غلظت دارو بر فراوانی آسیب‌های کروموزومی

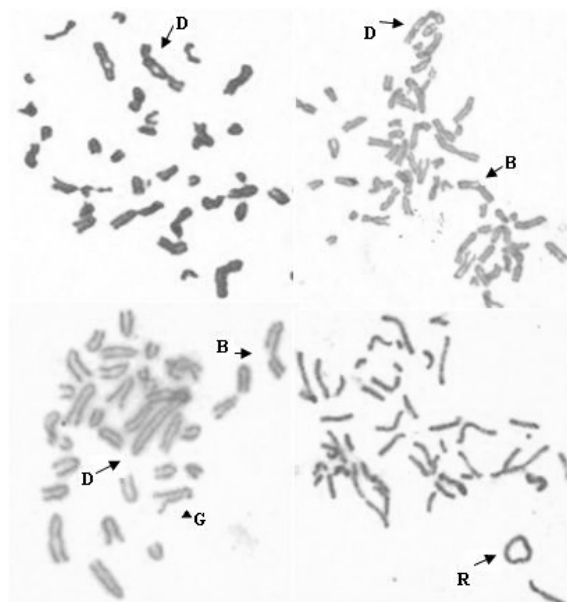
همان‌گونه که در جدول ۱ و شکل‌های ۲ تا ۵ مشاهده می‌شود، داروی BLM باعث افزایش فراوانی آسیب‌های کروموزومی در سلول‌ها در مرحله  $G_1$  چرخه سلولی می‌شود، اما این افزایش معنادار نیست ( $p > 0/05$ )، همچنین در مورد افزایش غلظت دارو نتایج مبین آن است که با افزایش غلظت دارو از ۵۰ به ۱۰۰ گرچه فراوانی مجموع آسیب‌ها افزایش می‌یابد، این افزایش معنادار نیست ( $p > 0/05$ ) بجز در مورد سلول WIL2 که رفتاری متفاوت نشان داد یعنی با افزایش غلظت دارو فراوانی مجموع آسیب‌ها به طور معناداری ( $p < 0/05$ ) در این سلول‌ها افزایش یافت.

تبادل کروموزومی از نوع دی‌سانتریک و کروموزوم حلقه، دیگر آسیب کروموزومی مورد بررسی بود. همان‌گونه که در شکل‌های ۲ تا ۸ نشان داده شد، فراوانی این نوع آسیب بسیار پایین است و تفاوت معناداری در دزهای مختلف در مورد آن‌ها مشاهده نشد ( $p > 0/05$ ). میزان تبادل در تیمارهای مختلف، متفاوت است و از روند منظمی پیروی نمی‌کنند. تنها مشاهده شد که در سلول WIL2 فراوانی تبادل به طور معناداری از سایر سلول‌های HF2x,NS1 و F3B6 بیش تر است ( $p < 0/05$ ).  $0/15 \pm 0/014$  به ازاء سلول برای دز  $50 \mu\text{g/ml}$  و  $0/27 \pm 0/042$  به ازاء سلول برای دز  $100 \mu\text{g/ml}$  در مقایسه با متوسط

$\mu\text{g/ml}$  (Sigma 0/08) اضافه، سلول‌ها طبق روش استاندارد (۱۹۶۰) محصول برداری شدند و بعد از فیکس کردن با اسید استیک/متانول (۳:۱) لام متافازی تهیه شد. گستره‌های کروموزومی خشک شده در معرض هوا، با گیمسا ۱۰٪ رقیق شده در بافر فسفات، رنگ شدند. متافازهای خوب باز شده و بدون روی هم افتادگی کروموزوم‌ها با حدود ۴۵-۵۸ کروموزوم برای سلول WIL2.NS.6TG، حدود ۶۵-۵۰ کروموزوم برای سلول‌های F3B6 و NS-1 حدود ۴۳-۵۵ کروموزوم برای سلول HF2X653 بررسی شدند و از نظر آسیب‌های کروموزومی (شکاف، شکست، قطعات بدون سانترومر، کروموزوم‌های دی‌سانتریک و حلقه) شمارش شدند. شاخص میتوزی نیز از طریق شمارش سلول‌های میتوزی در ۲۰۰۰ سلول برای هر تیمار به دست آمد. برای هر سلول و هر غلظت دو بار تیمار و شمارش انجام شد. شکل ۱ فتومیکروگراف انواع آسیب‌های مشاهده شده در سلول‌های مختلف را نشان می‌دهد.

### آنالیز آماری

در هر تیمار میزان شکاف، شکست، تبادل و مجموع آسیب‌ها (مجموع شکست و تبادل) جداگانه ثبت و با



شکل ۱: فتومیکروگراف نشان‌دهنده نمونه‌هایی از انواع آسیب‌های کروموزومی که در رده‌های مختلف سلولی مورد بررسی مشاهده و شمارش شده است. B؛ مبین شکست ساده، D؛ دی‌سانتریک، G؛ شکاف و R کروموزوم حلقه است (بزرگنمایی  $\times 1000$ ).

جدول ۱: فراوانی آسیب‌های کروموزومی مشاهده شده در نمونه‌های کنترل و تیمار شده با داروی بلتومایسین سولفات با غلظت‌های ۵۰  $\mu\text{g/ml}$  و ۱۰۰  $\mu\text{g/ml}$  در سلول‌های هیبرید HF2 و F3B6 و سلول‌های غیر هیبرید WIL2 و NS1 در مرحله G<sub>1</sub>

سلول	غلظت (( $\mu\text{g/ml}$ )	تعداد سلول بررسی شده	آسیب کروموزومی $\pm$ انحراف معیار				
			شکاف (Mean $\pm$ SE)	شکست (Mean $\pm$ SE)	تبادل (Mean $\pm$ SE)	مجموع آسیب‌ها (Mean $\pm$ SE)	درصد سلول‌های آسیب دیده
WIL2	کنترل	۱۰۰	۳ $\pm$ ۱/۴	۵ $\pm$ ۱/۴	۰	۵ $\pm$ ۱/۴	۴
	۵۰	۱۰۰	۷ $\pm$ ۲/۲۴	۵۸ $\pm$ ۵/۳	۱۵ $\pm$ ۱/۴	۷۳ $\pm$ ۱۷/۷	۳۶
	۱۰۰	۱۰۰	۹ $\pm$ ۱/۴	۹۸ $\pm$ ۸/۱۴	۲۴ $\pm$ ۴/۲۴	۱۲۵ $\pm$ ۱۰/۳۸	۵۶
NS1	کنترل	۱۰۰	۱۷ $\pm$ ۱/۴	۹۶ $\pm$ ۱۱/۳	۲ $\pm$ ۲/۸۲	۹۸ $\pm$ ۱۴/۱۲	۵۲
	۵۰	۱۰۰	۱۰ $\pm$ ۲/۸۲	۱۳۴ $\pm$ ۱۶/۹	۴	۱۳۸ $\pm$ ۱۶/۹۶	۶۶
	۱۰۰	۱۰۰	۱۲ $\pm$ ۲/۸۲	۱۶۶ $\pm$ ۱۹/۷	۷ $\pm$ ۱/۴	۱۷۴ $\pm$ ۲۲/۶	۷۴
HF2x653	کنترل	۱۰۰	۸ $\pm$ ۲/۸۲	۶۶ $\pm$ ۵/۶۴	۵ $\pm$ ۱/۴	۱۰۴ $\pm$ ۷/۷۷	۳۴
	۵۰	۱۰۰	۶ $\pm$ ۲/۸۲	۸۱ $\pm$ ۹/۸۸	۴ $\pm$ ۲/۸۲	۸۵ $\pm$ ۱۲/۷۰	۴۴
	۱۰۰	۱۰۰	۱۷ $\pm$ ۱/۴	۱۰۶ $\pm$ ۱۱/۳۰	۷ $\pm$ ۱/۴	۱۱۲ $\pm$ ۱۲/۷۰	۵۴
F3B6	کنترل	۱۰۰	۲۸ $\pm$ ۲/۸۲	۸۰ $\pm$ ۱۴/۱۴	۵ $\pm$ ۱/۴	۸۵ $\pm$ ۱۵/۵۴	۳۸
	۵۰	۱۰۰	۳۳ $\pm$ ۴/۲۴	۱۳۰ $\pm$ ۱۱/۳۸	۷ $\pm$ ۱/۴	۱۳۶ $\pm$ ۱۲/۷۰	۵۲
	۱۰۰	۱۰۰	۲۶ $\pm$ ۸/۴۸	۱۵۴ $\pm$ ۱۶/۹۶	۸ $\pm$ ۲/۸۲	۱۶۲ $\pm$ ۱۹/۷۸	۵۲

ندارد ( $p > 0.05$ ). اما با سلول NS1 اختلاف معناداری نشان می‌دهد ( $p < 0.05$ ). فراوانی مجموع آسیب‌ها در سلول هیبرید HF2x نیز با سلول NS1 اختلاف معناداری ندارد ( $p > 0.05$ ). اما با سلول WIL2 اختلاف معناداری نشان می‌دهد به عبارتی دو سلول هیبرید HF2x و انسانی WIL2 از نظر فراوانی مجموع آسیب‌ها با هم اختلاف معناداری ندارند ( $p > 0.05$ ) و در یک گروه قرار می‌گیرند (شکل ۷) و دو سلول هیبرید F3B6 و موشی NS1 نیز از نظر فراوانی با هم اختلاف معناداری ندارند ( $p > 0.05$ ) و در یک گروه قرار می‌گیرند.

در نمونه‌های تیمار شده با ۱۰۰  $\mu\text{g/ml}$  بلتومایسین سولفات نیز نتایج مشابه تیمار با ۵۰  $\mu\text{g/ml}$  مشاهده شد. فراوانی مجموع آسیب‌ها در سلول هیبرید HF2x با سلول WIL2 اختلاف معناداری ندارد ( $p > 0.05$ ). اما با سلول NS1 اختلاف معناداری نشان می‌دهد ( $p < 0.05$ ) فراوانی این متغیر در سلول هیبرید HF2 نیز با سلول NS1 اختلاف معناداری ندارد ( $p > 0.05$ ). اما با سلول WIL2 اختلاف معناداری نشان می‌دهد ( $p < 0.05$ ) (شکل ۸).

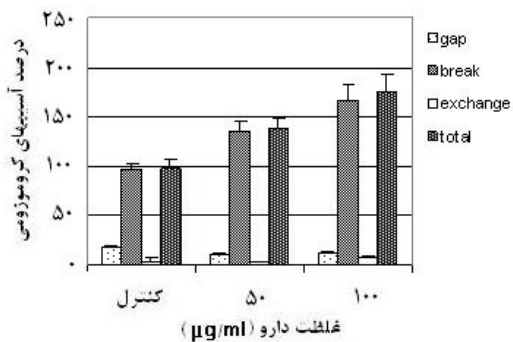
شکل‌های ۵ تا ۸ و نتایج ارائه شده در جدول ۱ نشان می‌دهد پس از تیمار با بلتومایسین بیش‌ترین فراوانی مجموع آسیب‌ها در سلول‌های موشی NS1 و کم‌ترین

۰/۰۷  $\pm$  ۰/۰۲۴ و ۵۰  $\mu\text{g/ml}$  برای دز ۰/۰۵  $\pm$  ۰/۰۱۴ در ۱۰۰  $\mu\text{g/ml}$  در سه سلول دیگر (شکل‌های ۳ و ۴). فراوانی آن در مجموع آسیب‌ها آورده شده است زیرا در برادرانده حذف یا شکست هستند. در تیمارهای مختلف فراوانی‌های gap یا شکاف، متغیر، متفاوت و بدون روند منظمی جهت گروه‌بندی سلول‌ها نشان می‌دهند. از آن‌جا که اهمیت واقعی آن با دیگر انواع آسیب‌ها مشخص نیست جزء مجموع آسیب‌ها در نظر گرفته نشد.

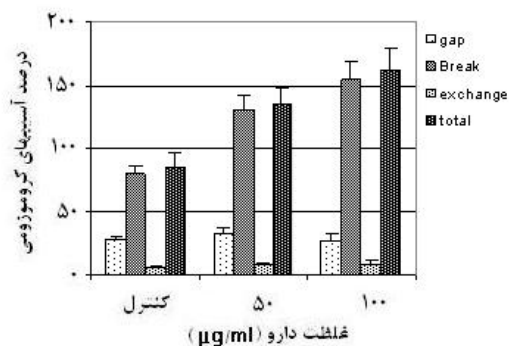
مقایسه فراوانی آسیب‌ها در دو سلول هیبرید با سلول‌های غیر هیبرید

آنالیز فراوانی داده‌ها در نمونه کنترل نشان داد که فراوانی مجموع آسیب‌ها در سلول هیبرید HF2x با فراوانی آن در سلول WIL2 اختلاف معنادار دارد ( $p < 0.05$ ), اما تفاوت با سلول NS1 معنادار نمی‌باشد ( $p > 0.05$ ). در مورد سلول هیبرید F3B6 نیز همین گونه بود. فراوانی این متغیر در سه سلول NS1، HF2x و F3B6 با هم اختلاف معناداری نشان نداد ( $p > 0.05$ ). نتایج در شکل ۶ نشان داده شد.

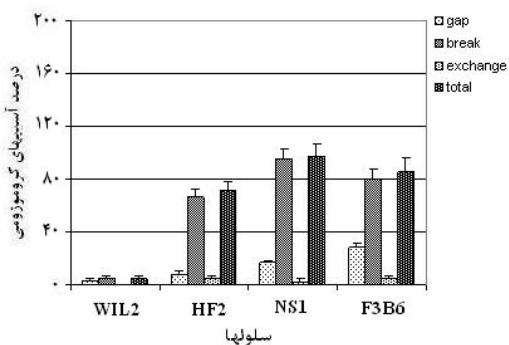
در نمونه‌های تیمار شده با ۵۰  $\mu\text{g/ml}$  بلتومایسین سولفات، آنالیز داده‌ها نشان داد که فراوانی این متغیر در سلول هیبرید HF2x با سلول WIL2 اختلاف معناداری



شکل ۴: آسیب‌های کروموزومی ایجاد شده توسط دزهای مختلف BLM-S در سلول NS1 در مرحله G<sub>1</sub> چرخه سلولی.



شکل ۵: آسیب‌های کروموزومی ایجاد شده توسط دزهای مختلف BLM-S در سلول F3B6 در مرحله G<sub>1</sub> چرخه سلولی.

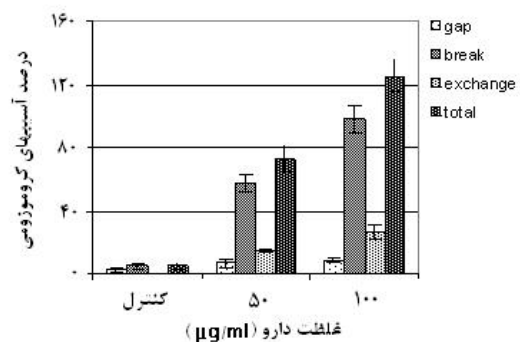


شکل ۶: مقایسه آسیب‌های کروموزومی در ۴ سلول بدون تیمار (کنترل) در مرحله G<sub>1</sub> چرخه سلولی.

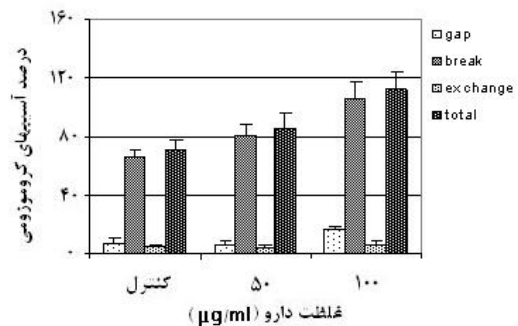
### بحث

فراوانی ناهنجاری‌های کروموزومی به عوامل بیولوژیکی متعددی مانند نوع سلول، مرحله چرخه سلولی، نوع ماده کلاستوزن، دز و درجه آسیب فیزیکی ایجاد شده با ماده مربوطه بستگی دارد و منحنی‌های وابسته به دز برای آن‌ها بسته به ماده ایجادکننده، مرحله چرخه سلولی و نوع سلول

آسیب در سلول‌های لنفوسیت انسانی WIL2 مشاهده شد و این تفاوت معنادار است. در آنالیز داده‌ها، سلول‌های هیبرید F3B6 و HF2x به ترتیب با NS1 و WIL2 در یک گروه قرار گرفتند. لذا این داده‌ها نشان می‌دهند که سلول هیبرید HF2x از نظر حساسیت به این دارو و آسیب‌های ایجاد شده توسط آن مشابه سلول والد انسانی خود WIL2 است و سلول هیبرید F3B6 مشابه سلول والد موشی خود NS1 است. اما در نمونه‌های کنترل یعنی سلول‌هایی که تحت تأثیر دارو قرار نگرفته‌اند روند متفاوتی مشاهده شد، WIL2 در یک گروه و سه سلول دیگر در گروه دیگر قرار گرفتند، یعنی فراوانی مجموع آسیب‌ها در HF2x، NS1 و F3B6 با هم تفاوت معناداری نشان ندادند ( $p > 0.05$ ). فراوانی این متغیر در سلول WIL2 به‌طور معناداری از سه سلول دیگر کم‌تر است (یعنی  $0.01 \pm 0.05$  برای WIL2 در مقابل  $0.08 \pm 0.07$ ،  $0.07 \pm 0.07$  و  $0.11 \pm 0.08$  به ترتیب برای سلول‌های NS1، HF2x653 و F3B6 به ازای سلول است (جدول ۱)).



شکل ۷: آسیب‌های کروموزومی ایجاد شده توسط دزهای مختلف BLM-S در سلول WIL2 در مرحله G<sub>1</sub> چرخه سلولی.

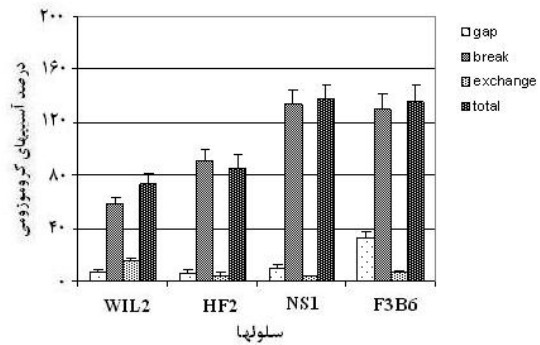


شکل ۸: آسیب‌های کروموزومی ایجاد شده توسط دزهای مختلف BLM-S در سلول HF2 در مرحله G<sub>1</sub> چرخه سلولی.

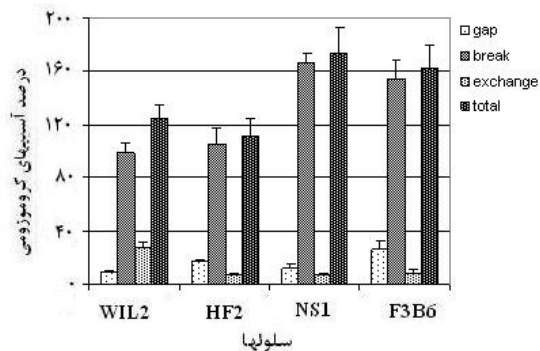
تحقیق بیش‌ترین آسیب مشاهده شده شکست بود، همان‌گونه که Li و Shiraiishi در سال ۱۹۹۰ آنرا به عنوان آسیب اصلی این مرحله گزارش کردند [۱۲]. آسیبی که BLM در کروموزوم‌های سلول‌های هیبریدومای F3B6 و HF2 ایجاد کرد نیز عمدتاً شکست (حذف) است، همچنانکه در سلول‌های والدی انسانی و موشی آن‌ها (WIL2 و NS1) نیز مشاهده شد. اثرات برخی مواد شیمیایی از جمله بلثومایسین سولفات می‌تواند به‌طور غیرمستقیم، از طریق تولید رادیکال‌های آزاد [۲] یا از طریق همانندسازی DNA الگوی آسیب دیده، یا مهار سنتز DNA و احتمالاً با مکانیسم‌های دیگر مثل مهار توپوایزومراز ۲ یا آنزیم‌های دیگر درگیر در ترمیم ایجاد آسیب می‌کنند [۱۳].

همان‌گونه که در شکل‌های ۲ تا ۸ نشان داده شد، فراوانی آسیب‌ها از نوع شکاف و بسیار کم است و تفاوت معناداری در گروه‌های مختلف دیده نشد بجز در مورد سلول WIL2 (سلول لئوسیت انسانی) که در نمونه‌های تیمار شده میزان بالاتری تبادل نسبت به سلول‌های دیگر نشان دادند. این امر می‌تواند به علت حضور کروموزوم‌های بزرگ متاسانتریک بیش‌تر نسبت به سلول‌های موشی و هیبرید که اغلب دارای کروموزوم‌های اکرو سانتریک‌اند، باشد. این یافته‌ها با یافته دیگری که گزارش شد توزیع نوآرای‌های کروموزومی در تیمار با داروها غیر تصادفی است، مطابقت دارد [۱۲]. البته میزان تبادل شمارش شده کم‌تر از میزان تبادلات کروموزومی و کروماتیدی واقعی رخ داده است چرا که برخی از این نوآرای‌های ساختاری را تنها با رنگ‌آمیزی فلورسانس از جمله برومواکسی یوریدین (BrdU)، Hoechst [۱۴] رنگ‌آمیزی الکالین گیمسا [۱۵] بعضی انواع تکنیک‌های پیشرفته‌تر از جمله FISH می‌توان تشخیص داد. با استفاده از روش رنگ‌آمیزی مورد استفاده در این تحقیق بررسی آسیب‌های ناپایدار کروموزومی که انواع آن در نمودارها نشان داده شد امکان‌پذیر است.

آنچه در این مطالعه معیار مقایسه سلول‌های هیبرید با سلول‌های غیرهیبرید در مواجهه با داروهای BLM-S بحث قرار گرفته است، نرخ مجموع کروموزوم (Total chromosome aberration) است که شامل مجموع حذف‌ها و تبادل‌هاست. آنالیز آماری داده‌های ثبت شده در جداول با استفاده از آزمون ناپارامتری Kruskal-Wallis



شکل ۷: مقایسه آسیب‌های کروموزومی در ۴ سلول تیمار شده با دز ۵۰ μg/ml بلثومایسین سولفات در مرحله G<sub>1</sub> چرخه سلولی.



شکل ۸: مقایسه آسیب‌های کروموزومی در ۴ سلول تیمار شده با دز ۱۰۰ μg/ml بلثومایسین سولفات در مرحله G<sub>1</sub> چرخه سلولی.

مورد بررسی متفاوت است [۱۱]. بر اساس معیار مورفولوژیکی، نقص‌های کروموزومی ساختاری به دو دسته اصلی تقسیم می‌شوند: نقص‌های نوع کروموزومی (CA) که دربرگیرنده هر دو کروماتید یک یا چند کروموزوم. این آسیب‌ها ناشی از مواجهه سلول‌ها در مراحل اولیه انتر فاز و پیش از همانندسازی با عوامل موتاژن و کلاستوژن هستند. این آسیب‌ها در یک رشته کروماتیدی ایجاد می‌شوند که بعد از طی مرحله S و همانندسازی DNA در یک نقطه از دو کروماتید وجود دارند. نقص‌های نوع کروماتیدی (CtA) دربرگیرنده تنها یکی از دو کروماتید یک کروموزوم یا کروموزوم‌های متعدد است [۶].

آسیب‌های کروموزومی مرحله G<sub>1</sub>، شکاف، شکست‌های کروموزومی (انتهایی و داخلی)، تبادلات کروموزومی، (دی سانتریکها و رینگها) است [۹]. در این

که این هم گروهی که ذکر شد و بالاتر بودن میزان آسیب‌ها در NS1 و F3B6 نسبت به HF2x و WIL2 تنها به علت برابر بودن تقریبی تعداد کروموزوم‌ها در سلول‌های هم گروه و بیش‌تر بودن تعداد کروموزوم‌های سلول‌های NS1 و F3B6 نسبت به HF2x و WIL2 نیست. در سلول‌های F3B6 و NS1 تعداد آسیب‌ها به ازاء کروموزوم نیز بیش‌تر از میزان آن در سلول‌های HF2 و WIL2 بود. یعنی دو سلول F3B6 و NS1 حساس‌تر از سلول‌های HF2x و WIL2 به ایجاد آسیب توسط BLM هستند و سلول‌های HF2x و WIL2 مقاومت بیش‌تری در مقابل این دارو نشان می‌دهند. با توجه به دانسته‌های پیشین و با دقت بیش‌تر در گسترده‌های متافازی کروموزوم‌های آن‌ها متوجه شدیم که F3B6 سلول هیبریدی بازمینه موش و HF2x سلول هیبریدی با زمین‌ه انسانی است. پس نمی‌توان گفت سلول‌های هیبرید از سلول‌های عادی و والد خود نسبت به عوامل خارجی و شیمیایی حساس‌ترند یا مقاوم‌تر. این امر می‌تواند به زمینه کروموزومی و ژنومی آن‌ها بستگی داشته باشد که در سلول‌های هیبرید متفاوت است و در هر سلول نیز می‌تواند از یک کلون به کلون دیگر متفاوت باشد. در حقیقت حساسیت سلول‌های هیبرید شبیه سلول والدی غالب است، گرچه در برخی موارد خلاف این امر دیده شد. شباهت فراوانی آسیب‌ها در سلول HF2 به سلول‌های NS1 و F3B6 و بیش‌تر بودن آسیب‌های آن نسبت به سلول WIL2 می‌تواند به دلیل حذف کروموزوم‌های دخیل در ترمیم آسیب‌ها و مقاومت دارویی باشد که در سلول والدی انسانی حضور دارد و در سلول این کلون از سلول هیبرید از بین رفته‌اند.

در این مطالعه مشاهده شد سلول‌های موشی NS1 حساس‌تر از سلول‌های انسانی WIL2 هستند رده سلولی موشی NS1 والد میلومایی سلول‌های هیبرید F3B6 و NS1 است. میلوما چه در انسان و چه در موش از طریق نقص‌های ژنومیکی پیچیده و فراوان مشخص می‌شود این نقص‌های ژنومیکی می‌توانند هم عددی و هم ساختاری باشد. جابجایی‌ها، حذف‌های نقطه‌ای و منوزومی‌های فراوانی در کروموزوم‌های سلول‌های میلومایی گزارش شده است. این سلول‌ها حساسیت افزایش یافته‌ای در مواجه با موتاژن‌ها دارند و نشانه‌هایی از ناپایداری ژنومی شامل آنوپلوئیدی‌ها و نقص‌های

تفاوت معناداری بین سلول‌های هیبرید با سلول‌های غیر هیبرید والدی آن‌ها نشان نداد. علی‌رغم آن‌که تصور می‌شود این سلول‌ها به علت از دست دادن برخی از کروموزوم‌ها ممکن است حساسیت بیش‌تری نسبت به سلول‌های والدی خود داشته باشند، اما سلول‌های واجد کروموزوم بیش‌تر (حدود ۵۵) از نظر آسیب ایجاد شده در یک گروه قرار گرفتند، یعنی سلول هیبرید F3B6 و سلول موشی NS1 و سلول‌های واجد کروموزوم کم‌تر (حدود ۴۶) یعنی سلول هیبرید HF2x و سلول انسانی WIL2 در گروه دیگر (شکل‌های ۶ تا ۸) قرار می‌گیرند. این نتیجه معادل با این یافته‌ها است که شمار شکست‌های کروموزومی به ازاء هر واحد DNA به‌طور خطی همراه با افزایش در محتوای DNA کروموزومی و کروماتیدی افزایش می‌یابد [۱۶]. هر چند شمار تبادلات به ازاء واحد DNA با افزایش کروموزوم‌ها افزایش پیدا نمی‌کند [۱۷]. البته در گستره‌های متافازی سلول‌ها مشاهده می‌شود دو سلول هیبرید از نظر محتوای کروموزومی، علاوه بر تعداد کروموزوم‌ها، از نظر اشکال و نوع کروموزوم‌هایشان با هم متفاوتند. کروموزوم‌های سلول F3B6 بیش‌تر شبیه به والد موشی خود است، از جمله آن‌که کروموزوم‌های اکروساتریک بیش‌تری دارد و کروموزوم‌های سلول HF2X536 بیش‌تر شبیه سلول والد انسانی خود است از جمله نسبت به F3B6 حاوی کروموزوم‌های متاساتریک بیش‌تری، مشابه سلول‌های انسانی است که البته با انواع روش‌های متمایزدهنده موشی و انسانی در یک سلول هیبرید این پدیده را بیش‌تر می‌توان بررسی کرد [۱۸].

به علاوه همان‌طور که قبلاً نیز ذکر شد کروموزوم‌های سلول‌های والدی پس از ادغام در محیط هسته‌ای و سیتوپلاسمی متفاوتی قرار می‌گیرند، ژن‌های دو گونه تحت تأثیر یکدیگر قرار می‌گیرند و معمولاً محتوای ژنتیکی و ماشین بیوسنتزی یک گونه بر مکانیزم‌های سلولی دیگر چیره می‌شود، در این جا نیز شباهت سلول هیبرید HF2 از نظر فراوانی آسیب‌های کروماتیدی به سلول والدی انسانی‌اش یعنی WIL2 و شباهت سلول هیبرید F3B6 به سلول والدی موشی اش یعنی NS2 می‌تواند به علت غالب شدن هسته WIL2 بر سلول والد موش در سلول هیبرید HF2x در مورد اول و غالب شدن هسته NS1 بر سلول والد انسانی در سلول هیبرید F3B6 باشد. نکته قابل توجه آنست



### منابع

1. Heilmann K, Groth T, Schossig M, Lendlein A, Micheel B. Modulation of hybridoma cell growth and antibody production by coating cell culture material with extracellular matrix proteins. *Biochemical Engineering Journal*. 2007, 35: 301-308.
2. Dzhambazov B, Teneva I, Koleva L, Asparuhova D, Popov N. Morphological, genetic and functional variability of a T-cell hybridoma line. *Folia Biologica (Praha)*. 2003, 49: 87-94.
3. Liebisch P, Dohner H. Cytogenetics and molecular cytogenetics in multiple myeloma. *European Journal of Cancer*, 2006, 42: 1520-1529.
4. Allio T, Donner EM, Preston RJ. A comparison of the roles of p53 mutation and AraC inhibition in the enhancement of bleomycin-induced chromatid aberrations in mouse and human cells. *Mutation Res.*, 2000, 447: 227-237.
5. Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volders M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 2006, 88:1515-1531.
6. Natarajan AT. Chromosome aberrations: Past, present and future. *Mutation Research*, 2002, 504: 3-26.
7. Rank DN. Development of somatic cell hybrid using buffalo leukocytes and mouse cell line. *Indian Vet. J.*, 2004, 81: 156 - 159.
8. Kuo TM and Hsu TC. Biochemical and cytological studies of bleomycin action on chromatin and chromosome. *Chromosoma*, 1978, 68: 229-234.
9. Cristina P, Araújo M, da Luz DF, Kronka SN and Takahashi CS. Effects of turmeric and its active principle, curcumin, on bleomycin induced chromosome aberration in Chinese hamster ovary cells. *Genetics and Molecular Biology*, 1999, 22: 407.
10. Koldamova RP, Lefterov IM. Synergistic effect of CCNU and bleomycin on human lymphocytes exposed at late G1 and G2 states of the cell cycle. *Mutation Res.* 1991, 260: 265-269.
۱۱. مزدارانی حسین. دزیمتری بیولوژیک، زیست نشانگرها و روش‌ها، انتشارات طب نوین، تهران، ۱۳۸۳.
12. Shiraishi MJ, Li Y. A unique human mutant B-lymphoblastoid cell line (ataxia telangiectasia) which exhibits increased sister-chromatid exchange retaining hypersensitivity to neocarzinostatin and bleomycin. *Mutation Res.* 1990, 230:167-175.
13. Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan AT, Norppa H, Shuker DE, Tice R, Waters MD, Aitio A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans, International Programme on Chemical Safety, *Mutation Res.*, 2000, 463: 111-172.
14. Kohn PH, Kraemer KH and Buchanan JK. Influence of ataxia telangiectasia gene dosage on bleomycin-induced chromosome breakage and inhibition of replication in human lymphoblastoid cell lines, *Exp. Cell Res.*, 1982, 137: 387-395.
15. Friend KK, Dorman BP, Kucherlapati RS, Ruddle FH. Detection of interspecific translocations in mouse-human hybrids by alkaline Giemsa staining. *Exp Cell Res.* 1976, 99: 31-36.

کروموزومی ساختاری را بروز می‌دهند [۱۹]، از این‌رو بالاتر بودن میزان آسیب‌های کروموزومی در سلول‌های NS1 و F3B6 نسبت به دو رده سلولی دیگر می‌تواند قابل توجیه باشد.

بعد از تیمار در مرحله G1 سلول‌ها تا وقوع چرخه سلولی دیگر در محیط کشت باقی می‌مانند و بلافاصله پس از تیمار با دارو در معرض کلشی سین و توقف چرخه سلولی قرار نمی‌گیرند [۲۰]، لذا عدم افزایش معنادار میزان آسیب‌ها با افزایش غلظت دارو می‌تواند به دلیل فرصتی باشد که سلول‌ها قبل از رسیدن به مرحله تقسیم جهت ترمیم دارند. احتمالاً سیستم ترمیم در فازهای دیگر سلول در صدی از آسیب‌ها را ترمیم می‌کنند، لذا عدم وابستگی نرخ آسیب‌ها به غلظت دارو در این مرحله می‌تواند به این دلیل باشد [۲۱].

### نتیجه‌گیری

حساسیت سلول‌های هیبرید نسبت به سلول‌های عادی و والدی خود به عوامل خارجی و شیمیایی می‌تواند به زمینه کروموزومی و ژنومی آن‌ها بستگی داشته باشد که در سلول‌های هیبرید متفاوت است و در هر سلول نیز می‌تواند از یک کلون به کلون دیگر متفاوت باشد. در حقیقت حساسیت سلول‌های هیبرید در این مطالعه شبیه سلول والدی غالب بود، به عبارتی نمی‌توان گفت که این سلول‌ها در ایجاد آسیب‌های کروموزومی توسط بلئومایسین سولفات در مرحله G1 چرخه سلولی، نسبت به سلول‌های غیر هیبرید حساسترند یا مقاوم‌تر.

### تقدیر و تشکر

این تحقیق بخشی از طرح شماره ۲۶۹ بانک سلولی، انستیتو پاستور ایران بود. از مساعدت کلیه همکاران محترم بانک سلولی ایران به ویژه سرکار خانم ناهید احمدی تشکر و قدردانی می‌شود.

16. Pandita TK, Gregoire V, Dhingra K, Hittelman WN. Effect chromosome size on aberration levels caused by gamma radiation as detected by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 1994, 67: 94-101.
17. MacLeod RA, Voges M, Bryant PE, Drexler HG. Chromatid aberration dose responses and dispersal in human G2 lymphocytes treated with bleomycin: comparison with equivalent X-irradiation reveals formation of a novel class of heavily damaged cells. *Mutation Res.*, 1994, 309: 73-81.
18. Buys CH, Aanstoot GH, and Nienhaus AJ. The Giemsa-11 technique for species-specific chromosome differentiation. *Histochemistry and Cell Biology*, 1984, 81: 465-468.
19. Islaih M, Halstead BW, Ibrahim AK, Baohui L, Jaclyn LRH, Leah F, Julie LA, Thom D, David KM, Ronald KN, David E. Relationships between genomic, cell cycle, and mutagenic responses of TK6 cells exposed to DNA damaging chemicals. *Mutation Research* 2005, 578: 100-116.
20. Hagmar L, Stromberg U, Bonassi S, Hansteen IL, Knudsen LE, Lindholm C, Norppa H. Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts. *Cancer Res.*, 2004, 64: 2258-2263.
21. Miller K.. Clastogenic effects of bleomycin, cyclophosphamide, and ethyl methanesulfonate on resting and proliferating human B- and T-lymphocytes. *Mutation Res.*, 1991, 251: 241-251.