مدلی جدید برای بررسی ناهنجاری های کروموزومی در مغز استخوان موش

امیر محمد ملوندی، فرهنگ حداد
مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و مهندسی بافت، دانشکده علوم پایه دانشگاه فردوسی مشهد.

چکیده

مقدمه: امروزه آنیوپلوئیدی به عنوان یکی از دلایل اصلی ایجاد سرطان در انسان شناخته می شود. در حال حاضر از وین بلاستین به عنوان متوقف کننده تشکیل دوک تقسیم در سلول های در حال تقسیم برای درمان انواعی از سرطان استفاده می شود. در عین حال وین بلاستین از دسته آلکالوئید های وینکا (از جمله وین کریستین و ...) به حساب می آید که تمامی اعزای این گروه به عنوان کارسینوژن های غیرجهش زا عمل می کنند. مطالعه نحوه فعالیت وین بلاستین(و مقاومت در برابر آن) و ارتباط آنیوپلوئیدی و سرطان از جمله زمینه های فعال سرطان شناسی محسوب می شود.

روش کار: در این پژوهش برای بدست آوردن دوز و زمان مناسب جهت القاء حداکثر آنیوپلوئیدی بدون جلوگیری از تقسیم سلولی در سلول های مغز استخوان موش های نر(نژاد balb/c) بوسیله آزمون میکرونوکلئوس، دوز های 1 ،2 ، 3 و 5 میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن؛ در زمان های 6، 18، 24و 30 ساعت پس از تیمار مورد آزمایش قرار گرفتند.

نتایج: پس از بررس نتایج، داده ها نشان دهنده بیشترین فراوان آنیوپلوئیدی القایی در دوز 2 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن،در زمان 24 ساعت پس از تیماربودند. بر اساس مطالعه انجام گرفته می توان مدل مناسبی جهت بررسی مکانیسم ایجاد سرطان بر اساس آنیوپلوئیدی در موش و همینطور بررسی روش های درمان سرطان در مطالعات بعدی ارائه نمود.

لغات کلیدی: آنیوپلوئیدی، وین بلاستین، آزمون میکرونوکلئوس.

مقدمه

سرطان به عنوان یک بیماری با اساس ژنتیکی یکی از اصلی ترین نگرانی های جوامع بشری می باشد. سالانه درصد بالایی از مرگ و میر در جوامع مختلف بر اثر سرطان گزارش می گردد. در سال 2004 بیش از 15 میلیون نفر از افراد بالای 18 سال در ایالات متحده به انواعی از سرطان مبتلا بوده اند. امروزه درباره منشاء شکل گیری سرطان موارد مختلفی مطرح می گردد که از این میان نقش ناهنجاری های کروموزومی در ایجاد و توسعه سرطان غیر قابل انکار است(1،2،3).

توزیع مساوی ماده ژنتیکی بین دو سلول دختر هدف نهایی در تقسیم میتوز است. خطاها در فرایند تفکیک کروموزومی باعث ایجاد سلول های ناهنجاری می گردد که از نظر تعداد کروموزوم ها دچار اختلال می باشند(4،5،6).

افزایش و یا کاهش یک یا بیشتر کروموزوم به صورت کامل، فرایندی است که به نام آنیوپلوئیدی شناخته می شود. یک سلول انسانی در حالت معمول 23 جفت(46 عدد) کروموزوم کامل و سالم دارد. سلول انسانی که عدد کروموزوم های آن متفاوت با حالت عادی باشد آنیوپلوئید محسوب می شود(5،6).

نقش آنیوپلوئیدی در زندگی روزمره انسان بسیار وسیع و گسترده است. آنیوپلوئیدی مسئول بسیاری از سقط های جنین، بدنیا آمدن نوزادان ناهنجار و در صورت وقوع در سلول های سوماتیک، انواعی از سرطان هاست. مطالعات روی ارتباط رشته های دوک و ساختار کینه توکوری کروموزوم ها و نقش آن در القای آنیوپلوئیدی بدلیل ارتباط آن با ایجاد سرطان منجر به حصول نتایج مهمی شده است(7).

در حقیقت تعداد غیرنرمال کروموزوم ها بیش از 100 سال است که در سلول های سرطانی انسانی شناخته شده است. بنیان این شناخت به فرضیه بوواری مبنی بر ایجاد سرطان بوسیله آنیوپلوئیدی باز می گردد. در این ارتباط عقیده بر این است که آنیوپلوئیدی مقدم بر ایجاد سرطان است(8). ایجاد ناهنجاری تعدادی کروموزومی در سلول های سوماتیک سهم بسیار زیادی در ایجاد سرطان بویژه در سرطان های بافت های جامد دارد. امروزه نقش موثر آنیوپلوئیدی در ایجاد سرطان های کولون و انواعی از سرطان خون به اثبات رسیده است(9،10،11). در همین راستا مقالات زیادی ارتباط بین آنیوپلوئیدی و القای سرطان را به طور مفصل توضیح داده اند(2،12،13). مواد سرطان زای(کارسینوژن ها) غیر جهش زا با القای آنیوپلوئیدی در سلول ایجاد تحول می کنند. نتیجه این تحول بهم خوردن تعادل صدها ژنی است که محصولات آنها در تفکیک کروموزومی، سنتز DNA و یا تعمیر آن دخالت دارند. چنین تغییراتی آسیب های جدی در روند های کنترل تقسیم سلولی ایجاد خواهند کرد و سلول توانایی تقسیم بدون کنترل را خواهد یافت. بنابراین آنیوپلوئیدی منبعی است که در نتیجه آن سلول های با برتری تقسیم ایجاد میشوند(14،15).

از جمله روش های درمانی که امروزه برای انواعی از سرطان ها استفاده می شود، شیمی درمانی با کمک دسته آلکالوئید های وینکا (از جمله وین کریستین و...) می باشد(16). وین بلاستین به عنوان عضوی موثر از این دسته با توجه به درصد سمیت کم و تاثیر در دوزهای بسیار پایین، امروزه مورد استفاده وسیع قرار می گیرد. این مواد به طور کلی به عنوان متوقف کننده های تشکیل دوک میتوزی در سلول های در حال تقسیم شناخته شده اند. وین بلاستین با تغییر اولتراساختاری در اتصال کینوتوکور-میکروتوبول و همچنین سانتروزوم در سلول های در حال تقسیم باعث توقف دوک میتوزی می شود (17). همچنین وین بلاستین توانایی مهار فعالیت میکروتوبول ها را در اینترفاز دارا می باشد(18).

شیمی درمانی روش مناسبی در درمان سرطان ها، و یا حداقل افزایش طول عمر فرد مبتلا، می باشد. اگرچه، در افراد تحت درمان مقاومت به این داروها و یا بدخیمی ثانویه به دلیل آنیوپلوئیدی القایی در این روش درمانی جزو نگرانی های مهم بشمار می رود(19). وین بلاستین در بحث سرطان شناسی و درمان آن دارای دو نقش متضاد می باشد. در حقیقت وین بلاستین به عنوان کارسینوژنی غیر جهش زا عمل می کند. به عبارت دیگر عدم ایجاد دوک سالم ایجاد ناهنجاری تعدادی (آنیوپلوئیدی) در سایر سلول های بدن فرد تحت درمان کرده و این امر همچنانکه بحث شد عاملی مهم برای ایجاد سرطان می باشد(2). وین بلاستین در دوزهای بسیار پایین مهار کننده تقسیم سلولی است. همین امر ضرورت بررسی دقیق اثرات ژنوتوکسیک مواد شیمیایی ضد سرطان، از جمله وین بلاستین، را نشان می دهد.

با توجه به این توضیح در این تحقیق، جهت بسترسازی مناسب برای کارهای آتی، تلاش صورت گرفته در این جهت بود که دوز مناسبی از وین بلاستین تعیین گردد تا در عین حال که القا کننده ناهنجاری تعدادی است، بر فرایند تقسیم سلولی تاثیر متوقف کننده ای نداشته باشد. به عبارت دیگر هدف این تحقیق ارائه مدل مناسبی از القای سرطان بواسطه آنیوپلوئیدی جهت مطالعات بیشتر سرطان و روش های درمانی است تا در صورت نیاز به بررسی آن در محیط ***in vivo*** استفاده

شود. به این منظور دوزهای متفاوت از وین بلاستین در زمان های مختلف مورد آزمایش قرار گرفت و در پایان پس از بررسی داده های آزمایشات انجام شده دوز و زمان مناسب برای هدف ذکر شده انتخاب گردید.

مواد و روشها

حیوان آزمایشگاهی مورد استفاده

در این تحقیق از موشهای نر نژاد balb/c که بین 3-5 هفته عمر داشتند استفاده شد. موش ها از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی گروه فیزیولوژی فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تهیه گردیدند و جهت تطابق با محیط به مدت 7 تا 10 روز در حیوان خانه با شرایط کنترل شده نگهداری شدند.

تیمار

در قسمت اول آزمایش جهت تعیین دوز مناسب وین بلاستین، به گروه های چهارتایی از موش ها دوزهای 1، 2، 3 و 5 میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن از وین بلاستین(Gedeon Richter LTD, Hungary) به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. پس از گذشت زمان شش ساعت از تزریق نمونه، برداری از مغز استخوان انجام شد.

جهت تعیین زمان مناسب تیمار با دوز بدست آمده از قسمت قبل، پس از تیمار گروه های چهارتایی از موشها نمونه برداری در زمان های 6، 18، 24 و 30 ساعت پس از تیماراز مغز استخوان صورت پذیرفت.

نمونه برداری از مغز استخوان

جهت نمونه برداری از مغز استخوان برای انجام آزمون میکرونوکلئوس(Micronucleous Test) از روش پیشنهادی Schmid و Hayashi استفاده شد(21،20). بطور خلاصه، پس از کشتن موش ها با کلروفرم، هر دو استخوان ران از بدن جدا شد و بعد از جدا سازی کامل ماهیچه های اطراف، مغز استخوان به کمک سرنگ 2 میلی لیتری استخراج گردید. از سلول های بدست آمده از هر استخوان به طور جداگانه پس از سانتریفوژ گسترش های سلولی تهیه گردید. تثبیت سلول ها در الکل 90% انجام و سپس به شیوه گیمسا- مای گرانوالد رنگ آمیزی صورت پذیرفت.

شمارش

شمارش سلولی توسط میکروسکوپ نوری(Olympus BH2) با بزرگنمایی 1000 انجام شد. در هر لام تعداد حداقل 1000 سلول پلی کروماتیک(PCE) شمارش گردید. در هر شمارش تعداد سلول های حاوی میکرونوکلئوس(PCEMN) تعیین شد. در این تعداد سلول شمارش شده همینطور تعداد سلول های متوقف در میتوز جهت محاسبه شاخص میتوزی(Mitotic Index) ، به طور اختصار MI، تعیین گردید.

بررسی آماری

مقایسه آماری داده ها توسط نرم افزار Minitab انجام شد. در این بررسی گروه های تیمار شده با کنترل و همینطور با یکدیگر مقایسه شدند. در جداول موجود، تفاوت آماری گروه های تیمار شده با کنترل و با یکدیگر با حروف a و b و c مشخص شده است. وجود حروف یکسان به معنی عدم وجود تفاوت معنی دار بین گروه هاست.

نتایج و بحث

ساختار و عمل وین بلاستین

وین بلاستین($C_{46}H_{58}N_4O_9$) و وزن مولکولی: $810/947^{g/mol}$ از دسته وینکا آلکالوئید ها و دارای استفاده در درمان انواعی از سرطان است (شکل 1).این ماده برای اولین بار توسط رابرت نوبل و کارلس توماس بیر از گیاه *Cantharanthus roseus*(L)G.Don استخراج گردید(16). این ماده با جلوگیری از فعالیت تکثیری به عنوان متوقف کننده میتوزی شناخته شده است. همچنین ثابت شده است در غلظت های پایین(0.1 nM-6)فعالیت میتوزی را بدون دپولیمریزه کردن شبکه میکروتوبولی بین متافاز تا آنافاز متوقف می کند. این داروی قدرتمند در غلظت پایین می تواند فعالیت رشد و کوتاه شدن انتهای میکروتوبول ها را متوقف کرده و زمان تقسیم را افزایش دهد. در حقیقت وین بلاستین امروزه به عنوان یک متوقف کننده قوی میتوز شناخته می شود(17).

در این پژوهش بر اساس ساختار و عمل کرد این ماده با توجه به اثر و ارتباط آنیوپلوئیدی و سرطان برای ایجاد بنیان برای فعالیت های آتی به گونه ای عمل گردید که با تعیین دوز مورد نیاز در سلول های مغز استخوان موش های مورد آزمایش، به جای توقف در میتوز حداکثر ناهنجاری تعدادی ممکن القا گردد. به عبارت دیگر زمان و دوزی مورد احتیاج بودند که با از نظم خارج کردن فعالیت دوک میتوزی بدون ممانعت از تقسیم، باعث القاء ناهنجاری تعدادی(آنیوپلوئیدی) در سلول های دختری گردند به گونه ای که به راحتی توسط آزمون میکرونوکلئوس قابل بررسی باشند. بدیهی است که توقف میتوزی القا شده با وین بلاستین نمی تواند اثر قابل بررسی و زود هنگامی در القای آنیوپلوئیدی داشته باشد. توقف طولانی مدت سلول های در حال تقسیم در میتوز در نتیجه فعالیت داروهای ممانعت کننده تشکیل رشته های دوک، بدلیل ممانعت از انجام فعالیت های حیاتی سلول از جمله نسخه برداری و ترجمه، با فعال کردن مسیرهای آپوپتوزیس سبب از بین رفتن سلول می گردد(23). نتیجه اینکه احتمال از دست دادن سلول های صدمه دیده در این شرایط بسیار زیاد خواهد بود.

تعیین دوز مناسب جهت القای آنیوپلوئیدی

برای یافتن دوز مناسب به منظور القا ناهنجاری تعدادی بدون توقف دوک میتوزی، دوزهای 1، 2، 3، 5 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن مورد آزمایش قرار گرفت که نتایج بدست آمده در جدول و نمودار (1) آمده است. فراوانی PCEMN در گروه کنترل برابر 1.12% محاسبه گردید که این میزان در محدوده فراوانی بدست آمده از مطالعه ای که به هدف دیگری انجام شده بود قراردارد(25،24). اندازه نسبتا بزرگ میکرونوکلئوس های القایی بعد از تیمار با وین بلاستین، نشان دهنده خاصیت آنیوژنیک وین بلاستین است. توانایی آنیوژنیک وین بلاستین در مطالعات متعددی به اثبات رسیده است(28،27،26). انتظار می رود که این میکرونوکلئوس ها بدلیل داشتن کروموزوم های کامل اندازه نسبتا در شتی را دارا باشند(29). تیمار با دوزهای 1، 2، 3و 5 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن نشان داد که در تمامی دوز های استفاده شده، به جز پایین ترین آنها، فراوانی معنی داری از میکرونوکلئوس توسط وین بلاستین، در مقایسه با گروه کنترل، القا می گردد(جدول 1). این فراوانی تا دوز 3 میلی گرم در هر کیلوگرم وزن بدن افزایش وابسته به دوز را نشان می دهد. بین فراوانی PCEMN دوزهای 1 و 2 و همچنین 3 و 5 تفاوت معنی داری مشاهده نگردید($P<0/01$). با توجه به توانایی وین بلاستین در صدمه زدن به دوک تقسیم، انتظار می رود با افزایش دوز،

فراوانی PCEMN افزایش وابسته به دوز داشته باشد. عدم وجود تفاوت معنی دار بین دوز های 3 و 5 میلی گرم در هر کیلوگرم وزن بدن بدلیل توقف سلولی در میتوز است که با افزایش شاخص میتوزی(MI) در این دوزها قابل تفسیر است.

بررسی فراوانی سلول های متوقف در تقسیم نشان داد که در دوز 1 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن هیچ سلول میتوزی وجود ندارد، اما در دوز های 3 و 5 میلی گرم در هر کیلوگرم وزن بدن این سلول ها با فراوانی های معنی داری نسبت به کنترل مشاهده گردید(جدول 1). نسبت فراوانی سلول های حاوی میکرونوکلئوس (PCEMN) به MI به سمت دوزهای $^{mg/kg}$ 3 و $^{mg/kg}$ 5 کاهش می یابد. اگر چه از نظر آماری تفاوت معنی دار نیست اما داده ها نمایان کننده کاهش فراوانی PCEMN و افزایش فراوانی MI در دوز 5 نسبت به دوز 3 می باشند. این مساله را می توان به متوقف شدن درصد بیشتر از سلول ها در مرحله تقسیم نسبت داد(1). به نظر می رسد اگر از دوز های بالاتری استفاده می شد کاهش در فراوانی PCEMN و افزایش در فراوانی MI به شکل معنی دارتری قابل ارائه می بود. اگر چه بیشترین درصد فراوانیPCEMN را دوز $^{mg/kg}$ 3 دارا می باشد، اما بدلیل اینکه در این دوز بالا ترین فراوانی سلول های میتوزی نیز مشاهده می گردد، با توجه به هدف بررسی این دوز از وین بلاستین جهت بررسی بعدی انتخاب نشد. همانطور که قبلا ذکر شد به دلیل یافتن مدل مناسب جهت القای آنیوپلوئیدی هدف تعیین دوزی از وین بلاستین است که اثر مهار کنندگی در تقسیم را نداشته باشد. نتیجتا اینکه در دوزهای بررسی شده که توانایی القای آنیوپلوئیدی را دارا بودند بالاترین دوزی که در آن فراوانی معنی دار و قابل ملاحظه ای از سلول های حاوی میکرونوکلئوس مشاهده شد ولی فاقد سلول های میتوزی بود، دوز 2 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن انتخاب گردید. نتایج گزارش شده در کاری مشابه که با هدف بررسی اثرات کلاستوژنیک وین بلاستین صورت گرفته است تایید کننده این انتخاب است(30).

تعیین زمان مناسب برای القای آنیوپلوئیدی

به منظور یافتن زمان مناسب جهت القای بیشترین فراوانی آنیوپلوئیدی 4 گروه به ترتیب بعد از تیمارهای 6، 18، 24 و 30 ساعت، بوسیله دوز انتخاب شده 2 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، مورد نمونه برداری مغز استخوان قرار گرفتند. نتایج بدست آمده در جدول ونمودار(2) آمده است. فراوانی میکرونوکلئوس در زمان های مورد بررسی فراونی وابسته به زمان معنی داری را در مقایسه با کنترل تا 24 ساعت پس از تیمار نشان دادند.

افزایش وابسته به زمان در فراوانی میکرونوکلئوس بدلیل انجام تقسیمات سلولی است. مشاهده میکرونوکلئوس ناشی از ناهنجاری های کروموزومی اعم از ساختاری و تعدادی وابسته به انجام تقسیمات سلولی می باشد. به این معنی که تا تقسیم سلولی انجام نپذیرد ناهنجاری صورت پذیرفته مشاهده نخواهد شد. میکرونوکلئوس همان هسته ی کوچکی است که از قطعات کروموزومی و یا کروموزوم جا مانده از مهاجرت با سایر کروموزوم ها در آنافاز تقسیم تشکیل شده است(20). بنابراین افزایش وابسته به زمان فراوانی میکرونوکلئوس های ناشی از القای آنیوپلوئیدی قابل انتظار است.

بین نتایج بدست آمده در دوره های تیمار 6 ، 18و 30 ساعت پس از تیمار اختلاف معنی داری مشاهده نگردید. بیشترین القای آنیوپلوئیدی که بر اساس فراوانی بالای میکرونوکلئوس مشخص می گردد در زمان 24 پس از تیمار بدست آمد. کاهش فراوانی PCEMN بعد از 24 ساعت از تیمار در مطالعات دیگر نیز مشاهده شده است(31،32).

کاهش معنی دار در فراوانی PCEMN 30 ساعت پس از تیمار در مقایسه با 24 ساعت را می توان به دلایل زیردانست:

- ادغام تصادفی میکرونوکلئوس به یکی از هسته های اصلی (33)
- تجزیه میکرونوکلئوس بوسیله نوکلئازهای سیتوپلاسمی(34)
- جایگزینی و ترمیم مخزن توبولینی و بازسازی دوک تقسیم مورد نیاز جهت تفکیک صحیح کروموزومی در تقسیم با انجام نسخه برداری(35)
- فعالیت مکانسیم های ایست بازرسی جهت توقف تقسیم سلول های ناهنجارو القای آپوپتوزیس در سلول های ناتوان در تعمیر(36)

نتیجه گیری

نتایج بدست آمده در این پژوهش ارائه کننده مدل مناسبی جهت بررسی آنیوپلوئیدی به عنوان یکی از اصلی ترین مکانیزم های ایجاد سرطان می باشد. جهت بررسی مکانیزم ایجاد سرطان و یافتن مناسب ترین استراتژی برای مقابله و یا درمان آن در موش، که نتایج آن مورد استفاده در زندگی انسانی نیز خواهد بود، تحقیق حاضر نشان می دهد که دوز $^{mg/kg}$ 2 از وین بلاستین در زمان 24 ساعت پس از تیمار بالاترین فراوانی آنیوپلوئیدی را بدنبال خواهد داشت. همچنین نتایج بار دیگر نشان دهنده کاربرد آزمون میکرونوکلئوس در بررسی های سیتوژنتیکی می باشد.

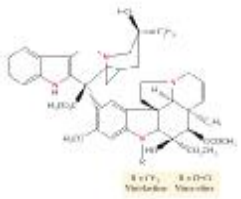
تقدیر و تشکر:

نویسندگان بدین وسیله بر خود لازم می دانند ضمن سپاس خدای متعال از آقای دکتراحمد رضا بهرامی رئیس مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و مهندسی بافت به دلیل فراهم کردن محلی مناسب جهت انجام آزمایشات این پژوهش صمیمانه تشکر و قدردانی به عمل آورند.

منابع :

1. Baggetto L G, Gambrelle J., Dayan G., Labialle S., Barakat S., Michaud M., Grange J.D., Gayat L., 2005, Major cytogenetic aberration and typical multidrug resistance phenotype of uveal melanoma: current views and new therapeutic prospects. Cancer Treatment Rev.: 31: 361-379.
2. Duesberg P., Li R., Fabarius A., Hehlmann R., 2005, The chromosomal basis of cancer. Cell Onco: 27: 293-318.
3. Summary Health Statistics for U.S. Adults: National Health Interview Survey. 2004.
4. Baker D J, Chen J., van Deursen J.M., 2005, The mitotic checkpoint in cancer and aging: what have mice taught us? Curr Opin Cell Biology: 17: 583-589.
5. Dey P., 2004, Aneuploidy and malignancy: an unsolved equation. J. Clin Pathol: 57: 1254-1249.
6. Yuen K.W., Montpetit B., Hieter P., 2005, The kinetochore and cancer: what's the connection? Curr Opin Cell Biology: 17: 576-582.
7. Cimini D. and Degrassi F., 2005, Aneuploidy: a matter of bad connections. Trends in Cell Bio: 15: 442-451.
8. Duesberg P., Li R., Rasnick D., Charlotte R., Willer A., Kraemer A., Yerganian G., Hehlmann R., 2000, Aneuploidy precedes and segregates with chemical carcinogenesis. Cancer Genet Cytogenet: 119: 83-93.

9. Rajagopalan H., Nowak M.A., Vogelstein B., Lengauer C., 2003, The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. Nat Rev Cancer: 3: 695-701.
10. Kobayashi K, Usami I, Kubota M., Nishio T., Kakazu N., 2005, Chromosome 7 abnormalities in acute megakaryoblastic leukemia associated with down syndrome. Cancer Genet and Cytogenet: 158: 184-187.
11. Stewenius Y, Gorunova L, Jonson T, Larsson N, Hoglund M, Mandahl N, Mertens F, Mitelman F, Gisselsson D., 2005, Structural and numerical chromosome changes in colon cancer develop through telomere-mediated anaphase bridges, not through mitotic multipolarity. PANS :102: 5541-5546.
12. Bialy H., 1998, Aneuploidy and cancer: vintage wine in a new bottle? Nat Biotechnol. :16(2):137-8.
13. Rasnick D., Duesberg H., 1999, How aneuploidy affects metabolic control and causes cancer. Biochem J.: 340:621-630.
14. Fabarius A, Hehlmann R, Duesberg PH., 2003, Instability of chromosome structure in cancer cells increases exponentially with degrees of aneuploidy., Cancer Genet Cytogenet.: 143(1):59-72.
15. Duesberg P, Li R, Fabarius A, Hehlmann R., 2006, Aneuploidy and cancer: from correlation to causation., Contrib Microbiol. ;13:16-44.
16. Okouneva T., Hill B.T., Wilson L., Jordan M.A., 2003, The effects of Vinflunine, vinorelbine, and vinblastine on centromere dynamics. Mol Cancer Ther: 2: 427-436.
17. Wendell K.L., Wilson L., Jordan M.A., 1993, Mitotic block in hela cells by vinblastine: ultrastructural changes in kinotochore-microtubule attachment and centrosomes. J. Cell Sci: 104: 261-274.
18. Dhamodharan R., Jordan M.A., Thrower D., Wilson L., Wadsworth P., 1995, Vinblastin suppresses dynamics of individual microtubules in living interface cells. Mol Bio of The Cell: 6: 1215-1229.
19. Li R., Hehlmann R., Sachs R., Duesberg P., 2005, Chromosomal alterations cause the high rates and wide ranges of drug resistance in cancer cells. Cancer Genet and Cytogenet: 163: 44-56.
20. Schmid W., 1975, The micronucleus test. Mut Res: 31: 9-15.
21. Hayashi M., Tice R.R., MacGregor J.T., Anderson D., Blakey D.H., Kirsh-Volders M., Oleson F.B. Jr, Pacchierotti F., Romagna F., Shimada H.,1994, In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. Mut Res: 312: 293-304.
22. Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R.L., 2000, Biochemistry & Molecular Biology of plants. . American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland.
23. Sherwood S.W., Sheridan J.P., Schimke R.T., 1994, Induction of apoptosis by the anti-tubulin drug colcemid: Relationship of mitotic checkpoint control to the induction of apoptosis in the Hela S3 cells. Experimental Cell Res.: 215: 373-379.
24. Hosseinimehr SJ, Tavakoli H, Pourheidari G, Sobhani A, Shafiee A., 2003, Radioprotective effects of citrus extract against gamma-irradiation in mouse bone marrow cells. J Radiat Res. : 2003 Sep;44(3):237-41.
25. Tiku AB, Abraham SK, Kale RK., 2004, Eugenol as an in vivo radioprotective agent. J Radiat Res. . 2004 Sep;45(3):435-40.
26. Bonatti S., Cavalieri Z., Viaggi S., Abbondandolo A. , 1992, The analysis of 10 potential spindle poisons for their ability to induce CREST-positive micronuclei in human diploid fibroblasts. Mutagenesis. 7. 111-114.
27. Channarayappa O.T., Nath J., 1992, Clastogenic and aneuploidogenic effects of cigarette smoke condensate, mitomycin C and vincristine sulfate. Mutagenesis. 7. 457-460.
28. Huber R, Salassidis K, Kulka U, Braselmann H, Bauchinger M. ,1996, Detection of centromeres in vinblastine- and radiation-induced micronuclei of human lymphocytes using FISH with an alpha satellite pancentromeric DNA probe. Environ Mol Mutagen. 1996;27(2):105-9.
29. Wakata A., Sasaki M.S., 1987, Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in cultured Chinese hamster cells: comparison with type and rates of chromosome aberrations. Mut. Res.: 190: 51-57.
30. Ramesh C., Palo A.K., Padhy A., 2004, Cytogenetic Consequences of Vinblastine Treatment in Mouse Bone Marrow. Chemotherapy: 50: 171-177.
31. Matsuoka A., Yamazaki N., Suzuki T., Hayashi M., Sofuni T. ,1993, Evalution of the micronucleus test using a chinese hamster cell line as an alternative test. Mutation Research. 272: 223-236.
32. Mac Gregor J.T., Casciano D., Muller L. ,2000, Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. Mutation Research. 455: 3-20.
33. Gustavino B, Degrassi F., Filipponi R., Modesti D., Tanzarella C., Rizzoni M., 1994, Mitotic indirect non-disjunction in phytohemagglutinin simulated human lymphocytes. Mutagenesis: 9: 17-21.
34. Granetto C., Ottaggio L., Abbondanolo A., Bonatti S., 1996, p53 accumulates in micronuclei after treatment with a DNA breaking chemical, methylnitrosourea, and with the spindle poison, vinblastine. Mutat Res.: 352: 61-64.
35. Nicholl D.S., Schloss J.A., John P.C., 1988, Tubulin gene expression in Chlamydomonas reinhardtii cell cycle: elimination of environmentally induced artifacts and the measurement of tubulin mRNA levels. J. Cell Sci: 89: 397-403.
36. Sablina A.A, Ilyinskaya G.V., Rubtsova S.N., Agapova L.S., Chumakov P.M., Kopnin B.P., 1998, Activation of p53-mediated cell cycle checkpoint in response to micronuclei formation. J. Cell Sci.: 111: 977-984.



شکل (1)- ساختار وین بلاستین(22)

جدول(1): تغییرات در فراوانی PCEMN و MI در دوزهای متفاوت از وین بلاستین

دوز وین بلاستین (mg/kg/BW)	در صد فراوانی PCEMN	در صد فراوانی MI	PCEMN/MI
0	1.12^{a}	0^{a}	*
1	$2.34^{a,b}$	0^{a}	*
2	2.53^{b}	0.39^{a}	6.49
3	4.3^{c}	4.98^{b}	0.86
5	$3.1^{b,c}$	5.14^{b}	0.6

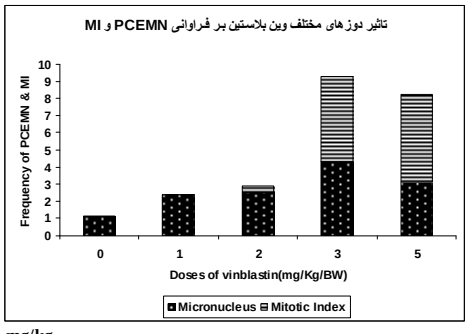
a,b,c نشان دهنده تفاوت معنی دار فراوانی PCEMN و MI در مقایسه بین گروه ها و کنترل است($P<0.01$).

جدول (2) میانگین درصد فراوانی PCEMN در زمان های مختلف بعد از تیمار با 2 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن با وین بلاستین.

زمان(ساعت)	میانگین در صد فراوانی PCEMN
کنترل	1.22^{a}
6	$2.44^{a,b}$
18	3.66^{b}
24	6.24^{c}
30	5.87^{b}

a,b,c نشان دهنده تفاوت معنی دار فراوانی PCEMN در مقایسه بین گروه ها و کنترل است($P<0.01$).

نمودار (1) مقایسه درصد فراوانی PCEMN و MI پس از تیمار با دوزهای مختلفی از وین بلاستین



نمودار (2) مقایسه فراوانی PCEMN در زمان های مختلف بعد از تیمار با دوز $^{mg/kg}$ 2 از وین بلاستین