مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره سوم، شماره دهم، بهار ۱۳۹۲

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی اثر القاء ناهنجاری کروموزومی داروی ضد سرطان وینکریستین با استفاده از سنجش میکرونوکلئوس در سلول های مغز استخوان موش های Balb/c

زهرا صغیری[۱]*، مسعود صالح مقدم[۲]، محمد سرمد نبوی[۳]، امیر محمد ملوندی[۱]

[۱] کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم ، دانشگاه پیام نور مرکز مشهد، مشهد، ایران
[۲] استادیار بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم ، دانشگاه پیام نور مرکز مشهد، مشهد، ایران
[۳] استادیار زراعت و اصلاح نباتات، گروه کشاورزی، دانشکده علوم ، دانشگاه پیام نور مرکز مشهد، مشهد، ایران

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 8:04 +0330 on Tuesday January 19th 2021

چکیده

سابقه و هدف : آلکالوئیدهای وینکا، آلکالوئیدهای دیمریک کاتارانتوس روزئوس، خانواده ای از داروهای ضد میتوزی می باشند که در شیمی درمانی سرطان بر علیه انواعی از تومورهای هماتولوژیکی و جامد مورد استفاده قرار می گیرند. به این ترتیب که این ترکیبات با زیر واحدهای توبولین برهمکنش می دهند و از خودآرایی میکروتوبول ممانعت می نمایند که این امر جداسازی کروموزومی ناهنجار را در سلول های در حال تقسیم القاء می کند و منجر به آنیوپلوئیدی می شود. هدف این مطالعه بررسی اثرات وینکریستین (VCR)، مهم ترین و طبیعی ترین (تولید شده در واکوئل گیاه) عضو خانواده آلکالوئیدهای وینکا، بر القاء ناهنجاری کروموزومی در سلول های مغز استخوان موش نر Balb/c در شرایط *in vivo* می باشد.

مواد و روش ها : دوزهای مختلفی از وینکریستین ابتدا از مسیر داخل صفاقی به حیوانات تزریق گردیدند. بعد از ۲۴ ساعت، حیوانات کشته شدند و سلول های مغز استخوان آن ها به منظور بررسی ژنوتوکسیسیتی و القاء ناهنجاری با استفاده از سنجش میکرونوکلئوس مورد ارزیابی قرار گرفت. داده ها توسط آنالیز آماری ANOVA و با استفاده از نرم افزار PASW۱۸ بررسی و تأیید گردیدند.

یافته ها : وینکریستین به طور معنی داری ($p< ۰/۰۵$) تشکیل میکرونوکلئوس ها را در تمام دوزها در اریتروسیت های پلیکروماتیک القاء نمود. این ماده ژنوتوکسیسیتی را در مغز استخوان موش ها القاء کرد و موجب آسیب میتوزی قابل ردیابی گردید.

نتیجه گیری : نتایج آشکار کردند که وینکریستین توانایی بالایی برای القاء تشکیل میکرونوکلئوس در شرایط *in vivo* در سلول های مغز استخوان طبیعی در موش Balb/c دارد. نتایج حاضر می تواند در تحقیقات و بررسی چگونگی ایجاد ناهنجاری کروموزومی و سرطان مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی : وینکریستین، میکرونوکلئوس، سلول های مغز استخوان، ژنوتوکسیسیتی

مقدمه

آلکالوئیدهای دیمریک (استخراج شده از گیاهان خانواده کاتارانتوس روزئوس) که تحت عنوان آلکالوئیدهای وینکا نامیده می شوند و در دهه ۱۹۶۰ به دنیای پزشکی معرفی شدند (۲۵)، یک گروه از داروهای ضد میتوزی مورد استفاده در شیمی درمانی سرطان هستند (۱۴). آلکالوئیدهای وینکا برعلیه انواع مختلفی از تومورهای هماتولوژیکی و جامد مورد استفاده قرار می گیرند. این ترکیبات برای ممانعت نمودن از خودآرایی میکروتوبول با زیر واحدهای توبولین آن برهمکنش می دهند که این حالت موجب القاء جداسازی غیرطبیعی کروموزوم در سلول های در حال تقسیم و ایجاد آنیوپلوئیدی می شود (۱۱). این عوامل ضد سرطان به عنوان تخریب کننده های میکروتوبول های سلول شناخته می شوند و در شرایط *in vitro* در غلظت های نسبتاً پایین، خودآرایی توبولین به صورت میکروتوبول ها را مهار می کنند، و در غلظت های بالاتر، مستقیماً با میکروتوبول ها برهمکنش می دهند و موجب کنده شدن پروتوفیلامنت ها از دیواره های میکروتوبول می شوند (۱۴). وینکریستین (VCR)،

آدرس نویسنده مسئول:مشهد-دانشگاه پیام نور مرکز مشهد
Email :b.saghiri@yahoo.com.
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱۱/۲/۲۵
تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۱۶

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 8:04 +0330 on Tuesday January 19th 2021

مهم ترین عضو خانواده آلکالوئیدهای وینکا، یک آلکالوئید طبیعی دیمریک استخراج شده از گیاه Madagascar Periwinkle از خانواده کاتارانتوس روزئوس است (۱۱). این دارو (C۴۶H۵۶N۴O۱۰) یک آلکالوئید بسیار فعال و عملکردی با وزن مولکولی ۸۲۵ دالتون می باشد (۳،۱۲). وینکریستین به زیر واحد β ی هترودیمر αβ-tubulin متصل می شود و دپلیمریزاسیون و به عبارت دقیق تر مهار پلیمریزاسیون میکروتوبول را القاء می کند و دینامیک های میکروتوبول را سرکوب می نماید (۱۶). این ترکیب تقسیم سلولی را در یک حالت وابسته به غلظت در متافاز میتوز به دام می اندازد (۱۵) به این ترتیب که بعد از برهمکنش با پروتئین های میکروتوبولی موجب یک تخریب کروموزومی می شود و به دنبال آن سبب آنیوپلوئیدی می گردد (۱۱). میکروتوبول ها اجزاء کلیدی اسکلت سلولی هستند و نقش مهمی در میتوز ایفا می کنند و بنابراین مداخله در دینامیک های میکروتوبول به وسیله وینکریستین سبب به دام افتادن میتوز و مرگ سلول (آپوپتوز) می شود (۵،۹،۱۶،۲۵). در میان آلکالوئیدهای وینکا، وینکریستین قدرتمندترین اثر را در مهار خودآرایی میکروتوبول ها و بنابراین دپلیمریزاسیون آن ها دارد (۱۴). این ماده برای درمان چندین شکل از بدخیمی سرطان استفاده می شود گرچه، استفاده کلینیکی از این دارو عمدتاً به دلیل آنکه مسمومیت عصبی را القاء می کند محدود شده است. فعالیت های بیولوژیکی وینکریستین می تواند به وسیله توانایی اش برای متصل شدن به توبولین (بتا-توبولین) و متوقف کردن توانایی پروتئین در پلیمریزه شدن به میکروتوبول ها شرح داده شود. باید یادآور شد که میکروتوبول ها علاوه بر نقش کلیدی شان در تشکیل دوک های میتوزی، در عملکردهای سلولی دیگر مانند حرکت، فاگوسیتوز و انتقال آکسونی شرکت می کنند. اثرات جانبی وینکریستین مانند نوروتوکسیسیتی ممکن است ناشی از تخریب این عملکردها باشد. این دارو یک طیف وسیع فعالیت ضد توموری دارد و در درمان لوکمی کودکان، تومور جامد، بیماری هاجکین، و لنفوماها مورد استفاده قرار می گیرد (۴،۱۹،۲۵). بنابراین با توجه به عملکرد وینکریستین بر روی سلول اثر این دارو بر سلول های مغز استخوان (مغز استخوان می تواند در طی چند روز و بعضی مواقع حتی در یک یا چند ساعت به طور کامل دستخوش تغییرات شود؛ بعد از بلوغ تنها جایگاه تولید اریتروسیت ها، مغز استخوان می باشد) موش نر سوری نژاد Balb/c در شرایط *in vivo* مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

مواد و روش ها

تهیه و نگهداری حیوانات

موش های نر نژاد Balb/c با وزن ۳۰-۲۵ گرم از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرمسازی رازی مشهد خریداری گردیده و به مدت یک هفته به منظور سازگار شدن با شرایط محیطی جدید در حیوان خانه دانشگاه پیام نور مشهد تحت شرایط کنترل شده شامل دما ۲ ± ۲۲ °C، رطوبت نسبی ۱۰٪ ± ۶۰، و دسترسی به غذای تولید شده مخصوص حیوانات آزمایشگاهی و آب آشامیدنی، نگهداری شدند. نوردهی به منظور تأمین نمودن دوره ۱۲ ساعت روز و ۱۲ ساعت شب به طور مصنوعی (با نور لامپ) کنترل شد. با حیوانات آزمایشگاهی مطابق با راهنماهای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی رفتار شد. حیوانات به طور تصادفی به ۴ گروه ۴ تایی، یک گروه کنترل و ۳ گروه آزمایشی، تقسیم بندی شدند.

داروی ضد سرطان وینکریستین (VCR)

وینکریستین (VCR, Gedeon Richter LTD, Hungary; ICR: ۱۲۲۸۰۷۶۷۵۶) مطابق با دوزهای مورد نظر، ۲، ۳، و ۵ میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن، از آن برداشته شده و از مسیر داخل صفاقی به موش های هر یک از گروه های تعیین شده تزریق گردید.

نمونه برداری از مغز استخوان

بعد از سپری شدن ۲۴ ساعت از زمان تزریق نمونه برداری و استخراج مغز استخوان صورت گرفت. حیوانات به وسیله کلروفرم کشته شدند و استخوان های هر دو ران آن ها جدا شده و سلول های مغز استخوان با استفاده از FBS (fetal bovin serum) استخراج گردیده و سوسپانسیون حاصل در ۱۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ (Wagtech Int., UK) شد. سپس مایع شفاف رویی دور ریخته شد و به رسوب سلولی باقیمانده PBS

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 8:04 +0330 on Tuesday January 19th 2021

(phosphate buffer saline) اضافه گردید و این محلول جدید روی لام های تمیز گسترش داده شد. نمونه های تهیه شده به مدت ۲۴ ساعت در هوای آزمایشگاه خشک شدند و سپس تثبیت (متانول) و رنگ آمیزی (گیمسا ۵ ٪، روز آزمون، ایران) و آماده مطالعه و بررسی میکروسکپی گردیدند.

سنجش میکرونوکلئوس (MN)

سنجش میکرونوکلئوس (Micronucleus Test) با استفاده از لام های نمونه های گسترش یافته مغز استخوان و میکروسکپ نوری (Motic, China) با بزرگنمایی ۱۰۰۰ انجام شد. حداقل ۲۰۰۰ سلول اریتروسیت پلیکروماتیک (PCE) با یا بدون میکرونوکلئوس (MN) (به ازاء هر حیوان) برای بررسی و ارزیابی تشکیل اریتروسیت های پلیکروماتیک میکرونوکلئات شده (MNPCE) شمارش شدند. همزمان و در همان میدان دید سلول های متوقف شده در میتوز (شاخص میتوزی یا MI) نیز شمارش گردیدند.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار PASW (SPSS) ۱۸ و مقایسه داده ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) صورت گرفت. تفاوت ها در سطح اطمینان ۹۵ ٪ ($p < ۰/۰۵$) معنی دار در نظر گرفته شدند.

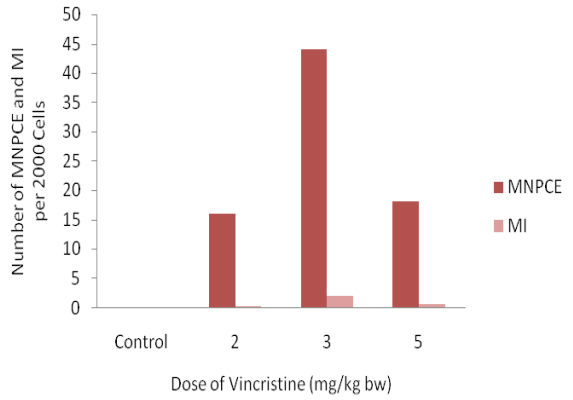
یافته ها

تحت تأثیر وینکریستین در تمام گروه ها القاء میکرونوکلئوس و نیز سلول های MI مشاهده گردیدند. در گروه حیوانات تیمار شده با دوز mg/kg bw ۲ وینکریستین، سلول های MNPCE دیده شدند که در مقایسه با عدم حضور آن ها در گروه کنترل مقدارشان قابل توجه بود. همچنین سلول های MI بسیار اندکی مشاهده گردیدند. در موش هایی که به آن ها دوز mg/kg bw ۳ تزریق شده بود تعداد سلول های MNPCE و سلول های MI افزایش داشت و به خصوص مقادیر سلول های MNPCE ایجاد شده افزایش شدیدتری را نسبت به آنچه در دوز mg/kg bw ۲ مشاهده شد نشان دادند. هنگامی که موش ها در گروه تعیین شده برای دوز mg/kg bw ۵ با این دوز از وینکریستین تیمار شدند تعداد سلول های MNPCE و نیز سلول های MI کاهش یافت.

Table 1. Data of the induction of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs) and MI in bone marrow of Balb/c mice treated with anticancer drug Vincristine.

Treatment groups	Number of examined animals	MNPCEs/ 2000 PCEs (means ± SD)	MI/ 2000 PCEs (means ± SD)
Control	4	0 ± 0	0 ± 0
Vincristine			
2 mg/kg bw	4	16.25 ± 4.193	0.25 ± 0.500
3 mg/kg bw	4	44.25 ± 5.377	2.00 ± 0.816
5 mg/kg bw	4	17.75 ± 3.304	0.50 ± 0.577

PCEs, polychromatic erythrocytes; MNPCEs, micronucleated polychromatic erythrocytes; MI, mitotic index.
$P < 0.05$



به عبارت دیگر در میان سه دوز، دوز۳mg/kg bw وینکریستین بیشترین اثر را بر القاء ناهنجاری (ایجاد میکرونوکلئوس) و با این حال اثر اندکی را بر القاء توقف تقسیم میتوزی (ایجاد MI ، شاخص میتوزی) نشان داد (جدول ۱ ، شکل ۱) و دوز mg/kg ۵ و ۲ کمترین القاء ناهنجاری کروموزومی را ارائه دادند.

بحث

وینکریستین از طریق مکانیسم هایی که هنوز به طور کامل شناخته نشده اند میتوزهای ناهنجار را القاء می کند که موجب از دست رفتن کروموزوم (آنیوپلوئیدی) و تولید میکرونوکلئوس می شوند. آسیب کروموزومی القاء شده به وسیله وینکریستین

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 8:04 +0330 on Tuesday January 19th 2021

از نظر ماهیت تعدادی است (از دست رفتن کروموزوم) و از آسیب دیدن خود آرایی و پلیمریزاسیون میکروتوبول و متعاقب آن جدایی اشتباه کروموزوم حاصل می گردد (۲،۷،۸). در یک مطالعه دوزهای بالای وینکریستین که از راه داخل صفاقی به موش ها تزریق شدند یک اثر آنیوپلوئیدی افزایش یافته را القاء کردند، که احتمالاً مربوط به تجمع وینکریستین به صورت آزاد یا پیوسته با توبولین می باشد (۲۰). اکثر داروهای القاء کننده آنیوپلوئیدی موجب آسیب DNA (ژنوتوکسیسیتی) می شوند که به طور طبیعی با شروع تومور همراه است و پیشروی تومور را سبب می شود (۲۷). آنیوپلوئیدی مدت زمان طولانی در پیوند و مرتبط با سرطان معرفی و شناسایی شده است. گر چه، تا به حال هیچ مدل آماری برای تعیین نقشی که آنیوپلوئیدی در تعیین کردن سرطان ایفا می کند در دسترس نبوده است (۱۸). در مطالعه های دیگر وینکریستین با استفاده از تزریق داخل صفاقی دوز ۰/۱۲۵ mg/kg bw به موش های نر نژاد CD-۱ چهار هفته ای و تیمار آن ها برای ۲۴ ساعت در شرایط *in vivo*، افزایش قابل ملاحظه ای در فراوانی PCE میکرونوکلئات شده (حاوی میکرونوکلئوس) در مغز استخوان مشاهده شد (۱۰۰۰MNPCE/ PCE ۰/۳۳ در کنترل و ۱۴/۳ PCE۱۰۰۰MNPCE/ در تک دوز، یعنی یک افزایش ۴۳ برابری) (۶). میکرونوکلئوس ها (MNs؛ هسته کوچک و گرد) از قطعات کروموزومی آسنتریک (بدون سنترومر) یا کروموزوم های کامل، که در طی تقسیم هسته در مرحله آنافاز با تأخیر در جدایی کروموزوم مواجه شدهاند، منشاء می گیرند و بعد از تقسیم هسته سلول مادر در هسته سلول دختری وارد نمی شوند و در سیتوپلاسم سلول مادری باقی می مانند (۱،۱۰،۱۱). حضور میکرونوکلئوس ها در سلول ها به عنوان یک علامت آسیب DNA (القاء آسیب ژنومی در سطح کروموزومی) در نظر گرفته می شود (۲۳). تحقیقات نشان داده اند که آشفتگی و تخریب دستگاه میتوزی (اسپیندل، کینهتوکورها) یا عملکرد آسیب دیده توپوایزومراز II موجب تشکیل میکرونوکلئوس می گردند (۲۴). در مطالعه حاضر هنگامی که موش ها از راه داخل صفاقی با دوزهای ۵ mg/kg bw، ۳، ۲ به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند بیشترین القاء تشکیل میکرونوکلئوس و MI در روز ۳ مشاهده گردید که یک افزایش وابسته به دوز را در ایجاد این ناهنجاری کروموزومی ارائه نمود. به دنبال تیمار حیوانات با دوزهای دیگر، افزایش اندکی در القاء تشکیل MN و MI مشاهده شد. در حقیقت وینکریستین القاء خود پیوستگی در توبولین می شود و در شرایط مناسب می تواند تشکیل پاراکریستال های توبولین را در سلول ها و در *in vitro* القاء نماید. این دارو در غلظت های بالا موجب مهار پلیمریزاسیون میکروتوبول ها می گردد و در غلظت های پایین به طور کینتیک آن ها را به وسیله کاهش دادن میزان افزایش و کاهش توبولین در *in vitro* در انتها های میکروتوبول پایدار می سازد (۱۵). احتمال دارد که با افزایش دوز (۵ mg/kg) سلول ها از مکانیسمی خاص برای مقاومت احتمالی در برابر این مقدار دوز استفاده نموده اند و بنابراین نتایج کاهش القاء آسیب کروموزومی را در این دوز نشان می دهند و یا امکان دارد که این افزایش دوز تعداد بیشتری از سلول ها را درگیر آسیب کروموزومی نموده و شدت آسیب بسیار بالاتر بوده و سلول های بیشتری از بین رفته و سلول های کمتری حاوی ناهنجاری کروموزومی باقی مانده و مشاهده شده اند. حساس ترین مرحله تقسیم سلولی به وینکریستین پیشروی میتوز از متافاز به آنافاز می باشد. در غلظت های بالاتر، وینکریستین به تعداد زیادی از جایگاه های اتصال خاص وینکریستین روی سطح میکروتوبول متصل می شود و در غلظت های پایین، به تعداد اندکی از جایگاه های اتصال وینکریستین با میل ترکیبی بالا در هر یک از دو انتهای میکروتوبول متصل می گردد (۱۵). این ماده موجب القاء آپوپتوز در لاین های سلولی لنفومای انسانی به خصوص سلول های لنفوبلاستوئید می گردد (۹). در یک مطالعه و در شرایط *in vitro* ، وینکریستین در دوزهای متفاوت (۰/۰۸ µg/ml، ۰ ، ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۴) و بعد از تیمار به مدت ۲۴ ساعت، در لنفوسیت های انسانی اثرات ژنوتوکسیک نشان داد و آسیب DNA را القاء نمود و موجب افزایش قابل توجه تشکیل MN و سلول های آپوپتوتیک گردید (۱۳). از آنجا که میکروتوبول ها نقش مهمی در سلول دارند و بخشی از دستگاه سلول برای تقسیم شدن و همانند سازی کردن خودش هستند مهار و تخریب ساختار میکروتوبول به وسیله وینکریستین (داروی ضد میکروتوبول) موجب القاء آپوپتوز می گردد (۲۶). در مطالعه ای دیگر وینکریستین در ۴ روز متوالی در فواصل زمانی ۲۴ ساعته به

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 8:04 +0330 on Tuesday January 19th 2021

موش ها و رتها از مسیر داخل صفاقی تزریق شد و در گروه هایی از دوزهای مختلف (۰/۰۱۲۵، ۰/۰۲۵۰، ۰/۰۵۰۰، یا ۰/۰۷۵۰، ۰/۰۰۶۲۵، ۰/۰۱۲۵۰، ۰/۰۲۵۰۰، یا ۰/۰۳۱۲۵ mg/kg) افزایش قابل ملاحظه ای در رتیکولوسیت های میکرونوکلئات شده (MNRET) خون محیطی آن ها مشاهده شد (۲۲). پتانسیل ژنوتوکسیک وینکریستین روی لنفوسیت های خون محیطی انسان به دنبال تزریق دارو در دوز ۰/g/ml۰۸۷۵ با استفاده از سنجش MN و بعد از ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت ارزیابی شده اند. تیمار ۲۴ ساعت تأیید کرد که وینکریستین اثرات آنیوژنیک و کلاستوژنیک را روی لنفوسیت های انسان نشان می دهد (۱۷). در این پژوهش، دوز مؤثر وینکریستین برای القاء ناهنجاری در مغز استخوان موش های نر Balb/c برابر ۳ mg/kg bw بدست آمد که نشان دهنده بیشترین مقدار القاء میکرونوکلئوس و کمترین میزان القاء MI بود. نتایج حاضر می تواند در تحقیقات و بررسی چگونگی ایجاد ناهنجاری کروموزومی، سرطان و دست یافتن به راه های ممانعت و یا درمان آن مورد استفاده قرار گیرد. علاوه بر این، نشان داده شد که سنجش میکرونوکلئوس همچنان ابزار قدرتمندی را به منظور تعیین نمودن توانایی یک ماده شیمیایی برای القاء کردن آسیب کروموزومی تأمین می نماید (۲۱).

تشکر و قدردانی

نویسندگان تشکر خود را از آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور مرکز مشهد ابراز می دارند.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 8:04 +0330 on Tuesday January 19th 2021

منابع

(۱) توکلی ح، پورحیدری غ. بررسی میزان حساسیت آزمون میکرونوکلئوس در مغز استخوان موشهای Balb/c پرتو دیده با گامای Co^{60}. مجله علمی پژوهشی طب نظامی، پژوهشگاه پلی کلینیک تخصصی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) تهران، تابستان ۱۳۸۱؛ دوره چهارم، شماره دوم: ۷۱-۷۴.

(2) Anderson D ,Bishop JB ,Garner RC ,Ostrosky-Wegmen P ,Selby PB .Cyclophosphamide: Review of its Mutagenicity for an Assessment of Potential Germ Cell Risks .Mutat Res, 1995; 330, 115-181.

(3) Basavaraju SR ,Jones TD .Atherosclerotic Risks from Chemicals: Part I. Toxicological Observations and Mechanisms of Atherosclerosis. Arch Environ Contam Toxicol, 1998; 35, 152-164.

(4) Bay A ,Yilmaz C ,Yilmaz N ,Oner AF .Vincristine Induce Cranial Polyneuropathy. Indian J Pediatr, 2006; 37 (6), 531-533.

(5) Buchanan BB ,Gruissen W ,Jones RL .Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Rockvill, Maryland: ASPP Symp P, 2000.

(6) Chen H ,Rupa DS ,Tomar R ,Eastmond DA .Chromosomal Loss and Breakage in Mouse Bone Marrow and Spleen Cells Exposed to Benzene In Vivo. Cancer Res, 1994; 54, 3533-3539.

(7) Cushnir JR ,Naylor S ,Lamb JH ,Farmer PB ,Brown NA ,Mirkes PE .Identification of Phosphoramide Mustard/DNA Adducts Using Tanem Mass Spectrometry. Rapid Commun Mass Sp, 1990; 4, 410-414.

(8) Eastmond DA ,Tucker JD .Identification of Aneuploidy-Inducing Agents Using Cytokinesis-Blocked Human Lymphocytes and an Antikinetochore Antibody. Environ Mol Mutagen, 1989; 13, 34-43.

(9) Fan S ,Cherney B ,Reinhold W ,Rucker K ,O'Connor PM .Disruption of P53 Function in Immortalized Human Cells Does not Affect Survival or Apoptosis After Taxol or Vincristine Treatment. Clin Cancer Res, 1998; 4 (4), 1047-1054.

(10) Fenech M .Cytokinesis Block Micronucleus Cytom Assay. Nat Protoc, 2007; 2 (5), 1084-1104.

(11) Gonzalez-Cid M ,Cuello MT ,Larripa I .Comparison of the Aneugenic Effect of Vinorelbine and Vincristine in Culture Human Lymphocytes. Mutagenesis, 1999; 14 (1), 63-66.

(12) Greig NH ,Soncrant TT ,Shetty HU ,Momma S ,Smith QR ,Rapoport SI .Brain Uptake and Anticancer Activities of Vincristine and Vinblastine are Restricted by Their Low Cerebrovascular Permeability and Binding to Plasma Constituents in Rat. Cancer Chemoth Pharm, 1990; 26 (4), 263-268.

(13) Jiang W ,Lu Y ,Chen Z ,Chen S ,Zhang M ,Jin L ,Lou J ,He J .Studying the Genotoxicity of Vincristine on Human Lymphocytes Using Assay, Micronucleus Assay and TCR "Gene" Mutation Test in Vitro. Toxicology, 2008; 252 (1-3), 113-117.

(14) Jordan MA ,Himes RH ,Wilson L .Comparison of the Effects of Vinblastine, Vincristine, Vindesine, and Vinepidine on Microtubule Dynamic and Cell Proliferation in Vitro. Cancer Res, 1985; 45, 2741-2747.

(15) Jordan MA ,Thower D ,Wilson L .Mechanism of Inhibition of Cell Proliferation by Vinca Alkaloids. Cancer Res, 1991; 51, 2212-2222.

(16) Jordan MA ,Wilson L .Microtubules as a Target for Anticancer Drugs. Net Rev Cancer, 2004; 4, 253- 265.

(17) Kopjar N ,Garaj-Vrhovac V .Application of Cytogenetic Endpoints and Comet Assay on Human Lymphocytes Treated with Vincristine in Vitro, Neoplasma, 2000; 47 (3), 162-167.

(18) Li Y ,Berg A ,Wu LR ,Wang Z ,Chen G ,Wu R .Modeling the Aneuploidy Control of Cancer, BMC Cancer, 2010; 10, 346, 1-9.

(19) Machado de Mattos DM ,Dire GF ,Lima RC ,Almedia ACC ,Bellucio D ,Azevedo CSS ,Azevedo SSS ,Nascimento SF ,Borda HR ,Garvalho JJ ,Bernardo Filho M .The Consequences of the Effects of the Chemotherapeutic Drug (Vincristine) in Organs and the Influence on the Bioavailability of Two Radio-Biocomplexes Used for Bone Evaluations in Balb/c Female Mice. Afr J Biotechnol, 2009; 8 (23), 6724-6730.

(20) Morales-Ramirez P ,Vallarino-Kelly T ,Cruz-Vallejo V .Kinetics of Micrinucleated Polychromatic Erythrocyte (MN-PCE) Induction in Vivo by Aneuploidogenes. Mutat Res-Gen Tox En Mutagen, 2004; 565 (1), 79-87.

(21) Parry EM ,Parry JM ,Corso C ,Doherty A ,Haddad F ,Hermine TF ,Johnson G ,Kayani M ,Quick E ,Warr T ,Williamson J .Detection and Characterization of Mechanisms of Action of Aneugenic Chemicals. Mutagenesis, 2002; 17 (6), 509-521.

(22) Recio L ,Hobbs C ,Caspary W ,Witt KL .Dose-Response Assessment of Four Genotoxic Chemicals in a Combined Mouse and Rat Micronucleus (MN) and Comet Assay Protocol. J Toxicol Sci, 2010; 35 (2), 149-162.

(23) Saleh K ,Sarhan MAA .Clastogenic Analysis of Chicken Forms Using Micronucleus Test in Peripheral Blood. J Appl Sci Res, 2007; 3 (12), 1646-1649.

(24) Stopper H ,Muller SO .Micronuclei as a Biological Endpoint for Genotoxicity. Toxicol in Vitro, 1997; 11 (5), 661-667.

(25) Upmanyu R ,Dvivedi J ,Saxena Y .Hepatotoxic Effects of Vincristine: an Experimental Study on Albino Rats. Indian J Physiol Pharmacol, 2009; 53 (3), 265-270.