

دوز مناسب تیمار با سیتوکالازین B در سلول های مغز استخوان موش نر سوری نژاد Balb/c در شرایط *in vivo* با استفاده از آزمون میکرونوکلیئوس

راحله جواهری^{۱*}، مسعود صالح مقدم^۲، محمد سرمد نبوی^۲

^۱ کارشناس ارشد بیوشیمی دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور مشهد
^۲ استادیار، گروه بیوشیمی دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور مشهد
^۳ استادیار، گروه کشاورزی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور مشهد

چکیده

سابقه و هدف: در حال حاضر، از سیتوکالازین B به عنوان متوقف کننده سیتوکینز در سلول های در حال تقسیم، برای درمان انواعی از سرطان استفاده می شود.

مواد و روش ها: موش های نر Balb/c (۲۵-۳۰ گرم) به دو گروه تقسیم شدند: گروه کنترل و مورد آزمایش. به موش های گروه کنترل آب مقطر استریل و به گروه تیماری دوزهای ۱، ۲، ۳، ۵، ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن موش سیتوکالازین B به ناحیه صفاقی تزریق شد. بعد از ۲۴ ساعت موش ها با کلروفرم کشته شدند و هر دو استخوان ران از بدن جدا سپس مغز استخوان با ۱ میلی لیتر محلول KCl استخراج شد. سو سپانسیون سلولی به دست آمده به مدت ۵ دقیقه تحت سانتریفوژ ۱۰۰۰ rpm قرار گرفتند. در نهایت گسترش های سلولی بر روی لام تهیه گردید. **یافته ها:** در این مطالعه برای به دست آوردن دوز مناسب جهت توقف تقسیم سیتوپلاسم توسط سیتوکالازین B دوزهای ۱، ۲، ۳، ۵، ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن موش در مدت زمان ۲۴ ساعت پس از تیمار مورد آزمایش قرار گرفتند. از آزمون میکرونوکلیئوس برای بررسی سلول های دو هسته ای و از روش های آمارگیری ANOVA و Tukey (نرم افزار SPSS) استفاده شد.

نتیجه گیری: پس از بررسی نتایج، داده ها نشان دهنده بیشترین فراوانی سلول های پرونورموبلاست دو هسته ای (متوقف شده در سیتوکینز) در دوز ۳ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش بودند.

کلمات کلیدی: پرونورموبلاست، سیتوکالازین B، سیتوکینز، آزمون میکرونوکلیئوس

مقدمه

کرد و سلول، توانایی تقسیم بدون کنترل را خواهد یافت. (۲،۴،۵). از جمله روش های درمانی که امروزه برای انواعی از سرطان ها استفاده می شود، شیمی درمانی است، شیمی درمانی روش مناسبی در درمان سرطان ها بوده اگرچه در افراد تحت درمان، مقاومت به داروها در این روش درمانی از نگرانی های مهم به شمار می رود (۱۲). ریز رشته های (میکروفیلان ها) اسکلت سلولی در ساختار دوک تقسیم میتوز نقش داشته و از زیر واحد های اکتین تشکیل شده اند. زنجیره هایی به قطر هفت نانومتر هستند که در تمام سلول های یوکاریوتی به وفور یافت می شوند. رشته های اکتین از واحدهای پروتئینی کروی به نام اکتین تشکیل شده اند که به صورت منظم به دنبال یکدیگر قرار گرفته اند. رشته های اکتین مانند ریز لوله قطبی هستند و سرعت اضافه و حذف شدن زیرواحدها در انتهای مثبت بیش از انتهای منفی است.

با وجود بیش از ۱۰۰ سال تحقیق درباره سرطان هنوز علت این بیماری کاملاً شناخته نشده و مورد بحث می باشد. سرطان به عنوان یک بیماری بر پایه تغییرات ژنتیکی و شرایط محیطی از اصلی ترین نگرانی های جوامع بشری است (۱،۲) مواد سرطان زا در سلول ایجاد تحول کرده که نتیجه این تحول به هم خوردن تعادل صدها ژنی است که محصولات آن ها در تفکیک کروموزومی، سنتز DNA و یا تعمیر آن، دخالت دارند. چنین تغییراتی آسیب های جدی در روند های کنترل تقسیم سلولی ایجاد خواهند

آدرس نویسنده مسئول: گروه بیوشیمی دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور مشهد

Email: Rahele.javaheri@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۳/۳

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۲۷

پایان پس از بررسی داده های آزمایشات انجام شده، دوز مناسب برای هدف ذکر شده، انتخاب شد.

مواد و روش ها حیوان آزمایشگاهی مورد استفاده

در این تحقیق از موش های سوری نر نژاد Balb/c به عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده شد. این جانوران از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی مشهد خریداری و در اتاق حیوانات در درجه حرارت ۲۲ درجه سانتی گراد و در دوره نوری طبیعی (۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی) نگهداری شدند. موش ها در قفس های شیشه ای مختص نگهداری این جانوران قرار داده شدند و جهت تطابق با محیط به مدت ۱۰-۷ روز در حیوان خانه با شرایط کنترل شده نگهداری شدند. در تمامی مراحل تحقیقات از موش هایی با سن ۸-۶ هفته ای و میانگین وزن ۳۰-۲۵ گرم استفاده شد.

تیمار

در این آزمایش جهت تعیین دوز مناسب سیتوکالازین B، به گروه های پنج تایی از موش ها، دوزهای ۱،۲،۳،۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن از سیتوکالازین B و گروه شاهد، به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان تزریق، نمونه برداری از مغز استخوان انجام شد.

نمونه برداری از مغز استخوان

نمونه برداری از مغز استخوان برای انجام آزمون میکرونوکلئوس استفاده شد. آزمون میکرونوکلئوس به طور گسترده ای به منظور شناسایی موادی که ژنوتوکسیک و یا سرطان زا هستند به کار می رود. این آزمون به عنوان روشی مطمئن و کارآمد برای غربالگری آثار جهش زا مواد گوناگون شیمیایی و نیز تشعشعات مختلف مورد استفاده قرار می گیرد. آزمون میکرونوکلئوس امروزه به عنوان یکی از شاخص های اصلی برای تایید قابل استفاده بودن داروها و ترکیبات گوناگون در دستور کار شرکت های دارویی قرار گرفته است. این روش که توسط schmid در سال ۱۹۷۵ ارائه شد. دارای مزایای مهمی نسبت به آنالیز کروموزوم های متافازی مغز استخوان است. در تکنیک آماده سازی و خواندن لام ها، این روش از آنالیز کروموزومی ساده تر و سریع تر بوده به نحوی که موجب کاهش دقت آزمون نمی شود. از جمله Heddle در سال ۱۹۷۳ نشان داده است که شمارش میکرونوکلئوس بیش از ده بار سریع تر از شمارش متافازی لنفوسیت

اصولاً اثر ضد سرطان سیتوکالازین B به تاثیر تداخل آن با میکروفیلانمان نسبت داده شده است و بیشترین اثر شناخته شده از این دارو در محیط *in vitro* بوده است. از جمله مواد مهارکننده دوک های تقسیم در تقسیم میتوز کلشی سین، وین پلاستین، وین کریستن و سیتوکالازین B می باشد. این مهارکننده ها با اتصال و تداخل عمل با سیستم میکروتوبولی - میکروفیلانمانی موجب مهار تقسیم سلولی می شوند و سیتوکالازین B واحد پروتئینی آکتین را بلوک می کند. از آنجایی که میکروفیلانمان ها در تقسیم سیتوپلاسم ضروری هستند لذا این دارو موجب مهار سیتوکینز می شود (سیتوکینز مرحله تقسیم سیتوپلاسم در تقسیم میتوز می باشد). این دارو نیز می تواند بر روی هسته سلولی با همان مکانیسم فوق الذکر اثر گذاشته، میکروفیلانمان ها دی اکسی ریبونوکلئیک اسید (DNA) را درون سلول در جایگاه مشخص نگه می دارند که اثر سیتوکالازین B بر روی فیلامان ها باعث قطعه قطعه شدن DNA می شود (۶). مطالعات نشان می دهد که سیتوکالازین B باعث توقف تقسیم سلولی در مرحله سیتوکینز می شود. اثر این ترکیب شیمیایی (در شرایط *in vivo*) بر روی سه نوع تومور مختلف در موش های نژاد آلبینو سوئسی نشان داد که تنها تزریق یک دوز از این دارو، به موش برای توقف تقسیم سیتوپلاسم موثر نبوده بلکه با تزریق سه دوز ۲+۲+۳ mg/kg با فاصله زمانی ۱۲ ساعت تا حدی توقف سیتوکینز مشاهده شد ولی نهایتاً موثرترین زمان مربوط به تیمار ۶۰ ساعته موش ها بود که بیشترین بی نوکلئوس دیده شد (۱۶).

مهمترین اثرات بیولوژیکی این دارو شامل:

۱- مهار تقسیم سیتوپلاسم، ۲- مهار برگشت پذیر حرکات سلولی ۳- القاء بیرون راندن هسته، ۴- مهار فعالیت های فاگوسیتی ۵- تراکم پلاکت ها و لخته شدن آن ها، ۶- انتقال قند (گلوکز)، ۷- آزادسازی هورمون رشد می باشد (۹). هدف تعیین دوز مناسبی از سیتوکالازین B است که باعث توقف تقسیم سیتوپلاسم می شود. به عبارت دیگر هدف این تحقیق، ارائه روش مناسبی از القای سرطان 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 سیتوکالازین B در مدت زمان تیماری ۲۴ ساعته مورد آزمایش قرار گرفت و در

های کشت شده است. میکرونوکلتوس را می توان در میلوبلاست ها، میلوپوسیت ها و اریتروسیت ها مشاهده نمود. آزمون میکرونوکلتوس به مقادیر بسیار کم عوامل موتاژن شکننده استاندارد، پاسخ مثبت می دهد. کاری که آزمون میکرونوکلتوس نمی تواند انجام دهد تعیین ماهیت اختلال هسته ای است در صورت نیاز به تعیین ماهیت اختلال هسته ای می توان از آنالیز متافاز و یا سایر روش های سیتوژنتیکی استفاده نمود. فراوانی میکرونوکلتوس در سلول های اریتروسیت مغز استخوان ایجاد ناهنجاری کروموزومی توسط اشعه و مواد شیمیایی را منعکس می کند (۱۰). اساس کار بر این اصل استوار شده است که در مرحله آنافاز، کروماتیدها به دلیل تاثیر مواد شیمیایی جا می مانند و این در حالی است که کروموزوم ها به سمت قطبین سلول حرکت می کنند. پس از توفاز کروموزوم های آسیب ندیده، هسته های دختر را به وجود می آورند. قطعات جا مانده نیز در سلول های دختر وجود دارند ولی نسبت قابل توجهی از آن ها به شکل یک یا چند هسته ثانویه تغییر شکل می دهند که میکرونوکلتوس خوانده می شوند (۷،۱۱).

مشخصات میکرونوکلتوس

میکرونوکلتوس ها در هماتولوژی به اجسام هاول - جولی موسومند در سلول های مغز استخوان، میکرونوکلتوس مشخص بوده و به صورت یک عنصر اضافی دیده می شوند به طوری که توسط افراد غیرمغرب در سیتوژنتیک نیز قابل شمارش هستند. بعضی از مشخصه های مهم میکرونوکلتوس ها که به عنوان ملاکی برای شناسایی به کار می رود، عبارتند از:

- ۱ - میکرونوکلتوس همواره در سیتوپلاسم سلول قرار دارد و کوچکتر از هسته سلول است، ۲ - میکرونوکلتوس ها از نظر ساختار، شکل و خاصیت رنگ پذیری همانند هسته اصلی است، ۳ - میکرونوکلتوس ها در سیتوپلاسم و در محدوده یک تا دو برابر قطر هسته از مرکز سیتوپلاسم قرار دارند، ۴ - اندازه میکرونوکلتوس از $\frac{1}{4}$ هسته اصلی کوچکتر می باشد، ۵ - میکرونوکلتوس ها معمولاً گرد و دارای ابعاد $\frac{1}{5}$ تا $\frac{1}{4}$ یک اریتروسیت هستند، ۶ - در موارد نادری میکرونوکلتوس ها به صورت بیضی، هلالی، حلقوی و بادامی شکل هم شناسایی شده اند. برخی اوقات آلودگی ها و ذرات ریز مانند گرانول های

بازوفیلی و باقیمانده های زاید رنگ، شکلی شبیه به میکرونوکلتوس به خود می گیرند. این ساختارها و آلودگی ها را می توان از نحوه توزیع آن ها در نمونه ها و یا از طریق نامیزان کردن کانون که در اثر آن، این ذرات به صورت حلقه شفاف انعکاس پیدا می کنند تشخیص داد (۱۰). به طور خلاصه، پس از کشتن موش ها با کلروفرم، هر دو استخوان ران از بدن جدا و بعد از جدا سازی کامل ماهیچه های اطراف، محتویات مغز استخوان هر ران را با ۵ میلی لیتر KCl، با استفاده از سرنگ ۲ ml درون فالكون جداگانه اتوکلاو شده استخراج شد. سپس فالكون ها را درون سانتریفیوژ با شتاب ۱۰۰۰ rpm و مدت زمان ۵ دقیقه قرار داده شد پس از خاتمه مدت سانتریفیوژ، فالكون را برداشته و به آرامی با استفاده از پی پت پاستور پلاستیکی ۱ ml، محلول رویی که همان محلول KCl است را خارج کرده بدون آنکه به رسوب ته نشین شده در ته فالكون ضربه و آسیبی وارد شود، سپس به هر فالكون ۱ ml از محلول PBS اضافه شد تا حدی که رسوب ته نشین شده معلق شود و با دست ضربه آهسته ای به فالكون وارد شد. سپس محلول با پی پت پاستور پلاستیکی ۱ ml برداشته شد و روی لام های استریل شده از قبل، گسترش داده شد و در مکانی تراز شده قرار گرفت تا کاملاً لام های حاوی گسترش مغز استخوان خشک شوند. از سلول های به دست آمده از هر استخوان به طور جداگانه پس از سانتریفیوژ گسترش های سلولی تهیه گردید. تثبیت سلول ها در متانول ۹۰٪ انجام و سپس به شیوه گیمسا رنگ آمیزی صورت گرفت.

شمارش

شمارش سلولی توسط میکروسکوپ نوری Motoc - BA - ۲۱۰ با بزرگنمایی ۱۰۰ انجام شد. در هر لام تعداد حداقل ۲۰۰۰ سلول پرونورموبلاست (PN) شمارش شد (شکل ۳). در هر شمارش تعداد سلول های حاوی میکرونوکلتوس (PNMN) و بی نوکلتوس (BNPN) تعیین شد.

بررسی آماری

مقایسه آماری داده ها توسط نرم افزار SPSS و روش های آماری ANOVA و Tukey انجام شد. در این بررسی گروه های تیمار شده با کنترل مقایسه شدند.

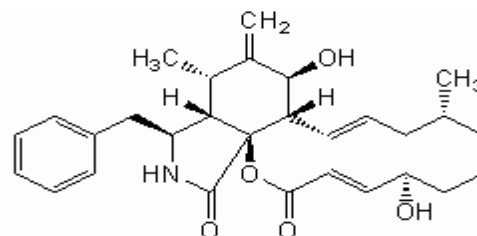
یافته ها

ساختار و عمل سیتوکالازین B

سیتوکالازین B از یک نوع قارچ با نام هلمینتوسپریوم بدست آمده است. این دارو اولین بار در سال ۱۹۶۴ کشف شد (شکل ۱ و ۲) (۹).



شکل ۲- تصویر میکروگراف از قارچ هلمینتوسپریوم.



شکل ۱- ساختار شیمیایی سیتوکالازین B

جدول ۱- فراوانی PNB و PNMN در مقایسه بین گروه ها و کنترل

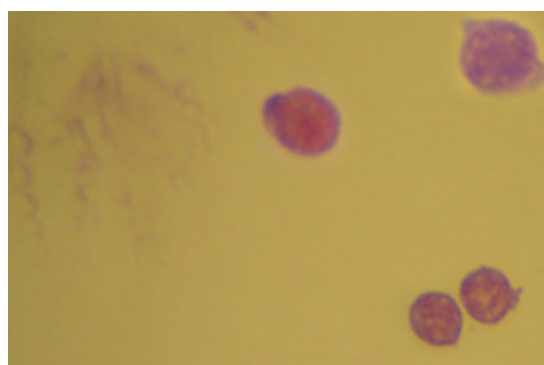
($P > 0.001$)

دوز سیتوکالازین B mg/kg/Bw	فراوانی BPN	فراوانی MNPN
۰	۰	۰
۱	۲۳	۸
۲	۳۹	۶
۳	۷۸	۲
۵	۱۲	۵

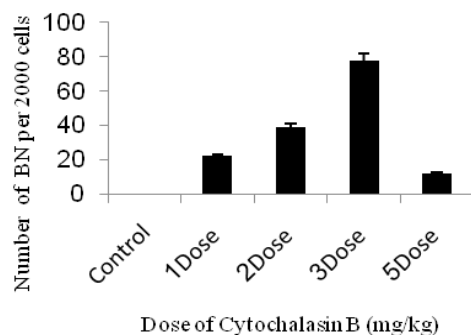
از آنجایی که داروی سیتوکالازین B به صورت پودر سفید رنگ تولید می شود لذا برای حلالت این پودر می توان از آب، استون، دی متیل سولفوکسید، دی متیل فورمامید و یا اتانول استفاده کرد (۹).

تعیین دوز مناسب جهت توقف سیتوکینز

برای یافتن دوز مناسب به منظور توقف تقسیم سیتوپلاسم دوزهای ۱، ۲، ۳، ۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش مورد آزمایش قرار گرفت که نتایج بدست آمده در نمودارهای ۱ و ۲ نشان دهنده تعیین دوز موثر داروی سیتوکالازین B می باشد، دوز ۳ میلی گرم با بیشترین مقدار بی نوکلئوس (BN) و کمترین مقدار میکرونوکلئوس (MN) با استفاده از آزمون میکرونوکلئوس مورد تایید می باشد. (نمودارهای ۲، ۱) (شکل ۵ و ۴). لذا با استفاده از روش های آمارگیری ANOVA و Tukey ثابت می شود که میانگین تعداد سلول های پرونورموبلاست تخریب یافته (متوقف شده در سیتوکینز) در دوز ۳ میلی گرم دارو، با میانگین دوزهای ۲ و ۵ میلی گرم تفاوت معنی داری داشته و به عبارتی دوز ۳ میلی گرم بیشترین تخریب سلولی را ایجاد نموده است. (گروه ۴ تایی $n=4$ و $P > 0.001$) این فراوانی تا دوز ۳ میلی گرم در هر کیلوگرم وزن بدن افزایش وابسته به دوز را نشان می دهد.

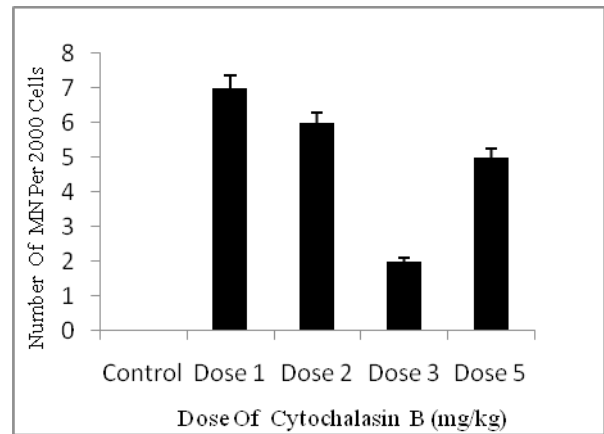


شکل ۳- سلول های پرونورموبلاست در حالت طبیعی (بدون تیمار، گروه کنترل)، بزرگنمایی ۱۰۰ با میکروسکوپ نوری، رنگ آمیزی با رنگ گیمسا.



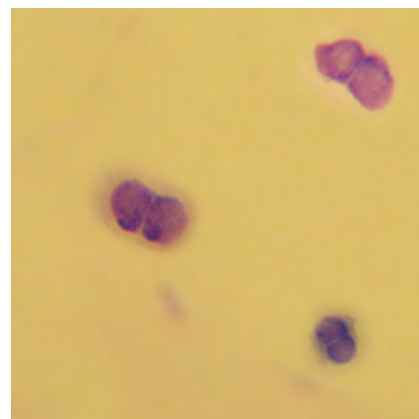
نمودار ۱- میانگین تعداد سلول های تخریب یافته تحت تاثیر داروی سیتوکالازین (B) BN.

بافت غده بناگوشی رت همراه بوده است. تحقیقات دیگر در زمینه اثر و عملکرد سیتوکالازین B بر روی سلول های BHK - ۲۱ کلیه همستر انجام شده است که این دارو در شرایط *in vitro* به محیط کشت حاوی سلول های BHK - ۲۱ اضافه شده و مشاهداتی که با میکروسکوپ فاز کنتراست انجام شده اثر سیتوکالازین B را بر روی پروتئین های آکتین و میوزین نیز ثابت می کند (۱۹). از جمله مواد مهارکننده دوک های تقسیم در تقسیم متیوز سیتوکالازین B می باشد. این مهار کننده با اتصال و تداخل عمل با سیستم میکروتوبولی - میکروفیلامانی موجب مهار تقسیم سلولی می شوند (۶، ۱۷). سیتوکالازین B با تغییر در ساختار میکروتوبول در سلول های در حال تقسیم، باعث توقف دوک میتوزی می شود (۸). همچنین سیتوکالازین B توانایی مهار فعالیت میکروتوبول ها را دارا می باشد (۱۸، ۱۹). میکرونوکلئوس هسته کوچکی است که از قطعات کروموزومی و یا کروموزوم جا مانده از مهاجرت با سایر کروموزوم ها در آنافاز تقسیم تشکیل شده است (۱۳، ۱۴). مشاهده بی نوکلئوس ناشی از ناهنجاری های کروموزومی وابسته به انجام تقسیمات سلولی می باشد. به این معنی که تا تقسیم سلولی انجام نپذیرد، ناهنجاری صورت پذیرفته مشاهده نخواهد شد. همچنین در تحقیقاتی که در شرایط *in vitro* بر روی اثر ضد سرطانی انواع سیتوکالازین (Cytochalasins Z^۳, A, B, F, T, Z^۲) انجام شد، نشان داد که موثرترین متوقف کننده سیتوکینز، سیتوکالازین B بوده است (۱۳). نتایج به دست آمده در این مطالعه ارائه کننده مدل مناسبی جهت بررسی توقف سیتوکینز به عنوان یکی از اصلی ترین مکانیسم های ایجاد سرطان و بررسی مکانیسم سرطان و یافتن مناسب ترین استراتژی برای مقابله و یا درمان آن در موش که نتایج حاصله، مورد استفاده در زندگی انسانی نیز خواهد بود و همچنین این نتایج نشان دهنده کاربرد آزمون میکرونوکلئوس در بررسی های سیتوژنتیکی بوده که از نقاط قوت این تحقیق می باشد زیرا به علت سادگی و قابلیت انجام این آزمون در شرایط *in vivo* آزمون میکرونوکلئوس به طور گسترده ای به منظور شناسایی موادی که ژنوتوکسیک و یا سرطان زا هستند به کار می رود و به عنوان روشی مطمئن و کارآمد برای غربالگری آثار جهش زا مواد گوناگون شیمیایی و نیز تشعشعات مختلف

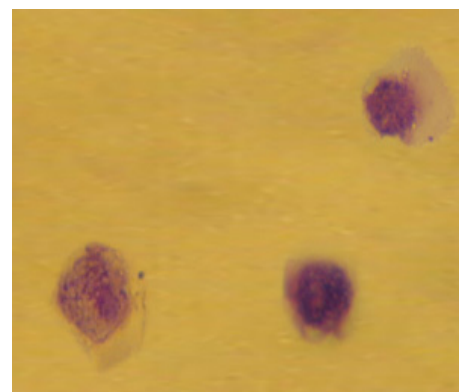


نمودار ۲- میانگین تعداد سلول های تخریب یافته تحت تاثیر داروی

سیتوکالازین (B) MN



شکل ۴- سلول های دو هسته ای تحت تاثیر داروی سیتوکالازین (B) BN.



شکل ۵- سلول های دارای ناهنجاری میکرونوکلئوس (MN) پس از تیمار با

دوزهای مختلف سیتوکالازین B.

بحث

مطالعاتی که در شرایط *in vitro* بر روی رت انجام شده است نشان می دهد که سیتوکالازین B باعث از هم گسیختگی میکروفیلان و کلشی سین سبب منقطع کردن میکروتوبول ها می شود که این تداخل عمل با آزادسازی α - آمیلاز از

مورد استفاده قرار می گیرد. آزمون میکرونوکلیئوس امروزه به عنوان یکی از شاخص های اصلی برای تایید قابل استفاده بودن داروها و ترکیبات گوناگون در دستور کار شرکت های دارویی قرار گرفته است.

نتیجه گیری

در تحقیق حاضر مشاهده ناهنجاری ها بر روی سلول های پرونورموبلاست در دوزهای مورد بررسی و مدت زمان تیمار ۲۴ ساعته در مقایسه با گروه کنترل بیانگر آن است که دوزهای ۵ و ۱۰ میلی گرم برای توقف تقسیم سیتوپلاسم کافی نبودند. بیشترین فراوانی بی نوکلیئوس و کمترین فراوانی میکرونوکلیئوس (مشخصه توقف کامل تقسیم سیتوپلاسم) در دوز ۳ میلی گرم و پس از تیمار ۲۴ ساعت می باشد. فراوانی بی نوکلیئوس (دو هسته ای ها) در دوزهای مورد بررسی فراوانی وابسته به دوز معنی داری را در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند. کاهش PNBN در دوز ۵ میلی گرم را می توان به دلیل فعالیت مکانیسم های ایست بازرسی جهت توقف تقسیم سلول های ناهنجر و القای آپوپتوزیس در سلول های ناتوان در تعمیر دانست (۱۲،۱۵).

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می دانند از مسئولین آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه پیام نور مشهد جهت فراهم نمودن امکانات و تجهیزات لازم برای این پژوهش صمیمانه قدردانی و تشکر به عمل آورند.

- (1) Baggetto LG, Gambrelle J, Dayan G, Labialle S, Barakat S, Michaud M, Grange JD, Gayat L. Major cytogenetic aberration and typical multidrug resistance phenotype of uveal melanoma: current views and new therapeutic prospects. *Cancer Treatment Rev*, 2005; 31: 361-379.
- (2) Duesberg P, Fabarius A, Hehlmann R. The chromosomal basis of cancer. *Cell Onco*, 2005; 27: 293-318.
- (3) Duesberg P, Li R, Fabarius A, Hehlmann R. Aneuploidy and cancer: from correlation to causation. *Contrib Microbiol*, 2006; 13: 16-44.
- (4) Fabarius A, Hehlmann R, Duesberg P H. Instability of chromosome structure in cancer cells increases exponentially with degrees of aneuploidy. *Cancer Genet Cytogenet*, 2003; 143: 59-72.
- (5) Fenech M. Commentary on the SFTG international collaborative study on the in vitro micronucleus test: To Cyt-B or not to Cyt-B?, *Mutat Res*, 2006; 607, 9-12.
- (6) Grenier G, Van sande J, willems C, Neve P, Dumont JE. Effects of microtubule inhibitors and cyt-B on thyroid metabolism in vitro. *Biochem*, 1975; 57: 337-41.
- (7) Heddle JA, Hyashi M. Amicronucleus as index of cytogenetic damage: past, present and future environmental and molecular mutagenesis, 1991; 18: 227-291.
- (8) J gou, Carrier. Microfluidics pushes forward microscopy analysis of actin dynamics. *BioArchitecture*, 2011; 19: 271.
- (9) Krishan A. J. *Cell Biol*, 1972; 54: 657-661.
- (10) K.-J. Hutter. Rapid Detection of Mutagen Induced Micronucleated Erythrocytes by Flow Cytometry. *Histochemistry*, 1982; 75: 353-362.
- (11) Lededure MV, Schmid W. The micronucleus test: methodological aspects. *Mutat Res*, 1973; 19: 109-117.
- (12) Li R, Hehlmann R, Sachs R, Duesberg P. Chromosomal alterations cause the high rates and wide ranges of drug resistance in cancer cells. *Cancer Genet and Cytogenet*, 2005; 44-56.
- (13) Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends Mol Med* 2010; 16: 107-121.
- (14) Sablina AA, Ilyinskaya GV, Rubtsova SN, Agapova LS, Chumakov PM, Kopnin BP. Activation of p5- mediated cell cycle checkpoint in response to micronuclei formation. *J Cell Sci*, 1998; 111: 977-984.
- (15) Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res*, 1975; 9-15.
- (16) Uma Devi P. A method to score micronuclei in vivo using cytochalasin B-induced cytokinesis block. *Mutation Research*, 1998; 401: 33-37.
- (17) Verschaeve L. Genetic damage in subjects exposed to radiofrequency radiation. *Mutat Res/Rev Mut Res* 2009; 681(2-3): 259-70.
- (18) Wheless JW, Clarke DF, Arzimanoglou A, Carpenter D. Treatment of pediatric epilepsy: European expert opinion 2007. *Epilept Dis*, 2009; 9: 353-412.
- (19) Willson J. Incorporation of myofibril activation mechanics into a human heart. *Annals of Biomedical Engineering*, 2010; 38: 321.