

تکنیک میکرونوکلوئوس در شرایط آزمایشگاهی

چکیده

۳ در این فرم اصلی روش CBMV با استفاده از معیارهای انتخاب مورفولوژیکی ارائه می شود و این نوع سمیت ژنتیکی و سمیت سلولی مورد ارزیابی قرار می گیرد: شکست کروموزوم، از دست رفتن کروموزوم، نوآرایی فام تنی (پل های نوکلئوپلاسمیک)، مهار تقسیم سلولی، نکروز و مرگ برنامه ریزی شده سلولی. تغییر سیتوزین-آرابینوزید روش CBMN امکان ارزیابی ضایعات قابل ترمیم حاصل از برش را فراهم می کند. استفاده از پروب های مولکولی تفکیک بین از دست رفتن کروموزوم و شکست کروموزوم و از همه مهتر کاستمان (ناگسستگی) در سلول های دو هسته ای را میسر می سازد. در تکنیک این ویترو CBMN، سمیت ژنتیکی و سمیت سلولی به صورت متعدد و تکمیلی ارزیابی می شود که با کاهش نسبی در سیستم بدست می آید. اصول و روش های اصلی CBMN (شامل معیارهای رتبه بندی دقیق برای نقاط پایینی سمیت ژنتیکی و سمیت سلولی) توصیف و حوزه کاری تحقیقات آینده نیز شناسایی می شود.

کلمات کلیدی: آسیب DNA؛ کروموزوم؛ سم شناسی ژنتیکی

(۱) مقدمه

عوامل فیزیکی و شیمیایی باعث تغییرات اساسی در مواد ژنتیکی سلول های یوکاریوت می شوند و اولین نشانه تایید کننده این موضوع، آسیب DNA در اثر مواجهه با تشعشعات یونی یا مواد شیمیایی سرطان زا بود. اگرچه درک ما ساختار کروموزوم کامل نیست اما شواهد نشان می دهد که ناهنجاری کروموزومی اثر مستقیم و نشانه آسیب در سطح DNA است، به عنوان مثال شکست کروموزوم ممکن است به علت شکست ترمیم نشده دو رشته DNA و نوآرایی کروموزوم در اثر نقص تعمیر شکست تک رشته DNA باشد. هم چنین مشخص شد که از دست رفتن کروموزوم و جدانشدن کروموزوم ها (کاستمان) رویدادهای مهمی در سرطان و پیری هستند و احتمالاً به علت نقص در دوک، سانترومر یا در نتیجه عدم تراکم ساختار کروموزوم قبل از متافاز ایجاد می شوند.

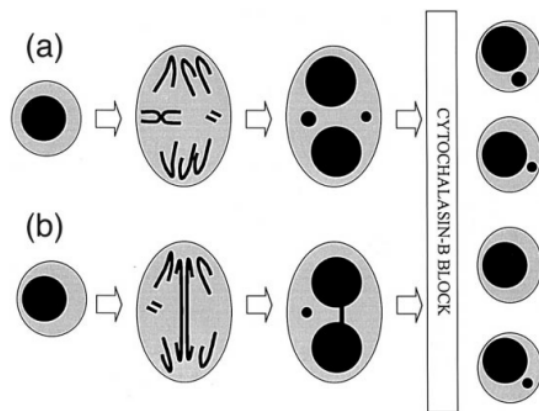
در روش های قدیمی سیتوژنتیک، کروموزوم ها مستقیماً با مشاهده و شمارش تعداد ناهنجاری موجود در متافاز مطالعه می شوند. این روش آنالیز دقیقی را ارائه می کند اما پیچیدگی و دشواری شمردن تعداد اختلال در متافاز و اثر مخدوش کننده از دست رفتن کروموزوم ها در نتیجه آماده سازی متافاز باعث ایجاد سیستم ساده تر ارزیابی آسیب DNA شده است.

اشمید و هدل به طور مستقل پیشنهاد دادند که روش جایگزین و ساده تر برای ارزیابی آسیب DNA در شرایط درون تنی (این ویو) شمارش میکرونوکلئی (MNi) ، در هماتولوژی معروف به اجسام هاول- ژولی، در تقسیم جمعیت سلول هایی مثل مغز استخوان است. روش شمارش میکرونوکلئی در مغز استخوان و اریتروسیت های خون محیطی امروزه یکی از بهترین روش ها در ارزیابی سیتوژنتیک درون تنی در زمینه سم شناسی ژنتیکی است اما برای سایر جمعیت های سلولی در شرایط درون تنی و آزمایشگاهی و روش هایی که تاکنون برای شمارش این ویتریوی MNi در سلول های هسته دار ایجاد شده اند، مناسب نیست.

MNi در سلول های در حال تقسیمی بیان می شوند که یا در آن ها کروموزوم بدون سانترومر می شکند (قطعات خارج از مرکز) و یا کل کروموزوم موجود در آن ها قادر به حرکت به قطب دوک در طول میتوز نیست. در تلوفاز، یک پوشش هسته ای در اطراف کروموزوم ها و قطعات پیرو تشکیل می شود که این پوشش بعداً از حالت پیچشی خارج شده و به تدریج مورفولوژی یک هسته اینترفاز را نشان می دهند به جز اینکه آن ها کوچکتر از هسته اصلی سلول هستند، بنابراین اصطلاح میکرونوکلئوس (شکل ۱) ، MNi شاخص مناسب و مطمئنی برای شکست کروموزوم و از دست رفتن کروموزوم می باشد. از آن جایی که MNi در سلول هایی که تقسیم هسته ای خود را تکمیل کرده اند بیان می شوند، در حالت مطلوب در مرحله دو هسته ای سیکل سلولی قرار می گیرند. گاهی در یک سلول دو هسته ای، بین هسته ها پل های نوکلئوپلاسمیک مشاهده می شود. این ها احتمالاً کروموزوم های دی سانتریک هستند که در آن ها دو سانترومر به قطب های مختلف سلول کشیده شده و در پل بوجود آمده DNA توسط غشای هسته ای پوشیده می شود (شکل ۱). بنابراین پل های نوکلئوپلاسمیک موجود در سلول های دو هسته ای ارزیابی کامل تری از بازآرایی کروموزومی ارائه می کنند که می توانند همراه با تعداد میکرونوکلئوس محاسبه شوند.

از مطالب بالا می توان نتیجه گرفت که MNi تنها در سلول های یوکاریوتی در حال تقسیم بیان می شوند. به عبارت دیگر، این روش به طور موثر یا به طور کمی در جمعیت های سلولی که در حال تقسیم نیستند یا در جمعیت های سلولی در حال تقسیم که کینتیک تقسیم سلولی در آن ها به طور کامل بررسی یا کنترل نشده است مورد استفاده قرار نمی گیرد. در نتیجه، نیاز به ایجاد روشی بود که بتواند در یک جمعیت سلولی، بین سلول هایی که در حال تقسیم نیستند و سلول هایی که در حال میتوز هستند را تفکیک نماید. علاوه بر این، به علت عدم قطعیت سرنوشت MNi بعد از بیشتر از یک تقسیم هسته، شناسایی سلول هایی که تنها یک تقسیم سلولی را تکمیل کرده اند مهم است. این پیش نیازها نیز ضروری هستند زیرا سلول ها بسته به شرایط مختلف فیزیولوژیکی، ژنتیکی و میکرو مغذی ها، با سرعت متفاوتی در شرایط درون تنی و این ویترو تقسیم می شوند.

چندین روش بر اساس استاتموکینتیک، فلوسیتومتری (شمارش سلول ها) و روش های نشانه گذاری DNA پیشنهاد شده اند اما روشی که به علت سادگی و اطمینان بالا در زمینه تاثیر بر روی آسیب زمینه DNA ، مطلوب تر است روش شمارش میکرونوکلئی در سلول های متوقف شده در مرحله سیتوکیناز (CBMN) می باشد.



شکل ۱. (a) منشا میکرونوکلئی از کل کروموزوم های پیشرو و قطعات کروموزومی آسنتریک در آنافاز. (b) تشکیل پل نوکلئوپلاسمیک از یک کروموزوم دی سنتریک که در آن سانترومر ها به قطب های مختلف سلول کشیده می شوند: تشکیل یک میکرونوکلئوس از اتصال قطعات کروموزومی آسنتریک نیز نشان داده می شود. نقش حیاتی سیتوکالاسین B در متوقف کردن سلول های در حال تقسیم در مرحله دو هسته ای نیز در این تصویر به نمایش گذاشته شده است. مثال نشان داده شده مربوط به سلولی فرضی با تنها دو جفت کروموزوم است.

در روش CBMN، در سلول هایی که یک تقسیم هسته ای را تکمیل کرده اند با استفاده از سیتوکالاسین B (Cyt-B) سیتوکینز متوقف می شود و در نتیجه این سلول ها به علت ظاهر دو هسته ای خود به سرعت شناسایی می شوند (شکل ۱). Cyt-B یک مهار کننده پلیمریزاسیون اکتین است که برای تشکیل حلقه ریزرشته که سیتوپلاسم بین هسته دختری را در طول سیتوکینز محدود می کند، ضروری می باشد. در جمعیت های سلولی در حال تقسیم، استفاده از Cyt-B باعث تجمع تقریباً تمام سلول های در حال تقسیم، با توجه به درجه انطباق آن ها و نسبت سلول های در حال تقسیم، در مرحله دو هسته ای می شود. MNi تنها در سلول های دو هسته ای محاسبه می شوند و مقایسه مطمئن آسیب DNA بین جمعیت های سلولی که ممکن است در کینتیک تقسیم سلولی متفاوت باشند، را در بردارد. این روش در ابتدا برای استفاده در لنفوسیت های کشت شده انسانی ابداع شد اما امروزه برای انواع سلول ها مثل تومور بافت توپر و سلول های مغز استخوان تنظیم شده است. علاوه بر این، ابداعات جدیدی در روش CBMN رخ داده است که باعث (a) تفکیک MNi مربوط به کل کروموزوم ها از MNi مربوط به قطعات کروموزومی، (b) تبدیل مناطق برش خورده ترمیم شده به MNi در یک تقسیم سلولی، (c) استفاده از پروب های مولکولی برای شناسایی رویدادهای کاستمان در سلول های دو هسته ای و (d) ادغام سلول های نکروتیک و آپوپتوتیک می شود.

پیشنهاد شده که برای بررسی سمیت ژنتیکی مواد شیمیایی جدید، به جای آنالیز متافاز از روش شمارش میکرونوکلئوس استفاده شود. موضوع جالب توجه اخیر درباره بررسی موتاسیون به این موضوع اختصاص دارد. روش شناسی و داده های موجود درباره بررسی میکرونوکلئوس این ویترو، در کارگاه بین المللی واشنگتن که درباره روش تست سمیت ژنتیکی بود و در سال ۱۹۹۹ برگزار شد دوباره مورد بررسی قرار گرفت.

روش استاندارد CBMN و تغییرات مختلف آن ها به صورت دقیق در بخش بعدی توضیح داده می شود. روش های توصیف شده بیشتر برای لنفوسیت های انسانی قابل اجرا هستند اما برای قابلیت استفاده در سایر انواع سلول ها، تغییراتی در این روش ها اعمال شده است.

۱،۱ روش استاندارد شمارش میکرونوکلی در سلول های متوقف شده در مرحله سیتوکیناز مربوط به لنفوسیت های انسانی ایزوله شده

در این روش، MNI تنها در سلول هایی که بعد از تحریک با فیتوهماگلوآنین یک تقسیم هسته ای را تکمیل کرده باشند، محاسبه می شوند. این سلول ها بعد از اینکه انجام سیتوکینز در آن ها با اعمال Cyt-B که باید قبل از اولین موج میتوزی اضافه شود، متوقف می گردد، از ظاهر دو هسته ای شان تشخیص داده می شوند. شرایط بهینه کشت باید در عرض ۷۲ ساعت بعد از تحریک با PHA، دارای ۶۰-۳۵٪ یا بیشتر سلول دو هسته ای به عنوان نسبتی از سلول های زنده (مثل سلول هایی که به جز سلول های نکروز شده و آپوپتوتیک) باشد. تمام تجهیزات برای محافظت از اپراتور باید زیست ایمنی داشته و محلول های استفاده شده در این روش استریل شوند.

۱،۱،۱ جداسازی لنفوسیت ها، کشت سلولی و برداشت سلولی

(۱) خون خالص توسط سوزن گرفته شده و در لوله هایی دارای هپارین به عنوان ماده ضد انعقاد خون جمع آوری و قبل از جداسازی لنفوسیت ها، کمتر از ۴ ساعت در ۲۲ درجه نگهداری می شود.

(۲) خون به نسبت ۱:۱ با سرم فیزیولوژی ایزوتونیک (۰،۸۵٪) رقیق شده و به آرامی به مخلوط میکس بر می گردد.

(۳) خون رقیق شده با استفاده از نسبت تقریبی ۱:۳ (مثلا ۲ میلی لیتر فایکول به ۶ میلی لیتر خون رقیق شده) به آرامی روی شیب چگالی فایکول (داروسازی) قرار می گیرد، مراقب باشید که اختلالی در واکنش ایجاد نشود.

(۴) گرادیان موجود در سانتریفیوژ بعد از متوازن ساختن لوله ها با دور ۴۰۰*g به مدت ۴۰-۲۵ دقیقه در دمای ۲۲ درجه سلسیوس اسپین شد.

(۵) لایه لنفوسیت در حدفاصل فایکول و پلاسما رقیق شده با یک پیپت پاستور استریل جمع آوری و به حجم ۵-۳ برابر محلول نمکی متوازن هانکس (HBSS) در دمای ۲۲ درجه اضافه شد. سوسپانسیون سلولی حاصل، بسته به حجم به مدت ۱۰-۵ دقیقه با دور ۴۰۰-۲۸۰*g سانتریفیوژ شد.

(۶) سوپرناتانت دور ریخته شد، سلول ها در HBSS با حجم ۲-۵ برابر مجدد مخلوط و بسته به حجم، به مدت ۵ دقیقه با دور ۴۰۰-۱۸۰*g سانتریفیوژ شدند.

(۷) سوپرناتانت دور ریخته شد و سلول ها مجدد در ۱ میلی لیتر از محیط کشت RPMI 1640 مخلوط شدند.

(۸) غلظت سلولی با استفاده از شمارنده کالتر یا هموسیتمتر اندازه گیری شد و با استفاده از درصد سلول های زنده شمارش شده از طریق آزمون دفع رنگ تریپان بلو تنظیم گردید.

(۹) سلول ها در محیط RPMI 1640 دارای ۱۵-۱۰٪ سرم جنین گاو غیر فعال شده با گرما با غلظت $0.5-1.0 \times 10^6$ سلول در میلی لیتر مخلوط شده و در حجم ۰,۷۵-۱,۰ میلی لیتر در لوله های ته گرد محیط کشت (با عرض ۱۰ میلی متر) کشت می شوند.

(۱۰) لنفوسیت ها سپس با اضافه کردن فیتوهمگلوتین (PHA) (Glaxo Wellcome HA15) به هر لوله کشت با غلظت ۱۰ میکرولیتر در میلی لیتر (از استوک محلول در آب ۲,۲۵ میلی گرم در میلی لیتر) تحریک به تقسیم شده و با درب شل در یک دستگاه بخور دارای ۵٪ دی اکسید کربن جو، در دمای ۳۷ درجه انکوبه می شوند. غلظت PHA استفاده شده بسته به خلوص و منبع شناساگر برای تایید حداکثر تعداد سلول های دو هسته ای بعد از توقف با Cyt-B بهینه سازی شده است.

(۱۱) چهل و چهار ساعت بعد از تحریک PHA، ۴,۵ میکروگرم Cyt-B به هر میلی لیتر از کشت اضافه می شود (از دستکش و هود فم استفاده شود): یک الیکوت ۱۰۰ میکرولیتری از استوک Cyt-B محلول در DMSO (۶۰۰ میکروگرم در لیتر) گرم شده، در ۹۰۰ ماکرولیتر از محیط کشت اضافه و مخلوط می گردد. هفتاد و پنج میکرولیتر از مخلوط به یک میلی لیتر از کشت اضافه می شود و غلظت نهایی سیتوکالاسین B به ۴,۵ میکروگرم در میلی لیتر می رسد (سایر آزمایشگاه ها از ۶ میکروگرم در لیتر سیتوکالاسین B در کشت های خود استفاده می کنند). لوله های کشت مجدد با درب های شکل انکوبه می شوند.

(۱۲) ۲۸ ساعت بعد از اضافه کردن Cyt-B، سلول ها با سیتوسانتریفیوژ برداشت می گردند. هزار میکرولیتر از محیط کشت بدون به هم خوردن سلول ها برداشته شده و سپس سلول ها به آرامی در لوله های خود مخلوط می شوند. ۱۲۰-۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی به ظرف سیتوسانتریفیوژ منتقل و برای تولید ۲ نقطه در هر لام سانتریفیوژ می شود (سیتوسانتریفیوژ بدین صورت انجام شود: زمان : ۵ دقیقه، سرعت: ۶۰۰ rpm). لام ها از

سیتوسانتریفیوژ حذف و فقط به مدت ۱۲-۱۰ دقیقه در دمای اتاق خشک می شوند سپس به مدت ۱۰ دقیقه در متانول خالص قرار می گیرند.

(۱۳) سلول ها با استفاده از روش های مختلفی که می توانند به وضوح مرزهای هسته ای و سیتوپلاسمی را مشخص کنند، رنگ می شوند. در آزمایش ما، استفاده از دیف کوییک، یک محصول تجاری آماده مصرف است، سریعترین و بهترین نتایج را ارائه می کند.

(۱۴) بعد از رنگ آمیزی، لام ها در معرض هوا خشک می شوند و با استفاده از دپکس (DPX) درون محیط کشت یک لامل روی سلول ها قرار می گیرد. این روند در زیر هود فوم انجام می شود و لام ها در هود باقی می مانند سپس به مدت نامحدود تا زمانی که نیاز باشد نگهداری می شوند.

نکته مهم: محیط های دو برابر کنترل یا سلول های تیمار شده با ژنوتوکسین تنظیم و لام های هر کشت باید تهیه شوند. بررسی تغییرات آزمایشگاهی، مثل ضریب تغییر که باید با هر یک از کشت های دو برابر بیان شود، ضروری است. این طراحی آزمایشگاهی در شکل ۲ به طور خلاصه بیان می شود.

برای میکروسکوپ فلورسانس، رنگ آمیزی با آکریدین نارنجی (۴۰ میکروگرم در میلی لیتر در بافر سورنسن فسفات با PH ۶,۹) توصیه می شود. اگر سیتوسانتریفیوژ در دسترس نبود، برای کل کشت های خونی، لام ها با این روش تهیه می شوند.

۱,۲ بررسی لام ها و شمارش تعداد MN

لام ها با استفاده از میکروسکوپ نوری یا فلورسنس با بزرگنمایی ۱۰۰۰، بهتر بررسی می شوند. لام ها باید قبل از آنالیز کد گذاری شوند به طوری که محاسبه کننده قادر به شناسایی لام نباشد. برای لام های مربوط به هر یک از کشت های دو برابر یک امتیاز باید بدست بیاید. تعداد سلول های شمارش شده بسته به سطح تغییرات موجود در شاخص MN تعیین می شوند که این آزمایش برای شناسایی و انحراف معیار مورد انتظار تخمین به کار می رود. برای هر یک از لام ها این اطلاعات مورد نیاز است:

۶) تعداد سلول مرده یا در حال مرگ به علت مرگ برنامه ریزی شده سلولی یا نکروز در هر ۵۰۰ سلول ممکن است بر روی لام های مشابه شمردن شوند (معیار شمارش برای این سلول ها در قسمت بعدی آورده شده است). شمارش تعداد سلول های زنده تک، دو و چند هسته ای.

لازم به ذکر است که اگر نحوه طبقه بندی یکی از سلول ها نامشخص بود بهتر است شمردن نشود. عوامل اصلی یک برگ شمارش در جدول یک مشخص شده است.

جدول یک. اطلاعاتی که باید در یک برگه محاسبه در روش شمارش میکرونوکلیئوس سلول های متوقف شده در سیتوکیناز ذکر شوند.

شماره کد هر اسلاید
تعداد سلول های BN شماره شده
توزیع سلول های BN با ۰، ۱، ۲، ۳، یا بیشتر MNi در حداقل ۱۰۰۰ سلول BN.
تعداد کل MNi در سلول های BN
فراوانی MNi در ۱۰۰۰ سلول BN
فراوانی سلولهای BN میکرونوکلیئوسی در ۱۰۰۰ سلول BN
نسبت سلول های BN با پل های نوکلئوپلاسمیک
نسبت سلولهای تکی، دوتایی، سه تایی و چهارتایی در ۵۰۰ سلول زنده
فراوانی سلول های BN در مجموع ۵۰۰ سلول زنده
شاخص تقسیم هسته ای
نسبت سلول هایی که در معرض آپوپتوز یا نکروز در ۵۰۰ سلول قرار دارند
شاخص سمیت سلولی تقسیم هسته ای
ضریب تنوع برای تخمین تکراری پارامترهای بالا

۱,۳ معیاری برای انتخاب سلول های دو هسته ای که از نظر تعداد میکرونوکلیئوس رتبه بندی می شوند.

سلول های متوقف شده در سیتوکینز که از نظر تعداد MN رتبه بندی شده اند باید این ویژگی ها را داشته باشند.

(a) سلول ها باید دو هسته ای باشند.

(b) دو هسته یک سلول دو هسته ای باید غشای هسته ای سالم داشته و در مرز سیتوپلاسمی مشابهی قرار گرفته باشند.

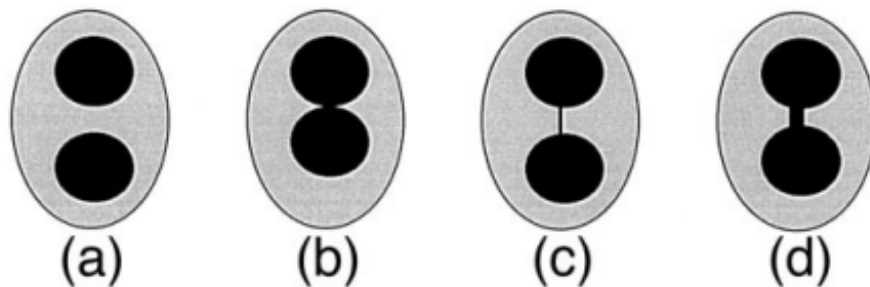
(c) دو هسته یک سلول دو هسته ای باید تقریباً به یک اندازه و الگوی رنگ آمیزی و شدت رنگ پذیری مشابهی داشته باشند.

(d) دو هسته یک سلول BN ممکن است توسط یک پل نوکلئوپلاسمیک سالم که عریض تر از $1/4^{th}$ قطر هسته نیست، به هم متصل باشند.

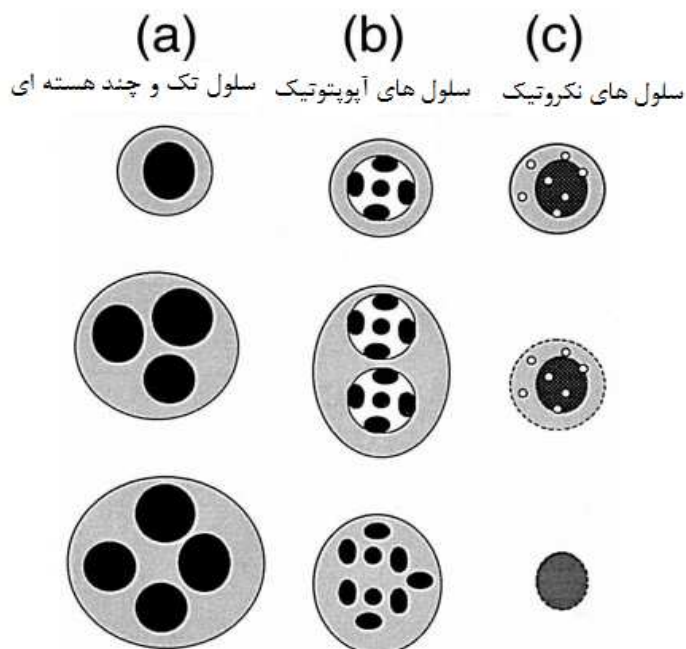
(e) دو هسته اصلی یک سلول BN ممکن است با هم تماس داشته باشند اما نباید یکدیگر را بپوشانند. یک سلول با دو هسته روی هم افتاده تنها اگر مرزهای هسته ای هر یک از هسته ها قابل شناسایی باشند، محاسبه می شوند.

(f) مرز سیتوپلاسمی یا غشای یک سلول دو هسته ای باید سالم بوده و از مرز سیتوپلاسمی سلول های مجاور قابل تشخیص باشند.

نمونه این نوع سلول دو هسته ای که ممکن است محاسبه شوند یا قابل احتساب نباشند، به شکل هندسی در شکل ۳ نمایش داده شده است. سلول هایی که نباید از نظر تعداد میکرونوکلئوس محاسبه شوند دارای سلول های تک، دو، سه، چهار و چند هسته ای و سلول های نکروتیک یا آپوپتوتیک هستند (شکل ۴).



شکل ۳. معیاری برای انتخاب سلول های دو هسته ای در روش شمارش میکرونوکلئوس سلول متوقف شده در مرحله سیتوکیناز. (a) سلول دو هسته ای مناسب، (b) سلول دو هسته ای با هسته متصل (c) سلول دو هسته ای با پل نوکلئوپلاسمیک باریک بین هسته ها (d) سلول دو هسته ای با پل نوکلئوپلاسمیک نسبتاً پهن. سلول هایی با دو هسته هم پوشانی شده اگر مرز هسته ای قابل تشخیصی داشته باشند، ممکن است به صورت سلول های دو هسته ای در نظر گرفته شوند. سلول های دو هسته ای موقت با بیش از یک پل نوکلئوپلاسمیک نیز مشاهده می شود.



شکل ۴. انواع مختلفی از سلول ها به جز سلول های دو هسته ای، که در روش این ویتروی شمارش میکرونوکلئوس در سلول های متوقف شده در مرحله سیتوکیناز مشاهده می شوند. این سلول ها نباید از نظر تعداد MN محاسبه شوند. (a) سلول های زنده تک، سه و چهار هسته ای. (b) سلول های تک و دو هسته ای در مرحله اولیه آپوتوز زمانی که تراکم کروماتین اتفاق می افتد اما غشای هسته ای قابل تشخیص نباشد و سلول های آپوتوز مرحله نهایی با سیتوپلاسم سالم، بدون هسته و جسم کروماتین آپوتوز در سیتوپلاسم. (c) سلول هایی در مراحل مختلف نکروز شامل مراحل اولیه نشان دهنده واکوئل داری، تجزیه غشای سیتوپلاسمی و از دست رفتن سیتوپلاسم با یک هسته سالم و مرحله نهایی که در آن سیتوپلاسم به طور جزئی یا کامل از دست می رود و غشای هسته ای به طور واضح آسیب می بیند و مواد هسته ای از هسته باقیمانده شروع به نشت می کنند.

۱,۴ معیاری برای محاسبه میکرونوکلئوی

MNi از نظر مورفولوژیکی مشابه با هسته اما کوچکتر از آن هستند. آن ها این ویژگی ها را نیز دارند:

(a) قطر MNi در لنفوسیت های انسان معمولا بین $^{th}16/1$ و $^{rd}3/1$ قطر میانگین هسته اصلی متغیر است که به ترتیب با $^{th}256/1$ و $^{th}9/1$ از سطح یکی از هسته ای اصلی موجود در سلول BN ارتباط دارند.

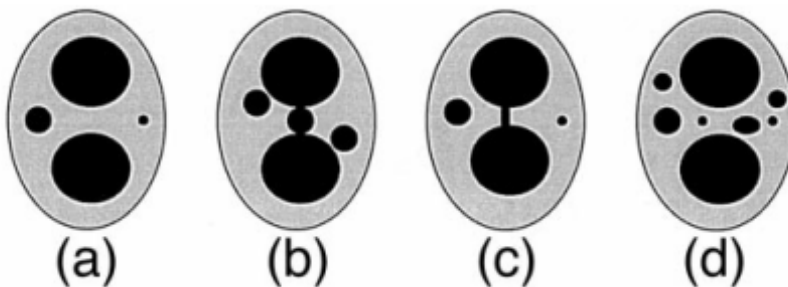
(b) MNi منعکس کننده نور نیستند و به راحتی از محصولات مصنوعی مثل ذرات رنگ آمیزی شده قابل تشخیص هستند.

(c) MNi به هسته اصلی متصل نیستند و با آن ارتباطی ندارند.

(d) MNi ممکن است به هم متصل باشند اما هسته اصلی را نپوشانده اند و مرز میکرونوکلئی باید از مرز هسته ای قابل تفکیک باشد.

(e) معمولا MNi شدت رنگ آمیزی مشابه با هسته اصلی دارند اما گاهی رنگ آمیزی ممکن است شدیدتر باشد.

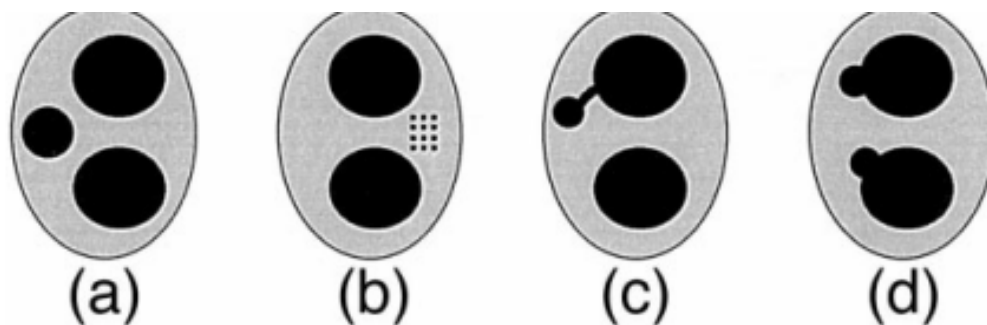
مثال هایی از MNi معمولی که این معیارها را دارند در شکل ۵ نشان داده شده اند. نمونه هایی از ساختار سلولی که مشابه با MNi هستند اما نباید به عنوان MNi مشتق گرفته از شکست کروموزومی یا از دست رفتن آن طبقه بندی شوند در شکل ۶ نشان داده شده است. تلقیح تکثیر ژنی ممکن است منجر به خروج ژن های تکثیر شده به جوانه های هسته ای در طول فاز S شده که در نهایت از هسته جدا شده و یک میکرونوکلئوس تشکیل می دهند، اگر تکثیر ژن مشکوک باشد، تعیین تعداد هسته با تشکیل جوانه هسته ای ضروری است.



شکل ۵. شکل ظاهری و اندازه نسبی میکرونوکلئوس در سلول های دو هسته ای. (a) سلولی با دو میکرونوکلئوس یکی با $rd_{3/1}$ و دیگری $th_{9/1}$ قطر یکی از هسته های اصلی سلول. (b) میکرونوکلئی متصل به هسته اصلی اما با هسته همپوشانی ندارد. (c) یک سلول دو هسته ای با پل نوکلئوپلاسمیک بین هسته اصلی و دو میکرونوکلئی (d) یک سلول دو هسته ای با شش میکرونوکلئی با سایزهای مختلف. این نوع از سلول به ندرت مشاهده می شود.

۱,۵ معیاری برای محاسبه پل های نوکلئوپلاسمیک

پل های نوکلئوپلاسمیک گاهی بعد از قرار گرفتن در معرض کلاستوزن، در سلول های دو هسته ای مشاهده می شوند. آن ها ارتباط پیوسته بین هسته موجود در سلول دو هسته ای هستند و به علت کروموزوم های دی سنتریک که در آن سانترومر ها در طول آنافاز به قطب های مخالف کشیده می شوند بوجود می آیند. وسعت پل نوکلئوپلاسمیک به طور قابل توجهی متغیر است اما معمولا از $4/1^{th}$ قطر هسته سلول بیشتر نمی شود. پل نوکلئوپلاسمیک باید ویژگی های رنگ آمیزی مشابه با هسته اصلی داشته باشند. در موقعیت های بسیار نادر، بیش از یک پل نوکلئوپلاسمیک در یک سلول دو هسته ای مشاهده می شود. یک سلول دو هسته ای با یک پل نوکلئوپلاسمیک غالبا دارای یک یا بیش از یک میکرونوکلئوس است. نمونه هایی از سلول های دو هسته ای با پل میکرونوکلئوس در شکل ۱ و ۵ نشان داده شده است.

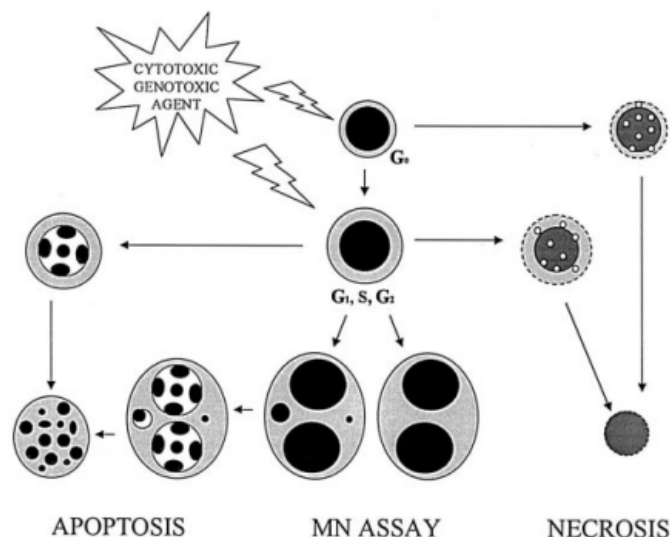


شکل ۶. سلول های دو هسته ای موقت (یا سلول هایی با سلول های دو هسته ای مشابه) ممکن است دارای ساختاری باشند که مشابه با میکرونوکلئوس است اما نباید به عنوان میکرونوکلئوس حاصل از دست رفتن کروموزوم یا شکست کروموزومی در نظر گرفته شود. این موقعیت ها شامل (a) یک سلول سه هسته ای که در آن یکی از هسته ها نسبتا کوچک است اما قطری بیش تر از $1/3$ قطر سایر هسته ها دارد. (b) نقطه دار کردن متراکم در ناحیه مخصوصی از سیتوپلاسم (c) مواد هسته ای دفع شده که شبیه به میکرونوکلئوس با یک ارتباط نوکلئوپلاسمیک باریک به هسته اصلی هستند و (d) برآمدگی های کوچک هسته که ارتباط نوکلئوپلاسمیک با هسته اصلی دارند.

۱,۶ معیاری برای محاسبه سلول های آپوتوتیک و نکروتیک

شکل ۷ مسیرها و رویدادهای مختلف مورد انتظار که در لنفوسیت های کشت شده که در معرض مواد سمی هستند رخ می دهد را نمایش می دهد. روش های سمیت ژنتیکی سیتوژنتیک که برای آماده سازی سلول های اینترفاز نیاز

به تیمار با هیپوتونیک دارند (برای روش شمارش کل میکرونوکلئوس موجود در خون) یا پلیت های متافاز جهت آنالیز کروموزومی، برای روش های سمیت سلولی مناسب نیستند زیرا تیمار با هیپوتونیک ممکن است سلول های نکروتیک و آپوپتوتیک را از بین برده و این روش را غیر قابل اجرا سازند. در نظر گرفتن نکروز و آپوپتوز برای تعریف دقیق مکانیسم فعالیت و ارزیابی حساسیت سلولی به یک ماده شیمیایی یا تابش مهم است. روش کشت لنفوسیت های جدا شده یا کشت لاین های سلولی برای آماده سازی لام، نیاز به تیمار با هیپوتونیک سلول ها ندارند بنابراین حفظ مورفولوژی سلول های نکروتیک و آپوپتوتیک را ممکن می سازند. استفاده از Cyt-B محاسبه سلول های آپوپتوتیک را آسان تر می کند زیرا انتظار می رود که تجزیه سلول های آپوپتوتیک به اجسام آپوپتوتیک کوچک تر را مهار نماید. روش بعدی نیاز به تجمع میکروفیلانمنت هایی که به سرعت توسط سیتوکالاسین B مهار می شوند، دارد.



شکل ۷. سرنوشت احتمالی سلول های متوقف شده در مرحله سیتوکیناز بعد از قرار گرفتن در معرض عوامل

سیتوتوکسیک/ژنوتوکسیک.

این دستورالعمل ها برای محاسبه سلول های نکروتیک و آپوپتوتیک توصیه می شوند: (a) سلول های نشان دهنده تراکم کروماتین با مرزهای سیتوپلاسمی و هسته ای سالم یا سلول های نمایش دهنده قطعات هسته ای به صورت اجسام هسته ای کوچک تر در یک غشای سیتوپلاسمی سیتوپلاسمیک سالم، در دسته آپوپتوتیک ها طبقه بندی می شوند. (b) سلول هایی با سیتوپلاسم احاطه شده با واکوئل های مختلف و غشای سیتوپلاسمی آسیب دیده با هسته

نسبتا سالم یا سلول های بدون سیتوپلاسم و غشای هسته ای آسیب دیده/ نامنظم با ساختار هسته ای نسبتا سالم در دسته نکروتیک ها قرار می گیرند. این معیارها و نتایج این روش ها با پراکسید هیدروژن اخیر در جای دیگری گزارش شده اند.

شکل ۴ و ۷ مثال های خاصی از سلول های نکروتیک و آپوتوتیک را ارائه می کنند.

۱,۷ شاخص تقسیم هسته ای (NDI) و شاخص سیتوتوکسیتی تقسیم هسته ای (NDCI)

NDI غالبا مطابق با روش استموند و تاگر محاسبه می شود. پنج هزار سلول زنده برای تعیین تعداد سلول های با ۱، ۲، ۳ یا ۴ هسته ای محاسبه می شوند و NDI با استفاده از این فرمول ، برآورد می گردد:

$$NDI = (M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4))/N,$$

در این فرمول M1-M4 نشان دهنده تعداد سلول با یک تا ۴ هسته و N تعداد کل سلول های زنده محاسبه شده است. NDI و نسبت سلول های دو هسته ای پارامترهای مفیدی برای مقایسه پاسخ میتوزنیک لنفوسیت ها و تاثیرات سیتواستاتیک عوامل آزمایش شده در این روش می باشد.

اگر سلول های نکروتیک و آپوتوتیک در تعداد کل سلول های محاسبه شده لحاظ شوند ارزیابی دقیق تری از وضعیت تقسیم هسته ای بدست می آید زیرا در دز های سمی بالاتر مواد شیمیایی تست شده، نسبت بالایی از سلول های مرده را می توان انتظار داشت. لازم به ذکر است که اگر سلول های نکروتیک و آپوتوتیک زمان شمارش سلول ها لحاظ نشوند، نسبت دو سلولی بودن و NDI بسیار زیاد تخمین زده می شود. تخمین دقیق تر وضعیت تقسیم هسته ای و کینتیک تقسیم سلولی با استفاده از معادله تغییر یافته زیر که سلول های زنده، نکروتیک و آپوتوتیک را در نظر می گیرد، بدست می آید:

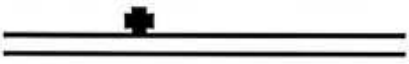




$$NDCI = (Ap + Nec + M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4))/N^*,$$

در این فرمول، NDCI شاخص سمیت سلولی تقسیم هسته ای، Ap تعداد سلول های آپوتوتیک، Nec تعداد سلول های نکروتیک، M1-M4 تعداد سلول های زنده با ۱-۴ هسته و N^* تعداد کل سلول های محاسبه شده (زنده و غیر زنده) می باشد.

۱,۸ ارزیابی آسیب های مربوط به DNA برشی ترمیم یافته در لنفوسیت های انسانی G0/G1 با استفاده از روش شمارش میکرونوکلئوس سیتوزین آرابینوزید در لنفوسیت های انسانی.

پس از ارزیابی پاسخ MN در لنفوسیت های G0 انسانی به قرار گرفتن در معرض ژنوتوکسین های مختلف مشخص شد که میزان تشکیل میکرونوکلئوس مربوط به سمیت سلولی، برای مواد شیمیایی و اشعه ماورابنفش کم است که اساسا این موضوع باعث تحریک آسیب به بازها و ترکیبات اضافی DNA به جای شکست رشته یا آسیب به دوک می شود. ما فرض را بر این گذاشتیم که این مسئله به علت ترمیم ضایعات می باشد، اما اگر هنوز ضایعاتی باقی مانده باشد بعد از یک دور سنتز DNA به شکست دو رشته ای DNA تبدیل نمی شود. علاوه بر این، ثابت شد که مهار ترمیم استخراجی توسط سیتوزین آرابینوز (ARA) منجر به تبدیل این ضایعات بازی به یک شکست تک رشته ای می شود که بعد از سنتز DNA برای تولید یک قطعه آسنتریک که در نهایت به صورت یک MN در یک سیکل تقسیم بیان می شود، به شکست دو رشته ای تبدیل می گردد. با استفاده از این مفهوم (شکل ۸) نشان دادیم که اضافه کردن ARA در طول ۱۶ ساعت اول کشت لنفوسیت (قبل از سنتز DNA) منجر به افزایش ناگهانی در پاسخ به دوز MN بعد از تیمار با UV یا MNU می شود. ولی افزایش تحریک ARA بعد از مواجهه با اشعه ایکس تنها ۱,۸ برابر بود که انتظار می رود به علت نسبت مواد اضافی DNA یا آسیب بازی مربوط به تحریک شکست رشته DNA باشد. این روش برای شناسایی آفت کش هایی که باعث ترمیم استخراجی می شوند و برای تفکیک بین عوامل ژنوتوکسیک که ممکن است ترمیم استخراجی را تحریک کنند، استفاده شده است. پروتکل ARA بخش مهمی در روش CBMN است و اگر تاثیر شدید سیتوتوکسیک همراه با تحریک ضعیف MN مشاهده می شود، باید تلاش زیادی در آن صورت بگیرد. ارزیابی دقیق آسیب های ترمیم شده DNA به روش استخراجی با استفاده از روش ARA تنها با استفاده از روش CBMN امکان پذیر است زیرا (a) تبدیل آسیب های ترمیم شده DNA به روش استخراجی به MN تنها در سلول هایی رخ می دهد که تقسیم سلولی خود را کامل کرده باشند و (b) اضافه کردن ARA ممکن است منجر به تغییر قابل توجه کینتیک تقسیم سلولی شود که نتایج روش MN بدون Cyt-B رابه هم می زند.

مهار DNA پلی مرز توسط ARA ممکن است باعث شکست رشته DNA در سلول هایی که در حال سنتز DNA هستند شود. از این رو، استفاده از این روش تنها در لنفوسیت های G0 تحریک شده با PHA با قرار گرفتن در معرض ARA در طول فاز G1 و قبل از فاز S رخ می دهد زیرا ترمیم استخراجی در طول G1 فعال می شود. در عمل بدین معنی است که سلول ها در طول ۱۶-۲۰ ساعت اولیه بعد از تحریک PHA در حضور ARA کشت می شوند، پس از آن سلول ها برای حذف ARA شسته و در محیط کشت دارای داکسی سیدین برای تغییر مهار DNA پلی مرز توسط ARA انکوبه می شوند، بعد از این مراحل پروتکل استاندارد CBMN اجرا می شود. برای جزئیات بیشتر این روش و نتایج مخصوص به آن به مقاله فنچ و نویل و سورال و همکارانش مراجعه نمایید.

1.  مواد اضافی بر روی DNA
2.  برش و ممانعت از پر شدن گپ به وسیله ARA که منجر به ایجاد تک رشته می شود.
3.  تبدیل تک رشته ای به دو رشته ای بعد از تکثیر DNA
4.  DSB با شکست کروماتید ایجاد می شود
5.  شکست کروماتید پیرو بصورت میکرونوکلیئوس بیان می شود.

۱,۹ روش CBMN در سایر سیستم های کشت سلولی

۱,۹,۱ کشت خون سالم برای لنفوسیت های انسانی

روش CBMN در لنفوسیت های انسانی با استفاده از کشت خون سالم انجام می شود. اساساً ۰,۴-۰,۵ میلی لیتر از خون سالم به ۴,۵ میلی لیتر از محیط کشت (RPMI 1640) غنی شده سرم جنین گاو دارای ال گلوتامین، آنتی بیوتیک (اختیاری) و PHA اضافه می شود. ۴۴ ساعت بعد از تحریک PHA، Cyt-B اضافه می شود. غلظت بهینه

پیشنهادی Cyt-B برای تجمع سلول های دو هسته ای در کشت خون سالم ۶ میکروگرم در میلی لیتر است. لنفوسیت های دو هسته ای ۴۸ ساعت بعد از اضافه کردن Cyt-B، برداشت می شوند، برای لیز گلبول های قرمز خون با ۰,۰۷۵ KCL مولار تیمار شده و قبل از انتقال به لام و رنگ آمیزی، با متانول:استیک اسید فیکس می شوند (اول سلول ها را روی لام زده و را بعد از خشک شدن در معرض هوا ثابت نمایید). به عنوان یک روش جایگزین، جداسازی مستقیم لنفوسیت های دو هسته ای از کشت خون سالم با استفاده از روش شیب غلظتی فایکول و سپس انتقال سلول ها به لام با استفاده از سیتوسانتریفیوژ قبل از تثبیت و رنگ آمیزی نیز امکان پذیر است (مشاهدات چاپ نشده است) که در این روش نیازی به تیمار هیپوتونیک نیست و سیتوپلاسم به طور مطلوبی حفظ می شود.

۱,۹,۲ کشت لنفوسیت های موش

لنفوسیت ها از خون محیطی و طحال جداسازی و مطابق با روش های توضیح داده شده توسط فنچ و همکارانش کشت می شوند. از آن جایی که لنفوسیت های موش سیکل تقسیم سلولی کوتاهتری نسبت به لنفوسیت های انسانی دارند، اضافه کردن Cyt-B قبل از ۱۸ ساعت بعد از تحریک با میتوزن و برداشت سلول ها ۲۰ ساعت بعد از آن، ضروری است. بسته به شرایط کشت، بدست آوردن بهترین نسبت دو هسته ای حتی در ۷۲ ساعت بعد از تحریک با میتوزن نیز امکان پذیر است.

۱,۹,۳ سایر کشت های اولیه سلولی

روش CBMN برای ارزیابی آسیب DNA تحریک شده در شرایط این ویترو، درون تنی یا خارج از بطن زنده، به سرعت با سایر انواع سلول های اولیه تنظیم می شود. مهمترین نکات بدین شرح هستند: (a) اطمینان از اینکه MNi در اولین تقسیم هسته ای بعد از اثر ژنوتوکسیک محاسبه می شود و (b) اجرای آزمایشات مقدماتی برای تعیین غلظت Cyt-B که در آن غلظت بیشترین تعداد سلول های در حال تقسیم در مرحله دو هسته ای باید متوقف شوند. علاوه بر این به خاطر سپاری این نکته نیز مهم است که Cyt-B ممکن است تا ۶ ساعت قبل از اینکه شروع به اعمال فعالیت متوقف سازی مرحله سیتوکیناز بکند جذب شود (اطلاعات مربوط به این بخش چاپ نشده است). زمان استفاده از لاین های سلولی ایجاد شده یا اولیه مربوط به جمعیت های سلولی در حال تقسیم، معمولاً بلافاصله

بعد از قرار گرفتن در معرض ژنوتوکسین برای بدست آوردن سلول هایی که اولین تقسیم سلولی خود را انجام می دهند مثل سلول های دو هسته ای، Cyt-B اضافه می شود، این موضوع بسته به مدت زمان سیکل سلولی قبل از برداشت سلول ها، عموماً نیاز به یک دوره ۲۴ تا ۴۸ ساعته انکوباسیون دارد. سلول های متصل شده می توانند تریپسین دار شده سپس مشابه با لنفوسیت های انسانی، با سیتوسانتریفیوژ آماده شوند. روش های بخصوصی برای استفاده با سلول های هسته دار مغز استخوان، فیبروبلاست های ریه، کراتینوسیت یا سلول های کراتین ساز پوست و کشت اولیه تومور سلولی توصیف شده است. به طور کلی بعد از اینکه سلول ها از حیوان جداسازی شده و در حضور Cyt-B در محیط کشت قرار گرفتند، ارزیابی تحریک درون تنی میکرونوکلئی با مهار مرحله سیتوکینز در سلول های در حال تقسیم، عملی تر و کاربردی تر است؛ این روش در مورد انواع سلول ها مثل فیبروبلاست ها، کراتینوسیت ها و سلول های هسته دار مغز استخوان موفق عمل کرده است.

۱.۱۰ روش شمارش میکرونوکلئی در لاین های سلولی با مهار سیتوکینز یا بدون توقف سیتوکینز

در مورد اینکه Cyt-B، که برای تجمع سلول های دو هسته ای استفاده می شود، ممکن است با بیان MN تداخل داشته باشد شبه وجود دارد. در بررسی سلول های نرمال، تحریک MNi با استفاده از Cyt-B یا اثر پاسخ وابسته به دوز Cyt-B با تعداد MN موجود در سلول های دو هسته ای در دوز هایی که معمولاً برای مهار سلول ها در مرحله سیتوکینز استفاده می شوند، نشان داده نشد. مطالعه اخیر نشان می دهد که بیان MN تحریک شده با داروهای شیمی درمانی ممکن است کمتر از مقدار مورد انتظار در سلول های BN متوقف شده در مرحله سیتوکینز باشد که احتمال دربرگیری مجدد قطعات پیشروی کروموزومی یا کل کروموزوم های برگشتی به هسته را افزایش می دهد اما این مسئله باعث کاهش اثر بخشی روش CBMN نمی شود.

بررسی امکان اجرای روش این ویتروی MN بدون Cyt-B به منظور کاهش اثر محدود کننده Cyt-B بسیار با وجود خطر بالقوه کسب نتایج منفی کاذب به علت کنترل نامناسب کینتیک تقسیم سلولی مورد توجه قرار گرفته است، به عبارت دیگر مهار تقسیم سلولی مانع از بیان میکرونوکلئوس ها می شود. درباره نتایج مثبت کاذب با روش CBMN در سلول های نرمال هیچ مدرکی وجود ندارد، اما شواهد کافی درباره اینکه اجرای روش MN بدون مهار

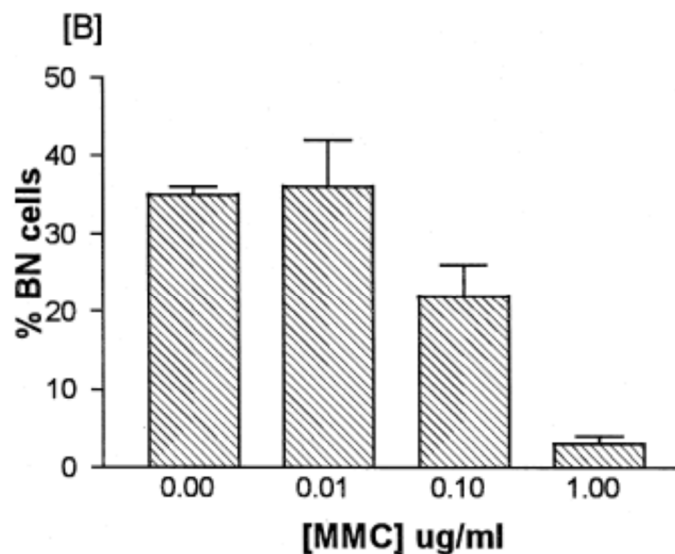
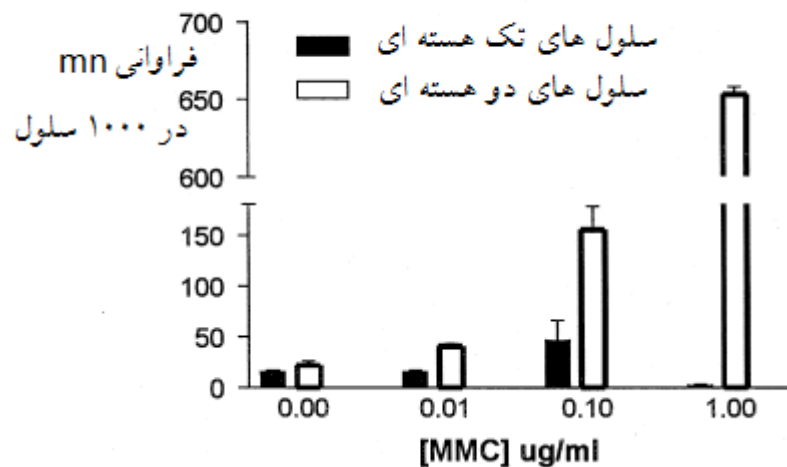
تقسیم سلولی، می تواند منجر به نتایج منفی کاذب یا کم اهمیت تحریک MN در کشت لنفوسیت های انسانی شود، وجود دارد و نمونه ای از این عیب روش MN ، بدون سیتوکالاسین B در شکل ۹ نشان داده شده است. با این وجود، مطالعات اخیر که روش میکرونوکلتوس با Cyt-B یا بدون آن را با هم مقایسه می کنند پیشنهاد می دهند که اگر لاین های سلولی با رشد مناسب استفاده و کشت شوند و شرایط تقسیم هسته مناسب باشد و زمانی که کلاستوزن های قوی آزمایش می شوند، نتایج مشابهی بین روش CBMN و روش MN بدون Cyt-B بدست می آید. مدل آماری بیان MN پیش بینی می کند (۱) که محاسبه MN در سلول های BN روش مطمئنی برای تعیین تعداد میکرونوکلتوس است (۲) محاسبه MN در سلول های تک هسته ای موجود در کشت های بدون مهار سیتوکینز، زمانی که تقسیم هسته ای با مواد شیمیایی تست شده مهار شده یا شرایط کشت باعث تکثیر بهینه سلول نشود، نتایج منفی کاذبی تولید می کنند. در نتیجه، تعداد میکرونوکلتوس حاصل از محاسبه میکرونوکلتوس های موجود در سلول های تک هسته ای در کشت های بدون Cyt-B ، نمی توانند به صورت قطعی در نظر گرفته شوند و نتایج منفی مربوط به این سیستم باید با استفاده از روش CBMN تایید شوند.

۲) روش های مولکولی برای ارزیابی از دست رفتن کروموزوم در میکرونوکلتی و کاستمان

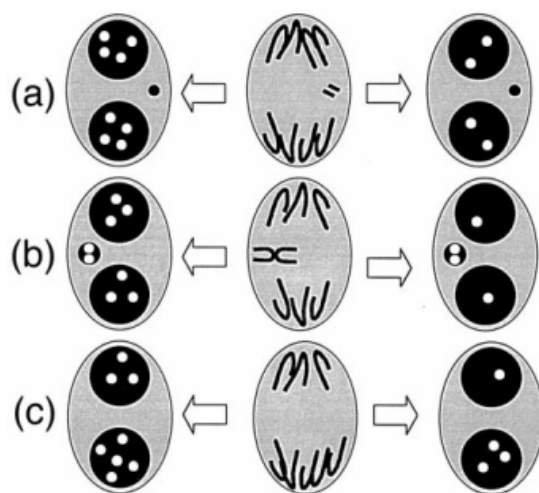
برای درک تمام قابلیت های روش CBMN تفکیک بین MNi مشتق شده از کل کروموزوم ها یا قطعات آسنتریک ضروری است. این مهم با استفاده از پروب هایی که مخصوص به DNA سانترومر یا آنتی بادی هایی که به پروتئین های کینتوکور که در نواحی سانترومری کروموزوم های فعال مشابه هستند، متصل می شوند ، بدست می آید. استفاده از اندازه MN به عنوان تفکیک کننده، برای سلول های انسانی یا سایر سلول هایی که در آن ها اندازه کروموزوم ناهمگون است توصیه نمی شود چرا که یک MN کوچک ممکن است دارای یک قطعه از کروموزوم بزرگ یا تمام کروموزوم کوچک باشد. ساده ترین و ارزان ترین تکنیک مورد استفاده روش آنتی بادی آنتی کینه توکور است اما این روش تفکیک بین کروموزوم های خاص را انجام نمی دهد و ممکن است از دست رفتن کروموزوم به علت عدم حضور کینه توکور بر روی سانترومرهای غیر فعال را شناسایی نکند. استفاده از هیبریداسیون در محل (ISH) برای شناسایی نواحی سانترومری گران تر و سخت تر است اما می تواند ویژگی های بیشتری را ارائه نماید به عنوان مثال

پروپ های سانترومری کروموزوم های منحصر به فرد نیز مورد استفاده قرار می گیرند که قادر به شناسایی رویدادهای کاستمان در سلول های دو هسته ای هستند (توزیع متفاوت کروموزوم های همولوگ در هسته های دختره). در این فصل تنها روش آنتی بادی کینه توکور توضیح داده می شود. برای جزئیات بیشتر درباره استفاده از شناسایی سانترومر با استفاده از ISH به مقالات فروغی و همکارانش، هاندو و همکاران، اهاجوجی و همکاران و شولر و همکاران مراجعه نمایید. انواع نتایج ممکن حاصل از تکنیک های مختلف در شکل ۱۰ نشان داده می شود.

[A] مقایسه ارزیابی رایج و سایتوکیناز بلاک



شکل ۹. (A) مقایسه پاسخ وابسته به دوز میکرونوکلئوس در لنفوست های انسانی G1/S/G2 قرار گرفته در معرض میتومايسين C (MMC) که در سلول های تک هسته در کشت های بدون Cyt-B (میله های سیاه پر رنگ) یا در سلول های دو هسته ای در کشت هایی دارای Cyt-B (میله های سفید) ارزیابی شده اند. (B) تعداد سلول های در حال تقسیم بررسی شده از طریق محاسبه درصد سلول های دو هسته ای در کشت های متوقف شده در مرحله سیتوکیناز. مشخص است که روش شمارش بدون Cyt-B میزان آسیب ژنتیکی ایجاد شده بوسیله MMC را کمتر تخمین می زند مخصوصا در دوز هایی که تقسیم هسته ای محدود می شود. داده ها SE میانگین سه کشت تکثیر شده را نشان می دهند.



شکل ۱۰. استفاده از تکنیک های مولکولی برای شناسایی (a) میکرونوکلئوس مشتق شده از قطعه کروموزومی آسنتریک (b) یک میکرونوکلئوس مشتق شده از کل کروموزوم پیشرو و (c) کاستمان کروموزوم آنیوپلوئیدی هسته دختری. نقاط سفید موجود در هسته و میکرونوکلئوی سلول های دو هسته ای در سمت چپ هر پنل نشاندهنده الگوی سانترومی یا کینه توکور رنگ آمیزی در زمان استفاده از پروب های پان سانترومی یا کینه توکور هستند. نقاط سفید هسته و میکرونوکلئوی سلول های دو هسته در سمت راست هر پنل الگوی رنگ آمیزی سانترومر زمان استفاده از پروب های سانترومی مخصوص به سانترومر درگیر در تشکیل میکرونوکلئوس یا رویداد کاستمان را نشان میدهد. مثال نشان داده شده یک سلول فرضی با تنها دو جفت کروموزوم است.

۲,۱ شناسایی کینه توکور در MNi موجود در روش CBMN

۲,۱,۱ آماده سازی لام

در این روش سلول های BN مثل روش CBMN تجمع می یابند، با استفاده از سیتوسانتریفیوژ به لام منتقل و به مدت ۵ دقیقه در معرض هوا خشک می شوند سپس ده دقیقه در متانول تثبیت و مجددا در معرض هوا خشک می شوند. در این مرحله لام ها به سرعت آماده شده و یا حداکثر سه ماه در یک باکس محکم در نیتروژن اتمسفر در بالای نیتروژن مایع نگهداری می شوند. برای شناسایی کینه توکور لام های نگهداری شده، از نیتروژن اتمسفر حذف شده و در دمای اتاق داخل باکس محکم متعادل می شوند.

۲,۱,۲ شناسایی کینه توکور

سرم آنتی کینه توکور ممکن است به صورت تجاری یا از کلینیک ایمونولوژی که دارای نمونه سرم مربوط به بیماران دارای سخت شدن پوست ساب تایپ CREST هستند، تهیه می شود. استفاده از سرم های بعدی نیاز به تاییدیه اخلاق انسانی و رضایت بیماران دارد. سرم ها باید روی لام های پر از سلول های کشت شده مرحله متافاز با استفاده از یک آنتی بادی ثانویه خرگوش IgG ضد انسانی کانژوگه با FITC و آزمایش و با میکروسکوپ فلورسنس بررسی شوند. فقط سرم هایی که منحصرا با کینه توکور های روی کروموزوم های متافاز واکنش می دهند باید برای این روش انتخاب شوند.

استفاده از آنتی بادی ثانویه کانژوگه با FITC یک روش مستقیم برای مجسم کردن کینه توکور است اما نیاز به استفاده از میکروسکوپ الکترونی و آماده سازی لام غیر دائمی دارد، تکنیک فلورسنس در جای دیگری به طور دقیق توضیح داده شده است. یک روش جایگزین، استفاده از روش رنگ آمیزی ایمونوپراکسیداز است که باعث تهیه لام های همیشگی می شود، این لام ها برای غربال گری همیشگی کاربردی هستند و در پاراگراف بعدی به آن ها می پردازیم.

در روش ایمونوپراکسیداز، لام های فیکس شده یک شب در دمای ۲۰ درجه در یک اتاق مرطوب با آنتی بادی آنتی کینه توکور اولیه ۴۰/۱ رقیق شده در بافر تریس-سالین با PH7.6 انکوبه می شوند (۶ گرم باز تریس / سالین). لام های کنترل منفی در معرض سرم های رقیق شده یک فرد سالم قرار می گیرند. روز بعد لام ها با غوطه ور شدن در

همان بافر تریس سالین استفاده شده برای رقیق کردن آنتی بادی به مدت ۳۰ ثانیه شسته می شوند. سپس لام ها بدون خشک کردن آبکشی و ۳ ساعت با IgG ضد انسانی خرگوش لیبیل دار شده با پراکسیداز انکوبه می شوند. مجدداً برای واکنش هیستوشیمیایی پراکسیداز لام ها بدون خشک کردن آبکشی می شوند. روش هیستوشیمیایی که بهترین مقایسه را انجام می دهد واکنش استاندارد دی آمینوبنزیدین (DAB) است که رسوب های سیاهی تولید می نماید. مخلوط واکنش شامل این موارد است: ۱ میلی لیتر DAB (۱ میلی گرم در میلی لیتر در استوک بافر تریس بیس، ۵، ۶۰ g/l ، PH 7.6)، ۳ میلی لیتر استوک بافر تریس بیس با PH 7.6 (60.5 g/l)، ۲۵ میکرولیتر محلول NiCl₂ (محلول ۸٪ در استوک بافر تریس بیس که درست قبل از استفاده تهیه می شود)، ۴۰ میکرولیتر از ایمیدازول ۰،۱ مولار و ۱۰ میکرولیتر از محلول پراکسید هیدروژن ۳۰٪.

مخلوط واکنش قبل از استفاده تهیه شده و فوراً از طریق فیلتر ۰،۲ میکرومتری برای کاهش رسوبات غیر اختصاصی موجود، بر روی لام ها استفاده می شود.

لام ها باید در گروه هایی دارای یک لام با سرم کنترل منفی رنگ آمیزی شوند. واکنش به مدت یک دقیقه در دمای ۲۰ درجه ادامه پیدا می کند سپس با آبکشی لام ها و شستشو در آب متوقف می شود. لام ها سپس در معرض هوا خشک ، مجدداً با رنگ هسته ای نوترال رد (۰،۱٪ در آب مقطر) به مدت ۳۰ ثانیه رنگ آمیزی ، با آب شسته شده، در معرض هوا خشک و برای تهیه لام های همیشگی آماده می شوند.

۲،۱،۳ روش محاسبه

محاسبه وضعیت کینه توکور MNi محدود به سلول های دو هسته ای است که در آن حداقل ۲۰ کینه توکور در هر هسته مشاهده می شود. حداقل ۱۰۰ MNi باید مطابق با اینکه آن ها دارای کینه توکور هستند یا خیر طبقه بندی شوند و تعداد کینه توکور در هر MN باید نوشته شود. مقدار نهایی نسبت MNi با کینه توکور با این فرمول تعیین می شود:

$$[P_s - P_c]/[1 - P_c],$$

در این فرمول P_c نسبت MNi است که واکنش مثبت پراکسیداز در لام های در معرض سرم کنترل نرمال دارند و P_s نسبت MNi است که دارای واکنش مثبت پراکسیداز در لام های در معرض سرم آنتی کینه توکور هستند.

۳) جداول تیماری بررسی ژنوتوکسیک در شرایط این ویترو

به طور ایده آل هر ماده شیمیایی باید از نظر توان ژنوتوکسیک در مراحل مختلف سیکل سلولی بررسی شود. از آن جایی که لنفوسیت های خون محیطی انسان در فاز G_0 هستند زمان جمع آوری آن ها برای ارزیابی آسیب هایی موجود در این مرحله مطلوب می باشند. ولی انتظار می رود که سلول ها در طول فاز S ، فاز G_2 و فاز M به اثرات ژنوتوکسیک حساس تر باشند، و برای این هدف زمانی که سلول ها در حال تقسیم هستند باید آن ها را در معرض تغییرات قرار داد. از آن جایی که بیان MN برای تکمیل نیاز به یک تقسیم هسته ای دارد، یک دوره بین تیمار و زمان برداشت باید در نظر گرفته شود.

با لنفوسیت های خون محیطی انسان تیمار شده در G_0 تجمع سلول های دو هسته ای در کوتاهترین زمان و طولانی ترین زمان ممکن برای تضمین اینکه سلول های با تاخیر میتوتیک نیز بررسی شده اند ضروری است. مثلاً پروتکل استاندارد اضافه کردن $Cyt-B$ در ۴۴ ساعت و برداشت سلول ها در ۷۲ ساعت باید صورت گیرد. با این حال، اضافه کردن $Cyt-B$ در ۲۴ ساعت و برداشت سلول ها در ۹۶ ساعت نیز کاربردی است که تعداد سلول های کند در حال تقسیم را افزایش می دهد.

اگر تیمار سلول ها در فازهای S ، G_2 و M نیاز باشد قرار گرفتن در معرض مواد شیمیایی باید در طول فاز رشد لگاریتمی کشت بلافاصله بعد از $Cyt-B$ تجمع یافته در سلول های در حال تقسیم رخ بدهد و سلول ها بین ۶ تا ۲۴ ساعت بسته به مرحله سیکل سلولی مورد آزمایش جمع آوری می شوند. در زمان های برداشت بسیار زود هنگام، سلول های مرحله G_2 یا اواخر مرحله S مثل سلول های دو هسته ای تجمع می یابند در حالی که در آخرین زمان برداشت سلول های موجود در تمام مراحل سیکل سلولی، آن ها در مرحله دو هسته ای متوقف می شوند. بنابراین زمان برداشت مربوط به اضافه کردن $Cyt-B$ نوع سلول مورد نظر را نیز تحت تاثیر قرار می دهد.

برنامه مخصوص به استفاده از روش CBMN برای تست ژنوتوکسیک در شرایط این ویترو در جدول ۲ خلاصه شده است. استفاده از یک سیستم فعالساز متابولیک مثل ترکیب S9 زمان بررسی مواد شیمیایی جدید باید یک گزینه را در نظر بگیرد اما این موضوع دوره مواجهه را به علت سمیت سلولی S9 برای سلول های هدف ، محدود نمی کند. گزینه بهتر استفاده از سلول های سازگار از نظر متابولیکی مثل سلول های تغییر یافته ژنتیکی MCL-5 می باشد.

جدول ۲- پروتکل های مخصوص استفاده شده برای بررسی تحریک میکرونوکلئوس توسط مواد شیمیایی یا پرتوآبی

زمان کشت (h)	لنفوسیت های خون محیطی انسان			رده های سلولی در فاز لگاریتمی	
	ارزیابی CBMN G ₀ مواجهه	ارزیابی CBMN G ₁ /S مواجهه	ارزیابی CBMN G ₁ /S/G ₂ /M مواجهه	ارزیابی CBMN/ARA مواجهه G ₀	ارزیابی CBMN G ₁ /S/G ₂ /M مواجهه
-4	اضافه کردن ماده تست				اضافه کردن ماده تست
0	اضافه کردن PHA	اضافه کردن PHA	اضافه کردن PHA	(i) add PHA, (ii) add ARA	add Cyt-B
16				(i) ARA شستوشو, (ii) محیط تازه ، DC و IL-2 با	
20		اضافه کردن ماده تست			
24					سلول برداشت
44	add Cyt-B ^a	add Cyt-B ^a	اضافه کردن ماده تست	add Cyt-B ^a	سلول برداشت
48			add Cyt-B		
72	سلول برداشت	سلول برداشت	سلول برداشت	سلول برداشت	
96	سلول برداشت	سلول برداشت	سلول برداشت	سلول برداشت	

۴) پیشرفت های آتی

مشخص است که روش شمارش میکرونوکلئوس در شرایط این ویترو به یک روش قطعی برای تشخیص آسیب های ژنتیکی با کاربرد در اکوتوکسیکولوژی، تغذیه، تست حساسیت پرتویی جهت ارزیابی خطر ابتلا به سرطان و بهینه سازی رادیوتراپی، بیوپایش جمعیت های انسانی و از همه مهمتر بررسی مواد دارویی جدید و ماده های شیمیایی کشاورزی تبدیل شده است. شکی نیست که به یک سیستم خودکار درجه بندی برای بدست آوردن سریع تر و مطمئن تر داده ها که به طور ایده آل بر اساس درجه بندی لام ها بوده و برای درجه بندی دیداری تهیه شده باشد نیاز داریم ، این سیستم نتایج مطمئنی ارائه می کند که تحت تاثیر متغیرهای زمانی و درون فردی در محاسبات انسانی قرار نمی گیرند. برای دستیابی به این هدف باید معیارهای درجه بندی ایجاد و پروتکل دقیق آماده سازی لام درست استفاده شده و لام های تهیه شده دائمی باشند از این رو می توان به صورت چشمی در صورت نیاز مجددا آن ها را مورد بررسی قرار داد. معمولا سیستم آنالیز تصاویر برای محاسبه خودکار میکرونوکلئوی در سلول های

پستانداران ایجاد شده است اما این سیستم ها رویدادهای مهمی مثل نکروزیز، آپوپتوزیز و سیتوستاسیس که برای درک دقیق نتایج بدست آمده ضروری هستند را بررسی نمی کنند. در آینده باید سیستم خودکاری داشته باشیم که بتواند به طور مطمئن و دقیق نقاط پایینی مختلف مربوط به روش شمارش میکرونوکلئوس سلول های متوقف شده در مرحله سیتوکیناز که در این مقاله صحبت شد را محاسبه نماید.

در پایان، باید در باره جدیدترین پیشرفت ها در درک تشکیل میکرونوکلئوس و وقایعی که ممکن است بیان این نقاط پایانی را تغییر دهند آگاهی داشته باشیم. بعضی از مثال های قابل توجه این موارد هستند (a) تشکیل میکرونوکلئی در نتیجه تکثیر ژن که در آن سلول سرعت تکثیر DNA را مستقیماً از طریق هسته، در طول فاز S کاهش می دهد و به یک میکرونوکلئوس تولید شده توسط جوانه زنی هسته ای تبدیل می شود. (b) تیمار با مهار کننده دوک میتوتیک ممکن است باعث کاهش میتوتیک و تولید هسته پلی پلوئیدی و تک هسته ای شود بنابراین نشان می دهد که در کشت های متوقف کننده مرحله سیتوکیناز، نه تنها محاسبه MNi در سلول های دو هسته ای مفید است بلکه MNi در سلول های تک هسته ای نیز نیاز به محاسبه و بررسی دارند و (c) حذف احتمالی سلول های میکرونوکلئی دار و میکرونوکلئی با استفاده از آپوپتوزیز.

تمام نکات ذکر شده به این نکته اشاره می کنند که زمانی که تمام نقاط پایانی مورفولوژیکی سمیت سلولی، سیتوستاسیس و آسیب DNA وارد سیستم شوند، روش شمارش میکرونوکلئوس سلول های متوقف شده در مرحله سیتوکیناز در شرایط این ویترو موفق خواهد بود.

References

- [1] H.J. Evans, Molecular mechanisms in the induction of chromosome aberrations, in: D. Scott, B.A. Bridges, F.H. Sobels (Eds.), *Progress in Genetic Toxicology*, Elsevier North Holland Biomedical Press, 1977, pp. 57–74.
- [2] J.R.K. Savage, Update on target theory as applied to chromosomal aberrations, *Env. Mol. Mutagen.* 22 (1993) 198–207.
- [3] H.J. Evans, *Cytogenet.: Overview. Prog. Clin. Biol. Res.* 340B (1990) 301–323.
- [4] V.L. Dellarco, K.H. Mavoumin, R.R. Tice, Aneuploidy and health risk assessment: current status and future directions, *Environ. Mutagen.* 7 (1985) 405–424.
- [5] M. Guttenbach, M. Schmid, Exclusion of specific human chromosomes into micronuclei by 5-azacytidine treatment of lymphocyte cultures, *Exp. Cell Res.* 211 (1994) 127–132.
- [6] A.T. Natarajan, G. Obe, Mutagenicity testing with cultured mammalian cells: cytogenetic assays, in: J.A. Heddle (Ed.), *Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology*, Academic Press, New York, 1982, pp. 171–213.
- [7] W. Schmid, The micronucleus test, *Mutat. Res.* 31 (1975) 9–15.
- [8] J.A. Heddle, A rapid *in vivo* test for chromosome damage, *Mutat. Res.* 18 (1973) 187–192.
- [9] M. Fenech, A.A. Morley, Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios* 43 (1985) 233–246.
- [10] M. Fenech, A.A. Morley, Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutat. Res.* 147 (1985) 29–36.
- [11] M. Fenech, A.A. Morley, Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in vivo* ageing and low-dose x-irradiation, *Mutat. Res.* 161 (1986) 193–198.
- [12] S.B. Carter, Effects of cytochalasins on mammalian cells, *Nature* 213 (1967) 261–264.
- [13] S. Masunaga, K. Ono, M. Abe, A method for the selective measurement of the radiosensitivity of quiescent cells in solid tumours-combination of immunofluorescence staining to BrdU and micronucleus assay, *Radiat. Res.* 125 (1991) 243–247.
- [14] Y. Odagiri, K. Takemoto, M. Fenech, Micronucleus induction in cytokinesis-blocked mouse bone-marrow cells *in vitro* following *in vivo* exposure to X-irradiation and cyclophosphamide, *Env. Mol. Mutagen.* 24 (1994) 61–67.
- [15] F. Degraffi, C. Tanzarella, Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei: a new assay for the detection of aneuploidy, *Mutat. Res.* 203 (1988) 339–345.
- [16] E.J. Thompson, P. Perry, The identification of micronucleated chromosomes: a possible assay for aneuploidy, *Mutagenesis* 3 (1988) 415–418.
- [17] Z. Farooqi, F. Darroudi, A.T. Natarajan, Use of fluorescence *in situ* hybridisation for the detection of aneuploidy in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, *Mutagenesis* 8 (1993) 329–334.
- [18] J.C. Hando, J. Nath, J.D. Tucker, Sex chromosomes, micronuclei and aging in women, *Chromosoma* 103 (1994) 186–192.
- [19] E.M. Parry, L. Henderson, J.M. Mackay, Guidelines for testing of chemicals. Procedures for the detection of chemically induced aneuploidy: recommendations of a UK Environmental Mutagen Society working group, *Mutagenesis* 10 (1) (1995) 1–14.
- [20] A. Elhajouji, P. Van Hummellen, M. Kirsch-Volders, Indications for a threshold of chemically induced aneuploidy *in vitro* in human lymphocytes, *Environ. Mol. Mutagen.* 26 (1995) 292–304.
- [21] M. Fenech, S. Neville, Conversion of excision-repairable DNA lesions to micronuclei within one cell cycle in human lymphocytes, *Env. Mol. Mutagen.* 19 (1) (1992) 27–36.
- [22] A. Zijno, F. Marcon, P. Leopardi, R. Crebelli, Simultaneous detection of X-chromosome loss and non-disjunction in cytokinesis-blocked human lymphocytes by *in situ* hybridisation with a centromeric DNA probe; implications for the human lymphocyte *in vitro* micronucleus assay using cytochalasin-B, *Mutagenesis* 9 (3) (1994) 225–232.
- [23] A. Elhajouji, F. Tibaldi, M. Kirsch-Volders, Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors *in vitro* in human lymphocytes, *Mutagenesis* 12 (1997) 133–140.
- [24] M. Schuler, D.S. Rupa, D.A. Eastmond, A critical evaluation of centromeric labelling to distinguish micronuclei induced by chromosomal loss and breakage *in vitro*, *Mutat. Res.* 392 (1997) 81–95.
- [25] M. Kirsch-Volders, A. Elhajouji, E. Cundari, P. Van Hummellen, The *in vitro* micronucleus test: a multi-end-point assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction, *Mutat. Res.* 392 (1997) 19–30.
- [26] M. Fenech, J. Crott, J. Turner, S. Brown, Necrosis, apoptosis, cytoskeleton and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide, *Mutagenesis* 14 (6) (1999) 605–612.
- [27] M. Kirsch-Volders (Ed.), The CB *in vitro* Micronucleus Assay in Human Lymphocytes, Special Issue, *Mutat. Res.* 392 (1997), Special Issue (1,2).
- [28] M. Kirsch-Volders, T. Sofuni, M. Aardema, S. Albertinin, D. Eastmond, M. Fenech, M. Ishidate, E. Lorge, H. Norppa, J. Surrales, W. von der Hude, A. Wakata, Report from the *in vitro* micronucleus assay working group, Washington International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (25–26 March 1999) 2000.
- [29] R. Atencia, M. Garciasanz, G. Perezyarza, A. Asumendi, E. Hilario, J. Arechaga, A structural analysis of cytoskeletal components during the execution phase of apoptosis, *Protoplasma* 198 (1997) 163–169.
- [30] D.A. Eastmond, J.D. Tucker, Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Env. Mol. Mutagen.* 13 (1) (1989) 34–43.
- [31] M. Fenech, J. Rinaldi, J. Surrales, The origin of micronuclei induced by cytosine arabinoside and its synergistic interaction with hydroxyurea in human lymphocytes, *Mutagenesis* 9 (3) (1994) 273–277.
- [32] J. Surrales, N. Xamena, A. Creus, R. Marcos, The suitability of the micronucleus assay in human lymphocytes as a new biomarker of excision repair, *Mutat. Res.* 341 (1–2) (1995) 43–59.
- [33] J. Surrales, E. Carbonell, R. Marcos, F. Degraffi, A. Antocchia, C. Tanzarella, A collaborative study on the improvement of the micronucleus test in cultured human lymphocytes, *Mutagenesis* 7 (6) (1992) 407–410.

- [34] M.F. Fenech, V. Dunaiski, Y. Osborne, A.A. Morley, The cytokinesis-block micronucleus assay as a biological dosimeter in spleen and peripheral blood lymphocytes in the mouse following acute whole body irradiation, *Mutat. Res.* 263 (1991) 119–126.
- [35] J.A. Heddle, A. Bouch, M.A. Khan, J.D. Gingerich, Concurrent detection of gene mutations and chromosomal aberrations induced in vivo in somatic cells, *Mutagenesis* 5 (2) (1990) 179–184.
- [36] S. He, R.S.U. Baker, Initiating carcinogen, triethylenemelamine, induces micronuclei in skin target cells, *Environ. Mol. Mutagen.* 14 (1) (1989) 1–5.
- [37] A. Wakata, M.S. Sasaki, Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in cultured Chinese hamster cells: comparison with types and rates of chromosome aberrations, *Mutat. Res.* 190 (1987) 51–57.
- [38] J.S. Prosser, J.E. Moquet, D.C. Lloyd, A.A. Edwards, Radiation induction of micronuclei in human lymphocytes, *Mutat. Res.* 199 (1988) 37–45.
- [39] C. Lindholm, H. Norrpa, M. Hayashi, M. Sorsa, Induction of micronuclei and anaphase aberrations by cytochalasin-B in human lymphocyte cultures, *Mutat. Res.* 260 (1991) 369–375.
- [40] S. Minissi, B. Gustavino, F. Degrassi, C. Tanzarella, M. Rizzoni, Effect of cytochalasin-B on the induction of chromosome missegregation by colchicine at low concentrations in human lymphocytes, *Mutagenesis* 14 (1999) 43–49.
- [41] M. Fenech, The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method, *Mutat. Res.* 392 (1997) 11–18.
- [42] S. Kalweit, D. Utesch, W. von der Hude, S. Madle, Chemically induced micronucleus formation in V79 cells — comparison of three different test procedures, *Mutat. Res.* 439 (2) (1999) 183–190.
- [43] T. Matsushima, M. Hayashi, A. Matsuoka, M. Ishidate Jr., K.F. Miura, H. Shimizu, Y. Suzuki, K. Morimoto, H. Ogura, K. Mure, K. Koshi, T. Sofuni, Validation study of the in vitro micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/TU), *Mutagenesis* 14 (6) (1999) 569–580.
- [44] M. Fenech, Mathematical model of the in vitro micronucleus assay predicts false negative results if micronuclei are not scored specifically in binucleated cells or cells that have completed one nuclear division, *Mutagenesis* 15 (4) (2000) (in press).
- [45] B.K. Vig, S.E. Sweargin, Sequence of centromere separation: kinetochore formation in induced laggards and micronuclei, *Mutagenesis* 1 (1986) 464–465.
- [46] W.C. Earnshaw, B.R. Migeon, Three related centromere proteins are absent from the inactive centromere of a stable dicentric chromosome, *Chromosoma* 92 (1985) 290–296.
- [47] A. Elhajouji, M. Cunha, M. Kirsch-Volders, Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay, *Mutagenesis* 13 (2) (1998) 193–198.
- [48] Y. Moroi, A.L. Hartman, P.K. Nakane, E.M. Tan, Distribution of kinetochore antigen in mammalian cell nuclei, *J. Cell Biol.* 90 (1981) 254–259.
- [49] M. Fenech, A.A. Morley, Kinetochore detection in micronuclei: an alternative method for measuring chromosome loss, *Mutagenesis* 4 (2) (1989) 98–104.
- [50] W. Straus, Imidazole increases the sensitivity of the cytochemical reaction for peroxidase with diaminobenzidine at neutral pH, *J. Histochem. Cytochem.* 30 (1982) 491–493.
- [51] I. Scopsi, L.I. Larsson, Increased sensitivity in peroxidase immunochemistry. A comparative study of a number of peroxidase visualisation methods employing a model system, *Histochemistry* 84 (1986) 221–230.
- [52] N.H. White, F. de Matteis, A. Davies, L.L. Smith, C. Crofton-Sleigh, S. Venitt, A. Hewer, D.H. Phillips, Genotoxic potential of tamoxifen and analogues in female Fischer F344/n rats, DBA/2 and C57BL/6 mice and in human MCL-5 cells, *Carcinogenesis* 13 (12) (1992) 2197–2203.
- [53] J.M. Gauthier, H. Dubeau, E. Rassart, W.M. Jarman, R.S. Wells, Biomarkers of DNA damage in marine mammals, *Mutat. Res.* 444 (2) (1999) 427–439.
- [54] M. Fenech, J. Rinaldi, A comparison of lymphocyte micronuclei and plasma micronutrients in vegetarians and non-vegetarians, *Carcinogenesis* 16 (2) (1995) 223–230.
- [55] D. Scott, J.P.B. Barber, E.L. Levine, W. Burrill, S.A. Roberts, Radiation-induced micronucleus induction in lymphocytes identifies a high frequency of radiosensitive cases among breast cancer patients: a test for predisposition? *Br. J. Cancer* 77 (4) (1998) 614–620.
- [56] Y. Shibamoto, C. Streffer, C. Fuhrmann, V. Budach, Tumour radiosensitivity prediction by the cytokinesis-block micronucleus assay, *Radiat. Res.* 128 (1991) 293–300.
- [57] M. Fenech, N. Holland, W.P. Chang, E. Zeiger, S. Bonassi, The HUMAN MICRONUCLEUS PROJECT — an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans, *Mutat. Res.* 428 (1999) 271–283.
- [58] A.N. Bates, M.T. van Welie, J.S. Ploem, The present state of the automated micronucleus test for lymphocytes, *Int. J. Radiat. Biol.* 58 (1990) 813–825.
- [59] P. Castelain, P. Van Hummelen, A. Deleneer, M. Kirsch-Volders, Automated detection of cytochalasin-B blocked binucleated lymphocytes for scoring micronuclei, *Mutagenesis* 8 (4) (1993) 285–293.
- [60] W. Bocker, W.U. Muller, C. Streffer, Image processing algorithms for the automated micronucleus assay in binucleated human lymphocytes, *Cytometry* 19 (4) (1995) 283–294.
- [61] W. Friccauff, F. Potterlocher, A. Cordier, W. Suter, Automatic analysis of the in vitro micronucleus test on V79 cells, *Mutat. Res.* 413 (1) (1998) 57–68.
- [62] F. Verhaegen, A. Vral, J. Seuntjens, N.W. Schipper, L. de Ridder, H. Thierens, Scoring of radiation-induced micronuclei in cytokinesis-blocked human lymphocytes by automated image analysis, *Cytometry* 17 (1994) 119–127.
- [63] N. Shimizu, N. Itoh, H. Utiyama, G.M. Wahl, Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase, *J. Cell Biol.* 140 (1998) 1307–1320.
- [64] C. Unger, S. Kress, A. Buchmann, M. Schwarz, Gamma-irradiation-induced micronuclei from mouse hepatoma cells accumulate high levels of the tumour suppressor protein p53, *Cancer Res.* 54 (14) (1994) 3651–3655.
- [65] A.A. Sablina, G.V. Ilyinskaya, S.N. Rubtsova, L.S. Agapova, P.M. Chumakov, B.P. Kopnin, Activation of p53-mediated cell cycle checkpoint in response to micronuclei formation, *J. Cell Sci.* 111 (1998) 977–984.