مقاله تحقیقی

مهار اتصال بنزوآلفاپیرین به DNA با فراکسیونهای سیتوزولی کبد و پوست موش صحرایی در *in vitro*

مصطفی محمدی .M.Sc*، عبدالامیر علامه .Ph.D**، محمدحسین اسدی .Ph.D***، محمدرضا خواجه .Ph.D****

* گروه بیوشیمی و میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان

** گروه بیوشیمی بالینی دانشگاه تربیت مدرس

*** گروه علوم تشریح دانشگاه علوم‌پزشکی بقیةا... (عج)

**** گروه زیست‌شناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان

تاریخ وصول: مرداد ماه ۸۲، تاریخ پذیرش: آبان ماه ۸۲

چکیده

هدف: بنزوآلفاپیرین فراوانترین ماده سرطان‌زای شیمیایی ژنوتوکسیک موجود در محیط با ساختمان هیدروکربنی آروماتیک چند حلقه‌ای است که از سوختن سوختهای فسیلی یا از پروسه حرارتی مواد اولیه پتروشیمیایی یا زغال سنگ و چوب به وجود می‌آید. اتصال متابولیتهایی از آن به DNA خصوصاً در ژنهای سرطان‌زای اولیهٔ مهارکننده تومور و مرگ سلولی انتخابی و جهش در این ژنها در نهایت می‌تواند منجر به سرطان شود.

مواد و روشها: در این تحقیق فعال شدن بنزوآلفاپیرین به‌وسیله میکروزومها، میزان اتصال بنزوآلفاپیرین به DNA تیموس گاوی با عملکرد فعال کنندگی میکروزوم‌های پوست و کبد موشهای صحرایی ماده شیرخوار و بالغ و نیز مهار اتصال آن به DNA توسط مهار رقابتی حاصل از عملکرد گلوتاتیون فعال شده توسط گلوتاتیون S ترانسفراز سیتوزولی و ارزیابی مقایسه‌ای سیستم‌های انکوباسیون فعال کنندگی و مهارکنندگی با توجه خاص به ارائه راه‌کارهای احتمالی درمانی مورد سنجش قرار گرفته است.

یافته‌ها: نتایج نشان می‌دهند که میکرووزوم‌ها باعث فعال شدگی بنزوآلفاپیرین می‌شوند و این به گونه‌ای است که میکروزوم‌های کبد در هر دو گروه سنی باعث متابولیزه شدن و اتصال بیشتر بنزوآلفاپیرین به DNA نسبت به میکروزوم‌های پوست می‌شوند. مقادیر اتصال در کبد بالغ نسبت به پوست حیوان بالغ ۳/۷ به ۱ می‌باشد. مقادیر اتصال در سیستم‌های اینکوباسیون حاوی میکروزوم‌های کبد شیرخوار نسبت به پوست شیرخوار ۱/۷ باربر است. مقادیر سیتوکروم P-۴۵۰ کبد بالغ ۲/۹ برابر کبد شیرخوار است. در مهار کردن اتصال توسط سیتوزول میزان مهار اتصال سیتوزول کبد بالغ ۳/۶، پوست بالغ ۲/۳، سیتوزول کبد شیرخوار ۱/۸ و سیتوزول پوست شیرخوار است.

نتیجه گیری: با توجه به سیستم‌های *in vitro* طراحی شده در این مقاله نشان داده شده است که با مهار فعال‌سازی، غیرفعال‌سازی نیز که پدیده‌ای غیرفعال است، به‌طور غیرمستقیم مهار می‌شود و این نکته بایستی در ساخت داروهای ضدسرطان از طریق مهار فعال‌سازی بیشتر مدنظر قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: بنزوآلفاپرین، DNA، گلوتاتیون، موش صحرایی

مقدمه

بنزوآلفاپیرین [۱] یکی از شناخته شده‌ترین و فراوان‌ترین هیدروکربنهای آروماتیک چند حلقه‌ای سرطان زای ژنوتوکسیک موجود در محیط است [۱و۲]. این ماده در ایجاد سرطانهای ریه، پوست، کبد و سایر بافتها در انسان و دیگر جانوران نقش دارد [۳و۴]. قرار گرفتن در معرض چنین عواملی می‌تواند به‌دلیل حرفه اشخاص (مثل کارکردن در معادن زغال سنگ، پالایشگاه‌های نفت، مراکز تصفیه روغن و پارافین و امثال آن)، رژیم غذایی (با استفاده از غذاهای دودی) و شیوه

آدرس مکاتبه: فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه بیوشیمی
صندوق پستی ۱۵۵-۸۴۵۱۵ Email:Mohammadi-mpss@yahoo.com

زندگی (مثل استعمال دخانیات یا استفاده از مواد پلاستیکی یا لاستیکی) و استفاده از سوخت‌های فسیلی [۱،۵و۶] باشد.

مطالعات اپیدمیولوژی نقش مؤثر عوامل شیمیایی خارجی و بعضی از عوامل درونی در ایجاد سرطان را معین نموده است. بنزوآلفاپیرین نیز بعد از ورود به سلول و اتصال به DNA موجب جهش می‌شود. چنانچه این جهش‌ها در ژن‌های مهار کننده تومور یا ژنهای سرطان‌زا و سرطان‌زای اولیه یا ژنهای مؤثر در مرگ سلولی انتخابی واقع شوند، در سرطان‌زایی بنزوآلفاپیرین نقش اساسی بر عهده خواهند داشت [۱و۷]. بنزوآلفاپیرین تقریباً در تمام بافتها قابلیت ایجاد سرطان را دارد. این سرطان زای شیمیایی همانند اکثر سرطان‌زاهای شیمیایی ابتدا طی فعال‌سازی متابولیک در مرحله I متابولیسم فعال می‌شود. بخری از آنزیم‌های مهم در این مرحله عبارتند از منواکسیژنازها، سیتوکروم‌های P-۴۵۰ اپوکسیدهیدرولازها و NADPH سیتوکروم P-۴۵۰ ردوکتاز بنزوآلفاپیرین که یک سرطان‌زای اولیه است، طی مرحله I متابولیسم مواد شیمیایی به متابولیت‌های حد واسط از جمله اپوکسیدها، دی‌هیدرودیولها، کینونها. فنولها و تترالها تبدیل می‌شود. تعدادی از این متابولیتها به‌وسیله اسید گلوکورونیک، گلوتاتیون و سولفات به کونژوگه‌های محلول در آب تبدیل می‌شود و تعدادی نیز سرطان‌زاهای نهایی ایجاد می‌کنند [۷،۸،۹و۱۰].

سرطان‌زاهای نهایی متابولیتهای فعال ماده سرطان‌زای اولیه هستند که با ایجاد اتصالات کووالانت با DNA موجب آغاز سرطان‌زایی می‌شوند. تعدادی از متابولیت‌های بنزوآلفاپیرین دارای گروههای عامل مثل کربوکسیل، هیدروکسیل، آمین و هالوژن‌ها یا دارای گروههای عامل فعال مثل اپوکسید با ترکیبات‌درون سلولی مثل اسید گلوکورونیک، گلوتاتیون یا سولفات به کونژوگه‌ها محلول در آب تبدیل می‌شوند. گلوتاتیون کونژوگاسیون یکی از مهمترین واکنش‌های کونژوگاسیون حاصل از گلوتایتون ترانسفراز سیتوزولی است. در این واکنش بسیاری از رادیکال‌های آزاد و حد واسطهای فعال بنزوآلفاپیرین همچون بنزوآلفاپیرین ۷و۸- دیول، بنزوآلفاپیرین ۷و۸- دیول ۹و۱۰- اکسید، بنزوآلفاپیرین -۴و۵- اکسید. ۹- هیدروکسی بنزوآلفاپیرین و اپوکسیدهای بنزوآلفاپیرین درگیر در سم‌زدایی می‌شوند [۱۰و۱۱]. مهمترین آثار زیستی بنزوآلفاپیرین شامل جهش‌زدایی، سرطان‌زایی و سرکوب سیستم ایمنی هستند [۱۲و۱۳]. شدت این تأثیرات به عوامل گوناگونی از جمله جنسیت، عوامل ژنتیکی، نوع متابولیت، حیوان، رژیم غذایی. دوز مصرفی، سن، بافت هدف و غیره بستگی دارد [۱،۱۴و۱۵].

در این مطالعه در جنسیت ماده از یک نوع حیوان (موش صحرایی)، آثار فعال‌سازی میکروزومی و سم‌زدایی سیتوزول، در دو گروه سنی و دو نوع بافت هدف بررسی شده است تا نسبت‌های فعالیت میکروزومی در ایجاد اتصال بنزوآلفاپیرین به DNQ و فعالیت سیتوزولی در سم زدایی با کونژوگاسیون گلوتاتیونی در دو بافت و در دو گروه سنی ارزیابی شود.

مواد و روشها

بنزوآلفاپیرین نشاندار [3H] B(α)P از شرکت Amerdham International خریداری شد. بنزوآلفاپیرین غیرنشاندار، DNA تیموس گوساله، آلبومین سرم گاوی (BSA)، نفتالین، نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید فسفات احیا (NADPH)، دی‌متیل سولفوکساید (DMSO)، تولوئین، هیدروکسید سدیم، اسید استیک گلاسیال، فنل، کلروفرم، ایزوآمین الکل، تریس HCO، اتیلن دی‌آمین تتراستیک اسید (EDTA)، تری‌کلرواستیک اسید (TCA)، اتانول، اسید سولفوریک، دی‌اتیل اتر از شرکت سیگما Sigma تهیه شد.

دی‌تیوتریتول. کلرید منیزیوم، اتیلن گلیکول تتراستیک اسید (EGTA)، کلرید سدیم، دی‌فنیل آمین، بتامرکاپتواتانول، کوماسی برلیانت‌بلو G-250، اسیدفسفریک، فسفات پتاسیم، سدیم - دی‌تیونات، گلوتاتیون، اتیل استات، ساکارز، کلرید پتاسیم از شرکت آلمانی Merck تهیه شد.

در کلیه آزمایشها از موشهای صحرایی سفید (Rat) نژاد ویستار (Wistar) استفاده شد. حیوانات ماده شیرخوار (سن ۳±۹ روز، وزن ۴±۲۰ گرم) و بالغ (سن ۴±۵۳ روز و وزن ۱۶±۲۰۰ گرم) از حیوانخانه دانشگاه تربیت مدرس تهی شد. محیط حیوانخانه از نظر دما و نورکنترل شده و معمولاً دما بین ۲۴-۲۰ درجه سانتی‌گراد در نوسان بود. غذای مصرفی

حیوانات از کارخانجات فرآورده‌های غذایی تهران شد که به‌صورت Pellet و با فرمول استاندارد در اختیار حیوانات قرار گرفت.

موشهای صحرایی مورد آزمایش در یک روز سربریده شده و از کبد و پوست آنها به روش ذکر شده، میکروزوم و سیتوزول تهیه شد.

تهیه میکروزوم از پوست و کبد

برای تهیه میکروزوم از روش Falgeret و همکاران [۱۶] استفاده شد. در این روش ناحیه پوست پشت موشهای بالغ بیهوش شده توسط دی‌اتیل‌اتر، با ماشین ریش‌تراشی برقی و تیغ، کاملاً فاقد موشده، پوست جدا شده و از ناحیه زیرین روی فایل آلومینیومی سرد قرار داده شد. چربی آن با روش خراش دادن از پوست جداگردید. پوست در این حالت توزین شده و در بافر قرار داده شده، سپس سرحیوان با قیچی جراحی جدا و کبد از بدن حیوان خارج گردید. بافت پیوندی روی فایل آلومینیوم سرد شده از کبد جدا گردید. کبد توزین شده و در بافر قرار داده شد. بافر مورد استفاده بافرفسفات ۱۰۰ میلی‌مولار سرد حاوی ۰/۲۵ مولار ساکارز، ۱/۴ میلی‌مولار بتامرکاپتوانانول با pH=۷/۴ نور بافتها در بافر شستشو داده شده و برای تهیه هموژناز ۳۰ درصد در بافر تریس HCl ۲۰ میلی‌مولار حاوی ۰/۵ مولار ساکارز، ۰/۵ میلی‌مولار EDTA، ۰/۱ میلی‌مولار EGTA و ۰/۵ میلی‌مولار دی‌تیرتریتول سرد ۴ درجه سانتی‌گراد با pH=۷/۵ با قیچی جراحی ابتدا خرد و سپس توسط هموژنایزر برقی Polytron هموژنیزه شد.

سپس مخلوط هموژن پوست و کبد در ۱۰/۰۰۰g به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی جداسازی شده و در ۱۰۰/۰۰۰g توسط اولتراسانتریفوژ به‌مدت ۶۰ دقیقه برای جدا شدن بخش میکروزومی سانتریفوژ گردید. بخش میکروزومی به‌صورت رسوب Pellet در ته لوله قرار می‌گیرد و محلول رویی سیتوزول است. سیتوزول داخل ویالهای ۱-۰/۵ میلی‌لیتر استریل قرار داده شد. رسوب میکروزومی دو مرتبه با محلول فیزیولوژیک کلرید پتاسیم ۱/۱۵٪ شسته و رسوب میکروزومی توسط بافرتریس HCl با pH=۷/۵ که دارای ۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم رقیق کرده و با هموژنایزر دستی به‌صورت همگن در آورده شد. مخلوط به‌دست آمده به ویالهای ۰/۵ میلی‌لیتر انتقال یافته و نمونه‌ها (میکروزومها و سیتوزولها) برای آزمایش‌های بعدی در فریزر ۷۰- تا ۷۴°- سانتی‌گراد قرار گرفت. میزان پروتئین نمونه‌ها با استفاده از روش برادفورد و استاندارد آلبومین گاوی تعیین شد [۱].

اندازه‌گیری توتال پروتئین به روش برادفورد

اساس این روش ایجاد پیوند کووالانس برلیانت‌بلو G-250 با پروتئین و تغیر مقدار جذب از ۴۶۵ نانومتر به ۵۹۵ نانومتر است. در این روش از استاندارد پروتئینی سرم آلبومین گاوی (BAS) برای تعیین مقدار پروتئین مجهول استفاده می‌شود [۱۷].

سیستم ایزنکوباسیون برای بررسی اتصال بنزوآلفاپیرین به DNA

این سیستم براساس روش Colovari و همکاران در سال ۱۹۹۳ [۱و۱۸] است. در این سیستم ابتدا مخلوطی دارای ۱ میلی‌گرم NADPH، ۸۰ نانومول B(α)P G[3H] در ۱/۵ میلی‌لیتر بافرفسفات پتاسیم با pH=۷/۴ و غلظت ۰/۱ مولار تهیه کرده و آن محلولی حاوی ۰/۵ میلی‌گرم DNA تیموس گوساله حل شده در ۰/۵ میلی‌لیتر محلول تریس - HCl (TE) افزوده شد. برای شروع فعال‌سازی واکنش برای تشکیل B(α) P-DNA adduct، ۱ میلی‌گرم پروتئین میکروزوم به مخلوط فوق افزوده و به‌مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و تکان داده شد. با افزودن محلول فنل:کلروفرم: ایزوآمیل الکل به نسبت حجمی به ترتیب ۲۵:۲۴:۱ به مخلوط واکنش متوقف شده و DNA از مخلوط جدا شد [۱۹و۲۰].

برای اینکه هیدروکربن‌هایی که به‌طور کووالانت به DNA اتصال نیافته‌اند، از آن جدا شوند. هر نمونه DNA را دوباره در ۱ میلی‌لیتر بافر TE حل کرده با اتانول مطلق سرد به نسبت ۱ حجم DNA و ۲ حجم اتانول سرد رسوب داده و ۳ مرتبه با ۲ میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪ سرد شستشو داده شد. در نهایت DNA در محلول TE حل شده و غلظت آن با استفاده از اسپکتروفتومر

U.V. مدل U.V 3100 shimadzu ژاپن تعیین شد. رادیواکتیویته نمونه‌ها با استفاده از دستگاه بتاکانتر مدل Raok Beta LKB-1219 اندازه گرفته شد [۱].

سیستم اینکوباسیون برای بررسی اثر گلوتاتیون ترانسفراز سیتوزولی بر مهار اتصال B(α)P با DNA

در طراحی این سیستم ۱ میلی‌گرم NADPH، ۸۰ نانومول B(a)P G[3H] در ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم با pH=۷/۴ و غلظت ۰/۱ مولار، ۰/۵ میلی‌گرم DNA تیموس گوساله حل شده در ۰/۵ میلی‌لیتر محلول تریس اسید کلریدریک (TE)، ۱ میلی‌گرم پروتئین سیتوزولی (حاوی گلوتاتیون ترانسفراز)، ۵ میلی‌مولار گلوتاتیون و در نهایت یک میلی‌گرم پروتئین میکروزومی است که به‌مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و تکان داده شد [۱۰و۲۱]. DNA به روش فنل از مخلوط جدا شده [۲۲و۲۳] و برای خارج کردن هیدروکربن‌هایی که به‌طور کووالانت به DNA اتصال نیافته‌اند و نیز تعیین غلظت و رادیواکتیویته آن به روشهای ذکر شده علم شد.

سیستم‌های انکوباسیون همزمان برای بررسی اثر متقابل میکروزومی و سیتوزولی (گلوتاتیون ترانسفراز) براساس جدول ۱ است.

جدول ۱. سیستم‌های انکوباسیون همزمان برای بررسی اثر متقابل میکروزومی و سیتوزومی (گلوتاتیون ترانسفراز)

سیستم مهارکنندگی متقابل (سیتوزولی)	سیتسم فعال‌کنندگی (میکروزومی)
میکروزوم کبد بالغ	سیتوزول کبد بالغ سیتوزول کبد شیرخوار سیتوزول پوست شیرخوار سیتوزول پوست بالغ
میکروزوم پوست بالغ	سیتوزول کبد بالغ سیتوزول کبد شیرخوار سیتوزول پوست شیرخوار سیتوزول پوست بالغ
میکروزوم کبد شیرخوار	سیتوزول کبد بالغ سیتوزول کبد شیرخوار سیتوزول پوست شیرخوار سیتوزول پوست بالغ
میکروزوم پوست شیرخوار	سیتوزول کبد بالغ سیتوزول کبد شیرخوار سیتوزول پوست شیرخوار سیتوزول پوست بالغ

استخراج DNA تغییر یافته از سیستم انکوباسیون

بعد از انکوباسیون لوله‌ها به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. ابتدا به هر لوله مقدار ۰/۵ میلی‌گرم DNA تیموس گوساله اضافه شد تا DNA قبلی به سهولت استخراج شود. سپس به هر کدام از لوله‌ها ۲ میلی‌لیتر مخلوط استخراج (فنل: کلروفرم: آیزوآمین الکل) با نسبت حجمی ۲۵:۲۴:۱ اضافه گردید. با تکان دادن لوله‌ها دو فاز آلی و آبی تشکیل می‌شود که DNA در فاز آبی قرار می‌گیرد. برای جداسازی DNA خالص، مخلوط به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۹۰۰۰g سانتریفوژ شد [۱و۲۲].

فاز آبی حاوی DNA را با پیپت پاستور به‌دقت خارج و به لوله‌های دیگر منتقل شد. برای رسوب DNA، بله لوله‌های آزمایش معادل یک حجم اتانول سرد اضافه شد. DNA در ته لوله به‌شکل فیبرهایی رسوب می‌کند. برای رسوب بیشتر نمونه‌ها را به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای صفر درجه و ۹۰۰۰g سانتریفوژ کرده که رسوب DNA در ته لوله تشکیل گردید. مایع رویی را به آرامی خارج کرده، رسول DNA را دوبار و هر بار با ۲ میلی‌لیتر اتانول سرد شستشو داده و سپس اتانول را خارج نموده و لوله‌ها را مدتی در دمای اتاق قرار داده تا اتانول آن تبخیر شود. DNA حاصل را در بافر TE حل کرده و به کمک هموژنایزر دستی glass-glass dance homogeniser به آرامی حل شد. قسمتی از این مخلوط هموژن برای اندازه‌گیری رادیواکتیویته و بخشی برای تعیین میزان DNA مصرف شد [۱،۴و۱۸].

تعیین میزان بازیافت DNA

به ۰/۳ میلی‌لیتر محلول DNA در TE، ۰/۳ میلی‌لیتر

TCA ۱۰ درصد اضافه کرده (۱:۱) و با TCA ۵ درصد به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده شد. مخلوط لوله‌ها را کاملاً به هم زده و سپس لوله‌ها را در دمای ۹۰ درجه به‌مدت ۲۰ دقیقه قرار داده، به هر لوله ۲ میلی‌لیتر معرف دی‌فنیل آمین اضافه کرده و لوله‌ها خوب تکان داده شد. سپس لوله‌ها به‌مدت یک شب در تاریکی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و جذب نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر در مقابل شاهد TCA در ۶۰۰ نانومتر قرائت شد. محلول DNA تیموس گوساله به‌عنوان استاندارد استفاده شد [۲۲و۲۴].

اندازه‌گیری میزان رادیواکتیویته در نمونه‌ها

برای اندازه‌گیری میزان رادیواکتیویتی در نمونه‌های مختلف، مقدار ۰/۳ میلی‌لیتر از DNA تغییر یافته توسط ماده سرطان‌زای رادیواکتیو را در ویالهای ۸ میلی‌لیتری مخصوص دستگاه بتاکانتر محتوی ۲ میلی‌لیتر محلول سنتیلاسیون اضافه کرده، درب لوله‌ها را محکم بسته و کاملاً با هم‌زن برقی مخلوط کرده و سپس به‌مدت حداقل ۱۶ ساعت در تاریکی قرار داده شد. توسط دستگاه بتاکانتر مدل LKB-1219 Raok Beta میزان رایدواکتیویته هر یک از لوله‌ها شمارش شد. باید متذکر شد، کلیه نمونه‌ها در کلیه مراحل آزمایش به‌صورت دوتایی تهیه شدند. همچنین قبل از اضافه کردن نمونه به ویالها، آلودگی احتمالی رادیواکتیو با شمارش میزان رادیواکتیویته معین شد. از بنزوآلفاپیرین نشاندار تهیه شده در DMSO به‌عنوان استاندارد در دو ویال جداگانه استفاده گردید [۳و۴].

محاسبه میزان اتصال بنزوآلفاپیرین به DNA برحسب پیکومول (Pmol B(α) p/mg DNA)

۵ میکرولیتر بنزوآلفاپیرین نشاندار ۸ نانومول را در ۳۵ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکسید حل کرده و ۵ میکرولیتر از محلول رقیق شده را به‌عنوان استاندارد به لوله‌های مخصوص شمارش منتقل و پس از افزودن ۳ میلی‌لیتر محلول سنتیلاسیون میزان رادیواکتیویته آن در مقابل شاهد قرائت شد. برای تبدیل میزان رادیواکتیویته نمونه‌ها از DPM به Pmol/mg DNA به روش زیر عمل شد.

الف) DPM(2) مربوط به ۵ میکرولیتر بنزوآلفاپیرین غلیظ = (ضریب دقت) ۸×DPM(1) استاندارد.

ب) رادیواکتیویته مربوط به ۵۰ میکرولیتر بنزوآلفاپیرین استفاده شده در سیستم انکوباسیون حاوی ۸۰ نانومول بنزوآلفاپیرین DPM(3)=۱۰×DPM(2)

شاهد عبارت است از نمونه فاقد میکروزوم با نمونه‌دارای میکروزوم که در زمان صفر، واکنش متوقف شده باشد. در این حالت رادیواکتیویته خالص نمونه DPM=DNA شاهد منهای DPM نمونه

DPM رادیواکتیویته مربوط به ۱ میلی‌گرم DNA اولیه =

۲× ضریب‌دقت (۴) × $\frac{۱}{\text{درصد بازیافت}}$ × DPM نمونه خالص

$$\text{Pmol/mg DNA} = \frac{۱۰۰۰\times\text{DPM/mg DNA}}{\text{DPM استاندارد}} = \text{میزان اتصال}$$

توضیح اینکه : (۱۰۰۰ پیکومول معادل یک DPM است.)

روش آماری

به‌منظور ارزیابی و تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقادیر به‌دست آمده بین دو گروه شیرخوار و بالغ از آزمون Student t-test استفاده شد. داده‌ها با استفاده از برنامه نرم‌افزاری SPSS پردازش گردید. نتایج حاصل به‌صورت جداولی که در آن تعداد کل نمونه‌ها، میانگین آنها، انحراف استاندارد، خطای استاندارد و مقادیر t, F درجه آزادی، برآورد واریانس ادغام شده و به‌طور مجزا مقادیر P تعیین شده است. با استفاده از P(P Value) به دست آمده، در مقایسه بین هر گروه با کنترل مشخص شد که آیا از نظر آماری اختلاف معنی‌دار است (P<0.05) و یا اهمیتی ندارد (P>0.05).

یافته‌ها

اثر سن بر میزان تم سیتوکروم P-۴۵۰ در پوست و کبد

نتایج حاصل نشان داد که میزان کل سیتوکروم P=۴۵۰ کبد موش صحرایی بالغ تقریباً ۲/۹۳ برابر مقدار آن در میرکوزوم‌های کبد موش صحرایی شیرخوار است. جدول ۲ مقادیر به‌دست آمده سیتوکروم‌های کبد موشها را نشان می‌دهد.

جدول ۲. مقدار سیتوکروم P در کبد موش شیرخوار و بالغ

مقدار سیتوکروم P-۴۵۰ بر حسب nmol/mg protein	سن موش بر حسب روز
۰/۱۷۳±۰/۰۳	۹±۳
۰/۵۰۷±۰/۰۷	۵۳±۴

نتایج به‌صورت میانگین ± خطای معیار نشان داده شده است.

مقایسه میزان اتصال B(α)P به DNA در شیرخوار و بالغ

در سیستم انکوباسیون بازسازی شده، B(α)P در حضور NADPH و میکروزوم که حاوی آنزیم‌های سیتوکروم P-۴۵۰ است به متابولیت‌های فعال تبدیل می‌شود که قادر به واکنش با هسته‌های نوکلئوفیل است [۱و۱۹]. در این سیستم DNA تنها منبع نوکلئوفیل است که متابولیت‌های بنزوآلفاپیرین به آن متصل شده و ایجاد DNA adduct می‌نماید. جدول شماره ۳ مقدار DNA معادل حاصل را نشان می‌دهد. براساس داده‌های جدول فوق‌الذکر میزان معادل در سیستم انکوباسیون حاوی میکروزوم‌های کبد حیوان بالغ تقریباً ۴/۳ باربر این مقدار پوست است (۲۱۶/۱۲ به ۵۹/۲۶) این در حالتی است که میزان اتصال در سیستم انکوباسیون حاوی میکروزوم‌های کبد شیرخوار تقریباً ۱/۴ باربر مقدار اتصال در پوست است (۲۹/۵۶ به ۱۷/۳۵). نسبت معادل بنزوآلفاپیرین به DNA در پوست بالغ ۳/۴ برابر پوست شیرخوار بوده (۵۹/۲۶ به ۱۷/۳۵) و این نسبت در حضور میکروزوم‌های کبد بالغ به شیرخوار ۷/۳ به یک (۲۱۶/۱۲ به ۲۹/۵) است.

جدول ۳. مقایسه میزان اتصال B(α)P به DNA در شیرخوار و بالغ

معادل برحسب پیکومول بر میلی‌گرم DNA Pmol B(a) P/mg DNA			
بالغ		شیرخوار	
کبد	پوست	کبد	پوست
۲۱۶/۱۲±۷/۲۲	۵۹/۲۶±۵/۵	۲۹/۵۶±۳/۸	۱۷/۳۵±۴/۹

اعداد به‌صورت میانگین ± خطای معیار نشان داده شده است.

مقایسه نقش مهاری سیتوزول (گلوتاتیون ترانسفراز سیتوزولی) در کاهش اتصال B(α)P به DNA

طراحی سیستم انکوباسیون برای بررسی نقش کونژوگاسیون گلوتاتیون توسط آنزیم گلوتاتیون -S- ترانسفراز سیتوزولی بدین طریق انجام شد:

۰/۵ میلی‌گرم DNA، ۵ میلی‌مولار گلوتاتیون (رقیب DNA در جذب و اتصال به مواد الکتروفیل)، سیتوزول (منبع آنزیم گلوتاتیون -S- ترانسفراز (GSH))، میکروزوم‌های مختلف حاصل از دو گروه سنی و دو نوع بافت مورد آزمایش (منبع آنزیم سیتوکروم P-۴۵۰)، NADPH (دهنده هیدروژن). هر گروه کنترل حاوی تمامی موارد فوق‌الذکر به‌جز سیتوزول و گلوتاتیون [۲۱،۲۶و۲۵]. جدول محتویات سیستم‌های انکوباسیون طراحی شده را نشان می‌دهد. نتایج حاصل در جداول ۴ تا ۹ نشان داده شده است.

جدول ۴. محتویات سیستم‌های انکوباسیون طراحی شده

سیتوزول (۳۰ میکرولیتر معادل ۱ میلی‌گرم پروتئین)	۵ GSH میلی‌مولار	[3H]B(a)P B(a)P	میکروزوم‌های مختلف ۱mg	۰/۵ DNA میلی‌گرم
-	-	+	+	+گروه کنترل
+	+	+	+	+گروه تیمار

جدول ۵. نقش مهاری سیتوزول در کاهش اتصال B(α)P فعال شده توسط میکروزوم کبد بالغ به DNA

درصد کاهش اتصال	درصد اتصال	معادل DNA	GSH	میکروزوم کبد بالغ	منبع سیتوزولی
۰	۱۰۰	۲۰۵/۳۶±۷/۳	-	+	کنترل
۲۷	۷۳	۱۴۹/۹۱±۸/۲۵	+	+	کبد بالغ
۱۳	۸۷	۱۷۸/۶۶±۶/۳	+	+	کبد شیرخوار
۱۷	۸۳	۱۷۰/۴۵±۹/۷۵	+	+	پوست بالغ
۷/۴	۹۲/۶	۱۹۰/۱۶±۱۰/۲	+	+	پوست شیرخوار

نتایج به‌صورت میانگین ± خطای معیار نشان داده شده است.

جدول ۶. نقش مهاری سیتوزول در کاهش اتصال B(α)P فعال شده توسط میکروزوم کبد شیرخوار به DNA

درصد کاهش اتصال	درصد اتصال	DNA adduct	GSH	میکروزوم کبد شیرخوار	منبع سیتوزولی
۰	۱۰۰	۲۸/۲۵±۳/۲۵	-	+	کنترل
۵۰	۵۰	۱۴/۱۲±۲/۳	+	+	کبد بالغ
۱۵/۳	۸۴/۷	۲۳/۹۳±۴/۱	+	+	کبد شیرخوار
۲۳/۴۹	۷۶/۵۱	۲۱/۶۱±۳/۶	+	+	پوست بالغ
۳/۳۶	۹۶/۶۴	۲۷/۳۰±۳/۶	+	+	پوست شیرخوار

نتایج به‌صورت میانگین ± خطای معیار نشان داده شده است.

جدول ۷. نقش مهاری سیتوزول در کاهش اتصال B(α)P فعال شده توسط میکروزوم پوست بالغ به DNA

درصد کاهش اتصال	درصد اتصال	DNA addact	GSH	میکروزوم پوست بالغ	منبع سیتوزولی
۰	۱۰۰	۵۲/۸±۴/۳۷	-	+	کنترل
۵۸/۱	۴۱/۹	۲۲/۱±۲/۳	+	+	کبد بالغ
۱۸/۲	۸۱/۸	۴۳/۲±۴/۱	+	+	کبد شیرخوار
۳۸/۴	۶۱/۶	۳۲/۵±۵	+	+	پوست بالغ
۱۳/۱	۸۶/۹	۴۵/۹±۳/۹	+	+	پوست شیرخوار

نتایج به‌صورت میانگین ± خطای معیار نشان داده شده است.

جدول ۸. نقش مهاری سیتوزول در کاهش اتصال B(α)P فعال شده توسط میکروزوم پوست شیرخوار به DNA

درصد کاهش اتصال	درصد اتصال	DNA adduet	GSH	میکروزوم پوست شیرخوار	منبع سیتوزولی
۰	۱۰۰	۱۹/۲۹±۳/۹	-	+	کنترل
۶۸/۵	۳۱/۵	۶/۱±۲/۳	+	+	کبد بالغ
۷۶/۲	۲۳/۸	۴/۶±۱/۶	+	+	کبد شیرخوار
۷۳/۶	۲۶/۴	۵/۱±۱/۲	+	+	پوست بالغ
۵۴/۱	۴۵/۹	۸۹±۲/۵	+	+	پوست شیرخوار

نتایج به‌صورت میانگین ± خطای معیار نشان داده شده است.

جدول ۹. مقایسه نسبت عملکرد گلوتاتیون -S- ترانسفراز با توجه به نوع میکروزوم موجود در سیستم انکوباسیون

سیتوزول پوست شیرخوار	سیتوزول کبد شیرخوار	سیتوزول پوست بالغ	سیتروزول کبد بالغ	میکروزومها
۱(٪۷/۴)	۱/۸	۲/۳	۳/۷	میکروزوم کبد بالغ
۱(٪۱۳/۱)	۱/۴	۲/۹	۴/۴	میکروزوم پوست بالغ
۱(٪۳/۳۶)	۴/۶	۶/۹۹-۷	۱۳/۹	میکروزوم کبد شیرخوار
۱(٪۵۴/۱)	۱/۴	۱/۴	۱/۳	میکروزوم پوست شیرخوار

نتایج به‌صورت میانگین ± خطای معیار نشان داده شده است.

بحث

مدت زمان زیادی است که خاصیت سرطان‌زایی مواد شیمیایی بررسی می‌شود و در بین مواد شیمیایی سرطان‌زا هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای از اهمیت ویژه‌ای برخورد دارند به گونه‌ای که از قرن ۱۹ میلادی توجه دانشمندان را به خود معطوف داشته‌اند [۱و۷].

مکانیزم‌های متابولیسمی گونه‌های مختلف موجودات زنده با تأثیرپذیری از عوامل ژنتیکی و محیطی متفاوت است. عملکرد سیستم متابولیزه‌کننده تحت تأثیر عواملی از قبیل سن، جنسیت، رژیم غذایی، سیستم ژنتیکی و عوامل محیطی است [۱،۵و۱۴].

جانوران در سنین مختلف در معرض مواد شیمیایی سرطان‌زا، به‌ویژه PAH ها قرار دارند. آزمایش‌های زیادی نشان داده‌اند که نوزادان نسبت به آثار سمی و مضر داروها و مواد شیمیایی حساس‌تر از بالغین هستند. مثلاً طبق گزارشی نوزادان موش صحرایی بین ۰/۱ تا ۲۰ برابر حساس‌تر از بالغین خود هستند [۵و۲۵].

نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان اتصال بنزوآلفاپیرین به DNA در حضور میکروزوم‌های حاصل از دو بافت پوست و کبد در موشهای صحرایی ماده شیرخوار و بالغ نشان داد که میکروزوم‌های کبد در هر دو گروه سنی بیشتر از پوست فعال‌سازی متابولیتک بنزوآلفاپیرین را بر عهده دارند. همچنین میکروزوم کبد بالغ نسبت به میکروزوم کبد شیرخوار، میکروزوم پوست بالغ نسبت به میکروزوم پوست شیرخوار، میکروزوم کبد بالغ نسبت به پوست بالغ، میکروزوم کبد شیرخوار نسبت به میکروزوم پوست شیرخوار بیشتر باعث فعال‌سازی متابولیک بنزوآلفاپیرین می‌شوند. بنابراین از نظر قدرت فعال‌سازی میکروزوم‌ها می‌توان نتیجه گرفت که فعالیت میکروزوم کبد بالغ > فعالیت میکروزوم پوست بالغ > فعالیت میکروزوم کبد شیرخوار > فعالیت میکروزوم پوست شیرخوار نشان داد که این مکانیزم سم‌زدایی در بالغین بیشتر از شیرخواران توسعه یافته است. حیوانات بالغ جوان در مقایسه با دیگر گروه‌های سنی (شیرخوار و پیر) نسبت به سرطان‌زایی مواد شیمیایی از مقاومت بیشتری برخوردارند. چنین به نظر می‌رسد که این گروه سنی به علت عملکرد بهتر سیستم‌های متابولیزه کننده و سم‌زداینده، پایداری بیشتر ژنوم، مقاومت طبیعی زیادتری دارند. در آزمایش‌های تحقیق حاضر نیز نشان

داده شد که گلوتاتیون -S- ترانسفراز در شیر خوار و بالغ نشان داد که این مکانیزم سم زدایی در بالغین بیشتر از شیرخواران توسعه یافته است. حیوانات بالغ جوان در مقایسه با دیگر گروه‌های سنی (شیرخوار و پیر) نسبت به سرطان‌زایی مواد شیمیایی از مقاومت بیشتری برخوردارند. چنین به نظر می‌رسد که این گروه سنی به علت عملکرد بهتر سیستم‌های متابولیزه کننده و سم زداینده، پایداری بیشتر ژنوم، مقاومت طبیعی زیادتری دارند. در آزمایشهای تحقیق حاضر نیز نشان داده شد که گلوتاتیون -S- ترانسفراز که یک آنزیم مهم در مسیر سم زدایی بنزوآلفاپیرین است به میزان بیشتری در حیوانات بالغ جوان نسب به شیر خواران وجود دارد. به‌طوری که با درصد بیشتری باعث کاهش اتصال ماده سرطان‌زا به DNA می‌شود. در سیستم‌های طراحی شده مشابه سلول در وضعیت طبیعی که میکروزوم و سیتوزول یک نوع بافت استفاده شده است، نشان می‌دهد که مقدار آنزیم گلوتاتیون -S- ترانسفراز در بافتهای دو گروه سنی متفاوت بوده، به‌طوری که بیشترین مقدار آنزیم در کبد بالغ، بعد کبد شیرخوار، پوست بالغ و پوست شیرخوار است. به‌طوری‌که نسبت این مقادیر در سیستم‌های انکوباسیون خنثی‌سازی تقریباً به‌صورت ذکر شده در متن است.

نتایج حاصل از سیستم‌های طراحی شده دارای میکروزوم و سیتوزول از یک نوع بافت نسبت به سیستم‌های حاوی میکروزوم و سیتوزول از بافتهای مختلف و در سنین مختلف نشان می‌دهد که در هر بافت و سن میزان فعال‌سازی بنزوآلفاپیرین در فاز اول متابولیسم با میزان غیرفعال‌سازی این ماده در فاز دوم متابولیسم مرتبط است. اما این ارتباط از یک نمودار خطی پیروی نمی‌کند؛ یعنی این‌گونه نیست که هر چه نسبت فعال شدن بیشتر باشد، به همان نسبت نیز غیرفعال‌سازی روی دهد. بلکه فعال‌سازی به مراتب بیشتر از غیرفعال‌سازی گلوتاتیونی در این سیستم‌های طراحی شده است. این اختلاف می‌تواند به‌دلیل وجود مقدر بیشتر آنزیمهای دخیل در فعال‌سازی بنزوآلفاپیرین خصوصاً سیتوکروم‌های P-۴۵۰ نسبت به آنزیم غیرفعال‌ساز گلوتاتیون -S- ترانسفراز باشد. همچنین احتمال وجود فعالیت ویژه بالاتر از آنزیمهای فعال‌ساز نسبت به آنزیمهای غیرفعال‌ساز یا حتی دخالت عوامل زمینه ساز دیگر همچون نیاز به عملکردهای هم زمان گلوکورونیک اسید کونژوگاسیون، سولفات کونژوگاسیون و گلوتاتیون کونژوگاسیون و غیره در مهار عملکردهای آنزیم‌های فعال‌ساز باشد. همچنین محاسبات تطابق سنی با فعال‌سازی و مهار بنزوآلفاپیرین به ترتیب توسط میکروزوم‌ها و گلوتاتیون -S- ترانسفراز نشان می‌دهد که میزان این فعالیتهای متابولیسم نسبت به سن از یک نمودار خطی پیروی نمی‌کند. هر چه سن بیشتر می‌شود، فعال‌سازی و غیرفعال‌سازی بیشتر می‌شود (تا یک سن خاص). عوامل مختلفی می‌تواند توضیح دهنده احتمالی این پدیده باشد. از آن جمله می‌توان تأثیر عوامل داخلی متنوع دیگر خصوصاً هورمون‌های جنسی را نام برد. بررسی این عوامل در *in vitro* کمک شایانی به درک تفاوتها با نمودارهای تطبیقی غیرخطی می‌کند [۱۵و۲۷].

این آزمایشها همچنین به‌طور ضمنی نشان می‌دهد که عملکرد اختصاصی شدن بافتها (در خصوص آنزیمهای به‌کار رفته شده در این سری آزمایشها) در شیرخوار هنوز کامل نبوده و احتمالاً تا سن معینی بعد از ارگانوژنز پدیده اختصاصی شدن ادامه خواهد داشت. بنابراین این مطالعه تأکیدی بر این مطلب است که هر چه ارگانوژنز کمتر باشد، همخوانی فیزیولوژیک و عملکردی بافتها بیشتر است. عملکردهای آنزیمی مطالعه شده در این سری از آزمایشها نشان دهنده این واقعیت است که با پایان ارگانوژنز هنوز فرآیند اختصاصی شدن پایان نیافته و مراحل پس از ارگانوژنز برای کامل شدن اختصاصی شدن بافتها باید روی دهد این فرآیند می‌تواند حاصل از وجود آثار فتوتیپی ادامه‌دار ایجاد شده و در ارگانوژنز با بیان ژنی خاص مراحل پس ارگانوژنز باشد. از دیگر عوامل احتمالی می‌توان تأخیر بیان ژنی و بیان انتوژنی ژن یا یک سری از ژنها را دانست [۶و۲۳].

باید متذکر شد که انجام آزمایشها در *in vitro* مسلماً نمی‌تواند اثرهای مختلف حاصل از میان‌کنش‌های متنوع سلول و محیط و سلول - سلول را نشان دهد. همچنین گام به گام *in vitro* ما را در درک بیشتر این فرآیندهای پیچیده یاری خواهد رساند.

References

١. محمدی قناتغستانی مصطفی، علامه عبدالامیر، نوری دلویی محمدرضا. فعال‌سازی متابولیک و اتصال بنزوآلفاپیرین به DNA در ضحور میکروزوم‌های پوست و کبد موش صحرایی نوزاد و بالغ. مجله دانشگاه علوم‌پزشکی کرمان. ١٣٧٩ ، شماره ٣ ، صفحات ١٤٤-١٣٧

2. **Alexandrov K, Rajas Moreno M.** In vivo DNA adduct formation by benzo(a) Pyrene in mouse and rat epidermal and dermal fibroblasts after topical application of aninitiating dose of benzo(a) ptrene. Arch Goschwulstforsch. 1990; 60(5): 329-340
3. **Changol W.** Macromelecular adducts: Bimarkers for toxicity and carcinogenesis. Anna Rev Prarmacol Toxicol. 1994; 34: 41-76
4. **Davanesan PD.** Identification and quantitationj of Benzo(a) pyrene-DNA adducts formed by rat liver microsomes in vitro. Chem Res Toxicol. 5(2): 302-309
5. **Martin CN, Garner RC.** The identification and mesurment of covalent binding in vitro and in vivo. Biochemical Toxicology eds. Suell and Mullock IRI press. Oxford, London. 109-125
6. **Wallace DM.** Large and small-scale phenol Extraction. In: Methods in Enzymology, Guide to molecular cloning techniques. Vol. 152, Ed. by Berger SL and Kimmel AB, Academic Press, INC. Sandiego. California. PP: 33-41
7. **Bartsh H.** DNA adducts in human carcinogenesis: etiological relevance and structure-activity relationship. Mutiotin Res. 340: 67-79
8. **Beland FA, Poirier MC.** DNA adducts and carcinogenesis. In: Sirica A.E., ed. The pathobiology of neoplasia. New York: Plenum Press. 57-80
9. **Bluhm C.** Effects of smoking on benzo(a) pyrene-Glutathione-metabolizing enzymesing human lung tissue. Klin Wochenschr. 69: 819-824
10. **Ophuis MBO, Van Lieshout EMM, Roelofs HMJ.** Glutathione S-transferase M1 and T1 and cytochrome P4501A1 polymorphisms in relation to the risk for benigh andmalignant head and neck lesions. Cancer. 1998; 82: 936-943
11. **Ramesh A, Greenwood M, Inyang F, Hood OB.** Toxicokinetics of inhaled benzo. Inhaltoxical. 2001; 13(16): 533-535
12. **Jakoby WB, Habig WH.** Glutathione transferases. In Enzymetic basis of detoxification, Academic press, New York, 63-94
13. **Helleberg H, Xu H. Ehrenberg I, Hemminki K, Rannyg U, Torngvist M.** Studies of dosedistribution, Premutagenic events and mutation fregnuncies for benzo. Mutagenesis. 2001; 16(4): 333-337
14. **Dean JH, Murray MJ.** Toxic responses of the immune system. In: Casarett and Doull's toxicology: the Basic science of poisons, 4th ed., edited by Doull J, Klaasen, and Amdur M-O. Pergamon press, New york, 2000, pp 282-333
15. **Roberts AE, Ritz MA, Hoekstra S, Descotes G, Hincks JR.** Induction of livercytochrome P-450 (cyp) 3 A in male and female rats by a steroidal and rogen receptorantagonist, Zanoterone, J Biochem Toxicol. 1996; 11(3): 101-110
16. **Wang NP, Zang LQ, Huang RB, Meng ZQ.** Determination of agerelated changes of cytochrome P-450 sensitive to mepyramine in rat hepatic microsomes. Kyao Hsueh Hsueh Pao. 1995; 30(10): 726-730
17. **Rebbeck TR.** Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase fenotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1997; 6: 733-743
18. **Herrmann BG, Frischanf A.** Isolation of Genomic DNA: In methods in Enzymology, Guid to molecular cloning techniques. Bol. 152, Ed. by Berger SL, and Kimmel AR. Academic press, INC. SanDiego. California. pp: 180-183
19. **Gonzalez Fg, Gelboin HV.** Role of human sytochromes P-450 in the metabolicacribation of chemical carcinogens and toxins. Drug Metab Rey. 1994; 26(1-2): 165-183
20. **Plewka A, Plewka D, Kminski M.** Induced modification of liver cytochrome P-450 leveles as a function of age in rats. Prstepy. Hig Med Dosw. 48(4): 457-470
21. **Omura T, Sato R.** The carbon monoxide binding

pigment of liver microsomes. I. Evidence for its homoprotein. J Bool Chem. 1964; 239: 2370-2378

22. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72: 248-254
23. **Falgueyret JP, Leblanc Y, Riendeau D.** Stereoselective carbonyl redutases from rat skin and leukocyte microsomes converting 12-ketoeicosatetraenoic acid to 12(S)-HETE. FEBS. 1990; 262(2): 197-200
24. **Allameh AL, Saxena M, Raj HG.** Differential effects of Butylated Hudroxyanisoleon metabolism of afltoxin BL in vitro by liver and lung microsomes. Cancer Lett. 1988; 40: 49-57
25. **Schut HAJ, Shiveick KT.** DNA adducts in humans as dosimeters of exposute to environmental, occupational, or dietar genetoxins, The FASEB J. 1992; 6: 2942-2951
26. **Zhan Deyin, Heflich RH, Fu PP.** Molecular charcterization of mutation and comparison of mutation profiles in the hprt gene of chinese hamster ovary cells treated with B(a) P-trans-7, 8-diol-anti-9, 10-epoxide, 1-Nitro B(a) P-trans-7, 8-diol-anti-9, 10-epoxid, and 3-nitro B(a) P-trans-7, 6-diol-anti-9, 10-epoxide, Environ Mol Mutag. 1996; 27(1):
27. **Allemeh AA, Nikseresht M, Kheyrdoosh F.** Role of cytosolic glutathione S-transferases in protection against acetaminophen-infuces lipid peroxidation in weanling rats. Medical J I.R.Iran. 1999; 13: 213-217
28. **Melikian AA, Prahalad KA, Amia S, Hecht SS.** Comparative DNA binding of PAHS and their dihydrodial and day region diolepoxide metabolites in newborn mouse lung andliver. Carcinogenesis. 1991; 12(9): 1665-1670
29. **Hughes NC, Phillips DH.** Covalent binding of dibenzyrens and B(a) P to DNA: evidence for synergistic and inhibitory interactions when applied in combination to mouse skin. Carcinogenesis. 1990; 11(9): 1611-1619
30. **Burton K.** A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric astimation of DNA. Biochem J. 1956; 62: 315-323
31. **Cresteil T.** Onset of Xenobiotic metabolism in children: toxicological implication. Foodaddit contam. 1998; 15(supple): 45-51
32. **Hsu TC, Spitz MR, Schant SP.** Mutagen sensitivity: A Biological marker for cancersusceptibility. Cancer Epidemiol Biomarkers Prey. 1991; 1: 83-89
33. **Kim HS, Lee BM.** Ingibition of Benzo (a) Pyrene-DNA adduct formation by AloeBarbadenis Miller. 1997; Apr Carcinogenesis. 18(4): 771-776