جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۰ ، شماره ۴ ، زمستان ۱۳۸۴
صفحات: ۲۴۱-۲۴۶

بررسی فعالیت آنزیمهای متابولیزکنندهٔ AFB_1 و واکنش آن با DNA در کبد موش صحرایی (Rat)

محمد سعیدی .M.SD

چکیــده

هدف: مقایسه تأثیر آفلاتوکسین B_1 (AFB_1) بعنوان یک عامل سرطان‌زا در فعالیت و توسعه آنزیمهای متابولیز کننده کبدی و میزان اتصال آفلاتوکسین B_1 به DNA در موشهای صحرایی نابالغ با بالغ.

روش بررسی: در این پژوهش فعالیت آنزیمهای گلوتاتیون- S – ترانسفرازسیتوزولی و سیتوکروم P450 میکروزومی همراه با تغییرات آنها در سنین مختلف پس از تولد با استفاده از روش جذب سنجیده شده است. همچنین توانایی کبد موشهای نابالغ برای تبدیل آفلاتوکسین B_1 به فرم فعال اپواکسید و مقدار اتصال $[^3H]$ AFB_1 اپواکسید در حضور میکروزمهای کبدی سنین مختلف به DNA بصورت in vitro سنجش و اندازه‌گیری شده است.

یافته‌ها: این پژوهش نشان می‌دهد که فعالیت آنزیمهای متابولیزکنندهٔ آفلاتوکسین B_1 در سنین قبل از بلوغ کمتر از میزان بالغ بوده و اختلاف معنی‌دار بین آنها مشاهده می‌شود. علاوه بر آن اتصال $[^3H]$ AFB_1 به DNA در موشهای نابالغ کمتر از موشهای بالغ است.

نتیجه‌گیری: از یافته‌های این پژوهش می‌توان استدلال کرد که کبد موشهای نابالغ ظرفیت کمتری در متابولیسم عوامل سمی و سرطان‌زای خارجی مانند آفلاتوکسین B1 داشته و موجب عدم دفع این مواد و ذخیرهٔ آنها در بدن خود می‌شوند که ممکن است در نهایت آنها را بطور دائم در معرض عوامل سرطان‌زا و آسیبهای کبدی قرار دهد.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین B_1 ، سیتوکرو م P-450 ، گلوتاتیون– S– ترانسفرز پروتئینهای میکروزومی و سیتوزولی، اسپکتروفتومتری، $[^3H]$ AFB_1

مقــدمــه

آنزیمهای متابولیزکنندهٔ داروها در کبد عامل مهمی در تبدیل مواد خارجی، سموم سرطان‌زاها، هورمونهای استروئیدی اندوژنوس، ویتامینها و اسیدهای چرب محسوب می‌شوند. (۱،۲) کاهش فعالیت این آنزیمها موجب هپاتیت یا سیروز کبدی و نهایتاً گسترش سرطان کبدی می‌شود. آفلاتوکسین B_1(AFB_1) که بوسیلهٔ قارچ اسپرجلیوس (Aspergillus's flavus) رشد یافته بر روی مواد غذایی و دانه‌های روغنی، تولید می‌شود بعنوان سم کبدی ارتباط زیادی با وقوع سرطان کبدی دارد. (۳) سیتوکرومها P-450S کبد بصورت ایزوزومهای IA، 2B ، 3A بعنوان کاتالیست متابولیسم اکسیداتیو AFB1 محسوب می‌شوند. (۴) تشکیل متابولیت AFB_1 (۸ و ۹ اپوکسید AFB_1) و سپس ایجاد پیوند با DNA

دریافت مقاله: ۸۳/۱۰/۱۶، پذیرش مقاله: ۸۴/۶/۱۳
نویسنده مسئول: مربی گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید رجایی ، تهران ـایران
آدرس پست الکترونیکی: Msaeedi@sru.ac.ir

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مراحل بسیار خطرناکی از سرطان کبدی است. (۵) این متابولیت در فاز II متابولیسم به AFB1 ترانس – ۸ و ۹ دی ال تبدیل شده و توسط آنزیم گلوتاتیون – S- ترانسفراز (G-S-T) کنژوگه شده و حلالیت آن افزایش یافته، توسط ادرار و صفراء دفع می‌گردد. (۶، ۷)

در پژوهشهای مختلف تأثیر عوامل متعدد در متابولیسم AFB1 مورد بررسی و مقایسه قرار گرفته است از جمله این عوامل می‌توان به تأثیر جنسیت (۸) ، رژیم غذایی (۹) و مصرف دارو (۱۰) نام برد که در پژوهش‌ها، گزارش شده است. در تحقیقات بعمل آمده، فعالیت آنزیم سیتوکروم P-450 در متابولیزه کردن داروهای سمی و زئوبیوتیک‌ها از جمله AFB1 در سنین جوانی و پیری مورد مقایسه قرار گرفته و نشان داده شده است که فعالیت آنزیم در سن پیری تا ۴۵٪ کاهش می‌یابد. (۱۱)

همچنین در پژوهشهای متعدد القاء کننده‌ها در فعالیت مسیر اکسیداتیو و کنژوگاسیون مواد سمی در سنین جنینی و نوزادی در پستانداران مختلف مورد اندازه‌گیری و مقایسه قرار گرفته است. این پژوهش‌ها نشان می‌دهند که فعالیت آنزیم فعال کننده (سیتوکروم P450) در اوایل حاملگی بسیار ناچیز بوده (تا ۳٪ میزان بالغ) و به تدریج افزایش یافته بطوریکه در دوران نوزادی فعالیت آن حدود ۴۰٪ بالغ می‌شود. (۱۲)

در این تحقیق فعالیت آنزیمهای مسیر فعال کننده (سیتوکروم P-450) و مهارکننده (GST) برای اولین بار در سنین مختلف موشها از نوزادی تا قبل از بلوغ مورد مقایسه قرار گرفته و چگونگی توسعه آنزیمها طی این دوران نشان داده شده است. همچنین میزان اتصال AFB1 به DNA نیز در این سنین اندازه‌گیری شده است، تا با بررسی نتایج بدست آمده ، بتوان آسیب‌پذیری پستانداران را نسبت به AFB1 در سنین قبل از بلوغ پیش‌بینی کرد.

روش بررسی

مواد . $[^3H]AFB_1$ (رادیو اکتیو) خریداری شده از شرکت American Radio Labeled. Chemical Co. آلبومین سرم گاوی (BSA)– DNA تیموس گوساله (Calf thymus DNA)، فنوباربیتال، دی تیونات سدیم، ۱ – کلرو ۲ و ۴ دی نیترو بنزن (CDNB)، نیکوتین آمید دی نوکلئوتید فسفات (NADPH) ۲ و ۵ – دی فنیل اکزازول (PPO) و ۱ و ۴ – بیس – ۲ – (۵- فنیل اکزازول) (POPOP) که کلاً از شرکت MERCK آلمان خریداری شده است.

حیوانات . در کلیه آزمایشها از موش صحرایی سفید (Rat) از نژاد ویستار استفاده شده که از آزمایشگاه حیوانات مؤسسه رازی حصارک خریداری شده و در شرایط عادی نگهداری شده‌اند. حیوانات نابالغ کمتر از ۲ ماه سن داشته و دقیقاً سن تولد آنها کنترل شده است. حیوانات بالغ جوان بوده و سن آنها بین ۳ تا ۶ ماه بوده است.

استخراج پروتئین‌های میکروزومی و سیتوزولی . میکروزوم و سیتوزول مطابق روش Les ca استخراج و تهیه گردید. (۱۳) به این منظور کبد چند موش بطور همزمان از اجزاء بدن جدا شده و پس از خرد شدن در با فر فسفات–سوکروز به مدت نیم ساعت با سرعت ۱۰۰۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریوفوژ شده و اجزاء سنگین سلولی از PMS (Post Mitochondrial Supernatant) جدا گردید.

PMS را در محیط کاملاً سرد به مدت یکساعت در التراسانتریفوژ با سرعت ۱۰۵۰۰۰g و دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شده محلول فوقانی (حاوی سیتوزول) از محلول تحتانی (حاوی میکروزوم) جدا می‌شود. به منظور استخراج کاملتر میکروزوم آن را در محلول KCL حل کرده مجدداً به مدت یکساعت در ۱۰۵۰۰۰g و دمای ۴ درجه سانتریفوژ گردید.

اندازه‌گیری پروتئین تام فراکسیون میکروزومی و سیتوزولی . با استفاده از روش Lowry و Omura مقدار پروتئین تام مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. (۱۵،۱۴) نتایج این اندازه‌گیری در جدول ۱ ذکر شده است.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سیتوکروم P-450 میکروزومی . با استفاده از روش Omura فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شد. (۱۵) به این منظور محلول حاوی میکروزوم پس از انحلال در با فر فسفات و افزودن سدیم دی تیونات توسط گاز CO کاهش داده شده و با اسپکتروفتومتری در ناحیهٔ طول موج nm ۵۰۰–۴۰۰ همراه با

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

نمونهٔ شاهد (کاهش نیافته) اندازه‌گیری شد. این آنزیم با کاهش CO در ناحیهٔ ۴۵۰ nm جذب ماکزیمم دارد. نتایج این اندازه‌گیری در جدول ۲ می‌باشد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون-S- ترانسفراز . برای سنجش فعالیت این آنزیم از روش Ellaman استفاده شد. (۱۶) در این روش پس از استخراج سیتوزول و انحلال آن در بافرفسفات ۱۰۰ میلی مولار با (pH = ۶/۵) آن را با CDNB یک میلی مولار مخلوط نموده و توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۳۴۰ nm اندازه‌گیری شد که نتایج آن در جدول ۳ می‌باشد.

اندازه‌گیری اتصال AFB1 نشان دار (رادیواکتیو) به DNA . سیستم انکوباسیون مطابق روش لوتلیکر (Lotliker) تشکیل گردید، (۱۷) سپس DNA با روش توصیف شده توسط Irving و Daoud جدا شد. (۱۸)

DNA جدا شده ۳ بار در ۹۰۰۰ g سانتریفوژ شده و دوبار با اتانول سرد شستشو داده و در یک میلی لیتر از بافر ۱ میلی مول (با فر تریس در PH=7.4) و EDTA یک میلی مول حل شده به ۳ ویال تقسیم گردید. یک ویال برای اندازه‌گیری مقدار DNA با روش اسپکتروفتومتری و با نمونه‌های استاندارد حاوی ۱۰ و ۲۰ و ۳۰ و ۴۰ میکروگرم DNA تیموس گوساله در طول موج ۶۰۰ nm مورد استفاده قرار گرفت و دو ویال دیگر پس از نگهداری در محیط تاریک به مدت یک شبانه‌روز در حضور AFB_1 [^{3}H] بوسیله شمارندهٔ تابش‌های رادیواکتیو (مدل Ls-2800 ، Beckman) میزان (disintegration Per minute) DPM اندازه‌گیری شد. (جدول ۴)

یافته‌ها

نتایج حاصل مربوط به نمونه‌های کبد موشهایی می‌باشد که آنها تحت شرایط عادی نگهداری شده و از رژیم غذایی استاندارد برخوردار بوده‌اند می‌باشد بطوریکه شرایط نگهداری و تغذیه برای کلیه موشها (بالغ و نابالغ) یکسان بوده است.

در جدول ۱ مقدار پروتئین تام میکروزومی و سیتوزولی بر حسب میلی‌گرم در هر گرم بافت کبد در موشهای بالغ و نابالغ نشان داده شده است. همانگونه که نتایج حاصل نشان می‌دهد مقدار پروتئین

جدول۱. مقدار پروتئین‌های تام فراکسیون میکروزومی و سیتوزولی

سن موشها	سیتوزول		میکروزوم	
	mg/g tissue	mg/ml	mg/g tissue	mg/ml
۸	۲۳/۸ ±۰/۸	۱۴/۱ ±۱/۱	۱۲/۴ ±۰/۶۵	۱۴/۹ ±۰/۲
۱۵	-	-	۱۲/۸ ±۰/۷	۱۲/۷ ±۰/۵
۲۵	۲۴/۲ ±۱/۲	۱۴/۳ ±۱	۱۳/۱ ±۹/۵	۱۴/۷ ±۱/۲
۳۳	۲۴/۴ ±۱/۲	۱۴/۳ ±۰/۹	۱۳/۲ ±۰/۵	۱۵/۱ ±۰/۶
۴۲	-	-	۱۳/۴ ±۰/۴۵	۱۵/۵ ±۰/۷۵
بالغ	۲۶ ±۱/۲	۱۵/۸ ±۰/۸	۱۴/۳ ±۰/۵۲	۱۵/۶ ±۰/۷

در هر سن از ۳ تا ۱۲ موش استفاده شده است. در موارد خط تیره اندازه گیری نشده است. هر آزمایش ۲ بار انجام شده و میانگین اعداد نوشته شده است. مقادیر داده شده ± میانگین انحراف استاندارد (S.E.M) می‌باشد.

جدول ۲. فعالیت آنزیم سیتوکروم P450 میکروزومی

سن موشها	فعالیت آنزیم	
	n mol/g tissue	n mol/mg protein
۸	۳/۴۴ ±۰/۱۶*	۰/۲۷۸± ۰/۰۰۷*
۱۵	۳/۹۲ ±۰/۳۱*	۰/۳۰۷± ۰/۰۱۷*
۲۵	۵/۱۲ ±۰/۱۸*	۰/۳۹۱± ۰/۰۲۱*
۳۳	۵/۳۵ ±۰/۲۱*	۰/۴۱۹ ± ۰/۰۱۲*
۴۲	۵/۸۴ ±۰/۲۸*	۰/۴۳۶ ± ۰/۰۱۵*
بالغ	۸/۳۵ ±۰/۳۲*	۰/۵۸۵ ± ۰/۰۴*

در هر سن بطور میانگین از ۳ تا ۶ حیوان استفاده شده است.
آزمایشها ۲ بار تکرار شده و میانگین اعداد بدست آمده در جدول نوشته شده است. مقادیر داده شده ± میانگین انحراف استاندارد (S.E.M) از فراکسیون میکروزومی کبد می‌باشد. * اختلاف معنی‌دار (Significant) بین نمونه‌ها (موشهای نابالغ) با نمونه کنترل (موشهای بالغ) دیده می‌شود. $P < 0.05$

در موشهای نابالغ و بالغ نزدیک هم بوده و اختلاف معنی‌دار مشاهده نمی‌شود. در جدول ۲ فعالیت آنزیم سیتوکروم P-450 بر حسب n mol در هر میلی‌گرم پروتئین و n mol در هر گرم بافت کبد نشان داده شده است. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که در موشهای با ۸ روز سن فعالیت این آنزیم حدود ۴۷٪ بالغ بوده و با افزایش سن این نسبت بیشتر می‌شود ، بطوریکه در موشهای با سن ۱۵ روز قبل از بلوغ) فعالیت آنزیم ۰/۰۱۵ ± ۰/۴۳۶ بوده که حدود ۷۴٪ موش بالغ است. این نتایج گویای آن است که اولاً اختلاف معنی‌دار (Significant) بین موشهای نابالغ با بالغ در

جدول ۳. فعالیت آنزیم گلوتاتیون S – ترانسفراز

سن	فعالیت آنزیم		درصد
	n mol/mg tissue	n mol/mg Protein	
۷	۱۴۹۹۴ ±۵۴۰*	۶۳۰ ±۲۲*	۵۵
۲۸	۳۲۳۰۱ ±۶۰۴*	۹۱۴ ±۲۴/۵*	۷۹
۴۰	۳۴۳۵۵ ±۷۸۱	۹۸ ±۳۷	۸۵
بالغ	۳۹۷۴۴ ±۹۱۰	۱۱۴۴ ±۵۳	۱۰۰

برای هر سن از ۳ تا ۸ حیوان استفاده شده است. آزمایشها ۲ بار تکرار شده و میانگین بدست آمده نوشته شده است. مقادیر داده شده ± میانگین انحراف استاندارد (S.E.M) از فراکسیون سیتوزولی کبد می‌باشد. * اختلاف معنی‌دار (Significant) بین نمونه‌ها (موشهای نابالغ) با نمونه کنترل (موشهای بالغ) دیده می‌شود. $P < 0.05$

جدول ۴. مقدار اتصال AFB1 نشان دار به DNA

سن موشها	فعالیتCY-P450	AFB_1*-DNA
	n mol/mg Protein	Pmol/mg DNA
۸	۰/۲۷۸±۰/۰۰۷*	۱۱۲ ±۳/۲۸
۱۵	۰/۳۰۷ ±۰/۰۰۱۷*	۱۱۶ ±۲/۴
۲۵	۰/۳۹۱ ±۰/۰۲۱*	۱۳۹/۵ ±۲/۱
۳۳	۰/۴۱۹ ±۰/۰۱۲*	۱۵۱ ±۲/۱
۴۲	۰/۴۳۶ ±۰ /۰ ۱ ۵*	۱۷۱ ±۱/۴۹

برای هر سن از ۴ موش بطور میانگین استفاده شده است. آزمایش‌ها ۲ بار تکرار شده و میانگین بدست آمده نوشته شده است. نتایج بر حسب میانگین ± میانگین انحراف استاندارد (S.E. M) می‌باشد. *اختلاف معنی‌دار (Significant) با کنترل (بالغ) دیده می‌شود. $P<0.05$

در فعالیت این آنزیم وجود دارد (P<۰/۰۵). ثانیاً با افزایش سن فعالیت آنزیم نیز توسعه یافته و زیاد می‌شود. فعالیت آنزیم گلوتاتیون –S– ترانسفراز در جدول ۳ مقایسه شده است. برای مقایسه از ۳ سن قبل از بلوغ یعنی سنین ۷ و ۲۸ و ۴۰ روزه استفاده شده است. همچنان که این جدول نشان می‌دهد فعالیت این آنزیم در سن ۷ روزه n mol ۲۲ ± ۶۳۰ در هر میلی‌گرم پروتئین (که ۵۵٪ میزان بالغ است) و ۱۴۹۹۴±۵۴۰ nmol در هر گرم بافت کبد است (حدود ۳۸٪ میزان بالغ است) که اختلاف کاملاً معنی‌داری با سن بالغ وجود دارد (P<۰/۰۵) و در سن ۲۸ روزه فعالیت آنزیم نسبت به میلی‌گرم پروتئین به ۸۰٪ بالغ و نسبت به گرم بافت کبد نیز به حدود ۸۰٪ بالغ رسیده است. جدول ۴ نتایج بدست آمده از اتصال AFB_1 به DNA (Calf Thymus DNA) را نشان می‌دهد.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان اتصال AFB_1 [^{3}H] و AFB_1* به DNA در موشهای جوان (نابالغ) اختلاف معنی‌دار با موش بالغ دارد بطوریکه در موش ۸ روزه مقدار اتصال AFB_1* بر حسب پیکومول در هر میلی‌گرم DNA حدود ۶۱٪ بالغ می‌باشد و با افزایش سن این میزان افزوده شده و در موشهای ۴۲ روزه به ۹۳٪ می‌رسد. این نتایج نشان می‌دهد که به دلیل پائین بودن فعالیت آنزیم‌های مسیر اکسیداتیو، AFB_1 رادیواکتیو، متابولیزه نشده و به فرمهای فعال خود تبدیل نشده است.

بحـــث

مواد دارویی در کبد از طریق سیستم متابولیزکنندهٔ سیتوکروم P450 میکروزومی، متابولیزه شده و جذب یا دفع می‌شوند. گزارشات متعددی در زمینه متابولیزه شدن داروها و فعالیت سیستم آنزیمی مونواکسیژناز وجود دارد. در پژوهش‌های مختلف عواملی مانند گونه حیوانات، جنسیت، بافت‌های هدف مواد دارویی و مواد سمی در فعالیت آنزیمهای متابولیزکننده به صورت *In vivo* و *In viro* مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته است. (۸ – ۱۰)

یکی از عواملی که مورد توجه پژوهشگران بوده است بررسی فعالیت این آنزیمها با سن حیوانات بوده است، از جمله یک ارتباط معکوس بین افزایش سن در سنین بعد از بلوغ و کارکرد سیستم متابولیزکننده داروها، گزارش شده است (۲۰) ، همچنین ارتباط سن با فعالیت آنزیم سیتوکروم P-450 در جنس‌های مذکر و مؤنث نیز مورد توجه قرار گرفته است. (۸)

Jayraj و همکارانش (۱۹۸۵) گزارش کرده‌اند که متابولیسم اتصال کووالانسی و موتاسیون‌زایی آفلاتوکسین B_1 در کبد موشها در سنین پیری و جوانی متفاوت می‌باشد و در موشهای پیر بین ۳۰ تا ۵۰ درصد در مسیر فعال شدن (فاز اکتیواسیون) کاهش ایجاد می‌شود. (۱۱) فعالیت آنزیمها در حالت جنینی و نوزادی نیز مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفته است و مطابق پژوهشهای انجام

یافته آنزیم‌های مونواکسیژناز کبدی در جنین در دوره‌های دوم و سوم حاملگی بسیار ناچیز بوده و حدود ۱ تا ۳٪ میزان بالغ می‌باشد . (۲۰) در برخی از حیوانات آزمایشگاهی فعالیت آنزیم چند روز پس از تولد به حد بلوغ می‌رسد و در بعضی از حیوانات حتی تا ماهها پس از تولد توسعه می‌یابد. (۲۱)

نتیجــه‌گیری: به هرحال در این پژوهش سنین مختلف قبل از بلوغ (۵ دورهٔ سنی) در موشهای صحرایی (Rats) مورد توجه قرار گرفته و روند افزایش یا کاهش فعالیت آنزیمهای متابولیزکننده فاز I و فاز II سنجیده شده است. با توجه به پائین بودن فعالیت آنزیم فعال کننده در سنین قبل از بلوغ مخصوصاً قبل از ۱۵ روز (که کمتر از ۶۰٪ حد بالغ است) می‌توان نتیجه گرفت که در دوران نوزادی مسیر اکسیداتیو یا فعال شدن زنوبیوتیکها بطور کامل انجام نمی‌گیرد و اگر نوزاد در معرض اینگونه مواد قرار گیرد نمی‌تواند آنها را کاملاً متابولیزه نماید و در نتیجه مواد سرطان‌زای نامحلول مانند AFB_1 از دو طریق می‌تواند آسیبهای سلولی و سرطان را موجب شود. اول به دلیل ذخیره‌شدن آن در کبد و متابولیزه شدن دائمی آن در کبد موجب می‌شود که همواره با تولید متابولیتهای فعال احتمال اتصال آنها را با DNA از نظر زمانی افزایش داده یعنی DNA سلول بطور دائم در معرض اتصال متابولیتهای فعال قرار می‌گیرد. دوم اینکه به دلیل ذخیره شدن مواد سمی در کبد در سنین بلوغ با توسعه آنزیمهای فعال کننده در یک زمان مقدار قابل توجه ازموادسمی متابولیزه شده و از این جهت هم ممکن است باعث بروز آسیبهای سلولی شود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت، قرار گرفتن نوزادان قبل از بلوغ در معرض مواد سرطان‌زا به مراتب امکان آسیب‌پذیری بیشتری را نسبت به سن بلوغ خواهند داشت.

References

1. Gonzalez Fj, Gelboin HV. Role of human cytochromes P-450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. Drug Metab Rev 1997; 26: 165-183.

2. LUH, Li Y. Cytochorme P450 and cancer. Prog physiol. Sci 1997; 28: 178-180.

3. Wogan GN. Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. Cancer Res 1992; 5 : 2114 –18 (7 SUPPL).

4. Pong RS. Wogan GN. Toxicity and biochemical and fine structure effects of synthetic aflatoxins M, and B, in rat liver. J Natl cancer Inst 1971; 47: 585-592.

5. Gallagher Ep, wienkers LC, stapleton PL, Kunze KL, Eaton DL. Role of human microsomal and human complementary DNA-expressed- cytchrome p450 1A2 and p450 3A4 in the bioactivation of aflatoxin B_1. cancer Res 1994; 54: 101-118.

6. Johnson WW, Ueng YF, Widerstern M, Mannervik conjugation of highly reactive oflatoxin B1 exo-8.9-epoxide catalyzed by rat and human glutathione transferases: estimation of kintic parameters. Biochemistry 1997; 18: 3056-60.

7. Larsson P, Buskl, Tjalve H, Hepatic and extrahepatic bioactivation and GSH conjugation of AFB1 in sheep carcinogenesis 1994; 15(5): 947-955.

8. Jayraj J.A. Diller T. the influence of age on activation metabolism of AFB1 by liver from male and female. Fed proc 1981; 40: 1577-81.

9. Masatomo K. Kiyoko L. Prathima G.K. Prabhakar D. effect of diet on oflatoxin B1-DNA binding and aflatoxin B1-induced glutathione S-transferase placental form positive hepatic foci in the rat experimental and molecular medicine 2004; 36(4): 351-357.

10. LU Hong. LI. Yan, Effect of bicyclol on alfatoxin B_1 metabolism and hepatotoxicity in rats. Acta pharmacol 2002; 10: 942-945.

11. Jayraj, Hardwich, Thomas.W. Diller T. and Arlan G. Metabolism, Covalent binding and mutagenicity of aflatoxin B1 by liver extracts from rats various ages JNC1 1982; 74(1): 95-103.

12. Larson P. Tjalve H. Extra hepatic bioactivities of AflatoxinB1 in fetal, infant and adult rats. Chem biol Interact. 1995; 94 (1): 1-19.

13. Lesca P, Lecointe P, Paolettic, Mansuy D, Induction des monoxygenases hepatiques I' ellipticine chez le rat: formatior de cytchrome P448. Activite hydroxylante CR Acard Sci 1976; 282: 1427-60.

14. Lowry Oh, Rosebrough NG. Farr Al, Randell RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol chem 1951; 193: 265-275.

15. Omura t, Sato SR, The carbon monoxide-binding pigment of liver microsome. II. Solubilization, purification, and properties J Biol Chem 1964; 239: 2379-85.

16. Ellaman GL, Tissue Sulphydryl groups. Arch Biochem Biophys 1959; 82: 70-77.

17. Lotliker PD, Raj HG, bohm LS, HOLL, Jhee, EC, Tsujik, Gopalanl a mechanism of inhibition of aflatoxinB_1 DNA binding in the liver by Phenobarbital pretreatment of rats. Cancer Res 1989; 49: 951-957.

18. Daoud AH,m Irving CC. Methylation of DNA in rat liver and intesting by dimethylnitrosamine and N-methylnitrosourea. Chem. Biol interact 1997; 167: 165-143.

19. Bar Rd M. Massi, H. Samis, H. Microsomal mixed function oxidase activity of the hepatic microsomal enzaymes system in rats of different ages. EXP Gerontol 1975; 10: 89-94.

20. Shoaf, S.E. The development of hepatic drug metabolizing enzyme activity in the neonatal calf and its effect on druy disposition. Druy metabolism and Disposition 1987; 15: 676-681.

21. Wong, Z. A. and Hsieh, D.P. The comparative metabolism and toxino kinetics of AFB1 in the monkey, rat and mouse. Toxicol APP1 pharmacol 1980; 55:115-119.