

فعال سازی متابولیک و اتصال بنزوآلفاپیرین به DNA در حضور میکروزوم های پوست و کبد موش صحرایی نوزاد و بالغ

مصطفی محمدی قناتستانی، دکتر عبدالامیر علامه ۲ و دکتر محمدرضا نوری دلویی ۳

خلاصه

بنزوآلفاپیرین یک هیدروکربن آروماتیک چند حلقه‌ای سرطان زاست که از سوختن سوخت‌های فسیلی به وجود می‌آید. شواهد اپیدمیولوژیکی متعددی رابطه آن را با سرطان‌های ریه، کبد و پوست نشان داده است. جهش‌زایی، سرطان‌زایی، سمیت و سرکوب سیستم‌ایمنی از اثرات زیستی مهم بنزوآلفاپیرین هستند. بنزوآلفاپیرین پس از جذب و توزیع در بدن، به وسیله سیتوکروم P-۴۵۰ اپوکسیده می‌شود و با اتصال به ماکروملکول‌ها به خصوص DNA اثرات خود را اعمال می‌کند. این ماده از راه کونژوگه شدن با موادی چون اسید گلوکوکورونیک، گلوکوتایون و سولفات، سم‌زدایی و دفع می‌گردد. میزان اثرات بنزوآلفاپیرین به عوامل گوناگونی از جمله گونه، سن، جنس، بافت، تغذیه، دوز مصرفی، سیستم ژنتیکی و غیره بستگی دارد. عدم توسعه و نقص سیستم‌های آنزیمی در نوزادان، احتیاجات بیشتر نوزادان به دلیل قرار گرفتن در مراحل رشد و توسعه، نقص سیستم ایمنی، تفاوت‌های فیزیولوژیک و غیره، حساسیت به مواد شیمیایی سرطان‌زا را در نوزادان و بالغین متفاوت ساخته‌است. در این مطالعه میزان اتصال بنزوآلفاپیرین به DNA تیموس گاوی به وسیله میکروزوم‌های دو بافت کبد و پوست، در موش‌های صحرایی ماده نوزاد و بالغ بررسی شده است. نتایج نشان می‌دهد 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 ۴/۲ به ۱ می‌باشد. مقادیر اتصال در سیستم‌های اینکوباسیون حاوی میکروزوم‌های کبد نوزاد نسبت به پوست نوزاد ۱/۵۱ برابر است. همچنین نشان داده شد که فنوباربیتون با شرایط ذکر شده در مقاله باعث القاء سیتوکروم‌های P-۴۵۰

کبدی موش‌های نوزاد و افزایش میزان اتصال) PaB به DNA نمی‌گردد. اندازه‌گیری مقادیر سیتوکروم P-۴۵۰ در کبد و پوست نشان داد که میزان آن در کبد بالغ ۲/۸۶ برابر کبد نوزاد می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بنزوآلفاپیرین، نوزاد، بالغ، فنوباریتون، DNA

مقدمه

بنزوآلفاپیرین ۷ و ۸-دی‌هیدرودیول ۹ و ۱۰-اپوکسید است (۳،۲۰). سمیت‌زدایی بنزوآلفاپیرین تحت تأثیر آنزیم‌های مرحله II متابولیسم موادشیمیایی خصوصاً از طریق تشکیل کونژوگه‌هایی با گلوکوتایون، اسیدگلوکورونیک و سولفات صورت می‌گیرد (۸،۹،۱۸،۲۵). عوامل متعددی از جمله گونه حیوانی، سن، جنس و غیره در روند فعال‌سازی و غیرفعال کردن این ماده سرطان‌زا دخالت دارند (۱،۲،۳،۴،۵،۱۶،۱۸،۲۳). لذا بررسی بعضی از این عوامل نظیر سن‌برروی اثرات زیستی بنزوآلفاپیرین می‌تواند مکانیزم‌های مقاومت و یا حساسیت موجود نسبت به این ماده را روشن‌تر کند (۱۵،۱۸،۲۴). در این مطالعه میزان اتصال بنزوآلفاپیرین به DNA تیموس گاوی در سیستم‌های حاوی میکروزوم‌های پوست و کبد موش صحرایی ماده نوزاد و بالغ و القاء سیتوکروم‌های P-۴۵۰ موش صحرایی نوزاد با توجه به سن حیوان مورد بررسی قرار گرفته است تا مشخص شود آیا سن بر میزان اتصال بنزوآلفاپیرین به DNA مؤثر است و در صورت تأثیر، علت احتمالی آن تأثیر چیست؟ عملکرد فنوباریتون در رابطه با میزان اتصال در نوزادان موش صحرایی با توجه به القاء سیتوکروم یا سیتوکروم‌های درگیر در اتصال بنزوآلفاپیرین به DNA چگونه است؟ میکروزوم‌های بافت‌های کبد و پوست رات‌ها از نظر میزان فعال‌سازی بنزوآلفاپیرین چه تفاوتی با هم داشته و کدامیک فعال‌ترند؟

بنزوآلفاپیرین یکی از شناخته شده و فراوان‌ترین هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای سرطان‌زای ژنوتوکسیک موجود در محیط می‌باشد (۲،۵،۳۳). این ماده شیمیایی در ایجاد سرطان‌های ریه، کبد، پوست و سایر بافت‌ها در انسان و دیگر حیوانات نقش دارد (۵،۱۶،۲۶). بنزوآلفاپیرین توسط سوخت‌های فسیلی، دخانیات، پالایشگاه‌های نفت، مراکز تصفیه روغن و پارافین و کارخانجات تصفیه قطران وارد محیط شده (۳۱،۳۳) و از راه‌های مختلف وارد بدن می‌گردد (۳،۵). این ماده دارای اثرات جهش‌زایی، سرطان‌زایی، سرکوب‌سیستم‌ایمنی و سمی می‌باشد (۲،۳،۲۰،۳۳). بنزوآلفاپیرین بعد از ورود به سلول تحت تأثیر سیستم آنزیمی موجود در شبکه آندوپلاسمیک به متابولیت‌های حدواسط و نهایی سرطان‌زاد تبدیل می‌شود (۱۳،۱۸،۲۲). تعدادی از آنها تحت تأثیر آنزیم‌های سم‌زدای موجود در سیتوزول، سم‌زدایی شده (۱۵،۲۳،۳۱) و برخی نیز با ورود به هسته سلول در نقاط خاصی به DNA متصل می‌شوند. چنانچه اتصال کووالان متابولیت‌های نهایی سرطان‌زا، موجب مهار فعالیت ژن‌های مهارکننده تومور و تغییر ژن‌های سرطان‌زای اولیه به ژن‌های سرطان‌زای فعال گردد، می‌تواند در نهایت موجب سرطان شود (۱،۲۳،۳۴). مهم‌ترین آنزیم‌های درگیر در فعال‌سازی متابولیک بنزوآلفاپیرین، برخی از آنزیم‌های سیتوکروم P-۴۵۰ میکروزومی می‌باشند (۱۴،۲۹) و متابولیت نهایی،

مواد و روش‌ها

مواد: بنزوآلفاپیرین نشاندار ($[^3\text{H}]\text{B}[\text{P}a\text{H}]$) از شرکت آمرشام (Amersham) خریداری شد و بنزوآلفاپیرین غیرنشاندار، DNA تیموس گاوی، آلبومین سرم گاوی (BSA)، تری کلروآسیتیک اسید (TCA)، دی متیل سولفو کسید (DMSO)، نفتالین، نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید فسفات احیا شده (NADPH)، تولوئن، EDTA، اسید استیک گلاسیال، فنل، کلروفرم، ایزوآمیل الکل، تریس-HCl، اتانول، اسیدسولفوریک و دی اتیل اتر از شرکت سیگما (Sigma) تهیه گردید. ساکارز، کلرورمیزیم، دی فنیل آمین، کلوروسدیم، فنوباربیتون، بتامرکاپتواتانول، کوماسی بریلیانت بلو G-250، اسید فسفریک، فسفات پتاسیم، سدیم دی تیونات، اتیل استات، کلروپتاسیم و دی تیوتریتول از شرکت مرک (Merck) تهیه شد.

در کلیه آزمایش‌ها از موش‌های صحرایی سفید (Rat) نژاد ویستار (Wistar) استفاده گردید. نوزادان ماده (سن 2×9 روز، وزن 3×17 گرم) و بالغ (سن 5×55 روز و وزن 15×200 گرم) از حیوان خانه دانشگاه تربیت مدرس تهیه گردید.

روش‌ها: در سیستم بازسازی شده جهت بررسی

اتصال بنزوآلفاپیرین به DNA تیموس گاوی، از روش Colovai و همکارانش (۹) استفاده شد. نمونه حاوی یک میلی گرم NADPH، ۸۰ نانومول ($[^3\text{H}]\text{B}[\text{P}a\text{H}]$)، ۱/۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم، $\text{pH}=7.4$ و غلظت ۰/۱ مولار، ۰/۵ میلی گرم DNA تیموس گاوی حل شده در ۰/۵ میلی لیتر محلول تریس-EDTA با غلظت ۲۰ میلی مولار و $\text{pH}=7.4$ و ۱ میلی گرم پروتئین میکروزومی بود که به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری و تکان داده شد. DNA به

روش فنل: کلروفرم: ایزوآمیل الکل به نسبت حجمی به ترتیب ۱:۲۴:۲۵ از مخلوط جدا شد و با اتانول مطلق سرد به نسبت ۱ حجم DNA و دو حجم الکل رسوب داده شد (۲۱،۷). برای جداسازی هیدورکربن‌هایی که به طور کووالانت به DNA متصل نشده‌اند، هر نمونه ۳ مرتبه با ۲ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ سرد شسته و در نهایت DNA را در محلول تریس-EDTA حل کرده و غلظت نهایی آن با استفاده از اسپکتروفتومتر Shimadzu U.V ۳۱۰۰ به روش Burton تعیین گردید (۷). رادیو اکتیویته آن با دستگاه بتا کانتر مدل Raok Beta LKB - 1219 تعیین گردید (۹). میکروزوم مورد استفاده در این سیستم با استفاده از روش Riendeau, Leblance, Falguyret تهیه شده بود (۱۲). در این روش ابتدا موش‌ها را با دی اتیل اتر به طور خفیف بیهوش کرده و بلافاصله در روی تشت تشریح پشت آنها راتراشیده و بعد از جدا کردن سر آنها، ابتدا کبد را در بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار ($\text{pH}=7.4$) سرد، حاوی ۰/۲۵ mM ساکارز و ۱/۴ mM بتامرکاپتواتانول، قرار داده و سپس پوست ناحیه پشت را جدا کرده و روی ورقه آلومینیومی سرد در دمای حدود ۴ درجه سانتی گراد توزین کرده و در بافر تریس-HCl ۲۰ میلی مولار، $\text{pH}=7.5$ حاوی ۰/۲۵ mM ساکارز، ۰/۵ mM EDTA، ۰/۱ mM اتیلن گلیکول تتراسیتیک اسید (EGTA)، و ۰/۵ mM دی تیوتریتول سرد (4°C) قرار داده شد. نمونه با استفاده از هموژنایزر برقی (Polytron) هموژنیزه گردید. کبد حیوان توسط کاغذ صافی خشک گردید و بعد از جدا کردن بافت‌های پیوندی، توزین و به بافر انتقال داده شد و با استفاده از هموژنایزر به صورت هموژن در آمد. مخلوط هموژن پوست و کبد در ۱۰۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید. سپس جهت جدا نمودن میکروزوم‌ها، محلول رویی

روش قابل اندازه گیری نبود. جدول ۱ مقادیر به دست آمده میکروزوم های کبد موش ها را نشان می دهد.

جدول ۱: مقدار سیتوکروم P-۴۵۰ در کبد موش نوزاد و بالغ

سن موش بر حسب روز	مقدار سیتوکروم P-۴۵۰ بر حسب nmol/mg protein
۹±۲ (نوزاد)	۰/۱۷۷±۰/۰۵
۵۵±۵ (بالغ)	۰/۵۰۷±۰/۰۸

- در گروه سنی نوزاد به واسطه کم بودن وزن کبد، میانگین ۴ گروه که در دسته های ۳ تایی قرار داده شده بودند، به دست آمده است و در گروه سنی بالغ، میانگین از کبد ۵ موش گزارش شده است.

۲- اثر فنوباریتون بر مقدار تام سیتوکروم P-۴۵۰ و میزان اتصال (PaB) به DNA

محاسبات نشان می دهد که سیتوکروم های P-۴۵۰ کبد موش صحرائی نوزاد توسط فنوباریتون با دوز ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت سه روز به صورت داخل صفاقی، القا نمی گردد و در سیستم اینکوباسیون بازسازی شده نیز که میزان اتصال (PaB) به DNA اندازه گیری شد، اختلاف معنی دار آماری بین گروه کنترل و گروه آزمایش دیده نشد (P) ۰/۰۵ (نمودار ۱). اندازه گیری ها نشان داد که مقدار سیتوکروم های تام کبد موش صحرائی نوزاد در حضور یا عدم حضور فنوباریتون حدود ۰/۸۷×۰/۰۸ نانومول در میلی گرم پروتئین میکروزومی می باشد.

۳- میزان اتصال (PaB) به DNA در موش نوزاد و بالغ

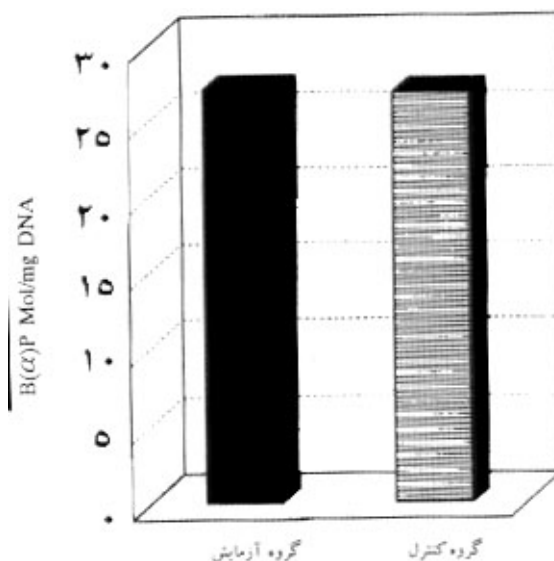
در سیستم اینکوباسیون تحت مطالعه، میزان اتصال بنزوآلفاپیرین به DNA بر حسب پیکومول (PaB) در میلی گرم DNA محاسبه شد. در سیستمی که از میکروزوم های کبد موش صحرائی ماده بالغ استفاده شده بود، میزان اتصال تقریباً ۷/۸۳ برابر سیستم حاوی میکروزوم های کبد موش صحرائی نوزاد، به دست آمد.

حاصل از سانتریفوژ قبلی در ۱۰۰۰۰۰g به مدت ۴۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد با استفاده از سانتریفوژ (مدل sorvall HB2 یخچال دار) سانتریفوژ شد. میکروزوم ها به صورت رسوب در ته لوله جمع شد که بعد از شستشو به صورت همگن در آمد و به ویال انتقال داده شده در ۷۰- الی ۷۴- درجه سانتی گراد نگهداری شد (۱۶،۱۰). غلظت پروتئین آن با استفاده از روش برادفورد (۶) و میزان سیتوکروم های P-۴۵۰ با استفاده از روش Omura & Sato تعیین گردید (۳۲،۲۶). جهت بررسی اثر القایی فنوباریتون بر میزان سیتوکروم های P-۴۵۰ نوزاد موش صحرائی، از محلول استریل فنوباریتون در آب مقطر به میزان ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به طور داخل صفاقی استفاده گردید. تزریق به مدت سه روز در ساعات معین انجام شد (۹،۸،۴). در روز چهارم تمامی موش های نوزاد تحت مطالعه و کنترل، سر بریده شدند و میکروزوم های پوست و کبد آنها خالص سازی گردید. میزان سیتوکروم P-۴۵۰ و اثر آن بر میزان اتصال بنزوآلفاپیرین به DNA بررسی گردید. روش آماری: نتایج حاصله از آزمایش ها با استفاده از آزمون آماری Student't-test و به کارگیری نرم افزار رایانه ای SPSS محاسبه گردید.

نتایج

۱- اثر سن بر میزان تام سیتوکروم P-۴۵۰ در پوست و کبد نتایج حاصل نشان داد که میزان کل سیتوکروم P-۴۵۰ کبد موش صحرائی بالغ تقریباً ۲/۶۸ برابر مقدار آن در میکروزوم های کبد موش صحرائی نوزاد می باشد. مقدار تام سیتوکروم P-۴۵۰ پوست در هر دو گروه سنی با این

نسبت‌های اتصال در سیستم‌های حاوی میکروزوم‌های پوست یا کبد حیوانات نوزاد و بالغ به شرح زیر است:



نمودار ۱: اثر فنوباریتون بر میزان اتصال (PaB) به DNA در کبد موش صحرایی (رات) نوزاد

نسبت اتصال بنزوآلفاپیرین به DNA:

(الف) در پوست بالغ حدوداً ۳/۳ برابر پوست نوزاد

(ب) در کبد بالغ تقریباً ۷/۸۳ برابر کبد نوزاد

(ج) در کبد بالغ تقریباً ۴ برابر پوست بالغ

(د) در کبد نوزاد حدوداً ۱/۵ برابر پوست نوزاد

می‌باشد.

محاسبات نشان داد که میزان اتصال (PaB)

برحسب پیکومول به میلی‌گرم DNA در کبد حیوان بالغ

حدود $۲۰۴/۱۹ \times ۶/۷۵$ ، در کبد نوزاد حدود $۲۶/۸۷ \times ۵/۲۳$ ، در

پوست بالغ $۵۹/۶۵ \times ۶/۳$ ، و در پوست نوزاد حدود

$۱۶/۳۵ \times ۴/۹۲$ می‌باشد.

بحث

گزارش‌های زیادی مبنی بر حساس‌تر بودن حیوان نوزاد نسبت به بالغ در برابر اثرات مواد شیمیایی وجود دارد (۱۶،۱۱،۴). نشان داده شده است که نوزادان موش صحرایی بین ۰/۱ تا ۲۰ برابر نسبت به بالغین در برابر اثرات زیستی و سمی داروها و مواد شیمیایی حساس‌تر و آسیب‌پذیرترند (۳۵،۱۷،۱۶). بنزوآلفاپیرین که از طرق مختلف وارد بدن موجود زنده می‌شود، می‌تواند به متابولیت سرطان‌زای نهایی یعنی بنزوآلفاپیرین ۷ و ۸-دی‌هیدرودیول ۹ و ۱۰-پوکسید تبدیل شود که به DNA متصل می‌شود (۲۴،۲۲،۳،۲). از آن جا که از فرایندهای ترمیم DNA در سلول‌های پستانداران اطلاعات کمی در دست است، این احتمال وجود دارد که تغییراتی که (PaB) در DNA ایجاد می‌کند، به صورت ارثی منتقل شده و این در حالی است که با توجه به عملکرد (PaB)، سطح بحرانی برای سرطان‌زایی این ماده هنوز معین نشده است. این شرایط نشان دهنده اهمیت این ماده در مطالعات سرطان‌زایی می‌باشد (۱۵،۱۳،۱۱). اندازه‌گیری میزان کل سیتوکروم‌های P-۴۵۰ میکروزوم‌های کبد موش صحرایی ماده نوزاد و بالغ پیشنهاد می‌کند که مقدار این آنزیم در موش‌های نوزاد کمتر از موش‌های بالغ است. به طوری که میزان سیتوکروم P-۴۵۰ میکروزوم‌های کبد موش‌های نوزاد ۳۵ درصد موش‌های بالغ است. در این رابطه نتایج ما مؤید نتایجی است که Wang و همکارانش در سال ۱۹۹۵ منتشر کرده‌اند. آنها نشان دادند که مقدار سیتوکروم P-۴۵۰ و نیز فعالیت آن از هفت روزگی شروع به افزایش می‌کند و در روزهای ۵۶ تا ۷۰ به حداکثر مقدار خود می‌رسد (۳۵). باید توجه داشت، انواعی از سیتوکروم‌ها در متابولیسم بنزوآلفاپیرین نقش دارند که ژن آنها به طور مداوم بیان شده و بعضی از آنها به شدت القایی هستند (۱۴). به علاوه آزمایشات متعددی

نشان داده است که سطح سیتوکروم P-450 کبدی تحت تاثیر سن قرار دارد. به طوری که میزان این آنزیم‌ها در اولین ماه زندگی افزایش یافته و در ماه چهارم کاهش می‌یابد و در موش‌های صحرایی پیرتر دوباره افزایش می‌یابد (۲۸). سطح بیان ژن سیتوکروم‌های P-۴۵۰- در بین افراد نیز بسیار متفاوت است. احتمالاً این تفاوت به واسطه تفاوت‌های سنی و نوع بافت می‌باشد (۲۸، ۲۹، ۳۰). مطالعات زیادی نشان داده است که کبد جنین انسان جایگاه فعال سازی ویوترانسفورمسیون داروها، مواد شیمیایی، و مولکول‌های هیدروفوب است. مطالعات زیادی نیز پیشنهاد می‌کنند که سیتوکروم‌های P-450 به طور مستقل تکامل یافته و بنابراین بسیاری از آنها در کبد جنینی حضور نداشته و یا قابل شناسایی نیستند. در این ارتباط سیتوکروم‌های P-450 را می‌توان به سه گروه تقسیم‌بندی کرد:

۱- آنهایی که در زمان جنینی بیان می‌شوند.

۲- آنهایی که در اولین ساعات پس از تولد قابل شناسایی هستند و در دوران جنینی وجود ندارند.

۳- سیتوکروم‌های P-۴۵۰ که در زمان نوزادی به وجود آمده و بعداً تکامل پیدا می‌کند (۱۱، ۱۸، ۲۲). بنابراین عملکرد بهتر سیستم‌های متابولیزه کننده و سم زداینده در بالغین می‌تواند دلیلی بر بیشتر بودن مقاومت آنها نسبت به نوزادان در برابر اثرات سمی بنزوآلفاپیرین باشد. میزان اتصال بنزوآلفاپیرین به DNA بانمونه‌های حاوی میکروزوم‌های پوست و کبد حیوانات نوزاد و بالغ متفاوت است و مقدار اتصال در سیستم اینکوباسیون حاوی میکروزوم‌های پوست و کبد حیوان بالغ نسبت به پوست و کبد نوزاد به ترتیب ۳/۳ و ۷/۸۳ برابر می‌باشد. این در حالی است که پوست نوزاد ۶۷٪ کبد نوزاد اتصال بنزوآلفاپیرین به DNA را القامی کند. در همین

ارتباط Parrish و همکاران با استفاده از برش‌های کبد و کلیه موش ماده گزارش کرده‌اند که بنزوآلفاپیرین باعث افزایش اتصال DNA در کبد می‌شود اما در برش‌های کلیه میزان اتصال را کم می‌کند. در مقابل قدرت اتصال NF-Kappa B به DNA به وسیله بنزوآلفاپیرین در هر دو بافت کلیه و کبد تحت تاثیر قرار نمی‌گیرد. بر این اساس پیشنهاد می‌کنند که مقابله سریع علیه این ماده سرطان‌زا در ارتباط با تغییر بیان چندین ژن مرتبط باشد و Ap-1 بوده و تفاوت خاص ارگانی در متابولیسم بنزوآلفاپیرین وجود دارد (۲۷). همچنین در آزمایشات دیگری نشان داده شده است که میزان فعال شدن هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای در ریه نوزادان موش بیشتر از پوست آنها می‌باشد. این افزایش بسته به روش مطالعه در شرایط مختلف متفاوت بوده است (۱۸، ۱۹). در سال ۱۹۹۴ Kobayashi و همکارانش (۱۷) در بررسی اثر القایی فنوباریتون بر سیتوکروم P-۴۵۰ موش‌های صحرایی نشان دادند که فنوباریتون تنها در موش‌های صحرایی ماده بالغ باعث افزایش سیتوکروم‌های P-۴۵۰ شده است و این ماده شیمیایی بر میزان سیتوکروم P-۴۵۰ موش‌های صحرایی نر بالغ و نیز موش‌های نوزاد ماده و نر اثر القایی ندارد. آزمایش اخیر نیز نشان می‌دهد که فنوباریتون در موش صحرایی ماده نوزاد اثر معنی‌داری در افزایش مقدار سیتوکروم P-۴۵۰ نداشته و باعث القا آن نشده است که با نتایج Plewka و همکارانش همخوانی ندارد. آنها گزارش کردند که فنوباریتون و بتانفتوفلاون در اولین ماه زندگی موجب القای سیتوکروم P-۴۵۰ می‌شود، در حالی که در چهارمین ماه زندگی مقدار این آنزیم‌ها کاهش می‌یابد (۲۸). در مقابل گزارش شده است که میزان این هموپروتئین به وسیله فنوباریتون و بتانفتوفلاون در تمامی سنین خصوصاً در

ضروری است. به علاوه بررسی نقش کلیه و سایر سیستم‌های دخیل در متابولیسم داروها در نوزاد و بالغ، از طریق *in vivo* نیز امکان پذیر است.

Summary

Metabolic Activation and DNA Adduct Formation of Benzo(a) Pyrene by Adult and Newborn Rat Skin and Liver Microsomes

M. Mohammadi Qanatghestani, MS¹; AA. Allameh, PhD²; and MR. Noori Dalooi, PhD³

1. Instructor of Medical School, Kerman University of Medical Sciences and Health Services, Kerman, Iran

2. Assistant Professor of Clinical Biochemistry, Tarbiat Moddaress University, Tehran, Iran

3. Associate Professor of Medical Generics, Tehran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran

Benzo (a) Pyrene is a carcinogen polycyclic aromatic hydrocarbon which diffuses into the environment from combustion of organic materials. Based on various epidemiological evidences it is related to lung, skin and liver cancer. Mutagenicity, and immunosuppressivity are among important biological effects of Benzo (a) pyrene. After absorption and distribution in the body, it undergoes epoxidation by cytochrome P-450 system in the cells. Some of the electrophilic metabolites covalently bind to cellular macromolecules and in particular to DNA. Its metabolites are partially detoxified by conjugation to cellular glutathione (GSH), glucuronic acid, and sulphate. Biological effects of B(a)P and its metabolites depend on various factors such as species, age, sex, tissue, diet, dose, genetic system, etc. The fundamental physiological differences between newborns and adults are variations in susceptibility to chemical carcinogens observed between the two age groups. In this paper we studied the level of binding of B(a)P to calf thymus DNA and formation of DNA adduct in the incubation systems which contained adult and newborn rat liver and skin microsomes. Results indicate that in both age groups liver microsomes in comparison to skin microsomes cause a higher increase in the level of DNA adduct and the ratio of DNA adduct in the liver of adults compared to animal skin was 4.2 to 1. The quantity of adduct in the incubation systems containing liver microsomes of newborn was 1.51 higher than that of skin microsomes. Moreover phenobarbiton failed to induce cytochrome P-450 and any increase in DNA

حیوانات جوان افزایش می‌یابد (۱۱، ۳۰) و تفاوت وابسته به جنس در فعالیت‌های سیتوکروم‌ها و واکنش آنها نسبت به zonorone وجود دارد. به طوری که اثر القایی این ماده در موش‌های مذکر حدود ۱/۳ و در موش‌های مؤنث حدود ۲/۹-۱/۲ بیشتر از فنوباربتون است (۳۰). باید توجه داشت گرچه مقدار کل سیتوکروم‌های P-450 القاء شده با فنوباربتون را نمی‌توان به طور مستقیم با میزان متابولیسم بنزوآلفاپیرین مرتبط دانست اما این ماده القاء کننده با دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن قادر به القاء کل سیتوکروم‌ها نیست زیرا مقدار تام این آنزیم‌ها در گروه‌های کنترل و تحت مطالعه از نظر آماری با یکدیگر تفاوتی نداشت. همچنین فنوباربتون با شرایط طراحی شده در تحقیق قادر به القاء سیتوکروم‌های خاص در گیر در متابولیسم بنزوآلفاپیرین نمی‌باشد زیرا محاسبات نشان داد که مقادیر DNA adduct (DNA متصل به ماده سرطان‌زا) در گروه کنترل از نظر آماری با گروه تحت درمان تفاوتی ندارد (۱۴، ۱۵). با توجه به نتایج حاصل از مطالعه حاضر در اندازه‌گیری میزان سیتوکروم P-۴۵۰ کبد نوزاد و بالغ، بررسی اثر فنوباربتون بر میزان سیتوکروم P-۴۵۰ و اتصال بنزوآلفاپیرین به DNA در خارج از بدن پیشنهاد می‌کند که احتمالاً میزان فعال‌سازی متابولیک بنزوآلفاپیرین در شرایط *in vitro* در نوزاد کمتر از بالغ می‌باشد و دلیلی بر نقص فعال‌سازی متابولیک (PaB) و نیز سم زدایی این ماده در پوست و کبد موش‌های نوزاد است. با توجه به شواهدی که در مورد وضعیت نوزاد نسبت به بالغ وجود دارد، صرفاً با آزمایش‌های *in vitro* نمی‌توان میزان حساسیت یا مقاومت نوزاد را نسبت به بالغ تعیین کرد و برای ارزیابی وضعیت سیستم متابولیسم کننده کبد و پوست، انجام آزمایش‌های مستقیم با استفاده از کل حیوان

Key Words: Benzo(a) pyrene, DNA, Newborn, Adult, Phenobarbiton

References

1. Alexandrov K and Rojas Moreno M. *In vivo* DNA adduct formation by benzo(a) pyrene in mouse and rat epidermal and dermal fibroblasts after topical application of an initiating dose of benzo(a)pyrene. *Arch Geschwulstforsch* 1990; 60(5): 329-340.
2. Arce GT, Allen JW, Doerr CL, et al. Relationships between B(a) P-DNA adduct levels and genotoxic effects in mammalian cells. *Cancer Res* 1987; 47(13): 3388-3395.
3. Bartsch H. DNA adducts in human carcinogenesis: etiological relevance and structure-activity relationship. *Mutat Res* 1996; 340(2-3): 67-79.
4. Behroozikha M, Saidee M and Allameh A. Comparison of aflatoxin B1-DNA binding and glutathione conjugate formation by liver preparations from rats of different ages. *Cancer Lett* 1992; 66(1): 69-76.
5. Bluhm C. Effects of smoking on benzo (alpha) pyrene and Glutathione- metabolizing enzymes in human lung tissue. *Klin Wochenschr* 1991; 69(18): 819-824.
6. 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.
7. Burton K. A study of the conditions and mechanism of diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of DNA. *Biochem J* 1956; 62: 315-323.
8. Cohen MB, Berenbaum MR and Schuler MA. Induction of cytochrome P450 -mediated detoxification of xanthotoxin in the Black Swallowtail. *J Chem Ecol* 1989; 15(9): 2347-2355.
9. Colovai AL, Herdan J, Popovici C, et al. *In vitro* inhibition of DNA adduct formation by hindered hydroquinols and quinones. *Carcinogenesis* 1993; 14(6): 1137-1141.
10. Coon MJ et al. Highly purification liver microsomal cytochrome P-450 properties and catalytic mechanism. *Cro Chem Acta* 1977; 49: 163-168.
11. Cresteil T. Onset of xenobiotic metabolism in children: toxicological implications. *Food Addit Contam* 1998; 15(suppl): 45-51.
12. Falguyret JP, Leblanc Y and Riendeau D. Stereoselective carbonyl reductases from rat skin and leukocyte microsomes converting 12-ketoicosatetraenoic acid to 12(S)-HETE. *FEBS Lett* 1990; 262(2): 197-200.
13. Gonzalez FJ and Gelboin HV. Role of human Cytochromes P-450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metab Rev* 1994; 26(1-2): 165-183.
14. Hall M, Forrester LM, Parker DK, Grover PL and Wolf CR. Relative contribution of various forms of cytochrome P450 to the metabolism of B(a)P by human liver microsomes. *Carcinogenesis* 1989; 10(10): 1815-1821.
15. Jeffrey AM, Grzeskowiak K, Weinspein IB, Nakanishi K, Roller P and Harvey RG. Benzo alfa pyrene-7, 8-dihydrodiol-9, 10-oxyladenosine and deoxyadenosine adducts: Structure and stereochemistry. *Science (wash. D.C.)* 1979; 206: 1309-1311.
16. Kaddouri M, Larrieu G, Eeckhoutte C and Galtier P. Comparison of hepatic drug metabolizing enzymes in threemonth-old lambs and kids. *Comp Biochem Physiol C Comp Pharmacol Toxicol* 1990; 96(1): 111-114.
17. Kobayashi Y, Yoshida T, Kotani E, et al. 1994. Involvement of testosterone in the induction of hepatic microsomal cytochrome P-450 2B1/2 by 1-benzyl-imidazole in male and female rats; sex-differentiated induction of P-450 2B1/2 species. *Biochem Biophys Acta* 1994; 1200(1): 8-11.
18. Leakey JA, Cunny HC, Bazare J Jr, et al. Effects of aging and caloric restriction on hepatic drug metabolizing enzymes in the Fischer 344 rat. II: Effects on conjugating enzymes. *Mech ageing Dev* 1989; 48(2): 157-166.
19. Lu AYH and West SB. Multiplicity of mammalian microsomal cytochromes P-450. *Pharmacol Rev* 1980; 31: 277-295.
20. Magee PN. Molecular mechanisms of chemical carcinogenesis. *Alleg Pathol* 1975; 6: 329-419.
21. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol* 1961; 3: 208-218.
22. Melikian AA, Prahald KA, Amin S and Hecht SS. Comparative DNA binding of PAHs and their dihydrodiol and bay region diolepoxide metabolites in newborn mouse lung and liver. *Carcinogenesis* 1991; 12(9): 1665-1670.

adduct level of B(a)P in the newborns rat. The level of cytochrome P-450 in adults liver was 2.86 times higher than that in newborns' liver.

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2000; 7(3): 137-144

23. Miller JA. Carcinogenesis by chemicals: An overview G.H.A. Clowes Memorial lecture. *Cancer Res* 1970; 30: 559-576.
24. Miller EC. Some current perspectives on chemical carcinogenesis in humans and experimental animals: presidential address. *Cancer Res* 1978; 38(6): 1479-1496.
25. Nomatan N. Glutathione, glucuronide and sulfate transferase in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism. In: Gelboin, HV and TSO pp, (Eds). polycyclic hydrocarbons and cancer, New York, Academic press, 1981; pp213-258.
26. Omura T and Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its heme protein nature. *J Biol Chem* 1964; 239: 2370-2378.
27. Parrish AR, Fisher R, Bral CM, *et al.* Benzo(a) Pyrene-induced alterations in growth-related gene expression and signaling in precision-cut adult rat liver and kidney slices. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; 152(2): 302-308.
28. Plewka A, Plewka D and Kaminski M. Induced modifications of liver cytochrome P-450 levels as a function of age in rats. *Postepy Hig Med Dosw* 1994; 48(4): 457-470.
29. Prough RA, Sipal Z, Jakobsson SW. Metabolism of B(a)P by human lung microsomal fractions. *Life Sci* 1977; 21: 1629-1636.
30. Roberts AE, Ritz MA, Hoekstra S, Descotes G and Hincks JR. Induction of liver cytochrome p450 (CYP) 3A in male and female rats by a steroidal androgen receptor antagonist, zanoterone. *J Biochem Toxicol* 1996; 11(3): 101-110.
31. Santella RM, Perera FP, Young TL, *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA and protein adducts in coal tar treated patients and controls and their relationship to glutathione S-transferase genotype. *Mutat Res* 1995; 334(2): 117-124.
32. Sato R and Omura T: Cytochrome P-450. New York, Academic press, 1978; pp1092-1098.
33. Schut HAJ and Shiverick KT. DNA adducts in humans as dosimeters of exposure to environmental, occupational, or dietary genotoxins. *FASEB J* 1992; 6(11): 2942-2951
34. Shimada T, Iwasaki M, Martin MV and Guengerich FP. Human Liver microsomal cytochrome P-450 enzymes involved in the bioactivation of procarcinogens detected by *umugene* response in salmonella typhimurium, TA 1535/pSK 1002. *Cancer Res* 1989; 49:3218-3228.
35. Wang NP, Zang LQ, Huang RB and Meng ZQ. Determination of age-related changes of cytochrome P-450 sensitive to mepyramine in rat hepatic microsomes. *Yao Hsueh Hsueh Pao* 1995; 30(10):726-730.