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 علوم آزمایشگاهی، دوره چهارم(شماره1) بهار و تابستان 1389

تحقیقی

میزان آسیب اکسیداتیو به DNA بافت معده در افراد سیگاری و غیرسیگاری با علائم سوء هاضمه

همایون دولتخواه
مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

محمدحسن صومی
مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

ابراهیم فتاحی
مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

رسول استخری
مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

ندا دولتخواه
مرکز آموزشی درمانی طالقانی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

احمد میرزاآقازاده
گروه علوم پایه، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

منوچهر نورآذریان
آزمایشگاههای بالینی، مرکز آموزشی، تحقیقاتی و درمانی امام رضا(ع) تبریز

بهروز پوراصغری
آزمایشگاههای بالینی، مرکز آموزشی، تحقیقاتی و درمانی امام رضا(ع) تبریز

نویسنده مسئول: همایون دولتخواه
تلفن : 09143117197
پست الکترونیک:
dolatkhahh@gmail.com

آدرس:تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد

وصول مقاله:89/2/14
اصلاح نهایی:89/11/18
پذیرش مقاله:89/11/24

چکیده

زمینه و هدف *: استعمال دخانیات با افزایش خطر ابتلا به زخم معده و سرطان دستگاه گوارش همراه است. موّاد سمّی موجود در دود و قطران سیگار در تولید ترکیبات سرطان زا ، صدمه به DNA و تکثیر سلولی در سرطان معده بسیار موثرند. بدین منظور ما در این مطالعه میزان آسیب به DNA در بافت معده افراد سیگاری و غیرسیگاری مبتلا به زخم پپتیک فعال مورد مطالعه قرار دادیم.*

روش بررسی*: در این مطالعه که از نوع مورد-شاهدی بود، از افراد مراجعه کننده به کلینیک گوارش دانشگاه ، 43 بیمار سیگاری با زخم پپتیک فعال (14 نفر مرد و 29 نفر زن) با میانگین سنی 13/16 ± 45/30 سال به عنوان گروه مورد ، 43 فرد غیرسیگاری بدون زخم پپتیک (13 نفر مرد و 30 نفر زن) با میانگین سنی 16/04 ± 42/67 سال بعنوان گروه کنترل یک ، 43 فرد سیگاری بدون زخم پپتیک (16 نفر مرد و 27 نفرزن) با میانگین سنی 12/07 ± 44/58 سال بعنوان گروه کنترل دو و 43 فرد غیرسیگاری با زخم پپتیک فعال (20 نفر زن و 23 نفرمرد) با میانگین سنی 13/39 ± 45/37 سال بعنوان گروه کنترل سه انتخاب شدند . میزان آسیب به DNA بافت معده در چهار گروه به روش کالریمتری اندازه گیری شد.*

یافته‌ها*: میانگین میزان آسیب به DNA در گروه موردیا افراد سیگاری با زخم پپتیک فعال ٥/٥٤±28/05 و در گروه کنترل یک 4/82 ± 11/8 AP در هر 100000 جفت باز میباشد و بیش از بقیه گروهها است. این تفاوت از نظر آماری با $p< 0/0001$ معنی دار میباشد. در صورتی که این میانگین مابین گروههای کنترل یک، دو و سه تفاوت معنی داری نداشت .*

نتیجه گیری*: نتایج این مطالعه نشان می دهد که بین مصرف سیگار و آسیب اکسیداتیو DNA ارتباط وجود دارد که ممکن است ناشی از ترکیبات سمی موجود در دود و قطران سیگار باشد. درک این مسئله نیاز به مطالعات بیشتر دارد.*

واژه های کلیدی *: آسیب به DNA ، استعمال دخانیات، سوء هاضمه*

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

مقدمه

استعمال دخانیات را تا سال 2002 به طور کامل، یکی از عوامل خطر زای موثر برای بیماری ها و کانسر دستگاه گوارش نمی شناختند(1). در این سال برخی از محققان نشان دادند که کشیدن سیگار با یک افزایش خطر ابتلاء به زخم معده و سرطان دستگاه گوارش در موش های آزمایشگاهی همراه است که این امر با خوراندن مزمن نیکوتین به موشها مشاهده شد(3-2). نیکوتین اصلی ترین ترکیب سمّی و مخرّب سیگار می باشد که باعث طیف وسیعی از گرفتاریهای کمپلکس در بدن انسان می شود(4).

از طرفی استرس در افراد با کشیدن سیگار همراه است و گزارش شده که استعمال دخانیات به ایجاد یک احساس آرامش در زمان استرس کمک می نماید. این امر شاید یک احساس روانشناختی باشد که فرد زمان بروز استرس به کشیدن سیگار تمایل پیدا می کند. با وجودی که کشیدن سیگار باعث تشدید و افزایش میزان استرس می شود. بنابر این به مرور زمان چرخه معیوب و فاسد استرس و استعمال دخانیات دائمی خواهد شد(5). در مطالعه ای که توسّط لیندل و همکارانش در سال 1997 بر روی موشها انجام شد، معلوم گردید که انباشته شدن نیکوتین در شیره معده باعث تحریک سیستم عصبی مرکزی و تشدید استرس اکسیداتیو در دستگاه گوارش این حیوانات می شود و گزارش شد که اثر متقابل بین استرس و نیکوتین در آنها باعث تشدید زخم معده می گردد(6).

پروستاگلاندین موکوس معده ، نیتریک اکساید و سایر ترکیبات موکوس چسبنده معده در سالم ماندن بافت معده شرکت می کنند(7و5). درصورتیکه گزارش شده که در استرس ایجاد شده در اثر نیکوتین در معده ، نوتروفیلها در دیواره معده رخنه می کنند که این امر عمل زخم شوندگی دیواره معده را افزایش می دهد(8).

مطالعات اپیدمیولوژیکی نشان داده است که استعمال دخانیات یک عامل اصلی در ایجاد بدخیمی ها در بافت های مختلف بدن انسان است(9). اگرچه مکانیسم های دقیقی در خصوص ارتباط مابین کشیدن سیگار و بروز و تسهیل سرطان، هنوز به اثبات نرسیده است ولی این مطلب واضح و مبرهن است که دود تنباکو حاوی بیش از 3800 نوع مختلف از مواد سمی، سرطانزاهای مختص تنباکو ، کارسینوژن ها و پیش برنده های توموری می باشد (10)که از آن جمله به هیدروکربن های آروماتیک چندحلقه ای، آمین های آروماتیک(11) و نیتروزآمین های مختص تنباکو (12) واز ترکیبات سمی به فرمآلدئید، استآلدئید، آکرولئین (13)، رادیکالهای با عمرکوتاه و گونه های اکسیژن فعّال که بوسیله چرخه اکسیداسیون و احیاء کاتکول و هیدروکوئینون تولید می شود(14) می توان اشاره کرد.

به ازای هرنخ سیگار، دودی که به تازگی تولید شده است، دارای بیش از 600 میکروگرم رادیکال نیتریک اکساید ($NO^{\cdot}$) در فاز گازی آن است. غلظت $NO^{\cdot}$ در داخل دودسیگار با میزان نیترات موجود دریک نخ سیگار ارتباط خطی متقابل دارد (11و10).

از طرفی گزارش شده که قطران سیگار دارای مقادیر بالایی از ترکیباتی مانند: گونه های اکسیژن فعّال(14)، پراکسی نیتریت (15) و عوامل اتیله کننده (16) می باشد که باعث آسیب مستقیم به مولکول DNA می گردد(10). گونه های رادیکالی اصلی که به شکل کمپلکس کوئینون و هیدروکینون (Q/QH2) دریک ماتریکس قطرانی حفظ شده اند (17)، یک سیستم اکسیداسیون-احیای فعال است که می تواند اکسیژن مولکولی را در جهت تولید رادیکال سوپراکسید ($O_2^{\cdot}$) کاهش دهدکه متعاقب آن پراکسید هیدروژن ($H_2O_2^0$) و رادیکال هیدروکسیل ($HO^{\cdot}$) نیزتشکیل خواهد شد(10). از طرفی نشان داده شده است که دود سیگار باعث تخریب و آسیب در زنجیره تک رشته ای DNA حاصل از سلول های کشت یافته انسان و جوندگان می شود(19و18). همچنین نشان داده شده که عصاره قطران تنباکو تخریب و آسیب را در مولکول DNA مارپیچی باکتریوفاژ ایجاد می کند(20). ازاین رو تصور می شود که این آسیب در مولکول DNA توسّط گونه های فعّال اکسیژن مانند: $O_2^{\cdot}$، $H_2O_2^0$ و $HO^{\cdot}$ ایجاد شده باشد. اخیراً به اثبات رسیده که فازگازی دود

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

سیگار به عنوان اصلی ترین عامل آسیب رشته ای و تغییرات بازی (ازجمله تشکیل گزانتین و هیپوگزانتین) در مولکول DNA در سلولهای پوششی دستگاه تنفسی در انسان می باشد (21) که نشان دهنده این امر می باشد که گونه های فعّال نیتروژن نیز ممکن است در القای آسیب به مولکول DNA نقش داشته باشد. بااین وجود تاکنون هیچگونه مطالعه ای روی آسیب های ناشی از دود سیگار به مولکول DNA با استفاده توام از محصولات فاز گازی و عصاره قطران تنباکو صورت نگرفته است.

به همین منظور، ما دراین مطالعه ضمن بررسی آندوسکوپی بافت معده و زخم های ناشی از استعمال دخانیات در این بافت، میزان آسیب به DNA را در بافت معده در افراد سیگاری مبتلا به سوء هاضمه در مقایسه با گروههای کنترل بررسی و مقایسه نمودیم.

روش بررسی

بیمارانی که با داشتن علائم سوء هاضمه به پزشک متخصّص گوارش مراجعه کرده بودند و اندیکایسون علمی برای اندوسکوپی داشتند به بخش اندوسکوپی مرکز آموزشی درمانی امام رضا(ع)تبریز ارجاع شده ، از نظر استعمال دخانیات بررسی و در دو گروه سیگاری و غیرسیگاری تقسیم شدند. وجود علائم بالینی قسمت فوقانی دستگاه گوارش (درد اپی گاستر، سوزش سردل، تهوع، کم اشتهایی، زودسیر شدن) که بعداز انجام آندوسکوپی، ضایعه ای در مری، معده و اثنی عشر مشاهده نشود، بعنوان سوء هاضمه تلقی گردید و در صورت رضایت و موافقت بیماران در این مطالعه وارد می شوند. برای این افراد بررسی از نظر ابتلا به سایر بیماریها نظیر کانسر معده، مصرف داروهای آنتی اکسیدانت و داروهای آنتی اسید و داروهائی نظیر بیسموت و سایر مواردی که در مطالعه ما اثرات کاذب ایجاد می نماید ، انجام می شد و در صورت مثبت بودن موارد فوق از مطالعه حذف می شدند .

طبق روال معمول آندوسکوپی بیماران انتخاب شده از نظر وجود یا عدم وجود زخم پپتیک فعال مورد ارزیابی قرار گرفتند و چهار گروه مورد نظر این مطالعه انتخاب شدند. لازم به توضیح اینکه تشخیص قطعی زخم معده منحصراً با انجام آندوسکوپی صورت می گیرد. از هر فرد ابتدا در شرایط ناشتا 2 نمونه بیوپسی از آنتروم و تنه معده اخذ شد. یکی از این نمونه ها برای تست سریع اوره آز (یکساعته) استفاده شد که یک تست سریع برای تشخیص وجود یا عدم وجود هلیکوباکترپیلوری است که نتیجه آن با درنظر گرفتن گروه مربوطه در فرم ثبت گردید .سپس، این نمونه برای تایید پاتولوژیکی وجود یا عدم وجود هلیکوباکترپیلوری به بخش پاتولوژی مرکز آموزشی درمانی امام(ره) ارجاع داده شد (اصولاً در مواردی که هردو تست اوره آز و بررسی پاتولوژیکی بیمار منفی باشند، از نظر هلیکوباکترپیاوری منفی خواهند بود. درصورتی که یکی از این تست ها مثبت باشد، نمونه مثبت تلقّی می شود). نمونه دوّم بیوپسی معده جهت آزمایش آسیب به DNA به فریزر 70- درجه سیلیسوس منتقل می گردید. در مطالعه حاضر ما افراد سیگاری را که مبتلا به زخم معده هستند تحت عنوان گروه مورد(گروه یک) بررسی نمودیم و با سه گروه کنترل یعنی افراد غیرسیگاری و مبتلا به زخم معده (گروه دو)، افراد سیگاری و بدون زخم پپتیک فعال (گروه سه) و افراد غیرسیگاری و بدون زخم پپتیک فعال (گروه چهار)، چه از نظر سن و جنس و چه از نظر سابقه بیماری و سطح درآمد و ... یکسان سازی شدند تا بدین نحو مطالعه حاضر قابل تعمیم به کلیه افراد سیگاری باشد. نمونه های بیوپسی گرفته شده از بافت معده، در دستگاه هموژنایزر با 1/5 میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات مطابق روش ناگاهاشی و همکاران کاملاً هموژنیزه شدند (20). این بافر متشکل از 10 میلی مول پتاسیم فسفات باضافه 30 میلی مول پتاسیم کلرید می باشد. اندازه گیری میزان آسیب به DNA در بیوپسی معده توسط کیت Oxidative DNA Damage ساخت کمپانی Kimiya Biomedical انجام شد که یک روش کالریمتری است و قابلیت اندازه گیری 1 تا 40 جایگاه AP از هر 1×10^5 bp را دارد.

آنالیز آماری مقادیر به دست آمده از آزمایشهای فوق با نرم افزار SPSS نسخه 13 با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه

(one-way ANOVA) و مقایسه های چندگانه (Tukey HSD) انجام شد.

یافته ها

دراین مطالعه کلاً 172 نفر مورد بررسی قرار گرفتند که 50% آنها افراد سیگاری و 50% غیرسیگاری بودند که هرکدام از آنها نیز خود به دوگروه تقسیم شدند. 50% از 86 نفر سیگاری دارای زخم پپتیک فعال بوده (گروه مورد)و 50% از آنها فاقد زخم معده بودند(گروه کنترل یک). به همین ترتیب 50% از 86 نفر غیرسیگاری دارای زخم پپتیک فعال بوده (گروه کنترل دو)و 50% بقیه سالم از نظر زخم پپتیک فعال بودند(گروه کنترل سه). گروه مورد 29 نفرمرد (67/5 %)و 14 نفر زن (32/5 %) ، گروه کنترل یک 30 نفر مرد (69/8 %) و 13 نفر زن (30/2%)، گروه کنترل دو 27نفر مرد (62/8 %) و 16 نفرزن (37/2 %)، گروه کنترل سه 23 نفر مرد (53/5 %) و 20نفر زن (46/5 %) بودند. میانگین سنی گروههای کنترل یک، دو و سه با گروه مورد از نظر آماری تفاوت معنی داری نداشتند. به عبارت بهتر یکسان سازی گروه مورد از نظر سن با سه گروه کنترل، به خوبی انجام شده بود.

همانطوری که درجدول و نمودار زیر مشاهده می شود، با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه تفاوت معنی داری بین میانگین گروههای چهارگانه مشاهده می شود. توضیح اینکه با استفاده از مقایسه های چندگانه (آزمون Tukey HSD) مشخص گردید که در گروه مورد یا افراد سیگاری با زخم پپتیک فعّال میزان آسیب به DNA بافت معده درمقایسه با گروههای کنترل از نظر آماری تفاوت معنی داری دارند. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده اند (درهمه موارد$p< 0/0001$).

بحث

روابط قوی اپیدمیولوژیکی میان استعمال دخانیات و افزایش خطر ابتلا به انواع سرطانها در کنار مطالعات تجربی مختلف نشان داده اند که ترکیبات سمی موجود در دود و قطران سیگار باعث ایجاد اثرات سرطانزایی در سلولهای هدف خواهند شد(23و22). در مطالعه حاضر، آسیب به DNA بافت معده در نتیجه دود و قطران سیگار با اندازه گیری جایگاههای AP آشکار شدند. همانطوری که در نتایج ملاحظه می نمایید، جایگاههای AP در گروه مورد یا افراد سیگاری با زخم پپتیک فعال نسبت به سه گروه کنترل دارای افزایش معنی داری بود (درهمه موارد $P< 0/0001$). و این افزایش به طور مستقیم با ترکیبات سمی موجود در دود و قطران سیگار علی الخصوص رادیکال $NO^{\cdot}$ مرتبط. همانطورکه در مقدمه نیز ذکر شد، نیتریک اکساید در فاز گازی دود تنباکو بسیار غلیظ است(12و10). همچنین نیتریک اکساید ممکن است در بدن انسان از آنزیم نیتریک اکسایدسنتاز در بافتهای مختلف نظیر ریه ها، اندوتلیال عروق و بافت معده تولید شود (24). ازطرفی در شیره معده نیتریک اکساید از طریق احیای غیرآنزیمی نیتریت ناشی از بزاق و غذا بوجود می آید (26و25). بنابراین در افراد سیگاری نیتریک اکساید با غلظت بالایی که در شیره معده دارد، می تواند مستقیماً با ترکیبات پلی هیدروکسی آروماتیک موجود در قطران سیگار برای تولید پراکسی نیتریت واکنش دهد که این مطلب قبلاً توسط افراد دیگری گزارش شده بود. بعنوان مثال نورمن و همکارانش(15)، تشکیل پراکسی نیتریت (یک عامل شناخته شده آسیب به DNA) را در دود سیگار نشان دادند. ماتسوکورا و همکارانش (27)گزارشی در مورد اثرات مستقیم سمی و جهش زای دود سیگار متراکم ارائه دادند. پری واست و شوکریک عامل اتیله کننده با اثر مستقیم بر روی سلولها و DNA آنها را در دود تنباکو توصیف نمودند که مقادیر بالای 3-اتیل-آدنین دفع شده در ادرار افراد سیگاری را با این عامل اتیله کننده می توان توضیح داد(16). ازطرفی درمطالعه ای که توسط یانگ و همکارانش صورت گرفته بود، حضور رادیکالهای آزاد با عمرکوتاه و ترکیبات آزاد کننده گونه های فعال اکسیژن در دود سیگار را تایید نمودند(14). چون واسطه های اکسیژن فعال مشتق از دود سیگار نیز یکی از عوامل آسیب به DNA درسلول های مختلف می باشد. از نتایج به دست آمده در این مطالعه می توان اینگونه نتیجه گیری کرد که استعمال دخانیات در نزد انسان ، بواسطه ترکیبات موجود در دود و

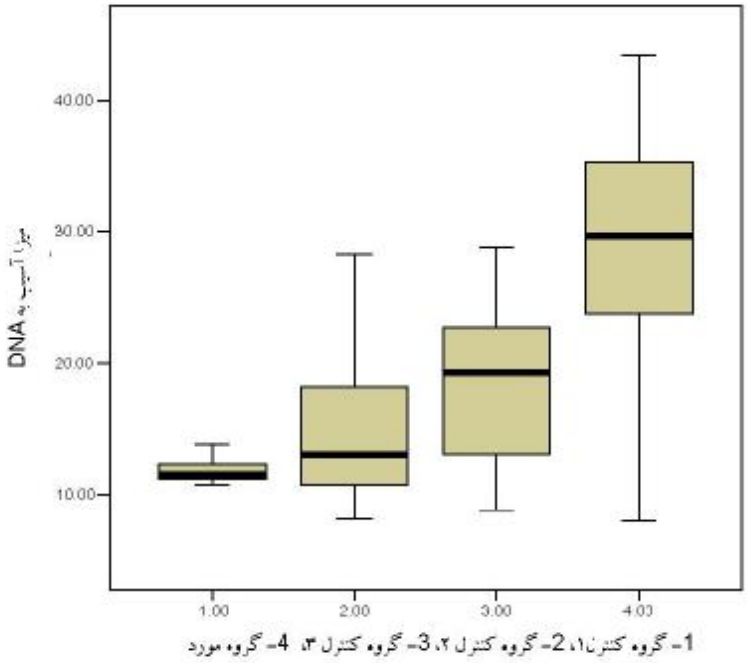
قطران سیگار ، از طریق فعال سازی چرخه اکسیداسیون-احیاء باعث شروع آسیب به DNA در سلولها و متعاقب آن افزایش خطر ابتلا به بدخیمی ها در این بافت خواهد شد.

تشکرو قدردانی

بدین وسیله از زحمات بی شائبه کلیه همکاران محترم مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، گروه بیوشیمی و آزمایشگاههای بالینی دانشکده پزشکی، بخش آندوسکوپی و آزمایشگاههای بالینی بیمارستان امام رضا (ع) که ما را در انجام و به اتمام رساندن این مطالعه یاری نمودند، نهایت تشکر و سپاس را داریم.

جدول1. مقایسه میانگین میزان آسیب به DNA بافت معده در چهار گروه مورد مطالعه

میزان آسیب به DNA / گروهها	تعداد	میانگین و انحراف معیار AP در هر 100,000 bp	f	p-value
گروه کنترل یک (افرادغیرسیگاری بدون زخم پپتیک فعال)	43	11/80 ± 4/82	56/42	<0/0001
گروه کنترل دو(افراد سیگاری بدون زخم پپتیک فعال)	43	14/90 ± 5/22		
گروه کنترل سه (افراد غیرسیگاری با زخم پپتیک فعال)	43	18/61 ± 5/67		
گروه مورد (افراد سیگاری با زخم پپتیک فعال)	43	28/05 ± 5/54		



نمودار1. توزیع پراکندگی میزان آسیب به DNA بافت معده در چهارگروه مورد مطالعه

References

1- Yoshida S, Kozu T, Gotoda T, Saito D .*Detection and treatment of early cancer in high-risk populations***.** Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2006;20(4):745-765.

2- González CA, Pera G, Agudo A, Palli D, Krogh V, Vineis P, etal. *Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC).* Int J Cancer. 2003; 107(4): 629-634.

3- Koizumi Y, Tsubono Y, Nakaya N, Kuriyama S, Shibuya D, Matsuoka H, etal. *Cigarette smoking and the risk of gastric cancer: a pooled analysis of two prospective studies in Japan.* Int J Cancer. 2004; 112(6):1049-1055.

4- Benowitz NL. *Clinical pharmacology of nicotine.* Annual Review of Medicine, 1986; 37(1): 21-32.

5- Qui BS, Mei QB, Liu L, Tchou-Wong KM. *Effect of nitric oxide on gastric ulceration induced by nicotine and cold-restraint stress*. World J Gastroenterol, 2004; 10(4): 594-597.

6- Lindell G, Bukhave K, Lilja I, Madsen JR, Graffner H . *Acute effects of high-dose intragastric nicotine on mucosal defense mechanisms: an analysis of nicotine, prostaglandin E2, phospholipase A2, and phospholipids*. Dig Dis Sci. 1997;42(3):640-644.

7- Qiu BS, Pfeiffer CJ, Cho CH . *Effect of chronic nitric oxide synthase inhibition in cold-restraint and ethanol-induced gastric mucosal damage in rats.* Digestion. 1996; 57(1): 60-66.

8- Nishida K, Ohta Y, Kobayashi T, Ishiguro I. *Involvement of the xanthine-xanthine oxidase system and neutrophils in the development of acute gastric mucosal lesions in rats with water immersion restraint stress.* Digestion. 1997;58(4):340-351.

9- Parkin DM, Pisani P, Lopez AD , Masuyer E. *At least one in seven case of cancer is caused by smoking. Global estimates for 1985*. Int. J. Cancer. 1994; 59(1): 494-504.

10- Yoshi Y , Ohshima. *Synergistic inductions of DNA strand breakage by cigarette tar and nitric oxide.* Carcinogenesis. 1997; 18(7): 1359-1363.

11- Brunnemann KD, Hoffmann D. *Pyrolytic origins of major gas phase constituents of cigarette smoking.* Recent Adv Tob Sci. 1982; 8(1):103-104.

12- Norman V, Ihrig AM, Larson TM , Moss BL. *The effect of some nitrogenous blend componets on NO/NOX and HCN levels in mainstream and sidestream smoke.* Beitr Tabakforsch. 1983; 12(1): 55-62.

13- Eisenbrand G, Schuhmacher J , Golzer P. *The influence of glutathione and detoxifying enzymes on DNA damage induced by 2-alkenals in primary rat hepatocytes and human lymphoblastoid cells*. Chem Res Toxicol.1995; 8(2): 40-46.

14-Yang Q, Hergenhahn M, Weninger A, Bartsch H . *Cigarette smoke induces direct DNA damage in the human* B-lymphoid cell line Raji. Carcinogenesis. 1999;20(9):1769-1775.

15- Muller T, Haussmann HJ, Schepers G. *Evidence for peroxynitrite as an oxidative stress-inducing compound of aqueous cigarette smoke fractions.* Carcinogenesis. 1997;18(2):295-301.

16- Prevost V, Shuker DE . *Cigarette smoking and urinary 3-alkyladenine excretion in man.* Chem Res Toxicol. 1996 ;9(2):439-444.

17- Pryor WA, Prier DG, Church DF. *Electron-spin resonance study of mainstream and sidestream cigarette smoke: nature of the free radicals in gas-phase smoke and in cigarette tar*. Environ Health Perspect. 1983; 47:345-355.

18- Stone KK, Bermúdez E, Pryor WA. *Aqueous extracts of cigarette tar containing the tar free radical cause DNA nicks in mammalian cells.* Environ Health Perspect. 1994 ;102 : (10)173-178.

19- Nakayama T, Kodama M, Nagata C. *Generation of hydrogen peroxide and superoxide anion radical from cigarette smoke.* Gann. 1984;75(2):95-8.

20- Borish ET**,** Cosgrove JP**,** Church DF**,** Deutsch WA**,** Pryor WA **.** *Cigarette tar causes single-strand breaks in DNA* . Biochem Biophys Res Commun. *1985 ; 133(2):780-786.*

21- Spencer JP, Jenner A, Chimel K, Aruoma OI, Cross CE, Wu R, etal. *DNA damage in human respiratory tract epithelial cells: damage by gas phase cigarette smoke apparently involves attack by reactive nitrogen species in addition to oxygen radicals***.** FEBS Lett. 1995;375(3):179-82.

22- World Health organization, International Agency for Research on Cancer. *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks of chemicals to huma*n. Tobacco Smoking, 1986; 38: 3-6.

23- Parkin DM, Pisani P, Lopez AD, Masuyer E. *At least one in seven cases of cancer is caused by smoking. Global estimates for 1985.* Int J Cancer. 1994;59(4):494-504.

24- Calatayud S, Barrachine D ,Esplugues JV. *Nitric oxide: relation to integrity, injury and healing of gasteric mucosa.* Microse Res Tech. 2001; 53(5): 325-335.

25- Felley CP, Pignatelli B, Van Melle GD, Crabtree JE, Stolte M, Diezi J, etal . *Oxidative stress in gastric mucosa of asymptomatic humans infected with Helicobacter pylori: effect of bacterial eradication.* Helicobacter. 2002 ;7(6):342-348.

26- Pignatelli B, Bancel B, Plummer M, Toyokuni S, Patricot LM, Ohshima H. *Helicobacter pylori eradication attenuates oxidative stress in human gastric mucosa.* Am J Gastroenterol. 2001; 96(6):1758-1766.

27- Matsukura N, Willey J, Miyashita M, Taffe B, Hoffmann D, Waldren C, etal. *Detection of direct mutagenicity of cigarette smoke condensate in mammalian cells.* Carcinogenesis. 1991;12(4):685-689.