

ارزیابی سمیت سلولی سیس پلاتین، اکسید آرسنیک و استامینوفن روی خطوط سلولی سرطانی و نرمال

دکتر محمد شکرزاده*^۱، دکتر سیدفرشاد حسینی شیرازی^۲، سید سهیل سعیدی ساروی^۳

چکیده

مقدمه: کشت سلولی، در واقع رشد سلولهای جدا شده از بافت اصلی بوده که سلولها در داخل ظرف کشت در یک محیط مایع افشانده و سپس این سلولها به هم چسبیده و تکثیر می یابند. امروزه از کشت سلولی جهت سنجش سمیت سلولی و مکانسیم های آن، اثرات ترکیبات مختلف بر روی اندامک های هدف داخل سلولی و همچنین بررسی شیوه های جدید درمان، استفاده می شود.
روش بررسی: جهت ارزیابی سمیت سلولی ما از روش کلنی زایی که در عین ساده بودن دقیق می باشد و میزان مرگ و میر سلول را بعد از یک زمان مشخص مواجه با ترکیبات را نشان می دهد استفاده نمودیم. لذا ما میزان IC50 را در خطوط سلولی سرطانی (HepG2, A549, SKOV3) و نرمال (LLCK1, CHO, HGF1) بعد از مواجهه با سه ترکیب شیمیایی سیس پلاتین، استامینوفن و آرسنیک ارزیابی کردیم.

نتایج: یافته ها نشان می دهد که در خصوص داروی استامینوفن در بین خطوط سلولی سرطانی HepG2 با IC50 برابر با $1/29 \pm 1/6$ و در خطوط سلولی نرمال CHO با IC50 برابر با $1/06 \pm 16/7$ بالاترین مقاومت و کمترین حساسیت را داشته است. ولی در خصوص سیس پلاتین در سلولهای سرطانی HepG2 با IC50 برابر با $0/07 \pm 0/87$ و در سلولهای نرمال HGF1 با IC50 برابر با $1/6+0/21$ کمترین مقاومت و بیشترین حساسیت را دارا می باشند، ولی در خصوص آرسنیک در خطوط سلول سرطانی A549 با IC50 برابر با $4/59 \pm 0/29$ و در خطوط سلولی نرمال LLCPK1 با IC50 برابر با $1 \pm 0/37$ کمترین مقاومت و بیشترین حساسیت را دارا می باشند.
نتیجه گیری: نظر به IC50 محاسبه شده مشخص می شود که حساسیت خطوط سلولی مختلف نسبت به سه داروی مورد ارزیابی متفاوت می باشد ($P < 0.05$). در کل مقاومت سلولهای سرطانی کمتر از سلولهای نرمال می باشد لذا این موضوع اهمیت مکانسیم های دفاعی سلولی در مقابل ترکیبات مختلف مثل گلوکوتایون را نشان می دهد.

واژه های کلیدی: سمیت سلولی، کلنی زایی، آرسنیک، سیس پلاتین، استامینوفن

مقدمه

کشت سلولی (Cell culture) در واقع رشد سلول های جدا

* نویسنده مسئول: استادیار گروه سم شناسی فارماکوژی - مرکز تحقیقات علوم دارویی دانشکده دارو سازی

تلفن: ۰۱۵۱-۳۵۴۳۰۸۱ - ۳۵۴۳۰۸۴ - همراه ۰۹۱۱۱۲۶۳۴۴۸

E mail: mslamuk@yahoo.com

۲- دانشیار گروه سم شناسی فارماکوژی دانشکده داروسازی

۳- دانشجوی داروسازی

۱،۳- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی مازندران

۲- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۵/۱۰/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۶/۳/۱۷

شده از بافت اصلی از طریق جدا سازی به وسیله روشهای فیزیکی و یا آنزیمی است و لذا بافت یا حاصل کشت، از یک کشت اولیه تکثیر می یابد و در معمول ترین حالت خود به صورت رشد سلول بر روی یک بستر جامد صورت می گیرد، سلول ها در داخل ظرف کشت در یک محیط مایع افشانده و سپس این سلول ها به هم چسبیده و تکثیر می یابند^(۱،۲).

استفاده از کشت سلولی در سم شناسی فارماکوژی شرایطی را برای

مرحله S مؤثرتر است لذا یک داروی سایتوتوکسیک بوده که باعث عدم رشد یا مرگ سلول می شود^(۵)

ارسنیک: ارسنیک در ساختار آفت کشها، سموم نباتی، مواد سرامیکی، ترکیبات موبر و ... به کار می رود و شایع ترین علت مسمومیت حاد با فلزات سنگین است که مکانیسم سمیت آن اختلال در متابولیسم سلولی از طریق ترکیب با آنزیم سولفیدریل دار و آهن و نقص فسفروپلاسیون اکسیداتیو و کاهش ATP می باشد^(۶).

استامینوفن: دارویی ضد درد و تب است که طول اثر ۴ ساعت داشته و عمدتاً توسط کبد متابولیسم شده ولی حدود ۵٪ آن توسط مکانیسم P450 به یک متابولیت شدیداً سمی به نام NAPQA تبدیل می شود که یک عامل عمده اکسیدانت داخل سلولی می باشد. در مصرف زیادی این دارو مسیرهای سم زدایی آن اشباع و میزان متابولیت سمی آن زیاد می شود^(۷). لذا با نظر به اهمیت این سه ترکیب شیمیایی، سمیت سلولی این سه ترکیب را بر روی سه خط سلولی سرطانی و سه خط سلولی نرمال مورد ارزیابی قرار دادیم.

روش بررسی

این مطالعه از نوع تجربی و به روش آزمایشگاهی است

مواد شیمیایی: تمام مواد شیمیایی که در این بررسی از آنها استفاده شده شامل سیس پلاتین، استامینوفن، اکسیدارسنیک، HEPES، تریپسین، سرم DMEM و سرم FBS، آنتی بیوتیک (استرپتوماسیسین، بنی سیلین)، OPT، بافر EDTA، بافر ۴، بافر تریس، تری کلرواستیک اسید ۱۰٪، DMSO، که تمامی داروها و مواد شیمیایی از کارخانه سیگماو مرک بوده است

خطوط سلولی: تمامی خطوط سلولی سرطانی شامل: HepG2 سلول سرطانی کبد انسانی، A549 سلول سرطانی ریه انسان، SKOV3 سلول سرطانی تخمدان انسانی و سه خط سلول نرمال: شامل LLCPK1 سلول کلیه سگ، CHO سلول تخمدان میمون و GHF1 سلول فیروپلاست میمون که همگی از انستیتو پاستور تهران تهیه شد. نکته مهم اینکه تمام این سلولها توانایی چسبیدن به پلیت را دارند.

روش کار: ابتدا محیط کشت DMEM/F12 به حجم یک لیتر تهیه شده و توسط فیلتر سرسرنگی با منفذ ۰/۲۲ میکرون استریل

تحقیق در انواع مواد دارویی و روشهای جدید درمانی به وجود آورده و در سال های اخیر از آن در جهت سنجش سمیت سلولی مواد شیمیایی، دارویی، آفت کشها، افزودنی های مواد غذایی و غیره استفاده می شود^(۱-۳).

کاربرد کشت سلولی در انجام آزمایشات گوناگون و سنجش اثرات مواد از قرن بیستم و با مطالعات هاریسون بر روی بافت عصبی قورباغه آغاز شد و در سال ۱۹۵۲ آقای George Gey سلولهای Hela و از یک کارسینومای تخمدان جدا نمود و کشت داد که در واقع این کشت تکثیر یافته اولین پاساژ سلول های انسان است^(۱-۳).

به منظور بررسی میزان سمیت سلولی ترکیبات شیمیایی متفاوت از آزمونهای مختلفی استفاده می شود که شامل Trypan blue dye exclusion، روش رنگ آمیزی افتراق Disc assay، سنجش MTT، سنجش پیش سازهای اسید نو کلئسیک، آزمون رنگ سنجی نوترال رد و روش سنجش کلنی زایی Clonogenic assay) که این روش یعنی کلنی زایی، روشی ساده - دقیق بوده که مرگ و میر تکثیری سلول را ارزیابی می نماید و لذا یک شاخص استاندارد برای تعیین مرگ سلولی بعد از تماس با داروها و سموم می باشد. در این روش سلول ها پس از تماس با غلظت های مختلف مواد شیمیایی برای مدت ۷ الی ۲۱ روز انکوبه شده و سپس کلنی های سلول تشکیل شده رنگ آمیزی و شمارش می شوند، اختلاف در تعداد کلنی ها در مجاورت دارو و یا بدون حضور دارو نمادی از سمیت سلولی دارو می باشد. در این بررسی ما به منظور ایجاد اثرات سایتوتوکسیسته از سه ترکیب شیمیایی سیس پلاتین (Cis)، اکسیدارسنیک (As) و استامینوفن (Ace) استفاده نموده ایم^(۳،۴) و همچنین باید گفت که اثر سمیت سلولی این سه ترکیب روی این خطوط سلولی مورد بررسی و مقایسه قرار نگرفته اند.

سیس پلاتین: یکی از پر مصرف ترین داروها در شیمی درمانی سرطان می باشد و یک ترکیب آلکیل کننده و ضدتومور بوده که از طریق ایجاد پیوندهای جانبی با DNA باعث تداخل در عملکرد آن و RNA می شود. این دارو بر چرخه سلولی اثر کرده ولی در

می گردد و به آن آنتی بیوتیک به میزان ۱٪ و سرم به میزان ۵ تا ۲۰٪ اضافه شده و در یخچال برای استفاده نگهداری می نمایم^(۸). خطوط سلولی تحویل گرفته از انستیتو را پاساژ داده به گونه ای که در هر پلیت به میزان ۸۰-۷۰٪ رشد خود رسیده و هیچگونه آلودگی نداشته باشند، سلولها را از انکوباتور CO₂ خارج نموده و تمام عملیات بعدی را زیر هود انجام می دهیم. سلولهای چسبیده به فلاسک را دو مرتبه و هر مرتبه با ۲ ml نرمال سالین می شویم و سپس حدود ۱-۰/۵ ml از محلول تریپسین را به آن اضافه می نمایم و سپس سلولها را در مجاورت چند قطره تریپسین حدود ۵-۲ دقیقه انکوبه می شوند و پس از طی شد زمان مذکور با زدن چند ضربه به زیر فلاسک سلولها جدا شده و سپس حدود ۲ml محیط به فلاسکها اضافه می نمایم و توسط پی پت پاستور خوب پی پتاژ می نمایم تا سلولها کاملاً از یکدیگر جدا و آماده شمارش توسط لام هموسایتومتر و میکروسکوپ گردند. در این روش شمارش، حدود ۱۰۰ میکرولیتر نمونه را با ۱۰۰ میکرولیتر رنگ تریبان بلو در پلیت ۹۶ خانه ای مجاورت کرده و حدود ۲۰ میکرولیتر از آنها را به روی لام هموسایتوتر ریخته و توسط میکروسکوپ سلولهای خانه وسط را شمارش نموده و بعد از این مرحله به پلیت های جدید ۶ خانه ای حدود ۴۰۰ سلول را منتقل می نمایم. به هر پلیت ۴ میلی لیتر محیط تازه تهیه شده اضافه نموده و تا ۲۴ ساعت در داخل CO₂ انکوباتور در دمای ۳۷°C و ۵٪ CO₂ قرارداده تا رشد و تکثیر نماید و به خوبی به ته ظرف بچسبند و برای مرحله سنجش کلنی زایی آماده گردد.

-روش کلنی سنجی^(۹،۱۰).

۱- به هر پتری دیش ۴cc محیط کشت DMEM/F12 که حاوی ۷۰۰-۵۰۰ عدد سلول است، اضافه می کنیم (برای هر غلظت مشخص ۳ پتری دیش قرار می دهیم).

۲- پتری دیش ها برای مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار می گیرند.

۳- پس از اتمام ۲۴ ساعت انکوباسیون، از سه دارو غلظتهای مختلفی تهیه می شود بطوریکه برای.

سیس پلاتین: دوزهای ۰، ۰/۵، ۱، ۳، ۵، ۱۰، ماکروگرم در

میلی لیتر
استامینوفن: دوزهای ۰، ۱، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ ماکروگرم در
میلی لیتر

اکسید آرسنیک: دوزهای ۰، ۱، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ ماکروگرم در
میلی لیتر تهیه شده و استریل می شوند و سپس به میزان
۴۰ میکرولیتر به هر پلیت هر غلظت را اضافه می نمایم.

۴- پس از افزودن غلظت های مورد نظر به سلول، پلیت های شش
خانه ای برای مدت ۲-۱ ساعت در مجاورت داروها قرار می گیرند.

۵- پتری دیش ها را از انکوباتور خارج کرده، پس از خارج
کردن محیط رویی سلول ها، سلول ها را ۲ مرتبه و هر بار با ۲cc
نرمال سالین می شویم.

۶- به هر پتری دیش ۴cc محیط کشت جدید اضافه کرده و
سلول ها را برای مدت ۱۴-۷ روز در انکوباتور قرار می دهیم.

۷- در خلال زمان انکوباسیون سلول ها، هر دو روز یک بار،
سلول ها را بررسی کرده تا از چگونگی رشد سلول ها و عدم
آلودگی آنها، اطمینان حاصل کنیم.

۸- پس از طی شدن زمان لازم، محیط رویی سلول ها را خارج
کرده، سپس برای رنگ آمیزی، سطح پتری دیش ها را با
محلول تریبان بلوی ۷/۴w/v٪ می پوشانیم، به ترتیبی که کاملاً
روی سلول ها را پوشانند. پتری دیش ها برای مدت ۲۰ دقیقه به
طور ثابت در تماس با رنگ قرار می گیرند. بعد از مدت زمان
طی شده محلول رنگ را خارج کرده، سپس پتری دیش ها را
۳ بار به آرامی در آب فرو برده و برای خشک شدن، بر روی
دستمالی در مجاورت هوای آزاد قرار می دهیم

۹- کلنی های رنگ گرفته هر ظرف، به کمک میکروسکوپ
شمارش می شوند و توسط نرم افزار Prism که اختصاصی برای
تعیین IC₅₀ می باشد تعیین آن صورت گرفته است. نکته مهم
اینکه هر یک از خطوط سلولی با هر یک از غلظت های ترکیبات
مورد بررسی (آرسنیک، سیس پلاتین، استامینوفن) سه بار
مواجه داده شده اند.

محاسبات آماری: کلیه محاسبات آماری با استفاده از برنامه
کامپیوتری Instate 3.1 (از روش رگرسیون غیرخطی
(Non linear Regression) استفاده شده و مقایسه داده ها با

روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و Post test مربوطه (Turkey-Kramer multiple comprehension test) صورت گرفته و $P < 0.05$ به عنوان معیار قابل قبول اختلاف معنی دار در نظر گرفته شده است.

نتایج

با توجه به جدول (۱) که میانگین و انحراف از معیار IC50 را در سه خط سلولی سرطانی مواجهه یافته با سه ترکیب شیمیایی مورد بررسی را نشان می دهد مشخص می گردد که در خط سلولی سرطانی کبد HePG2 IC50 (سمیت سلولی) سه ترکیب از نظر مرتبه بندی Cis<As<Ace می باشد و در خط سلولی سرطانی ریه A549 از نظر مرتبه بندی Cis<Ace<As بوده و در خط سلولی سرطان تخمدان SKOV3 از نظر مرتبه بندی Cis<As<Ace، ارزیابی شده است.

در خصوص سیس پلاتین از نظر مرتبه بندی سمیت در خطوط سلولی سرطانی HePG2<SKOV3<A549، در مواجهه با ترکیب اکسید آرسنیک A549<SKOV3<As در مواجهه با ترکیب استامینوفن A549<SKOV3<HePG2 حساسیت آنها

ارزیابی شده است. با توجه به جدول (۲) که میانگین و انحراف از معیار IC50 را در سه خط سلولی نرمال مواجهه یافته با سه ترکیب شیمیایی (سیس پلاتین Cis، اکسید آرسنیک As و استامینوفن Ace) را نشان می دهد مشخص می گردد که در خط سلولی نرمال کلیه LLCPK1 از نظر مرتبه بندی سمیت سلولی سه ترکیب شیمیایی As<Cis<Ace بوده و در خط سلولی نرمال CHO از نظر مرتبه بندی سمیت سه ترکیب مورد بررسی Cis<Ace<As و در خط سلولی نرمال HGF1 از نظر مرتبه بندی سمیت سه ترکیب مورد بررسی Cis<As<Ace ارزیابی شده اند.

از طرف دیگر در خصوص سه ترکیب مورد ارزیابی در هر خط سلول نرمال مورد ارزیابی میزان حساسیت آنها به هر ترکیب به گونه ای است که در خصوص ترکیب سیس پلاتین (Cis) از نظر مرتبه بندی LLCPK1<HGF1<CHO بوده و در خصوص ترکیب اکسید آرسنیک (As) از نظر مرتبه بندی LLCPK1<HGF1<CHO بوده و خصوص ترکیب استامینوفن (Ace) از نظر مرتبه بندی LLCPK1<HGF1<CH ارزیابی شده اند

جدول (۱): مقادیر میانگین و انحراف از استاندارد IC50 مربوط به سه ترکیب مورد ارزیابی در خطوط سلولی سرطانی

خطوط سلولی	شیمیایی		
	استامینوفین	اکسید آرسنیک	سیس پلاتین
IC50 (μ g/ml) Cancer Cell Lines	HEPG2	۶/۳۷±۰/۴۱	۰/۸۷±۰/۰۷
	A549	۴/۵۹±۰/۲۹	۳/۲۷±۰/۳۵
	SKVO3	۶/۰±۰/۲۴	۰/۹۹±۰/۰۸

P<0.05

جدول (۲): مقادیر میانگین و انحراف از استاندارد IC50 مربوط به سه ترکیب مورد ارزیابی در خطوط سلولی نرمال

خطوط سلولی	شیمیایی		
	استامینوفین	اکسید آرسنیک	سیس پلاتین
IC50 (μ g/ml) Normal Cell Lines	LLCPK1	۱±۰/۳۷	۵/۵±۰/۳۵
	CHO	۱۸/۹±۰/۹۷	۵/۵±۰/۲۱
	HGF1	۳/۷±۰/۶۴	۱/۶±۰/۲۱

P<0.05

بحث

HePG2 بین سمیت سلولی ایجاد شده توسط استامینوفن و آرسنیک و سیس پلاتین اختلاف معنی داری وجود دارد

با بررسی آماری از روش رگرسیون غیرخطی (Non linear Regression) مشخص می گردد که در خطوط سلولی سرطانی

علت این موضوع بر می گردد به اینکه این دارو از یک طرف به علت داشتن گروههای کلری توانایی تولید رادیکال آزاد بالاتر و از طرف دیگر توانایی باند شدن با DNA را داشته و مانع از کپی برداری از آن و در نتیجه مانع از سنتز پروتئین و در نهایت مانع از تولید گروههای ایجاد مقاومت مثل گلوکوتایون می شود. لذا سمیت سلولی شدیدتری را در دوزهای پایین ایجاد می نماید (یعنی IC50 کوچکتر و سمیت سلولی شدیدتر) با نظریه تحقیقات قبلی در خصوص ارزیابی مرگ سلولی ناشی از سیس پلاتین روی خطوط سلولی SKOV3 به روش نوترال رد مشخص گردیده که سیس پلاتین با ایجاد اثرات وابسته به دوز منجر به آسیب DNA شده و ایجاد آپوپتوزیس می نماید (۱۳-۴).

نتیجه گیری

مقاومت سلولهای سرطانی در ارتباط با سمیت سلولی ایجاد شده کمتر از سلولهای نرمال بوده زیرا سلولهای سرطانی نظم طبیعی خود را نداشته و احتمالاً عوامل مقاومت داخل سلولی نسبت به ایجاد رادیکالهای آزاد و یا مقابله با رادیکالهای تولید شده مثل گلوکوتایون (GSH) کاتالاز، سوپراکسید دستموتاز می کنند کمتر است زیرا مقدار زیادی مصرف شده و تبدیل به فرم اکسید شده این ترکیب آنتی اکسیدانی مهم در سلول می شوند (۱۴،۱۵).

پیشنهادها

- ۱- سمیت این ترکیبات با فاکتورهای داخل سلولی مثل گلوکوتایون به صورت مقایسه ای ارزیابی شود.
- ۲- عوامل اکسیدان مختلف خصوصاً ترکیبات مختلف شیمیایی یا دارویی و اسانس های گیاهی مورد ارزیابی قرار گیرد.
- ۳- عوامل اکسیدان را با عوامل آنتی اکسیدانت طبیعی و شیمیایی مثل ویتامین E, C یا کوآنزیم Q10 به شکل همزمان مورد ارزیابی قرار گیرد.

سپاسگزاری

از آنجا که هر پروژه تحقیقاتی بدون همکاری و هماهنگی مسئولین اجرایی و تیم تحقیقاتی به سرانجام نمی رسد لذا وظیفه خود می دانیم از همکاران محترم حوزه پژوهشی و همکاران آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده داروسازی شهید بهشتی تقدیر و تشکر داشته باشیم.

($P < 0.05$) و در خطوط سلولی سرطانی A549 بین استامینوفن و آرسنیک اختلاف معنی دار ولی بین استامینوفن و سیس پلاتین غیرمعنی دار می باشد ($P < 0.05$)، در خط سلولی سرطانی SKOV3 بین سه ترکیب ارزیابی شده اختلاف معنی دار می باشد ($P < 0.05$).

در خطوط سلولی نرمال LLCPK1 بین استامینوفن و سیس پلاتین با آرسنیک اختلاف معنی دار ولی بین استامینوفن با سیس پلاتین غیرمعنی دار می باشد و اختلاف دیده نمی شود ($P < 0.05$).

در خط سلولی نرمال HGF1 بین سه ترکیب شیمیایی مورد ارزیابی اختلاف معنی دار می باشد ($P < 0.05$). در خط سلولی نرمال GHO بین استامینوفن و آرسنیک اختلاف دیده نشده ولی بین این دو ترکیب با سیس پلاتین اختلاف معنی دار بارزی دیده می شود ($P < 0.05$).

این سه ترکیب شیمیایی اگر چه به منظورهای مختلف مورد مصرف قرار می گیرند و مکانیسم های متفاوتی برای اثر گذاری در سایت های سلولی و غیرسلولی دارند ولیکن این توانایی برای آنها وجود دارد که به نحوی در داخل سلول تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS (Reactive-Oxygen-espease) و رادیکالهای آزاد را تولید نماید که این رادیکالها عامل اصلی سمیت سلولی و مرگ سلولی چه به شکل برنامه ریزی شده (اپوپتوزیس) و یا غیربرنامه ریزی شده (نکروزیس) را در پی دارند (۱۱،۱۲). و لذا اثرات این سه ترکیب سایتوتوکسیسته را در بافتهای مختلف یا خطوط سلولی مختلف به شکلهای متفاوت بروز می دهند. در این بررسی با یک اختلاف جزئی مشخص گردیده که اصولاً استامینوفن با دوز بیشتری اثر سایتوتوکسیسته خود را اعمال می نماید و می توان اذعان داشت که سلول مقاومت بیشتری نسبت به این ترکیب داشته و در این میان بالاترین مقاومت را سلولهای سرطانی کبد HePG2 با IC50 برابر $1/29 \pm 18/6$ و سلولهای نرمال CHO با IC50 برابر $1/06 \pm 16/7$ دارند. از طرف دیگر مقاومت خطوط سلولی مورد مطالعه در خصوص سیس پلاتین کمترین مقدار بوده و بیشترین میزان سمیت سلولی را (با کمترین دوز ترکیب شیمیایی) ایجاد می نمایند (به غیر از LLCPK1 که با آرسنیک سمیت شدیدتری را ایجاد می نماید).

References

- 1- Chiu S, Bhakthan NMG. *Experimental cisplatin - induced hepatic necrosis*. Lab Invest; 1978, 39: 193-203.
- 2- Multimer DJ, Ayres RCS, Neuberger JM, Davies MH, Holguin J, Buckets JAC, et al. *serious paracetamol poisoning and the results of liver Transplantation*; 1994, 35: 809-14.
- 3- Savides MC, Oehme FW. *Cisplatin and its toxicity*. J Appl Toxicol; 1983, 3: 96-111.
- 4- Patten CJ, Thomas PE, Guy RL, Lee M, Gonzalez FJ, Guenger-ich FP, et al. *Cytochrome P450 enzymes involved in cisplatin activation by rat and human microsomes and their kinetics*. Chem Res Toxicol; 1993, 6: 511-8.
- 5- WJ.Clerici, K.Hensley, D.L.DiMartino, D.A.Butterfield; *Direct Detection of Ototoxicant-induced Reactive Oxygen Species Generation in Cochlear Explants*. Hear. Res, 1996, 98, 116-124.
- 6- DD Von Hoff, B.Forseth, LE Warfel. *Use of a Ra-diometric System to Screen for Antineoplastic Agents: Correlation with a Human Tumor Cloning System*, Cancer Res. 1985, 45, 4032-4038.
- 7- Allan H. Conney; *Enzyme Induction and Dietary Chemicals as Approaches to Cancer Chemoprevention: The Seventh DeWitt S. Goodman Lecture*, Cancer Res. 2003, 63, 7005-7031.
- 8- Hazelton GA, Hjelle J J, Klaassen CD. *Effects of cystein pro-drugs on acetaminophen-induced hepatotoxicity*. J. Pharmacol. Exp Ther. 1986b, 237, 341-349.
- 9- M.Paschal . *Resistance of three Immortalized human hepatocyte cell lines to acetaminophen*. J.Hepatology, 1999,31,841-851.
- 10- S.B. Prasad, A. Giri. *Antitumor effect of cisplatin against murine ascites Dalton's lymphoma*. Indian J. Exp. Biol. 1994, 32 -57-62.
- 11- G. Chu. *Cellular responses to cisplatin*. J. Biol. Chem. 1994, 269 , 787-790.
- 12- B. D. Zamble, S.J. Lippard. *Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy*., Trends Biochem. Sci. 1995, 20 -435-439.
- 13- H. J. Cross, M. Tilby, J. K. Chipman, D.R. Ferry, A. Gescher. *Effect of quercetin on the genotoxic potential of cisplatin*, Int. J. Cancer, 1996, 66 -404-408.
- 14- M.J. Pillaire, A. Margot, G. Villani, A. Sarasin, M. Defais, A. Gentil. *Mutagenesis in monkey cells of a vector contain-ing a single d(GPG) sic-diamminedichloroplatinum(II) adduct placed on codon 13 of the human H-ras proto-oncogene*, Nucleic Acide Res. 1994, 22 2519-2524.
- 15- Vermeulen N.P.E. and G.S. Baldew, *The role of lipid peroxida-tion in the nephrotoxicity of cisplatin*, Biochem. Pharmacology. 1992, 44, 1193.
- 16- WJ.Clerici, K.Hensley, D.L.DiMartino, D.A.Butterfield; *Direct Detection of Ototoxicant-induced Reactive Oxygen Species Generation in Cochlear Explants*. Hear. Res. 1996, 98, 116-124.
- 17- Allan H. Conney; *Enzyme Induction and Dietary Chemicals as Approaches to Cancer Chemoprevention: The Seventh DeWitt S. Goodman Lecture*, Cancer Res. 2003, 63, 7005-7031.
- 18- D. Hardej, L.D. Trombetta, *The effects of ebselen on cisplatin and diethyldithiocarbamate (DDC) cytotoxicity in rat hippocampal astrocytes*. Toxicology Letters , 2002, 131, 215-226.