2003 춘계학술발표회 논문집
한국원자력학회

Radioprotective effect of vitamin A and selenium in mice splenic and blood lymphocytes by comet assay.

혜성분석을 이용한 쥐의 비장 및 혈액 림프구내 vitamin A와 selenium의 방사선 방어 효과.

천기정, 김우정,
한국원자력연구소
대전광역시 유성구 덕진동 150

요약

본 연구에서는 방사선 조사 전 vitamin A와 selenium의 투여에 따른 방사선 방어 효과를 알아보았다. 방사선 조사 후 생쥐의 비장 및 혈액 림프구의 DNA 손상정도의 측정을 통해 vitamin A와 selenium의 방어 효과를 인지하였다. vitamin A 및 selenium의 방사선 방어 기능을 인지를 위해 6주령 ICR 생쥐에 방사선 조사 전 vitamin A, selenium 및 vitamin A와 selenium을 병행하여 6일 동안 1일 1회 경구투여 한 다음 8.0 Gy (1min/Gy)의 방사선을 전신 조사하여 그룹별로 실험하였다. 방사선 조사 후, 비장과 혈액을 채취한 다음 Ficoll-histopaque gradient를 사용하여 림프구를 분리하였다. 생쥐의 비장과 혈액 림프구의 DNA 손상에 대한 TM(Tail moment)값은 단 세포 겔 전기영동법을 사용하여 측정하였다. 혜성분석이라도 불리는 이 방법은 환경 독성 물질들과 같은 많은 화학물질들에 의한 DNA 손상인지를 위해 적용되고 있는 방법이다. 혜성분석은 각각의 세로들의 알카리에 불안정한 부분 즉 DNA가 깨어지는 부분을 측정하기 위한 유능한 방법이다. 본 실험에서 비장과 혈액의 림프구내 vitamin A와 selenium의 TM 값은 방사선만 조사한 집단과 비교해 볼 때 약간 감소하였다. 혈액 림프구에서의 방사선 방어 효과를 보면, 높은 양의 vitamin A(12mg/kg)과 selenium(2mg/kg)을 함께 투여한 결과 모든 낮은 양을 투여한 실험 집단과 비교해 볼 때 TM 값이 매우 감소하였다. 이들 결과들로 부터, vitamin A와 selenium은 다른 항산화제들과 마찬가지로 생쥐에서 약간의 방사선 방어 효과를 보여주었다. 그러나 이들 물질의 병행 투여에 따른 방사선 방어 효과는 비장 림프구 보다 혈액 림프구에서 더 효과적이었다.

Abstract

The aim of this study was to investigate the protective effects of vitamin A and/or selenium treatments prior to whole-body irradiation in mice. This was obtained the radioprotective effect of vitamin A and selenium by evaluation of DNA damage levels in mice spleen and blood after irradiation. Six-week-old ICR male mice were administrated with vitamin A(low dose : 3.0 mg/kg, high dose : 12mg/kg) and/or selenium(low dose : 0.5 mg/kg, high dose : 2.0 mg/kg) orally once a day for 6 days and then irradiated with 8.0 Gy of γ-ray. After that, the mice were sacrificed 3 days later. Spleen and blood were taken and then lymphocytes were isolated. Spleen and blood were collected aseptically and isolated the lymphocytes by Ficoll-histopaque gradient centrifugation. Cells embedded in agarose are lysed, subjected briefly to an electric field, stained with a fluorescent DNA binding stain and viewed using a fluorescence microscope. The tail moment(TM) of DNA single-strand breaks in mice splenic and blood lymphocytes were evaluated by single cell gel electrophoresis assay (Comet assay). Comet assay has been applied for detection of DNA damage due to many chemicals like environmental toxic materials. The comet assay is a novel method to assess DNA single-strand breaks, alkali-labile sites in individual cells. TM values of selenium and vitamin A in splenic lymphocytes and blood lymphocytes reduced a little compared to the irradiated control group. TM values in high administration doses of vitamin A(12mg/kg) and plus selenium(2mg/kg) reduced the most compared to low administration dose group and those of all experimental groups in blood lymphocytes. From these results, it showed that vitamin A and selenium were a little radioprotective effect in mice like other antioxidants but combined effect of these chemical in splenic lymphocytes showed a little unlike blood lymphocytes.

1. 서론

단세포겔 전기영동법 (Single cell gel electrophoresis,SCGE)라 불리는 혜성분석 (comet assay)은 각각의 세포 DNA 손상을 직접적으로 간단하게 시행하는 전기영동 방법으로서 1984년에 stling과 Johanson에 의해서 처음으로 알려진 후 1989년에 Singh에 의해 DNA분자를 풀어주는데 강알칼리 조건이 매우 중요함을 밝혀 높은 pH조건으로 변형되어 사용되고 있다(N. P. Singh et al., 1988). 정상적인 조건에서 세포핵에 있는 DNA는 supercoil을 이루고 있으나 강알카리 조건은 DNA 구조를 완화시켜 DNA의 손상

정도를 쉽게 감지하고 측정할 수 있게 한다. 이 방법은 세포를 슬라이드 위의 얇은 agarose gel에 끼워 넣어 세포막을 분해하여 전기영동 하게 되는데 전류에 의해 전위를 가진 DNA를 핵으로부터 잡아당김으로써 완화된 DNA와 깨진 DNA 절편들은 이동하게 된다. 이들을 형광염색하면 DNA가 혜성과 같이 끌린 형태를 관찰할 수 있는데 이로 인하여 혜성분석법이란 이름이 붙여졌으며 DNA 손상 정도를 쉽게 측정할 수 있다. 혜성분석의 장점은 많은 세포를 필요로 하지 않으며 짧은 기간 안에 실험이 가능하며 절차가 매우 간단하다는 것이다. 게다가, 가장 큰 특징은 각 세포의 DNA 손상 정도를 직접적으로 관찰 할 수 있으므로 한 개체내의 모든 세포들이 동일한 손상을 받았는지에 대한 여부를 설명하는 것이 가능하다. 이러한 특이한 장점들 때문에 단일 세포 겔 전기영동법은 여러 실험 조건 내에서 DNA 손상과 회복을 관찰하고 측정하는데 유용하게 사용될 수 있다. 이러한 면에서 수년 동안 혜성분석에 대한 관심이 증대되고 있으며 생물, 독성 및 유전분야에서 널리 이용되고 있다. 본 실험에 사용된 vitamin A와 selenium은 항산화제로써 방사선 방어에 효과가 있다고 알려진 물질들이다. Weitberg(1985)등은 염색체 손상을 일으키는 산화 radical에 대해 vitamin A가 방어를 나타낸다고 증명하였다. vitamin A는 암, 동맥경화증, 관절염, 백내장, 방사선에 의한 DNA 손상등을 유발하는 산화적 스트레스로부터 방어하는 중요한 역할을 하고 있다(Sung-Ho Joh et al., 1997). Vitamin A가 질병을 예방하는 기전은 첫째 retinol로 전환, 둘째 산화적 손상으로부터의 보호작용, 셋째 분자자체가 내인성으로 질병을 예방하는 활성이다. Selenium은 glutathione peroxidase의 구성성분으로써 비타민과 함께 항산화제로서 작용한다. 또 selenomethionine, selenocysteine 등의 화합물로서 항산화작용, 방사선 방어작용, 항암작용 등을 한다. Selenium의 흡수율은 50 100% 정도로 보며 체내 selenium의 함량은 요를 통한 배설로 조절되거나 많은 섭취는 dimethylselenide로서 호흡을 통해서 배출되며 식이로서는 methionine, vitamin E, 비소의 함유로 selenium의 배설이 촉진된다. 간과 신장에 많으며 혈장 또는 적혈구의 selenium 수준, glutathione peroxidase 활성도로 체내 selenium 영양상태를 알 수 있다.

본 연구에서는 이와 같이 많은 약효를 갖고 항산화제로 잘 알려진 vitamin A와 selenium을 ICR 생쥐를 실험동물로 하여 6일간 미리 투여한 후 감마선을 조사한 다음 3일 경과된 비장 및 혈액 림프구의 DNA를 단세포 겔 전기영동법을 이용하여 손상 정도를 분석 및 측정하여 항산화제로써의 vitamin A와 selenium의 방사선에 대한 방어 효과를 관찰하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험동물의 vitamin A와 selenium의 처리 및 방사선 조사

실험동물은 생후 6주된 ICR 숫컷 생쥐를 사용하였으며 실험하는 동안 물과 사료는 자유롭게 접근할 수 있도록 하였다. 전체 10개의 집단으로 나누어 실험하였다. A 집단은 어떤 처리도 하지 않은 일반군이며 B 집단은 나머지 집단의 대조군으로 8.0 Gy의 Co-60 감마선을 전신 조사하였다. C와 D집단은 각각 3mg/kg, 12mg/kg 의 vitamin A을 1일 1회 6일간 경구 투여한 후 8.0 Gy의 Co-60 감마선을 전신 조사하였으며 E와 F집단은 0.5mg/kg, 2mg/kg의 selenium을 1일 1회 6일간 경구 투여한 후 8.0 Gy Co-60 감마선을 조사하였다. G J집단은 vitamin A와 selenium을 병행 투여하였다. G와 H집단은 3mg/kg의 vitamin A에 0.5mg/kg과 2mg/kg의 selenium을 함께 병행하여 경구 투여한 후 8.0 Gy의 Co-60 감마선을 전신 조사하였고, I와 J집단은 12mg/kg의 vitamin A에 0.5mg/kg과 2mg/kg의 selenium을 함께 병행하여 경구 투여한 후 8.0 Gy의 Co-60 감마선을 전신 조사하였다. Vitamin A(Sigma)는 100% EtOH 300㎕에 녹인 후 식음료를 첨가하여 사용하였으며, selenium(Sigma)은 식음료에 녹여 사용하였다. 방사선 조사는 한국 원자력연구소 소재 Co-60 감마선원(선원강도 : 약 150TBq, Panoramic Irradiator, Atomic Energy Canada Limited)을 사용하였으며 분당 1.0 Gy의 선량률로 전신 조사하였다.

2.2. 시료의 채취 및 림프구 분리

방사선 조사 3일 후 각각의 생쥐들은 마취시킨 후 혈액을 심장으로부터 뽑고 비장(Spleen)을 적출하였다. 혈액 및 비장 림프구는 Ficoll-histopaque gradient (Pharmacia)를 사용하여 분리하였다. 분리한 림프구는 24°C에서 400 g에서 30분간 원침(Mega 17R, Hanil)한 후 분리하고 4°C에서 250 g에서, 10분간씩 두 번 원침하여 Ficoll을 제거한 후 PBS (pH 7.0)로 희석하여 시료로 사용하였다.

2.4. 슬라이드제작 및 전기영동

손상된 DNA 분자의 수복을 방지하기 위하여 모든 절차는 4℃ 이하에서 행하였다. 슬라이드 상에 200 ㎕의 1 % agarose (Sigma)로 첫 번째 층을 입힌 다음 고체화시키고 그 위에 림프구들을 37℃에서 low melting point (LMP) agarose (Sigma)와 현탁시켜 최종 농도가 0.5 %가 되도록 한 후 100 ㎕씩 도말하여 두 번째 층을 덮는다. 림프구가 포함된 두 번째 층을 고체화시킨다. 이렇게 만들어진 슬라이드는 1 % Triton X-100 (Sigma)과 10 % DMSO (Merck)를 사용 전에 첨가하여 미리 만들어 놓은 colding lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA-disodium, 10 mM Tris, pH=10)에 최소 1시간 동안 detergent로 된 high salt solution에 잠기게 했다. 이 단계에서 핵안의 protein들은 모두 제거된다. 전기영동 전 슬라이드는 높은 pH (>pH 13.5)로 된 알칼리성의 전기영동 용액 (0.3 M NaOH, 1 mM Na2EDTA)에서 20분 동안 방치하여 전기영동에 방해가 될

detergent를 제거하여 평형을 유지시켰고 동시에 DNA를 unwinding시켜 supercoiling을 풀어주었다. 전기영동은 25V, 300 mA로 20분간 수행하였다.

2.5. 형광 염색 및 분석

전기영동이 끝난 다음 슬라이드를 세척하고 0.4 M Tris buffer (pH 7.5)를 몇 방울 처리하여 5분간 중성화하였다. 다음의 염색 단계를 위해 이 과정을 2번 더 수행하였다. 그 후 buffer를 제거하고 50 μℓ의 ethidium bromide (20 μg/ml, Sigma)로 염색하였으며 염색결과 생성된 comet을 CCD camera (Hitachi Denshi, Ltd., Japan)가 부착된 광학현미경 (Olympus fluorescence microscope, Japan) 하에서 exitation filter (515-560 nm)와 barrier filter (590 nm)를 사용하여 x 400으로 확대하여 검경하고 Image Analysis System Software (Komet 4.0, Kinetic imaging, Ltd., Great Britain)을 통하여 분석하였다.

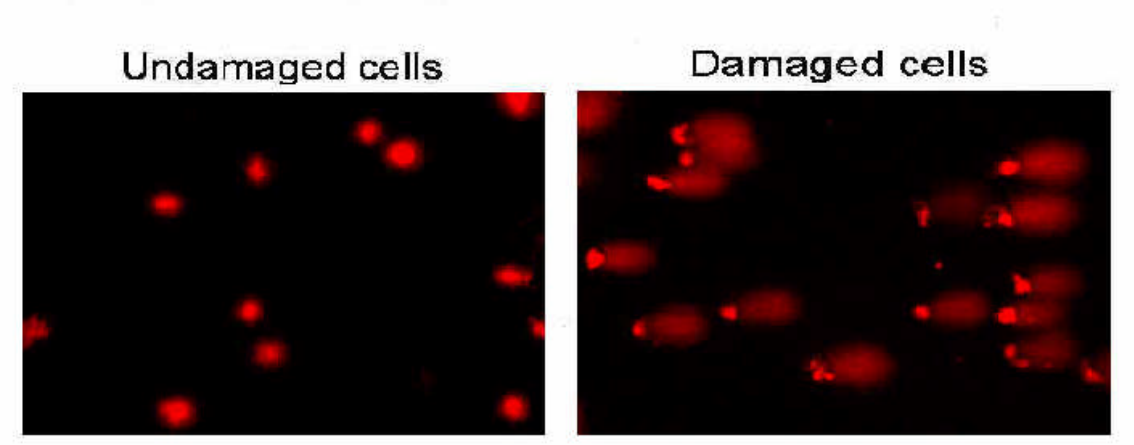

Fig 1. Representative photomicrograph of Comet assay. Left : unirradiated. Right : irradiated.

3. 결과 및 고찰

본 연구에서는 생쥐의 비장 림프구와 혈액 림프구를 추출하여 vitamin A와 selenium의 농도별 투여에 따른 방사선의 방어 효과와 vitamin A와 selenium의 병행 투여에 따른 방사선 방어 효과를 알아보았다. 단일 세포 겔 전기영동에 따른 비장 림프구에서의 방사선 방어 효과 정도를 보면, vitamin A를 농도별로 투여시 3mg/kg을 투여했을 때 TM 값이 3.54±0.41을 나타내어 12mg/kg을 투여했을 때 TM값이 3.18±0.30를 나타낸 값보다 약간 낮아 고농도 투여시 방어 효과가 조금 더 있음을 알 수 있었고, selenium을

농도별로 투여했을 때도 높은 농도 투여시 방어 효과가 조금 더 있음을 알 수 있었다. 또한 vitamin A와 selenium의 농도별 투여시 selenium보다는 vitamin A가 조금 더 방어 효과가 있음을 인지할 수 있었다. Vitamin A와 selenium의 병행 투여시 방어 효과를 살펴보면 저농도의 vitamin A와 selenium을 병행 투여했을 때 보다 고농도로 병행처리 했을 때 조금 더 방어 효과가 있음을 인지할 수 있었다. 그리고 혈액 림프구의 경우는 비장 림프구과 마찬가지로 농도별에 따른 투여시 vitamin A는 TM 값이 3mg/kg 투여시 2.51±0.21을 나타내었고, 12mg/kg 투여시 2.41±0.20을 나타내어 고농도 투여시 약간 더 방어 효과가 있음을 알 수 있었고 selenium 투여시 0.5mg/kg 투여했을 때 TM 값이 2.70±0.22을 나타내었고 2mg/kg 투여했을 때 2.51±0.21을 나타내어 고농도 투여시 더 방어 효과가 있음을 알 수 있었다. 두 물질을 병행 투여했을 때 높은 농도끼리 병행 투여했을 때 방어 효과가 더 있음을 알 수 있었다. 그러나, 어떤 처리도 하지 않은 대조구 집단과 비교했을 때 방어 효과는 어느 정도 있지만, 대조구 집단에 가까운 방어 효과를 갖지는 못했다. 또한 비장 림프구과 혈액림프구에서의 방사선 방어 효과를 살펴보면, vitamin A와 selenium을 투여했을 때 비장 림프구보다는 혈액림프구에서 방어 효과가 더 높음을 Fig 1에서 알 수 있어 물질이 방어 효과를 나타내는 정도가 lymphocyte 마다 차이가 있음을 알 수 있었다.

본 실험에서 단일 세포 겔 전기영동을 실시하여 방사선에 의한 DNA 손상에 대한 vitamin A와 selenium의 방사선 방어 효과를 알아본 결과 각 물질의 농도별 투여시 저농도 투여시 보다 고농도 투여시 약간의 방어 효과가 더 있음을 알 수 있었고 vitamin A가 selenium 보다 약간의 방어 효과가 더 있음을 알 수 있었다. 또한 두 물질을 병행 투여했을 때 단독 투여시 보다 병행 투여시 림프구에 대해 방사선 방어 효과가 약간 더 있음을 알 수 있었으며, 고농도로 병행 투여했을 때 방어 효과가 약간 높음을 알 수 있었다. 그러나, vitamin A와 selenium을 단독 투여 또는 병행투여 했을 때 lymphocyte에 따른 방어효과의 차이를 나타내어 투여물질에 따른 방어 효과의 차이를 인지할 수 있었다.

이들 물질과 같은 항산화 물질들은 화학적인 돌연변이물질과 방사선에 대해 항돌연변이적 특성과 항발암성 특성을 타나내며 (for riview see De Flora and Ramel, 1988; Gebhart and Arutyunyan, 1991) 이들 물질은 단독으로 작용하기 보다 서로 밀접한 상관관계를 갖는다. 여기에는 vitamin E, vitamin C (ascorbate), provitamin A등의 viatmin들과 cysteine, cysteamine과 같은 sulfhydryl 화합물등이 있다 (Ham et al., 1982; Fukuzawa et al., 1985; Chance et al., 1979). Vitamin E(α-tocopherol)는 주요 지용성의 항산화 영양소이며 세포막 같은 지방이 있는 곳에서 작용, 이 물질이 세포막을 구성하는 지질분자에 끼어 있어서 보호막 역할을 하며, vitamin C, vitamin A등과 협동하여 활성산소를 제거하기도 한다. Vitamin C (ascorbate)는 산화 반응이 일어날 때 제일 먼저 방어에 참여하는 물질이다. Vitamin A (Provitamin A)는 특히 singlet oxygen의 제거 작용이 강하다. 인체에서 자연 생산되는 항산화제와는 다르게 α-tocopherol (vitamin E), ascorbic acid (vitamin C), vitamin A등은 외부에서 섭취해야 한다. Carotenoid 중의

vitamin A는 영양학적인 작용과는 별도로 singlet oxygen과 같은 반응성이 높은 산소를 불활성화 할 수 있다. Vitamin A가 반응성이 강한 singlet oxygen 분자로부터 superoxide radical을 형성하기 위하여 필요한 에너지를 빼앗아 singlet oxygen을 제거하고 연쇄반응을 중단시킨다. 즉, 이중결합이 많아 유리기 공격을 받기 쉬운 불포화 유리지방산에 vitamin A가 먼저 유리기와 결합하여 carbon centered radical이 되고 불포화 유리 지방산은 유해하지 않은 비활성형 형태가 된다. 사람에게는 필수적인 selenium은 적혈구의 glutathione peroxidase의 구성성분으로 중요하며 vitamin E와 같이 항산화제 역할을 한다. 또 selenomethionine, selenocysteine 등의 화합물로서 항산화작용, 방사선 방어작용, 항암작용 등을 한다. 간과 신장에 많으며 나이가 많을수록 함량이 높아지며 머리카락 발톱의 함량측정이나 혈장 또는 적혈구의 selenium 수준, glutathione peroxidase 활성도로 체내 selenium 영양상태를 알 수 있다. Selenium 과잉시에는 탈모증과 피로감, 설사, 손톱의 약화 및 소실, 소화기관의 장애, 황달 등이 일어나고 selenium 결핍이 임상적인 증상으로까지 나타나는 경우는 흔치 않으나 결핍시에는 식이섭취 저하, 성장속도 감소, 조직의 합성 및 성장 호르몬의 합성에 제한이 나타난다. 중국의 케산지역에서 많이 나타나는 심근장애증상도 selenium 결핍으로 보며 케산병(Keshan disease)이라고도 불린다. 식이 내 함유량은 토양의 영향을 받아 식습관과도 관계가 있으며 곡류가 섭취량의 절반을 공급한다. 그러나 성장기나 젊은층에서는 일반식품 섭취로 부족 될 염려가 거의 없으나, 40대 이후 나이가 들면서 발생하는 성인병환자들에게는 외부로부터 보충시켜주는 것이 건강유지에 좋다. 현재 방어 물질로 개발된 화합물질들은 심각한 부작용과 중독성을 나타내어 방어물질로 사용시 조심성을 요한다. 이에 따른 대책으로 중독성의 부작용이 없는 이온 방사선에 대한 방사선 방어물질을 찾기 위한 시도로 많은 화합물들을 합성하게 되었다. 하지만 임상적으로 내성을 갖는 물질들도 여러 가지 부작용을 나타낸다. 합성 물질들의 부작용으로 인한 사용 제한 대책으로 천연방어물질 개발의 노력이 많아지고 있다. 본 연구에 사용된 vitamin A와 selenium은 잘 알려진 항산화제들과 마찬가지로 자유 래티칼을 제거하는 항산화 기능을 갖는 물질로 많이 연구되고 있다. 이 물질들의 *in vivo, in vitro* 연구에서 자유 레디칼을 형성하는 여러 화학물질이나 자유레디칼 생성 과정에 의해 세포가 입는 산화적 손상에 대해 세포, 조직 및 기관을 보호하는 것으로 보고되고 있다.

본 실험에서 이와 같이 보고된 vitamin A와 selenium의 항산화 능력은 혜성분석을 통해 생쥐 비장 림프구의 DNA손상 정도를 관찰하여 방사선 방어효과를 손쉽게 인지할 수 있었다. 앞으로 이러한 방법을 통해서 여러 가지 방사선 방어 후보물질에 대한 검색을 계속 추진한다면 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

Table 1. Tail moments of splenic lymphocytes pretreated with vitamin A and selenium by oral administration before 8.0 Gy irradiation.

Splenic lymphocytes		
Experimental Group		Olive TM
A	Non-irradiated Control	1.91±0.28
B	Irradiated Control	3.95±0.46
C	Vitamin A 3mg/kg	3.54±0.41
D	Vitamin A 12mg/kg	3.18±0.30
E	Selenium 0.5mg/kg	3.59±0.30
F	Selenium 2mg/kg	3.40±0.28
G	Vitamin A 3mg/kg+ Selenium 0.5mg/kg	3.45±0.29
H	Vitamin A 3mg/kg+ Selenium 2mg/kg	3.35±0.29
I	Vitamin A 12mg/kg+ Selenium 0.5mg/kg	3.19±0.27
J	Vitamin A 12mg/kg+ Selenium 2mg/kg	2.87±0.24

Table 2. Tail moments of blood lymphocytes pretreated with vitamin A and selenium by oral administration before 8.0 Gy irradiation.

Blood lymphocytes		
Experimental Group		Olive TM
A	Non-irradiated Control	0.87±0.16
B	Irradiated Control	3.52±0.29
C	Vitamin A 3mg/kg	2.51±0.21
D	Vitamin A 12mg/kg	2.41±0.20
E	Selenium 0.5mg/kg	2.70±0.22
F	Selenium 2mg/kg	2.51±0.21
G	Vitamin A 3mg/kg+ Selenium 0.5mg/kg	2.67±0.22
H	Vitamin A 3mg/kg+ Selenium 2mg/kg	2.55±0.21
I	Vitamin A 12mg/kg+ Selenium 0.5mg/kg	2.37±0.20
J	Vitamin A 12mg/kg+ Selenium 2mg/kg	2.25±0.19

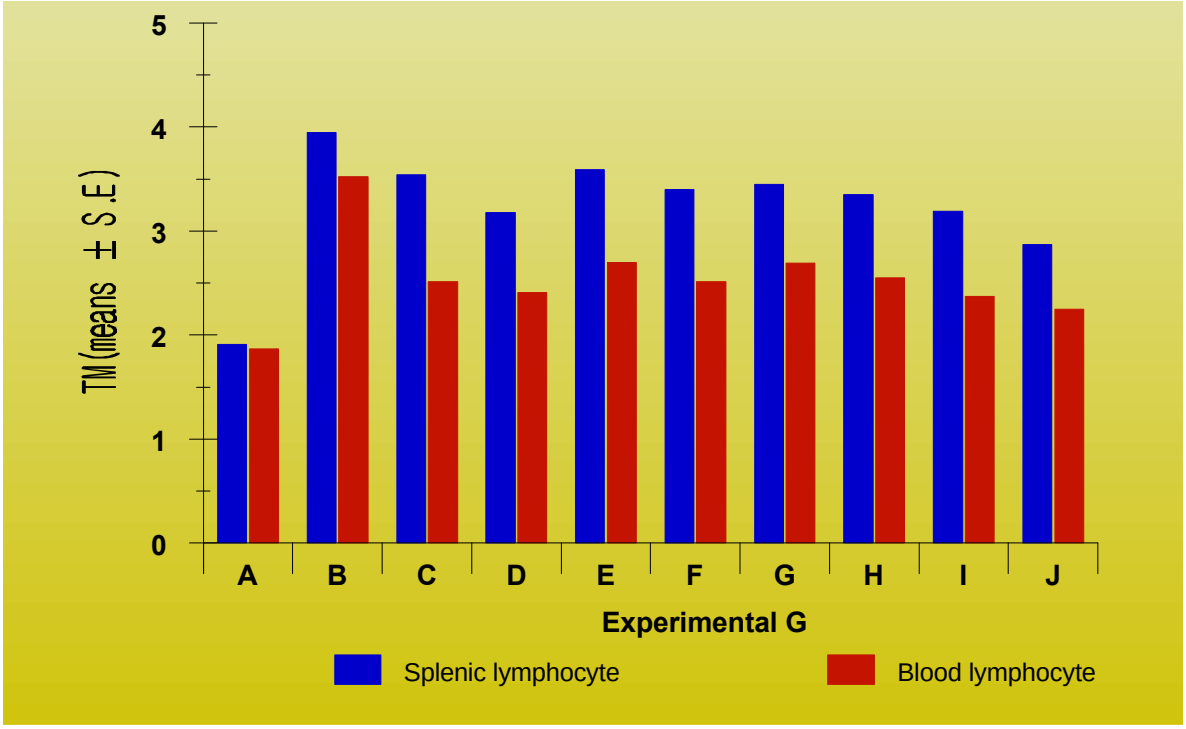

Fig 1. TM values in the mice splenic and blood lymphocytes pretreated with vitamin A and/or selenium and then whole body irradiated with 8.0Gy.

4. 참고문헌

1. O. stling and K. J. Johanson, "Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells.", Biochem. Biophys. Res. Commun., 123:291-298(1984).
2. P. Singh, M. T. McCoy, R. R. Tice and E. L. Schneider, "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells.", Exp. Cell Res. 175:184-191(1988).
3. Weitberg, A.B., S.A. Weitzman, E.R. Clark and T.P. Stossel "Effects of antioxidants on oxidant-induced sister chromatid exchanges formation.", J. Clin. Invest., 75:1835-1841(1985).
4. Sung-Ho Joh, Man-Hee Cho, Samg-Han Lee, Kee-Min Woo, Ye-Jin Chang and Chang-Se Kim, "The effects of vitamin A on the enzyme activities in ethanol-administered rats.", J. Soonchunhyamg Med. Coll. 3(2):325-335(1997).
5. De Flora, S and C. Ramel, " Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis.", Classification and overview, Mutation Res., 202:285-306(1988).

6. Gebhart, E and R.M. Arutyunyan, " Anticlastogens in mammalian and human cells.", Springer-Verlag, New York, pp. 125(1991).
7. Fukuzawa K, Takase S and Tsukatani H., "The effect of concentration on the antioxidant effectiveness of alpha-tocopherol in lipid peroxidation induced by superoxide free radicals.", Arch Biochem Biophys., 40(1):117-202(1985).
8. K.H. Chance, H. Sies and A. Boveris., " Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.", Physiol. Rev., 59: 527-605(1979).
9. H.F. Stich, M.P. Rosin A.P. Horny: Mathew, R. Sankaramarayanan and M.K. Nair, " Remission of oral leukoplaskias and micronuclei in tobacco/ betel quid chewers treated with beta-carotene and with beta-carotene plus vitamin A.", Int. J. Cancer., 42:195-199(1988).
10. mit Mutlu T rko lu, Yesim Erbil, Serdar ztezcan, Vakur Olga , G l in Toker and M jdat Uysal., " The effect of selenium and /or vitamin E treatments on radiation-induced intestinal injury in rats. ", Life Sciences, 66(20):1905-1913(2000).