

سنجش آسیب‌زایی رنگزاهای آزوی اسیدی در DNA به روش الکتروفورز تک سلولی

سیامک سلامی^۱، فرحناز نورمحمدیان^۲، فاطمه کرمی تهرانی^{۳*}، محمود آقایی^۳

۱- آزمایشگاه تحقیقات مولکولی، گروه بیوشیمی و تغذیه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران، صندوق پستی: ۱۱۳۸

۲- گروه مواد رنگزای آلی، پژوهشکده صنایع رنگ، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۶۷۶۵-۶۵۴

۳- آزمایشگاه تحقیقات سرطان، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۹۶-۱۴۱۱۵

تاریخ دریافت: ۱۳۸۶/۹/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۶/۱۲/۱ در دسترس به صورت الکترونیکی از: ۱۳۸۶/۱۲/۲۰

چکیده

رنگزاهای آزو به عنوان دسته‌ای از رنگزاهای کاربردهای گوناگونی در صنایع مختلف دارند که پتانسیل جهش‌زایی و سرطان‌زایی برخی از این نوع رنگزاهای در مطالعات اولیه معلوم شده است لذا سنجش پتانسیل ترکیبات شیمیایی پرمصرف این گروه بخصوص در کیفیت تجاری آنها در ایجاد آسیب در ماده ژنتیکی سلول، DNA، اهمیت ویژه‌ای دارد. در این تحقیق، میزان آسیب در DNA به دنبال تیمار رده سلولی HL-60 با رنگزاهای آزوی اسیدی شامل اسید قرمز ۱۴، اسید آبی ۹۲، اسید آبی ۵ و اسید زرد ۳۶، به روش سنجش میزان تولید سلول‌های کامت یا الکتروفورز تک‌سلولی بررسی گردید. رده سلولی با غلظت‌های ۰.۱، ۰.۲، ۱٪ به مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت تیمار شد. نتایج نشان داد که این چهار رنگزا در مقایسه با بنزیدین به عنوان کنترل مثبت قادر به افزایش معنی‌داری در میزان هیچ یک از اشکال +۱، +۲ یا +۳ سلول‌های کامت نیستند. با توجه به مکانیسم‌های فعال‌ساز متابولیسمی درون‌بدنی برای رنگزاهای آزو، انجام آزمایش کامت به فرم *in vivo* یا بعد از فعال‌سازی رنگزاهای با استفاده از سیستم کبدی پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: رنگزاهای اسیدی، رنگزاهای آزو، سرطان‌زایی، سنجش کامت، الکتروفورز تک‌سلولی، رده سلولی HL-60.

Assessment of Acid Azo Dyes-induced DNA Damage Using Single Cell Electrophoresis

S. Salami, F. Nourmohammadian, F. K. Tehrani*, M. Aghaei

Abstract

Carcinogenic and mutagenic potential of some azo dyes as a category of common dyes in different types of industries has been reported. Current study was designed to assess the DNA damage induced by some commonly used commercial grade acid azo dyes using single cell electrophoresis, comet assay, in human HL-60 cell lines. The results showed that DNA damage in HL-60 cells, namely comet positive cells, were not significantly increased after 12 and 24 hours treatment with azo dyes: Acid Red 14, Acid Blue 92, Acid Blue 5 and Acid Yellow 36 at concentration ranging 0.1- 1.2%. Considering complex metabolic mechanisms of azo dyes in mammals, further evaluation of DNA damage using *in vivo* comet assay is suggested. *J. Color Sci. Tech.* 1(2008), 111-119. © Institute for Colorants, Paint and Coatings.

Keyword: Acid dyes, Azo dyes, Carcinogenic, Comet assay, Single cell electrophoresis, HL-60 cells.

۱- مقدمه

آزو نیز از آن جمله‌اند [۱۵-۸،۱۳]. روش الکتروفورز تک سلول (SCGE)^۱ که سنجش کامت^۲ نیز نامیده می‌شود یکی از روش‌های نوین، ساده و کارا در ارزیابی بروز آسیب در ماده ژنتیکی در شرایط آزمایشگاهی و درون‌بدنی است که می‌تواند بر روی انواع گوناگون سلول‌ها انجام گردد. این روش در سال ۱۹۸۸ میلادی معرفی شد [۱۶] و تا به امروز کاربرد زیادی یافته است. ویژگی‌های زیست‌محیطی و خاصیت سرطان‌زایی اکثر رنگزهای آزو به صورت خالص، بررسی شده است. نکتهٔ حائز اهمیت، تفاوت رنگزهای خالص با رنگزهای تجاری است که درجه خلوص پایین‌تری داشته و ممکن است به همراه رنگز اصلی، ناخالصی‌های خطرناکی وجود داشته باشند [۱۷]. در کشور ما نیز رنگزهای آزوی متنوعی در صنایع مختلف بویژه نساجی مصرف می‌شود. این رنگزها از کارخانه‌های متفاوت تهیه شده و مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این تحقیق، خاصیت جهش‌زایی مواد رنگز آزو که در کشور مورد استفاده قرار می‌گیرد بررسی شد. رنگزهای آزو از گروه رنگزهای آزوی اسیدی شامل اسید قرمز ۱۴ (AR 14)^۳، اسید آبی ۹۲ (AB 92)^۴، اسید آبی ۵ (AB 5)^۵، و اسید زرد ۳۶ (AY 36)^۶ به عنوان مدل مورد مطالعه قرار گرفتند.

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد شیمیایی

رنگزهای آزوی اسیدی شامل اسید قرمز ۱۴، اسید آبی ۹۲، اسید آبی ۵ و اسید زرد ۳۶ استفاده شد. سایر مواد شیمیایی و بیولوژیک مورد مصرف از شرکت‌های مرک یا سیگما تهیه شده است.

۲-۲- روش کار

محلول ذخیره ۵، ۲٪ رنگزهای اسید قرمز ۱۴، اسید آبی ۹۲، اسید آبی ۵ و اسید زرد ۳۶ در محیط کشت استریل تهیه و تا زمان استفاده در ۴ °C نگهداری می‌شد.

ردهٔ سلولی HL-60 (NCBI Code: C217) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. این رده سلولی منشاء انسانی داشته و از لکوسیت‌های خون محیطی فرد مبتلا به لوسمی حاد پرومیلوسیتی به روش لکوفورز تهیه شده‌اند و به خوبی به صورت معلق در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۲ mM گلوتامین و ۲ g/L بی‌کربنات سدیم و ۱۰٪ سرم جنین گوساله و پنی‌سیلین (۱۰۰ u/ml)، استرپتوماسین (۱۰۰ μg/ml) در فلاسک ۲۵ cm^۳ رشد می‌کنند. سلول‌ها در اتمسفر ۵٪ گاز CO₂ و ۹۰٪ رطوبت رشد داده شدند. فلاسک‌ها به صورت

ترکیبات آزو، از بزرگترین گروه رنگزهای آلی سنتزی را تشکیل می‌دهند. در نمایه رنگزها، بیش از ۲۰۰۰ ترکیب آزو قید شده است [۱]. رنگزهای آزو از دیازوتاسیون آمین‌های آروماتیک و جفت شدن با ترکیباتی نظیر فنل‌ها و ... سنتز می‌شوند. این رنگزها را می‌توان به دو گروه محلول و غیرمحلول در آب تقسیم نمود [۲،۳]. بر اساس تعریف اتحادیه اروپا برای طبقه‌بندی مواد خطرناک، بروز سمیت حاد ناشی از رنگزهای آزو پدیده شایعی نیست. حساسیت شغلی به رنگزهای آزو از سال ۱۹۳۰ میلادی در بین کارگران صنعت نساجی مشاهده شده است. اولین مشاهدات به صورت بروز اگزمای شغلی در ۲۰٪ کارگران رنگرز پنبه با رنگزهای آزوی قرمز بود. بیشتر رنگزهای حساسیت‌زای موجود در البسه از گروه رنگزهای دیسپرس می‌باشند که برای رنگرزی الیاف پلی‌استر به کار می‌روند [۴،۵]. اطلاعات بسیار محدودی در خصوص جذب، توزیع و دفع رنگزهای آزو در دست است ولی تحقیقات وسیعی در مورد متابولیسم آنها به دنبال تجویز خوراکی به عمل آمده است. جذب رنگزهای آزو از راه پوست مبهم است چرا که به نظر نمی‌رسد رنگزهای آزو تغییر نیافته، قادر به نفوذ در پوست باشند [۶-۸].

از اواسط قرن نوزدهم صنعت رنگزهای سنتزی و به ویژه صنعت رنگزهای آزوی بر پایهٔ آمین‌های آروماتیک رشد چشمگیری داشت و تماس شغلی با این مواد افزایش یافت. ارتباط میان میزان تماس آمین‌های آروماتیک و سرطان‌های انسانی در سال ۱۸۹۵ میلادی گزارش شد. بروز ۱۲۷ مورد مرگ ناشی از سرطان مثانه در افراد شاغل در ساخت رنگزهای آزو در انگلیس نشان داد که مرگ و میر ناشی از این نوع سرطان بسیار بیشتر از فراوانی طبیعی ۴ مورد در سال است. تقریباً ۲۵٪ از کارگرانی که در تماس با آمین‌های آروماتیک (شامل ۲- نفتیل آمین و بنزیدین) بودند به سرطان مثانه دچار شده‌اند [۸،۹]. ارتباط بین آمین‌های آروماتیک و سرطان مثانه انسان منجر به آزمایشات وسیع در بررسی امکان القاء سرطان مثانه در حیوانات آزمایشگاهی شد. در مدل حیوانی، آمین‌های آروماتیک سبب سرطان‌های کبد، روده یا مثانه می‌شوند. علاوه بر آن، تومور در غدد پستانی و پوست نیز در موش‌های صحرایی دیده شده است [۱۰]. اگرچه رنگزهای آزوی کاملاً خالص، پتانسیل سرطان‌زایی کمتری نشان می‌دهند اما مهمترین مورد در خصوص این ترکیبات شیمیایی، ناخالصی‌هایی است که غالباً در تمام رنگزهای آزوی تجاری وجود دارد. ناخالصی‌ها می‌تواند ناشی از مواد اولیه مورد استفاده در فرآیند ساخت یا نگهداری باشند. رنگزهای آزو بر اساس آمین آروماتیک اولیه خود ممکن است این آمین را به صورت ناخالصی فرآیند تولید، به همراه داشته باشند. روش‌های مختلفی در بررسی سمیت ژنتیکی رنگزها و سایر ترکیبات آلی استفاده شده است [۱۱،۱۲] که رنگزهای

1- Single cell gel electrophoresis

2- Comet assay

3- C.I. Acid Red 14

4- C.I. Acid Blue 92

5- C.I. Acid Blue 5

6- C.I. Acid Yellow 36

از محلول SYBR® Green I (10,000× in DMSO) استفاده شد. لام‌های رنگ‌آمیزی شده با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و فیلتر فلورسین (فیلتر ۴۹۴ برای تهییج و ۵۲۱ نانومتر برای تابش) مطالعه شد. جهت ارزیابی آماری نتایج به دست آمده از آزمون χ^2 با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS استفاده شده است. تصاویر سلولی به روش عکس‌برداری میکروسکوپی با استفاده از سیستم دیجیتال جمع‌آوری و توسط نرم‌افزار کامت تحلیل شد.

۲- نتایج و بحث

نتایج بر اساس رنگزاهای مورد استفاده و نوع سلول کامت به دست آمده به سه گروه میزان بروز سلول‌های کامت خفیف (+۱) (شکل ۱-الف)، کامت متوسط (+۲) (شکل ۱-ب) و کامت شدید (+۳) (شکل ۱-ج) تحلیل شد.

۱-۳- نتایج مربوط به رنگزای اسید قرمز ۱۴

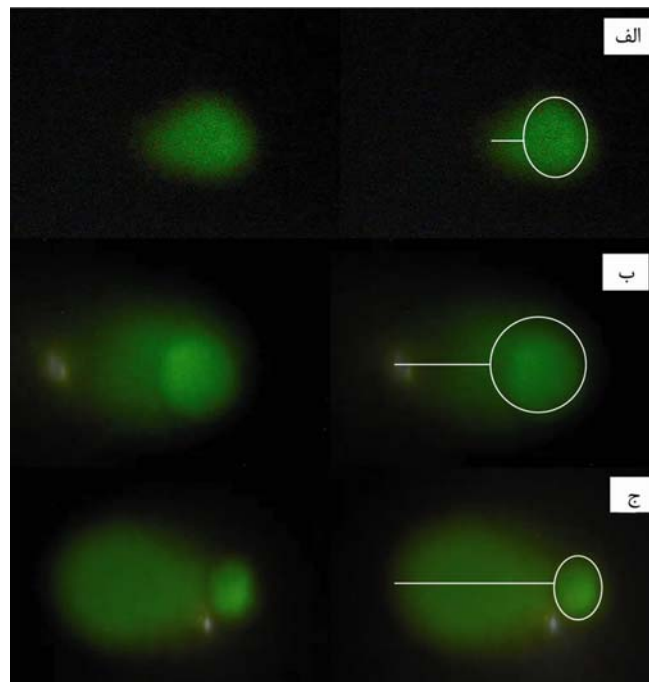
نتایج میزان القای آسیب DNA در این نوع از سلول‌ها نشان داد که بعد از ۱۲ ساعت تیمار سلول‌ها با غلظت‌های بررسی شده، افزایش معنی‌داری در هیچ یک از انواع سلول‌های کامت مثبت یا در مجموع آنها نسبت به گروه کنترل منفی دیده نمی‌شود (شکل ۲-الف)

1- Trevigen's comet assay

روزانه به طریق میکروسکوپ معکوس از نظر رشد، تقسیم سلولی و تراکم پدید آمده، مورفولوژی سلولی و همچنین کنترل عدم ایجاد آلودگی باکتریایی و قارچی بازدید و محیط کشت فلاسک‌ها هفته‌ای دوبار تعویض می‌شد.

با توجه به غلظت کاربردی رنگزاهای غلظت‌های ۰٫۱، ۰٫۲، ۰٫۴، ۰٫۸ و ۱٫۲ درصد مورد آزمایش قرار گرفت و سلول‌ها به مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت تیمار شدند. از تیمار با بنزیدین به عنوان نمونه شاهد مثبت و سلول‌هایی که با رنگزا تیمار نشده بودند به عنوان نمونه شاهد منفی استفاده شدند.

برای انجام این آزمایش از کیت سنجش کامت تروین^۱ استفاده شد. به طور خلاصه از سلول‌ها با 10^5 به نسبت ۱:۱۰ با آگاروز دارای نقطه ذوب پایین (در 37°C) مخلوط و بلافاصله ۷۵ μL به محل مخصوص روی لام منتقل گردید. لام‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 4°C و تاریکی قرار داده شده و سپس به مدت یک ساعت در محلول لیزکننده خنک قرار گرفت. لام‌ها در دمای اتاق و محل تاریک به مدت ۱ ساعت درون محلول قلیایی قرار داده شد. در انتها، لام‌ها به درون مخزن الکتروفورز افقی منتقل و در شرایط غیر بافری محلول قلیایی (۱ mM EDTA و ۳۰۰ mM NaOH) ($\text{pH} > 13$) با ایجاد میدان الکتریکی ۱ Volt/cm و ۳۰۰ mA به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز گردید. لام‌ها بعد از اتمام الکتروفورز با آب شسته شده و به مدت ۵ دقیقه در اتانول 70°C قرار گرفته در هوای آزاد خشک گردید. برای رنگ‌آمیزی



شکل ۱: تصاویر سلول کامت (الف) +۱، (ب) +۲ و (ج) +۳ و نحوه تحلیل سر و دنباله.

که سبب تولید واکنشگرهای الکتروفیلی می شود وجه مشترک است [۱۹،۲۰]. همبستگی بین نتایج آزمون‌های جهش‌زایی و مشاهده سرطان‌زایی ناشی از رنگزاهای آزو در مدل حیوانی ضعیف است. فقدان همبستگی احتمالاً به دلیل مسیرهای متابولسمی پیچیده‌ای است که رنگزاهای آزو در پستانداران سپری می‌سازند [۸]. اغلب رنگزاهای آزو جهت ایجاد جهش‌زایی در سیستم‌های آزمایشی *in vitro* نیازمند فعال‌شدگی متابولسمی، بویژه احیاء و شکست پیوند آزو به جزء آمین آروماتیک می‌باشند و لذا اکثر رنگزاهای آزو در صورتی که کاملاً خالص بوده باشند حداقل بدون فعال‌شدگی متابولسمی قادر به ایجاد نتایج مثبت در آزمون‌های جهش‌زایی نیستند. شواهد قوی وجود دارد که آمین‌های آروماتیک برای سرطان‌زایی نیازمند فعال‌سازی متابولسمی می‌باشند [۲۱]. مرحله اول شامل *N*-هیدروکسیله شدن و *N*-استیله شدن است و در مرحله دوم *O*-استیله شدن رخ می‌دهد که سبب تولید آمین‌های آسیل‌اکسی می‌شود. این ترکیبات می‌توانند به اشکال بسیار واکنشگر یون‌های نیترونیوم و کربونیوم تبدیل گردند. چنین واکنشگرهای الکتروفیلی می‌توانند به سهولت به صورت کووالانسی به ماده ژنتیکی سلول یعنی DNA و RNA متصل شوند [۲۵-۲۲، ۱۹]. در شرایط pH اسیدی مثانه تبدیل به یون‌های نیترونیوم آسان‌تر بوده و این یون قادر به تأثیر متقابل با بازگوانین DNA است [۲۵، ۲۶]. با این حال غالب رنگزاهای آزوی تجارتي در دسترس به دلیل ناخالصی‌های موجود در آنها (مانند آلودگی با آمین‌های آروماتیک) خواص جهش‌زایی *in vitro* نشان می‌دهند [۱۷]. ناخالصی‌ها می‌تواند مربوط به فرآیند ساخت یا نگهداری باشند. آمین‌های آروماتیک همچنین می‌توانند به دلیل تخریب حرارتی یا فوتوشیمیایی رنگزاهای آزو در آنها پدید آمده باشند [۲۷].

الکتروفورز تک سلول (SCGE) یا سنجش کامت روشی بسیار حساس و سریع برای تعیین میزان آسیب در DNA در هر یک از سلول‌ها است که اساس آن ایجاد شرایطی برای مهاجرت DNA دناتوره (از حالت طبیعی خارج شدن) و شکسته شده در میدان الکتریکی است. در شرایطی که به DNA آسیبی نرسیده باشد مهاجرت بسیار کمی نشان داده و در فضای هسته‌ای باقی می‌ماند اما DNA آسیب دیده به فرم ستاره دنباله‌دار درآمده که شکل و میزان مهاجرت این دنباله میزان صدمه‌دیدگی DNA را نشان می‌دهد [۱۶]. این روش در ده سال اخیر توجه محققین بسیاری را به خود جلب کرده است [۳۱-۲۸]. در مقایسه با سایر روش‌هایی که برای مطالعه سمیت ژنتیکی وجود دارند ساده‌تر و ارزان‌تر است. در این روش می‌توان به روش‌های مختلف سلول‌ها را از هم تفکیک کرد و به آنها امتیاز داد. این کار می‌تواند به واسطه برنامه‌های کامپیوتری انجام شود [۳۲، ۳۳]. تحقیق بر روی ۱۰ رنگزای آزوی نساجی با استفاده از سه روش مختلف نشان داده است که سنجش کامت روش قابل اعتمادی در سنجش سمیت ژنتیکی است [۳۴].

(۵، $P > 0$). در تیمار ۲۴ ساعته نیز در هیچکدام از غلظت‌های استفاده شده افزایش معنی‌داری در میزان هیچکدام از اشکال سلول‌های کامت اعم از ۱+، ۲+ و ۳+ مشاهده نشد (شکل ۳-الف) (۵، $P > 0$). تیمار ۱۲ و ۲۴ ساعته سلول‌ها با بنزیدین افزایش معنی‌داری را در میزان بروز آسیب در DNA سلول‌ها ایجاد کرد (شکل ۴-الف و ب) (۱، $P < 0$).

۳-۲- نتایج مربوط به رنگزای اسید آبی ۵

تیمار ۱۲ و ۲۴ ساعته سلول‌ها با غلظت‌های بررسی شده این رنگزا نیز میزان القای آسیب DNA را به شکل معنی‌داری افزایش نداد و هیچ یک از انواع سلول‌های کامت مثبت یا در مجموع آنها نسبت به گروه کنترل منفی افزایش معنی‌داری نیافت (شکل ۲-ب و ۳-ب) (هر دو ۵، $P > 0$). تیمار ۱۲ و ۲۴ ساعته سلول‌ها با بنزیدین افزایش معنی‌داری در میزان بروز آسیب در DNA سلول‌ها ایجاد کرد (۱، $P < 0$) (شکل ۴-الف و ب).

۳-۳- نتایج مربوط به رنگزای اسید آبی ۹۲

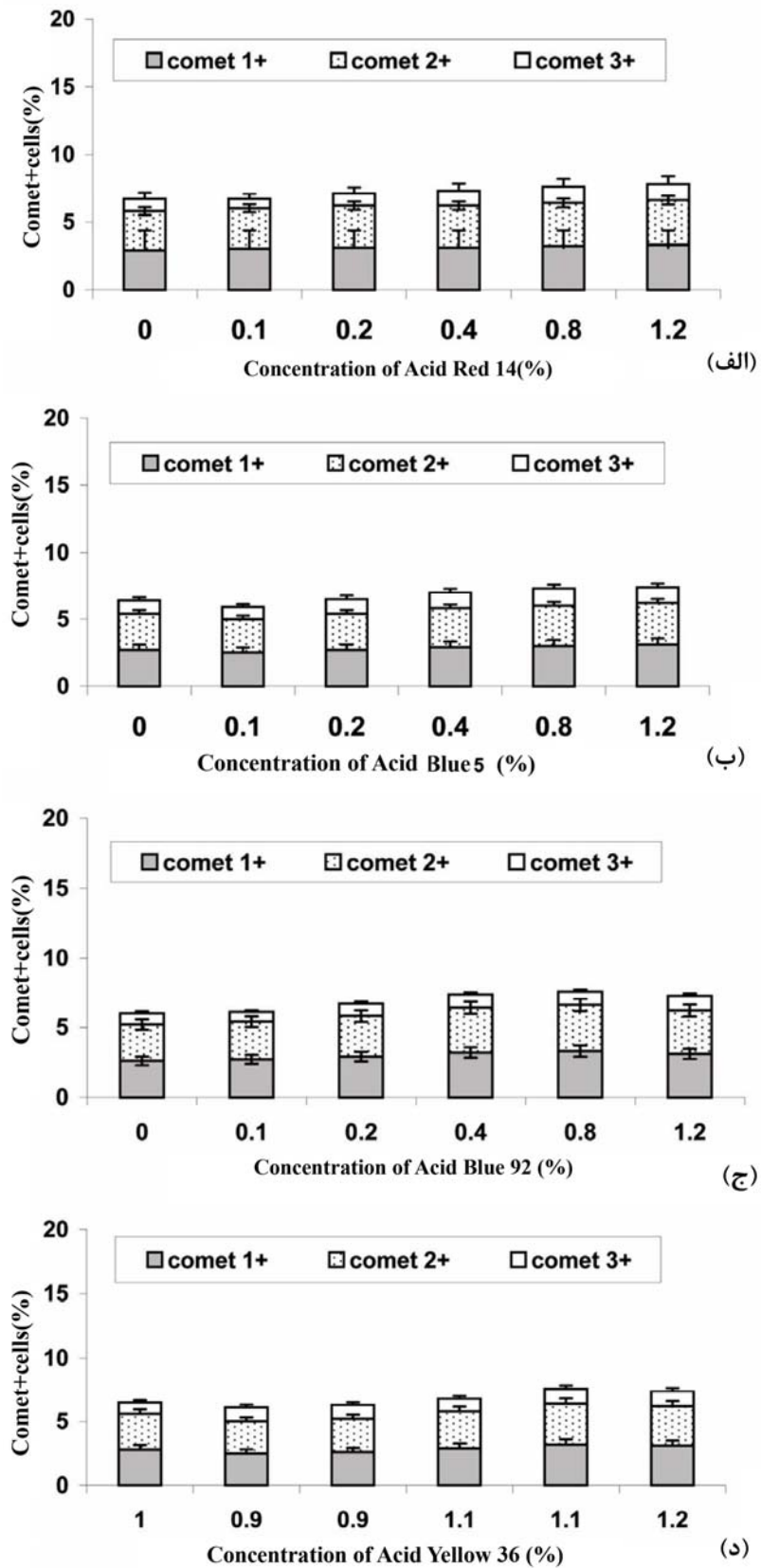
تیمار ۱۲ ساعته سلول‌ها با غلظت‌های بررسی شده این رنگزا قادر به افزایش معنی‌داری در میزان القای آسیب DNA به صورت هیچ یک از انواع سلول‌های کامت مثبت یا در مجموع آنها نسبت به گروه کنترل منفی نبود (شکل ۲-ج) (۵، $P > 0$) و در تیمار ۲۴ ساعته نیز در هیچکدام از غلظت‌های استفاده شده افزایش معنی‌داری در میزان هیچکدام از اشکال کامت اعم از ۱+، ۲+ و ۳+ مشاهده نشد (شکل ۳-ج) (۵، $P > 0$). بنزیدین در تیمار ۱۲ و ۲۴ ساعته سبب افزایش معنی‌داری در میزان بروز آسیب در DNA گردید (۱، $P < 0$) (شکل ۴-الف و ب).

۳-۴- نتایج مربوط به رنگزای اسید زرد ۳۶

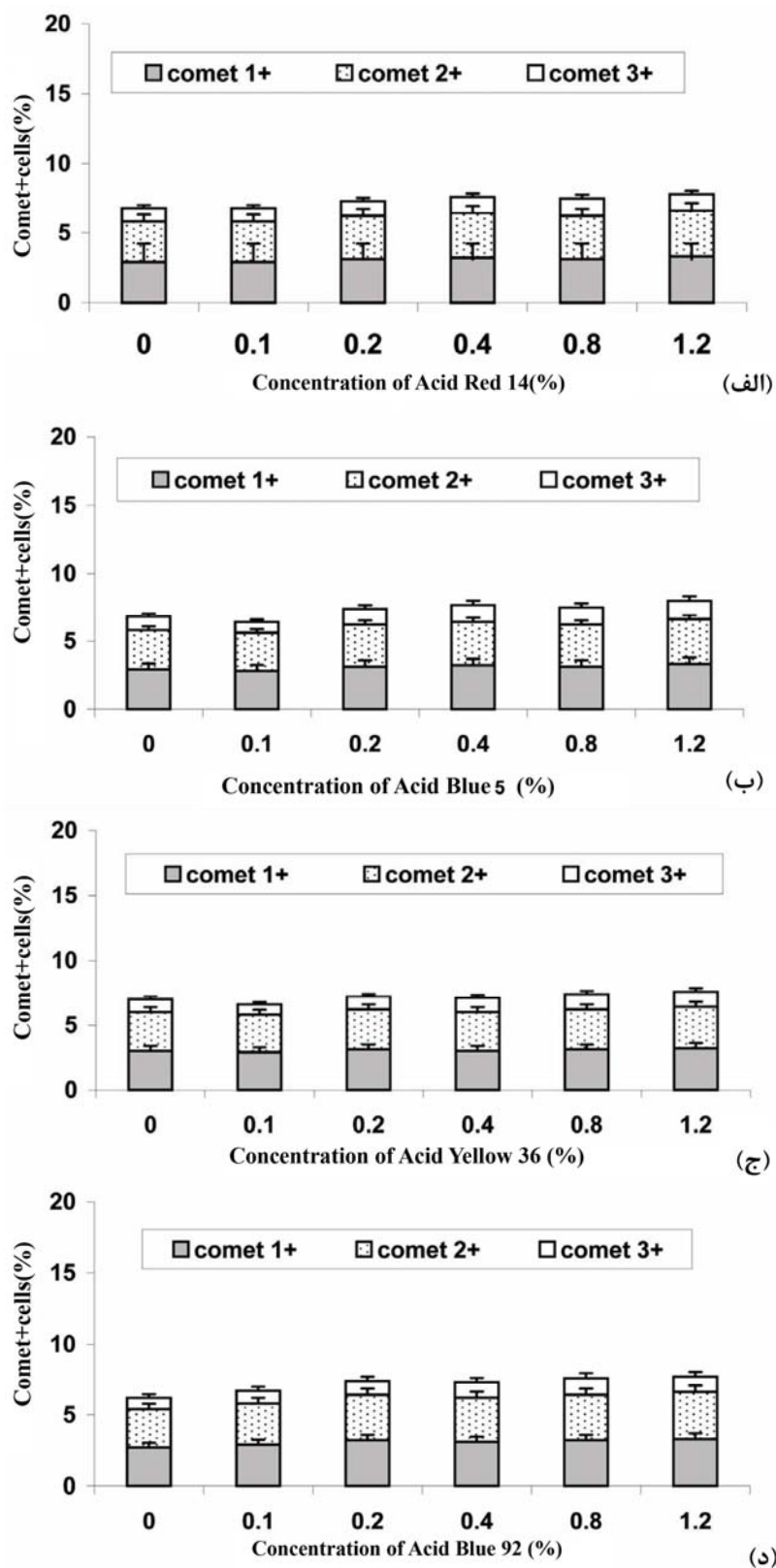
در تیمار ۱۲ و ۲۴ ساعته سلول‌ها با غلظت‌های بررسی شده این رنگزا افزایش معنی‌داری در میزان القای آسیب DNA در این نوع سلول‌ها رخ نداد و میزان هیچ یک از انواع سلول‌های کامت مثبت یا مجموع آنها نسبت به گروه کنترل منفی افزایش معنی‌داری نداشت (شکل ۲-د و ۳-د) (هر دو ۵، $P > 0$). تیمار ۱۲ و ۲۴ ساعته سلول‌ها با بنزیدین با افزایش معنی‌داری در میزان بروز آسیب در DNA سلول‌ها همراه بود (۱، $P < 0$) (شکل ۴-الف و ب).

۵-۳- بحث

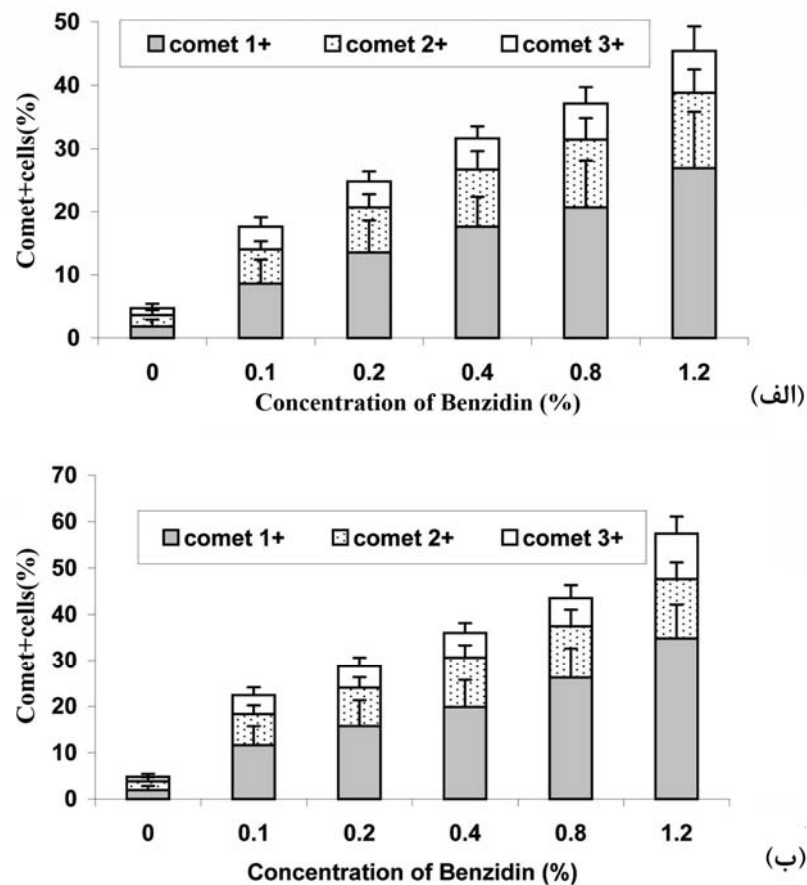
سرطان‌زایی و آسیب ناشی از برخی از رنگزاهای آزو بخصوص انواع بنزیدینی گزارش شده است [۱۸، ۸]. تفاوت در ساختمان مولکولی آمین‌های آروماتیک به نحو قابل توجهی پتانسیل سرطان‌زایی آنها را تغییر می‌دهد. ولی به نظر می‌رسد ساز و کار فعال‌شدگی متابولسمی



شکل ۲: میزان درصد تجمعی انواع سلول‌های کامت به دنبال تیمار ۱۲ ساعته با رنگزاهای (الف) Acid Red 14، (ب) Acid Blue 5، (ج) Acid Blue 92، (د) Acid Yellow 36.



شکل ۳: میزان درصد تجمعی انواع سلول‌های کامت به دنبال تیمار ۲۴ ساعته با رنگزاهای (الف) Acid Red 14، (ب) Acid Blue 5، (ج) Acid Blue 92، (د) Acid Yellow 36.



شکل ۴: میزان درصد تجمعی انواع سلول‌های کامت به دنبال تیمار بنزیدین (الف) ۱۲ ساعته و (ب) ۲۴ ساعته.

تا اثرات آنها بر روی ارگان‌های مختلف بعد از فعال شدگی متابولیسمی نیز بررسی شود. چنین آزمایشاتی در مورد برخی از سایر رنگزاهای آزو و مواد دیگر انجام شده است [۳۷-۳۵].

تشکر و قدردانی

این تحقیق به عنوان طرح پژوهشی بین دانشگاهی با حمایت مالی سازمان مدیریت و برنامه‌ریزی بین دانشگاه تربیت مدرس و پژوهشکده صنایع رنگ انجام شده است. مؤلفین کمال تشکر خود را از حمایت‌ها و مساعدت‌های انجام شده اعلام می‌دارند.

۴- نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر از رنگزاهای آزوی اسیدی استفاده شد که بر اساس مرور منابع، تحقیق مشابهی بر روی آنها انجام نشده است. نتایج به دست آمده نشان داد که رنگزاهای مذکور در غلظت آزمایش قادر به ایجاد اثر سمیت ژنتیکی معنی‌داری در رده سلولی HL-60 نبودند. با توجه به این که آزمون کامت انجام شده یک آزمون آزمایشگاهی *in vitro* است رنگزاهای هیچ‌گونه تغییر متابولیسمی را تحمل نمی‌کنند و فعال‌شدگی متابولیسمی می‌تواند در افزایش سمیت ژنتیکی این ترکیبات مؤثر باشد. لذا به نظر می‌رسد در ادامه این تحقیق می‌توان به بررسی خاصیت سمیت ژنتیکی با روش درون بدنی *in vivo* پرداخت

۵- مراجع

1. R. M. Christie, Colour chemistry, Royal Society of Chemistry, Cambridge. (2001), 206-18.
2. P. M. Klaus Hunger, Wolfgang Rieper, R. Raue, K. Kunde, A. Engel, Azo dyes Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Berlin. (2002), 896-903.
3. H. Zollinger, Color chemistry: syntheses, properties, and applications of organic dyes and pigments, Verlag Helvetica Chimica Acta:Wiley-VCH, Zurich Weinheim [Great Britain]. (2003), 478-84 .
4. A. K. Bajaj, R. K. Pandey, K. Misra, A. K. Chatterji, A. Tiwari, S. Basu, Contact depigmentation caused by an azo dye in alta. *Contact Dermatitis*. 38(1998), 189-93.
5. A. Ancona, L. Serviere, A. Trejo, F. Monroy, Dermatitis from an azo-dye in industrial leather protective shoes. *Contact Dermatitis*. 8(1982), 220-1.
6. K. A. K. David Jacobson-Kram, Toxicology testing handbook: Principles, applications, and data, Marcel Dekker. (2001), 543-78.
7. L. J. Casarett, J. Doull, C. D. Klaassen, Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons, McGraw-Hill Medical Pub. Division, New York. (2001), 374-89.
8. M. Boeniger, The carcinogenicity and metabolism of azo dyes, especially those derived from benzidine, Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Center for Disease Control, National Institute for Occupational Safety and Health, Robert A. Taft Laboratories. (1980), 1-8.
9. M. C. B. Diane Susan Henshel, M. C. Harrass, Environmental toxicology and risk assessment: standardization of biomarkers, ASTM. (1999), 1-12.
10. R. O. Alves de Lima, A. P. Bazo, D. M. Salvadori, C. M. Rech, D. de Palma Oliveira, G. de Aragao Umbuzeiro, Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source. *Mutat. Res*. 626(2007), 53-60.
11. P. Patnaik, A comprehensive guide to the hazardous properties of chemical substances, John Wiley & Sons, New York. (1999), 1-10.
12. J. M. P. S. Venitt, Mutagenicity testing: A practical approach. IRL Press. (1984), 438-45.
13. A. W. Burg, Azo dyes: evaluation of data relevant to human health and environmental safety: report to the Dyes Environmental and Toxicology Organization Inc, Arthur D. Little Inc. (1980), 1-15.
14. J. F. Chiu, M. Hunt, L. S. Hnilica, Tissue-specific DNA-protein complexes during azo dye hepatocarcinogenesis. *Cancer. Res*. 35(1975), 913-9.
15. J. J. Roberts, G. P. Warwick, Azo-dye carcinogenesis, The reactions of 4-hydroxymethylaminozobenzene with cytosine derivatives. *Int. J. Cancer*. 1(1966), 107-17.
16. H. Raza, S. K. Khanna, G. B. Singh, C. R. Murti, Absorption & metabolic disposition of azo dye metanil yellow in rats. *Indian J. Exp. Biol*. 20(1982), 48-51.
17. M. S. Tsuboy, J. P. Angeli, M. S. Mantovani, S. Knasmuller, G. A. Umbuzeiro, L. R. Ribeiro, Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. *Toxicol. In Vitro*. (2007), 223-9.
18. S. J. Biswas, A. R. Khuda-Bukhsh, Cytotoxic and genotoxic effects of the azo-dye p-dimethylaminoazobenzene in mice: a time-course study. *Mutat. Res*. 587(2005), 1-8.
19. H. Chen, Recent advances in azo dye degrading enzyme research. *Curr. Protein. Pept. Sci*. 7(2006), 101-11.
20. K. Enslein, H. H. Borgstedt, A QSAR model for the estimation of carcinogenicity: Example application to an azo-dye. *Toxicol. Lett*. 49(1989), 107-21.
21. C. R. Nony, M. C. Bowman, Analysis, purification and stability: Requirements for a metabolism study of an azo dye and pigment. *J. Anal. Toxicol*. 4(1980), 63-7.
22. Y. An, L. Jiang, J. Cao, C. Geng, L. Zhong, Sudan I induces genotoxic effects and oxidative DNA damage in HepG2 cells. *Mutat. Res*. 627(2007), 164-70.
23. M. Stiborova, V. Martinek, H. H. Schmeiser, E. Frei, Modulation of CYP1A1-mediated oxidation of carcinogenic azo dye Sudan I and its binding to DNA by cytochrome b5. *Neuro. Endocrinol. Lett*. 27(2006), 35-9.
24. K. Srinivasan, M. M. Bhargava, Hepatic binding proteins translocating azo dye carcinogen metabolites from cytoplasm into nucleus in rats. *Food. Chem. Toxicol*. 42(2004), 503-8.
25. M. Stiborova, B. Asfaw, P. Anzenbacher, P. Hodek, A new way to carcinogenicity of azo dyes: the benzenediazonium ion formed from a non-aminoazo dye, 1-phenylazo-2-hydroxynaphthalene(Sudan I) by microsomal enzymes binds to deoxyguanosine residues of DNA. *Cancer Lett*. 40(1988), 327-33.
26. C. Tagesson, D. Chabiuk, O. Axelson, B. Baranski, J. Palus, K. Wyszynska, Increased urinary excretion of the oxidative DNA adduct, 8-hydroxydeoxyguanosine, as a possible early indicator of occupational cancer hazards in the asbestos, rubber, and azo-dye industries. *Pol. J. Occup. Med. Environ. Health*. 6(1993), 357-68.
27. A. Wang, J. Qu, H. Liu, J. Ge, Degradation of azo dye Acid Red 14 in aqueous solution by electrokinetic and electrooxidation process. *Chemosphere*. 55(2004), 1189-96.
28. R. R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J. C. Ryu, Y. F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen*. 35(2000), 206-21.
29. K. Hashimoto, W. Takasaki, I. Sato, S. Tsuda, DNA damage measured by comet assay and 8-OH-dG formation related to blood chemical analyses in aged rats. *J. Toxicol. Sci*. 32(2007), 249-59.

30. A. Baumgartner, E. Cemeli, D. Anderson, The comet assay in male reproductive toxicology. *Cell. Biol. Toxicol.* 17(2007), 154-62.
31. G. Speit, A. Hartmann, The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol. Biol.* 314 (2006), 275-86.
32. P. Rajaguru, L. J. Fairbairn, J. Ashby, M. A. Willington, S. Turner, L. A. Woolford, N. Chinnasamy, J. A. Rafferty, Genotoxicity studies on the azo dye Direct Red 2 using the in vivo mouse bone marrow micronucleus test. *Mutat. Res.* 444(1999), 175-80.
33. C. Helma, M. Uhl, A public domain image-analysis program for the single-cell gel-electrophoresis (comet) assay. *Mutat. Res.* 466(2000), 9-15.
34. K. M. Wollin, B. D. Gorfiltz, Comparison of genotoxicity of textile dyestuffs in Salmonella mutagenicity assay, in vitro micronucleus assay, and single cell gel/comet assay. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol* 23(2004), 267-78.
35. F. Nessler, N. Zennouche, S. Simar-Meintieres, I. Talahari, E. N. Nkili-Mboui, D. Marzin, In vivo comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds. *Mutat. Res.* 630(2007), 28-41.
36. B. Burlinson, R. R. Tice, G. Speit, E. Agurell, S. Y. Brendler-Schwaab, A. R. Collins, P. Escobar, M. Honma, T. S. Kumaravel, M. Nakajima, Y. F. Sasaki, V. Thybaud, Y. Uno, M. Vasquez, A. Hartmann, Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo comet assay workgroup. *Mutat. Res.* 627(2007), 31-5.
37. K. Sekihashi, A. Yamamoto, Y. Matsumura, S. Ueno, M. Watanabe-Akanuma, F. Kassie, S. Knasmuller, S. Tsuda, Y. F. Sasaki, Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay. *Mutat. Res.* 517(2002), 53-75.