

Cypermethrin 과 Piperonyl butoxide 가 rat 의 독성반응에 미치는 영향

정규혁·홍사옥
성균관대학교 약학대학
(Received January 12, 1990)

Effect of Cypermethrin and Piperonyl Butoxide on Toxic Response in Rats

Kyu Hyuok Chung and Sa Uk Hong
College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746

Abstract — The aim of this experiment is to observe the toxicity of cypermethrin[S, R- cyano-3-phenoxybenzyl-(1R, 1s, cis, trans)-2,2-dimethyl-3-(2,2-dichlorovinyl) cyclopropane carboxylate] and to investigate the synergistic effect of piperonyl butoxide on the cypermethrin toxicity.

In cypermethrin (CYP) treated group, the biochemical parameters such as ALT, LDH, glucose in serum were remarkably elevated. The content of cytochrome P-450 and activity of NADPH-cytochrome c reductase in renal microsomal fraction were increased but those in hepatic microsomal fraction were not significantly increased. The activity of aniline hydroxylase and ATPase in liver were decreased.

In the case of CYP plus piperonyl butoxide (PB) treated group, AST, ALT, LDH and glucose were more increased. Cytochrome P-450 and NADPH-cytochrome c reductase in liver and kidney were suppressed and aniline hydroxylase and ATPase in liver were more decreased.

Especially, in the case of CYP plus PB 100 mg/kg treated group, hepatic TBA value was increased but activity of glucose-6-phosphatase was remarkably depressed.

Keywords □ *cis*-Cypermethrin, piperonyl butoxide, biochemical parameters, cytochrome p-450, NADPH-cytochrome C reductase, aniline hydroxylase, ATPase, TBA value glucose-6-phosphatase

과거 살충제로서 많이 사용되었던 천연 pyrethrum의 살충성분이 pyrethrin I과 pyrethrin II임이 밝혀짐에 따라 이를 모체로 하여 구조 중 활성작용이 있는 부분들을 수식하여 천연 pyrethrin에 비해 안정성이 높으며 포유동물에 독성이 적고 잔류성도 그다지 문제가 되지 않을 뿐 아니라 경제성이 보완되는 방향으로 합성 pyrethroid계 살충제의 개발이 활발히 이루어지고 있다.^{1,2)}

1974년 Elliot³⁾에 의해 합성된 cypermethrin [(RS)- α -cyano-phenoxybenzyl (1RS)-cis, trans-3-(2, 2-dichlorovinyl)-2, 2-dimethyl-cyclopropane carboxylate]은 3개의 chiral 중심(cyclopropane C-1과 C-3, alcohol moiety의 C- α)을

가진 8개의 이성체가 있으며 합성 pyrethroid 중에서 비교적 독성이 강한 것으로 알려져 있다.

Cypermethrin의 대사경로에 관하여 David 등⁴⁾은 mouse에서, Crawford 등⁵⁾은 rat에서 규명하여 유사한 결과를 보고하였다. 즉 주대사반응은 ester 결합의 분해이며 대사산물은 glucuronide 및 sulfate 포함체로서 뇨로 배설된다고 하였으며, cyanide ion의 대부분은 2-imino-thiazolidine-4-carboxylic acid와 thiocyanate로서 대사되어 뇨로 배설된다고 보고하였다. ester 결합의 가수분해과정은 대부분 methyl group 및 phenoxy group이 hydroxylation된 후에 일어난다고 하였다.

Pyrethroid 계 살충제는 선택독성을 나타내는데, 이는 포유류 및 조류에 비해 ester 결합의 분해 및 hydroxylation 등에 의한 대사가 해충류 및 어류 등에서는 느리기 때문에 강한 독성을 나타내는 것이라고 한다. 또한 pyrethroid의 종류에 따라 대사속도에 차이가 있으며 동족체의 pyrethroid 중에서도 비교적 cis체가 trans체에 비해 대사속도가 느린 것으로 보고되어 있다.⁴⁻⁶⁾

한편 1947년 Wachs⁷⁾는 바구미(sitophilus oryzae) 등의 방충에 유효한 piperonyl butoxide를 천연 pyrethrin의 synergist로서 사용할 때 살충효과가 더 우수함을 보고하였다. 이는 piperonyl butoxide가 생체내에서 천연 pyrethrin을 분해하는 esterase를 불활성화하기 때문이라고 주장한 바 있다. Yamamoto 등⁸⁾은 esterase 저해작용 보다는 다른 복합작용 등이 관여하는 것으로 추리하였을 뿐 명확히 규명된 바는 없었다.

금번 저자 등은 합성 pyrethroid 중 cis-cypermethrin과 synergist인 piperonyl butoxide를 선정하여 rat에 각각 단독 및 혼합투여함에 따른 독성의 변화를 관찰하고자 본 실험에 착수하였다.

실험방법

1. 실험동물 및 약물투여방법

체중 200~230g의 건강한 웅성 Sprague-Dawley 계 rat를 삼육축산(경기도 화성군 소재)에서 분양받아 실온 22±2°C, 습도 55±5%를 유지하면서 1군을 8~10마리로 하여 동일한 cage 내에서 사육하였다. 사료는 배합고형사료(삼양유지사료주식회사)를 급식하였고 급수는 수도수를 사용하였다. 사료의 조성은 조단백질 22.1%, 조지방 3.5%, 조섬유소 5.0%, 조회분 8.0%, Ca 0.6%, P 0.4%이다. 실험군은 다음과 같이 구분하여 약물을 1일 1회씩 1주 및 2주간 각각 경구투여 하였다.

대조군—corn oil을 5.0 ml/kg씩 투여하였다.

Piperonyl butoxide(이하 PB라 칭함) 단독투여군—PB(순도 90%) 용액을 corn oil에 용해하여 100 mg/kg씩을 대조군과 동일한 방법으로 투여하였다.

Cis-cypermethrin(이하 CYP라 칭함) 단독투여군—CYP(순도 96%, cis체)을 corn oil에 용해

하여 10 mg/kg씩을 대조군과 동일한 방법으로 투여하였다.

PB 50 mg/kg 혼합투여군—CYP 10 mg/kg과 PB 50 mg/kg을 corn oil에 용해하여 대조군과 동일한 방법으로 투여하였다.

PB 100 mg/kg 혼합투여군—CYP 10 mg/kg과 PB 100 mg/kg을 corn oil에 용해하여 대조군과 동일한 방법으로 투여하였다.

2. 체중과 간장 및 신장 중량의 측정

약물투여전의 체중과 최종 약물투여 24시간 후의 체중을 측정하여 약물투여 전후의 체중증감율로 표시하였다. 약물투여 24시간 후에 ether로 마취하여 복부정중선을 절개하고 상법⁹⁻¹¹⁾에 따라 간장과 신장의 원형을 유지하면서 적출하고 수분을 제거한 다음 즉시 칭량하였다.

3. 혈액생화학적 변화측정

약물투여 24시간 후에 ether로 마취시켜 신속히 복부정중선을 절개하여 복부대동맥에서 채혈하여 혈청을 autoanalyzer를 사용하여 혈액생화학적 검사를 하였다.

4. 간장 및 신장 microsome 분획의 분리

적출한 간장 및 신장을 세공하여 potter elverhjem homogenizer를 사용하여 0.25 M sucrose 용액으로 homogenizer시켰다. 10~20%의 간장 homogenate를 Kamath 등¹²⁾의 방법을 개량한 Cinti 등⁹⁾의 방법에 따라 원심분리한 다음 그 pellet을 microsome 분획으로 사용하였다.

Cytochrome P-450 함량측정—microsome 분획중의 cytochrome P-450 함량측정은 Omura와 Sato¹⁰⁾의 방법을 참조하고 Takashi 등¹³⁾의 변법에 준하여 조작하여 difference spectrophotometry로 450 nm와 500 nm에서 흡광도를 측정하고 molar extinction difference를 104 mM⁻¹ cm⁻¹로 하여 cytochrome P-450의 함량을 계산하였다.

NADPH-cytochrome c reductase 활성측정—Master 등¹⁴⁾의 방법 및 Mazel¹⁵⁾의 방법에 준하여 조작한 후 reaction rate가 linear하게 되는 3~4분 사이에 550 nm에서 1분간의 흡광도 차를 측정하고 molar extinction difference를 19.1 mM⁻¹ cm⁻¹로 하여 NADPH-cytochrome c reductase의 활성을 계산하였다.

Aniline hydroxylase 활성측정—간 microsome

분획중 aniline hydroxylase의 활성측정은 Kato와 Gillete¹⁶⁾의 방법에 준하여 조작한 후 640 nm에서 흡광도를 측정하여 산정하였다.

간장 microsome 분획중 과산화 지질측정—Oishi¹⁸⁾의 방법에 준하여 조작한 후 표준액으로 1, 1, 3, 3-tetraethoxypropane 5 nmole을 사용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 간장 heavy microsomal membrane 분획의 분리

적출한 간장을 잘게 썰어서 homogenizing medium (5 mM EDTA, 0.1% deoxycholic acid, 30 mM tris-HCl을 함유하는 0.25 M sucrose 용액, pH 7.5)을 가하고 potter elverhjem homogenizer를 사용하여 homogenize한 다음 Kartz 등¹⁹⁾의 방법에 따라 조작하여 얻은 heavy microsomal fraction에 homogenizing medium을 가하여 사용하였다.

Total ATPase 활성측정—Microsome 분획내의 ATPase 활성측정은 Boyer와 Reno의 방법²⁰⁾을 수정하여 incubation medium [100 mM NaCl, 20 mM KCl, 10 mM imidazole buffer (pH 7.5), 5 mM MgCl₂]에 enzyme protein (heavy microsomal membrane suspension) 0.5 ml을 가하고 37°C에서 3분간 preincubation시킨 다음 2 mM ATP-Na₂ 용액을 가하여 총반응액을 5 ml로 한 다음 정확히 10분간 반응시킨 후 반응결과로서 유리되어 나온 무기인 (Pi)의 함량을 상등액 2 ml를 취하여 Fiske-Subba Row²¹⁾의 방법으로 측정하였다.

Mg²⁺ ATPase 및 N⁺-K⁺ ATPase 활성측정—Mg²⁺ ATPase 활성을 측정하기 위한 medium 조성은 total ATPase를 측정하기 위한 medium의 조성과 같으나 20 mM KCl 대신에 1 mM Ouabain을 넣어 Na⁺-K⁺ ATPase 활성을 억제시킨 후 동일한 방법으로 측정하였다. Na⁺-K⁺ ATPase의 활성은 total ATPase의 활성에서 Mg²⁺ ATPase 활성의 차를 구하여 산정하였다.

6. Glucose-6-phosphatase의 활성측정

적출한 간장을 냉각된 pH 6.2 tris-maleate 완충액으로 세척하여 닦아낸 다음 무게를 칭량하고 homogenizer를 사용하여 냉각된 pH 6.2 tris-maleate 완충액으로 20% (w/v) 간장 homogen-

ate를 조제한 후 다시 냉각된 pH 6.2 tris-maleate 완충액으로 단계적으로 희석하여 농도가 20 mg/ml가 되도록 하였다.

Triawger와 Plaa²²⁾의 변법에 따라 pH 6.2 tris-maleate 완충액 0.4 ml와 glucose-6-phosphate 용액 0.2 ml를 시험관에 넣어 metabolic shaking incubator에서 37°C로 가온한 다음 20 mg/ml의 간장의 균일한 현탁액 0.2 ml를 넣어 20분간 반응시켰다.

이 반응을 10% trichloroacetic acid 5.0 ml를 넣어 중지시킨 다음 원심분리하고 그 상등액 2.0 ml를 Fiske-Subba Row²¹⁾ 방법에 따라 무기인산을 측정하였다.

실험결과 및 고찰

CYP은 deltamethrin의 중독증상과 유사한 증세를 나타낸다고 보고되어 있다.^{23,24)} CYP의 투여 24시간 후 경구 LD₅₀ 값을 Behrens-Kärber 법에 의하여 구한 결과 41.67 mg/kg이었다. 주증세로는 사지의 뒤틀림 타액분비의 과다, 강직성 간질발작 등이 일어난다고 한다.

본 실험에서도 CYP를 단독으로 투여할 때 초기에는 뚜렷한 중독증상이 나타나지 않았으나 투여회수가 계속됨에 따라 타액분비의 과다, 경련 등의 증상이 점차적으로 진행되어감을 관찰할 수 있었다. CYP과 PB를 혼합하여 투여한 군에서는 이러한 증세가 더욱 초기에 나타나기 시작했다. 따라서 CYP의 독성을 PB가 더욱 촉진하는 현상이 일어남을 예측할 수 있었다.

1. 체중과 간장 및 신장의 중량변화

체중변화—CYP 및 PB 투여에 따른 체중변화는 Table I에서 보는 바와 같이 2주 후의 체중증가율은 대조군은 19.52%, PB 단독투여군은 17.36%, CYP 단독투여군은 13.54%, PB 50 mg/kg 혼합투여군 및 PB 100 mg/kg 혼합투여군은 각각 13.22% 및 8.26%이었다. 각 투여군의 체중변화는 대체로 대조군에 비해 감소되는 경향이 있으며 PB 100 mg/kg 혼합투여군에서는 유의하게 감소하였다.

사료섭취량의 efficacy는 Table II에서 보는 바와 같이 대조군에 비해 각 실험군이 감소되는 경향

Table I—Effect of cypermethrin and piperonyl butoxide on body weight, and liver and kidney weight per body weight ratio (%) in rats.

Groups		Final b.w.	Gained (%)	Liver wt/b.w.	Kidney wt/b.w.
Control	1 week	236.3±3.64	+10.16	3.16±0.097	0.70±0.018
	2 weeks	264.4±4.01	+19.52	3.14±0.100	0.72±0.021
PB (100 mg/kg) ^a only	1 week	244.6±3.55	+8.86	3.12±0.106	0.72±0.024
	2 weeks	269.8±3.62	+17.36	3.13±0.097	0.73±0.029
CYP (10 mg/kg) ^b only	1 week	232.3±3.42	+7.40	3.15±0.104	0.71±0.022
	2 weeks	243.2±3.95	+13.54	3.10±0.094	0.70±0.020
CYP (100 mg/kg) ^b +PB (50 mg/kg) ^a	1 week	226.0±3.54	+7.31	3.21±0.098	0.69±0.023
	2 weeks	258.6±4.43	+13.22	3.17±0.091	0.72±0.022
CYP (10 mg/kg) ^b +PB (100 mg/kg) ^a	1 week	224.9±4.18	+7.66	3.20±0.104	0.73±0.020
	2 weeks	241.1±4.40	+8.26*	3.29±0.106	0.70±0.024

Each value is the mean±SE of 8-10 rats.

Significant difference between control and treated group. (*, $p < 0.05$)

a; piperonyl butoxide, b; cypermethrin, b.w.; body weight

Table II—Effect of cypermethrin and piperonyl butoxide on average feed efficacy for 2 weeks in rats.

Groups	Total intake (g)	Net gain (g)	Efficacy (g)
Control	1527	344	22.5
PB (100 mg/kg) only	1617	319	19.7
CYP (10 mg/kg) only	1456	232	15.9
CYP (10 mg/kg) +PB (10 mg/kg)	1408	242	17.2
CYP (10 mg/kg) +PB (100 mg/kg)	1321	147	11.1

이 있었으며 PB 100 mg/kg 혼합투여군에서 가장 낮게 나타났다. 따라서 각 투여군의 체중 감소현상은 사료 섭취량의 감소에 기인하며 또한 중독증세 등 다른 요인과의 관련이 있는 것으로 사료된다.

간장 및 신장의 대체중증량비는 대체로 대조군과 유사하여 별로 변화가 없었다. Esbiol 0.3~0.01%를 사료에 섞어 투여할 때 고농도 투여군에서 체중의 증가가 억제된다는 보고²⁵⁾가 있으며 Howard 등²⁶⁾은 천연 pyrethrum 1875 mg/kg 씩을 rat에 90일간 경구로 매일 투여할 때 체중은 감소되나 간중량은 증가됨을 보고하였다. 그러나 pyrethrum 180 mg/kg 과 PB 750 mg/kg 을 혼합하여 투여할 때 pyrethrum 단독투여군 보다는 체중의 감소율은 적었으나 간중량의 증가율은 더욱 높아졌다고 하였다. 본 실험에서는 PB 100 mg/kg 을 혼합하여 2주

간 투여한 군에서 체중증가는 억제되고 간중량대체증비는 약간 증가하는 현상이 있었다.

2. 혈액생화학적 변화

혈액상의 생화학적 변화는 Table III에서 보는 바와 같다.

Aspartate amino transferase(이하 AST)의 활성에 있어서는 PB 및 CYP 단독투여군은 별변화가 없었으나 CYP와 PB 혼합투여군은 약간 증가되어 PB 100 mg/kg 혼합투여군이 1주에는 131.6 U/L, 2주에는 139.3 U/L로서 유의한 증가를 나타냈다. alanine amino transferase(이하 ALT) 활성은 PB 단독투여군은 대조군에 비해 별변화가 없었으나 CYP 단독 및 PB와의 혼합투여군은 유의하게 증가하였다. 특히 PB 100 mg/kg 혼합투여군은 1주 및 2주에 각각 82.5 U/L 및 85.9 U/L로서 더욱 증가하였다. CYP를 단독투여할 때 AST 활성은 별변화가 없었으나 ALT 활성은 유의하게 증가하였는데 이는 Dikshith 등²⁷⁾이 독성의 초기단계에 병리적인 조직손상이 일어나기 이전에 막투과성의 변화가 생길 경우 AST 활성의 변화없이 ALT 활성이 증가된다는 보고와 유사한 것으로 사료된다.

Lactic dehydrogenase(이하 LDH) 활성에 있어서는 PB 단독투여군은 별변화가 없었으나 CYP 단독투여군은 증가하여 2주에는 유의하게 증가하였다. PB 50 mg/kg 및 PB 100 mg/kg 혼합투여군도 유의하게 증가하였으며 특히 PB 100 mg/kg 혼합투여군에서 2주 후에 현저한 증가가 나타났다. 일반적

Table III—Effect of cypermethrin and piperonyl butoxide on biochemical parameters in serum of rats.

Groups		AST (U/L)	ALT (U/L)	LDH (U/L)	ALP (U/L)	Glucose (mg/dl)
Contron	1 week	115.9±3.29	54.8±2.26	372.2±22.21	199.6± 9.44	96.2± 2.83
	2 weeks	117.5±5.07	55.6±2.09	369.9±19.21	212.3±10.24	96.7± 3.84
PB (100 mg/kg) ^a only	1 week	116.9±5.39	57.0±3.08	363.5±28.18	204.2±13.81	96.5± 8.43
	2 weeks	116.3±4.17	56.8±2.57	369.4±33.97	201.5±16.77	96.1±10.80
CYP (10 mg/kg) ^b only	1 week	118.2±1.31	68.7±1.72**	437.1±28.57*	201.2±12.52	122.3± 8.70*
	2 weeks	120.2±6.51	71.6±2.90**	458.4±25.83*	208.7±12.67	129.6± 6.81**
CYP (10 mg/kg) ^b +PB (50 mg/kg) ^a	1 week	123.2±5.71	69.6±2.12**	467.6±21.51*	218.6±20.52	125.3± 8.00**
	2 weeks	122.9±2.88	76.4±3.03**	463.2±30.09*	219.1±12.59	131.4± 8.17**
CYP (10 mg/kg) ^b +PB (50 mg/kg) ^a	1 week	131.6±3.93*	82.5±3.24**	470.8±25.16*	221.5±15.68	135.8±10.99**
	2 weeks	139.3±5.40*	85.9±3.14**	493.9±21.88**	233.4±17.99	157.3± 7.60**b

Each value is the mean±SE of 8-10 rats.

Significant difference between control and treated group. (*, p<0.05, **, p<0.01)

a; piperonyl butoxide, b; cypermethrin.

으로 LDH의 혈중농도는 조직손상의 지표가 되므로, PB 혼합투여에 의해 조직손상이 더 진행되는 것으로 예측되며 PB 100 mg/kg을 혼합하여 투여할 때 간손상이 현저한 것으로 추리된다. 한편 Ray 등²⁴⁾은 deltamethrin 중독에 의하여 유발된 운동량의 증가로 인하여 혈중 lactate 양이 증가되며 그에 따라 산성증이 유발됨을 보고하였으며, Lock 등²⁸⁾은 rat 정맥내에 CYP을 투여후 중독증상이 발현할 때 LDH 활성과 관련있는 lactate 양이 증가됨을 보고하고 있다. 본 실험에 있어서 CYP 단독 및 PB 혼합투여군의 LDH 활성이 증가한 현상과도 관련이 있다고 사료된다.

Alkaline phosphatase(이하 ALP) 활성은 PB 및 CYP 단독투여군은 대체로 대조군과 유사하였으며 PB와의 혼합투여군은 점차 상승하는 경향을 보이나 유의성은 없었다.

Glucose 량은 LDH 활성변화와 유사하였으며 대조군에 비해 PB 단독투여군은 별변화가 없었으며 CYP 단독투여군 및 CYP와 PB 혼합투여군은 현저히 증가하였다. 특히 PB 100 mg/kg 혼합투여군은 더욱 높았으며 CYP 단독투여군에 비해서도 유의하게 증가하였다. Ray 등²⁴⁾은 deltamethrin을 rat 복강내에 투여할 때, Lock 등²⁸⁾은 CYP을 rat 정맥내에 투여할 때 혈중 glucose 량이 증가됨을 보고하였다. Cremer 등²⁹⁾도 deltamethrin이 혈중 glucose 량을 증가시키며 이는 plasma noradrenalin과 adrenalin도 같이 증가되는 것으로 미루어

보아 adrenalin medulla로부터의 adrenalin 분비 촉진에 deltamethrin이 영향을 주기 때문이라고 하였다. 따라서 본 실험결과에서도 유사한 결과를 보이고 있으며 PB와의 혼합투여에 의해 더욱 현저하였다.

3. 간장 및 신장 microsome 분획 중의 cytochrome P-450 함량과 NADPH-cytochrome c reductase 활성변화

간장 및 신장 microsome 분획 중의 cytochrome P-450 함량과 NADPH-cytochrome c reductase 활성의 변화는 Table IV에서 보는 바와 같다.

간장 microsome 분획 중의 cytochrome P-450 함량과 NADPH-cytochrome c reductase 활성

변화—간 microsome 분획 중의 cytochrome P-450 함량은 대조군에 비해 PB 단독투여군, CYP 단독투여군 및 PB 50 mg/kg 혼합투여군에서는 각각 유의성있는 변화가 없었다. PB 100 mg/kg을 혼합투여한 군에서는 1주에는 대조군 및 CYP 단독투여군과 유사하나 2주에는 0.607 nmole/mg protein으로서 유의하게 감소되었다.

간 microsome 분획 중의 NADPH-cytochrome c reductase 활성은 cytochrome P-450 함량과 유사한 경향을 보여주고 있으며 PB 단독투여군은 2주 투여군에서 유의하게 감소하였다. CYP 단독투여군은 별차이가 없었으며 PB 100 mg/kg 혼합투여군에서 2주 후에 약간 감소하는 경향은 있으나 유의성은 없었다.

Carlson 등³⁰⁾과 Riviere 등³¹⁾은 CN 기를 가진 합성 pyrethroid는 cytochrome P-450 함량 및 NADPH-cytochrome c reductase 활성을 증가시키지 않는다고 보고하였다. 본 실험결과 rat에 CYP을 경구투여할 때도 cytochrome P-450 함량 및 NADPH-cytochrome c reductase 활성의 유의한 증가가 나타나지 않았다. 한편 Springfield 등³²⁾은 천연 pyrethrin이, Carlson 등³⁰⁾은 CN 기가 없는 permethrin이 약물대사효소를 유도하는 작용이 있음을 보고한 바 있다. pyrethroid계 화합물은 ester 결합의 분해 및 hydroxylation에 의해 독성이 감소되어 배설되므로 약물대사효소에 미치는 영향에 대한 이러한 차이에 따라 CYP이 CN 기가 없는 천연 pyrethrin 또는 permethrin보다 강한 독성을 나타내는 것으로 사료된다.

Piperonyl 화합물은 포유류의 microsomal NADPH₂ system의 inhibitor로서 작용한다고 하며 rat에 있어서 benzo(α)pyrene의 hydroxylation을 감소시키나 발암성에는 변화를 주지 않는다고 보고³³⁾한 바 있다. methylene dioxyphenyl (MDP)기를 가지고 있는 PB와 같은 MDP 화합물과 microsome의 구성성분과의 상호작용에 관하여는 명확히 규명된 바는 없으나 이는 MDP 화합물이 cytochrome P-450과 직접 또는 적어도 어느 부위와 결합하여 heme group 주위의 구조를 변화시키

기능의 변화를 초래한다고 보고³⁴⁾되어 있다. 본 실험에서도 PB 단독투여군에서 cytochrome P-450 함량 및 NADPH-cytochrome c reductase 활성이 감소되었다. PB가 synergist로서 작용을 나타낼 경우에는 mixed function oxidase를 억제함에 의해 함께 사용된 농약의 대사를 저해하여 분해를 억제함에 의해서 효력을 증진시키는 것으로 보고되어 있다.^{33,35-37)} Casida 등,³⁸⁾ Essac 등,³⁹⁾ Wilkinson 등⁴⁰⁾은 MDP 화합물이 MFO system의 substrate 대신에 제공됨에 따라 분해를 저해한다고 하였다. Hansch⁴¹⁾와 Hennessy⁴²⁾ 및 Wilkinson⁴³⁾은 MDP가 MFO system의 substrate로 제공되는 것이 아니라 MDP moiety의 methylene group으로부터 hydride ion이나 hydrogen radical이 이탈되어 형성되는 cation이나 free radical이 MFO system의 어느 부위에 작용하여 살충제의 산화분해를 저해하여 synergist로서 작용을 나타낸다고 하였다. 본 실험에서도 PB 100 mg/kg 혼합투여군에서는 cytochrome P-450 함량이 감소되어 PB에 의해 CYP의 산화분해가 억제됨을 알 수 있으며 그에 따라 CYP의 독성이 더욱 증진되는 것으로 사료된다.

신장 microsome 분획 중의 cytochrome P-450 함량과 NADPH-cytochrome c reductase 활성 변화—신장 microsome 분획 중의 cytochrome

Table IV—Effect of cypermethrin and piperonyl butoxide on hepatic and renal microsomal cytochrome P-450 contents, NADPH-cytochrome c reductase activity in rats.

		Liver		Kidney	
		P-450	Cyt.cred.	P-450	Cyt.cred.
control	1 week	0.749 ± 0.0287	115.1 ± 6.54	0.252 ± 0.0181	10.96 ± 0.662
	2 weeks	0.743 ± 0.0333	121.0 ± 6.19	0.259 ± 0.0158	10.52 ± 0.546
PB (100 mg/kg) ^a only	1 week	0.686 ± 0.0322	98.4 ± 5.72	0.227 ± 0.0139	10.45 ± 0.572
	2 weeks	0.661 ± 0.0313	99.1 ± 66.11*	0.219 ± 0.0146	9.662 ± 0.550
CYP (10 mg/kg) ^b only	1 week	0.758 ± 0.0345	123.2 ± 6.73	0.315 ± 0.0176*	11.24 ± 0.665
	2 weeks	0.752 ± 0.0362	138.4 ± 6.65	0.321 ± 0.0179*	12.86 ± 0.578*
CYP (10 mg/kg) ^b + PB (50 mg/kg) ^a	1 week	0.746 ± 0.0356	118.5 ± 4.69	0.304 ± 0.0146	11.12 ± 0.622
	2 weeks	0.739 ± 0.0324	120. ± 7.04	0.287 ± 0.0153	11.83 ± 0.627
CYP (10 mg/kg) ^b + PB (50 mg/kg) ^a	1 week	0.710 ± 0.0310	116.5 ± 5.49	0.292 ± 0.0160	11.20 ± 0.595
	2 weeks	0.607 ± 0.0288*	117.7 ± 5.90	0.301 ± 0.0204	11.07 ± 0.601

Each value is the mean ± SE of 8-10 rat.

Significant difference control group (*p < 0.05)

Unit; cytochrome P-450 (n mole/mg pretein), NADPH-cytochrome c reductase (cyt.c red.) (n mole cyt.c. reduced/min/mg/protein), a; piperonyl butoxide, b; cypermethrin.

P-450 함량은 CYP 단독투여군은 1주 및 2주에 각각 0.315 및 0.321 nmole/mg protein으로서 유의하게 증가하였다. 그러나 PB 단독투여군 및 CYP과 PB를 혼합하여 투여군은 각각 대조군 및 CYP 단독투여군에 비해 약간 억제되는 경향을 보이나 유의성은 없었다.

신장 microsome 분획 중의 NADPH-cytochrome c reductase 활성의 변화는 신장 cytochrome P-450 함량변화와 유사한 경향이 있으며 CYP 10mg/kg을 2주간 단독투여한 군은 유의하게 증가되었다. CYP는 간에서 대사되어 생성된 cis 및 trans-acid는 glucuronide 포함체로, 3-hydroxybenzoic acid는 sulfate 포함체로 되어 배설되고 cyanide ion은 2-imminothiazolidine-4-carboxylic acid와 thiocyanate 같은 물질로 변화되어 배설된다고 한다.^{4,5)}

따라서 CYP을 단독투여할 때 간에서와는 달리 신장 microsomal cytochrome P-450 함량 및 NADPH-cytochrome c reductase 활성이 증가되는 것은 이들 대사산물이 신장의 약물대사효소에 관여하여 영향을 미치기 때문으로 사료된다.

4. 간장 microsome 분획 중의 aniline hydroxylase의 활성변화

간 microsome 분획 중의 aniline hydroxylase 활성변화는 Table V에서 보는 바와 같이 PB 단독투여군은 별변화가 없었으나 CYP 단독투여군은 점차 감소되어 2주 투여군은 0.807 nmole/mg protein/hr로서 유의하게 감소되었다. 혼합투여군은 PB 투여량에 비례하여 더욱 감소되며 특히 PB 100 mg/kg 혼합투여군은 CYP 단독투여군에 비해서도 유의하게 감소하였다.

Riviere 등³¹⁾은 Japanese quail에 CYP을 투여할 때 간 microsome 중의 aniline hydroxylase가 감소된다는 보고와 유사하였다. 또한 PB를 혼합하여 투여할 때는 억제작용이 더욱 강해지는 것은 PB가 CYP의 aniline hydroxylase 활성 억제작용에 synergist로서 작용된 것으로 사료되나 그 전에 대해서는 아직 규명하지 못하였다.

5. 간장 microsome 분획중 과산화지질의 변화

간 microsome 분획중 과산화지질의 변화는 Table VI에서 보는 바와 같이 1주 투여군에서는 각 실험군에서 별변화가 없었다. 2주 투여군에 있어

Table V—Effect of cypermethrin and piperonyl butoxide on hepatic microsomal aniline hydroxylase activity in rats.

Groups	1 week	VP(%) ^c	2 weeks	VP(%) ^c
Controls	1.192±0.0539	—	1.219±0.0630	—
PB (100 mg/kg) ^a only	1.174±0.0587	-1.51	1.132±0.0527	-7.14
CYP (10 mg/kg) ^b only	0.863±0.0476	-27.60	0.807±0.0363*	-33.80
CYP (10 mg/kg) ^b + PB (50 mg/kg) ^a	0.845±0.0431*	-29.11	0.786±0.0365*	-35.52
CYP (10 mg/kg) ^b + PB (100 mg/kg) ^a	0.813±0.0392*	-31.80	0.655±0.0277*	-46.28

Each value is the mean±SE of 8-10 rats.

Significant difference between control and treated group. (*, p<0.05)

Unit; p-aminophenol formed n mole/mg protein/hr a; piperonyl butoxide, b; cypermethrin, b.w.; body weight

Table VI—Effect cypermethrin and piperonyl butoxide on hepatic TBA value in rats.

Groups	1 week	VP(%) ^c	2 weeks	VP(%) ^c
control	1.28±0.074	—	1.26±0.069	—
PB (100 mg/kg) ^a only	1.27±0.058	-0.78	1.43±0.062	+13.49
CYP (10 mg/kg) ^b only	1.31±0.070	+2.34	1.30±0.065	+3.17
CYP (10 mg/kg) ^b + PB (50 mg/kg) ^a	1.30±0.065	+1.56	1.44±0.073	+14.29
CYP (10 mg/kg) ^b + PB (100 mg/kg) ^a	1.29±0.063	+0.78	1.49±0.059*	+18.25

Each value is the mean±SE of 8-10 rats.

Significant difference between control and treated group. (*, p<0.05)

Unit; n mole/min/mg protein, a; piperonyl butoxide, b; cypermethrin, c; variation percent.

서도 별로 유의성있는 증가가 없었으나 다만 PB 100 mg/kg 을 혼합하여 투여한 군에서 유의성있게 증가하였다. PB 를 단독 또는 CYP 과 혼합하여 투여할 때 과산화 지질량이 증가하는 경향을 보이는 것은 PB 의 MDP moiety 의 methylene group 으로부터 생성되는 cation 이나 free radical 로 인하여 과산화지질을 증가시키는데 영향을 미치기 때문으로 사료된다.

6. 간장 microsomal membrane fraction 중의 ATPase 활성변화

간장 microsomal membrane fraction 중의 total ATPase 및 Mg^{2+} ATPase 와 $Na^+ K^+$ ATPase 의 활성변화는 Table VII 에서 보는 바와 같다.

간 microsomal membrane fraction 중의 total ATPase 활성은 PB 단독투여군에서는 별변화가 없었으나 CYP 단독투여군 및 PB 50 mg/kg 혼합투여군은 다같이 2주 투여군에서 유의하게 감소하였다. PB 100 mg/kg 혼합투여군은 1주 및 2주에 모두 현저히 감소하였다.

Mg^{2+} ATPase 및 $Na^+ K^+$ ATPase 활성의 변화는 total ATPase 활성변화와 유사하며 PB 50 mg/kg 및 PB 100 mg/kg 혼합투여군에서는 2주에 모두 유의하게 감소하였다. 특히 PB 100 mg/kg 을 혼합하여 투여한 군은 2주 후에는 CYP 단독투여군에 비해서도 유의한 감소를 나타냈다.

일반적으로 독성물질은 생체막의 단백질 또는 지질성분과 반응하여 수송기능을 변화시킴에 따라 cellular integrity 에 변화를 초래하게 된다. $Na^+ K^+$ ATPase 와 Ca^{2+} ATPase 및 ATPase 는 대부분 이러한 막의 중요한 성분이다. 따라서 이들 효소계는 다양한 생리적 및 생화학적 생체기능유지에 필수적인 역할을 한다. 일반적으로 심장 $Na^+ K^+$ ATPase 의 저해는 간접적으로 calcium transient 에 변화를 주어 심장기능에 영향을 미친다고 보고⁴⁴⁾ 되어 있으며 신장 $Na^+ K^+$ ATPase 의 저해는 뇨세관 수송에 결함을 일으킨다고 보고⁴⁵⁾ 되어 있다. 또한 간장 $Na^+ K^+$ ATPase 의 저해는 간세포의 비정상적 퇴행성 변화를 일으켜 대사 또는 해독 mechanism 및 담즙분비에 영향을 주게된다⁴⁶⁾ 고 알려져 있다.

본 실험에서 CYP 단독투여에 의해 간장의 total ATPase, Mg^{2+} ATPase 및 $Na^+ K^+$ ATPase 가 억제되었으며 PB 와 혼합투여에 의해 더욱 억제되어 합성 pyrethroid 가 mitochondrial ATPase 를 억제한다는 Matsumura⁴⁷⁾ 의 보고와 유사하였다. 또한 $Na^+ K^+$ ATPase 활성이 total ATPase 및 Mg^{2+} ATPase 보다 더 현저히 감소되는 경향이 있어 간 microsomal membrane fraction 에 있어서는 $Na^+ K^+$ ATPase 활성에 더 많은 영향이 미치는 것으로 사료된다. 따라서 $Na^+ K^+$ ATPase 의 억제는 간세포의 손상에 기인하는 것으로 사료되

Table VII—Effect of cypermethrin and piperonyl butoxide on hepatic microsomal membrane ATPase activity in rats.

Groups		total ATPase	Mg^{2+} ATPase	$Na^+ K^+$ ATPase
Control	1 week	0.655 ± 0.0346	0.271 ± 0.0142	0.384 ± 0.0182
	2 week	0.649 ± 0.0289	0.270 ± 0.0135	0.379 ± 0.0164
PB (100 mg/kg) ^a only	1 week	0.648 ± 0.0287	0.276 ± 0.0143	0.372 ± 0.0204
	2 weeks	0.657 ± 0.0284	0.269 ± 0.0158	0.388 ± 0.0288
CYP (10 mg/kg) ^b only	1 week	0.555 ± 0.0281	0.230 ± 0.0148	0.325 ± 0.0157
	2 weeks	0.544 ± 0.0286*	0.227 ± 0.0152	0.318 ± 0.0180*
CYP (10 mg/kg) ^b + PB (50 mg/kg) ^a	1 week	0.560 ± 0.0230	0.234 ± 0.0110	0.326 ± 0.0135*
	2 weeks	0.522 ± 0.0252*	0.202 ± 0.0118**	0.319 ± 0.0152*
CYP (10 mg/kg) ^b + PB (50 mg/kg) ^a	1 week	0.549 ± 0.0290*	0.232 ± 0.0121	0.317 ± 0.0150*
	2 weeks	0.483 ± 0.0222**	0.185 ± 0.0089**	0.298 ± 0.0148**

Each value is the mean ± SE of 8-10 rats.

Significant difference between control and treated group. (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$)

Unit; μ Mpi/mg protein/min, a; piperonyl butoxide, b; cypermethrin.

Table VIII—Effect of cypermethrin and piperonyl butoxide on hepatic glucose-6-phosphatase activity in rats.

Groups	1 week	VP(%) ^c	2 weeks	VP(%) ^c
control	4.48 ± 0.216	—	4.51 ± 0.224	—
PB (100 mg/kg) ^a only	4.42 ± 0.241	-1.34	4.29 ± 0.234	-4.89
CYP (10 mg/kg) ^b only	4.43 ± 0.232	±1.12	4.04 ± 0.227	-10.42
CYP (10 mg/kg) ^b + PB (50 mg/kg) ^a	4.45 ± 0.217	-0.67	3.96 ± 0.236	-12.20
CYP (10 mg/kg) ^b + PB (100 mg/kg) ^a	4.41 ± 0.225	-1.56	3.77 ± 0.220*	-16.41

Each value is the mean ± SE of 8-10 rats.

Significant difference between control and treated group. (*, p < 0.05)

Unit; n mole/min/mg preprotein a; piperonyl butoxide, b; cypermethrin, c; variation percent.

며 PB 혼합투여에 의해 더욱 억제되는 것으로 보아 간세포 손상이 심해짐을 알 수 있다.

7. 간장 glucose-6-phosphatase 활성변화

간장 homogenate 중의 glucose-6-phosphatase 활성변화는 Table VIII에서 보는 바와 같이 1주 투여군에서는 각 실험군이 대조군에 비해 별변화가 없었으나 2주 투여군에 있어서는 PB 단독투여군은 별변화가 없었으나 CYP 단독 및 PB와의 혼합투여군은 감소하는 경향이 있었다. 특히 PB 100 mg/kg을 혼합하여 투여한 군에서 대조군에 비해 현저히 감소하였다. glucose-6-phosphatase는 endoplasmic reticulum과 관계가 있고 이 효소활성의 저하는 organelle의 손상을 특이적으로 반영한다.⁴⁸⁾ Feuer 등⁴⁹⁾은 10종의 간독성물질들을 rat에 투여하였을 때 모두 glucose-6-phosphatase 활성을 억제한다는 것을 발견한 바 있다. 또한 Traiger 등²²⁾은 CCl₄에 의해 간세포의 손상이 유발되었을 때 이 효소의 활성이 억제됨을 보고한 바 있다. 따라서 이 효소활성의 측정은 간손상에 대한 하나의 지표로서 이용되고 있다. 본 실험결과로 보아 PB 100 mg/kg과 혼합하여 투여할 때 간세포막의 손상이 현저하게 나타나는 것으로 사료된다.

결 론

Cypermethrin(CYP) 및 piperonyl butoxide (PB)를 rat에 단독 및 혼합 경구투여하여 혈액생화학적 변화와 약물대사효소에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 간장의 세포막에 미치는 영향을 보기 위하여 과산화지질량과 ATPase 및 glucose-6-phosphatase 활성의 변화를 관찰하였다.

PB 100 mg/kg을 혼합하여 2주간 투여한 군에서 AST, ALT, LDH 활성 및 glucose 양은 증가하였다. PB 100 mg/kg을 혼합하여 2주간 투여한 군에서 간장 cytochrome P-450 함량이 감소하였고 CYP 단독투여군에서 신장 NADPH-cytochrome c reductase 활성이 증가하였다. 또한 간장 aniline hydroxylase 활성은 CYP 단독 및 PB 혼합투여군에서 다같이 감소하였다. PB 100 mg/kg을 혼합하여 2주간 투여한 군에서 과산화지질은 증가하였으며, 간장 glucose-6-phosphatase 활성은 감소하였다. 또한 간장 ATPase 활성은 CYP 단독 및 PB 혼합투여군에서 다같이 감소하였다.

이상의 결과로 보아 CYP을 단독으로 투여할 때보다 PB와 혼합투여함에 따라 간장해가 더욱 심해지는 것으로 판단할 수 있다.

문 헌

- 1) John E. Casida: Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticide, *Environ. Health Perspect.*, vol. 34 pp. 189-202 (1980).
- 2) W.N. Aldridge: Toxicology of pyrethroids. *Pesticide chemistry*, vol. 3, pp. 484-490 (1982).
- 3) Elliot, M.: Properties and application of pyrethroids. *Environ. Health Perspect.* vol. 14, pp. 3-13 (1975).
- 4) R.D. Verschoyle and M.N. Aldridge: *Arch. Toxicol.* vol. 45, pp. 325-329 (1980).
- 5) David H. Huteon, Laretta C. Gaughan and John E. Casida: Metabolism of the cis- and trans-isomers of cypermethrin in mice. *Pest. Sci.* vol. 12, pp. 385-398 (1981).
- 6) Wauroen J. Grawford, Andrew Crouchor and David

- H. Huston: The metabolism of the pyrethroid insecticide cypermethrin in rats: Excreted metabolites. *Pest. Sci.* vol. 12, pp. 399-411 (1981).
- 7) Wach, H., *Science.* vol. 105, p. 530 (1947).
 - 8) Yamamoto, I. et al. *J. Econ. Entomol.* vol. 59, p. 1542 (1967).
 - 9) Cinti, D.I., Moldeus P. and Schenkman, S.: Kinetic parameters of drug metabolizing enzyme in Ca^{2+} sedimented microsome from rat liver. *Biochem. Pharmacol.* vol. 21, pp. 3249-3256 (1972).
 - 10) Omura, T. and Sato R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes I Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* vol. 239, pp. 2370-2378 (1964).
 - 11) Carson P. and Schoenig G.P.: Induction of liver microsomal NADPH-cytochrome c reductase, cytochrome P-450 by some new synthetic pyrethroids. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* vol. 52, pp. 507-512 (1980).
 - 12) Kamath, S. A., Kummerow, F.A. and Narayan, K.A.: A simple procedure for the isolation of rat liver microsomes. *Febs. Letters.* vol. 17(1), pp. 90-92 (1971).
 - 13) Takashi, M., Mashiro, K., Akira, T., Yoshihiro, T. and Koichi S.: Quantitative determination of cytochrome P-450 in rat liver homogenate. *Ana. Biochem.* vol. 75, pp. 596-603 (1976).
 - 14) Masters B.S.S., Williams Jr. C.H. and Kamin H.: The preparation and properties of microsomal TPNH cytochrome c reductase from pig liver. *In method in Enzymology* vol. 10, pp. 565-573. Ed. by Estabrook, R.W. and Pallman, M.E., Academic Press. New York, (1967).
 - 15) Mazel, P.: Comparison of microsome from control and phenobarbital pretreated rats as to NADPH-cytochrome c reductase activity. *In Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition.* pp. 575-577, Ed. by La Du E. N., Mandel, H.G. and Way, E.L. (1972).
 - 16) Ryuichi Kato and Tames R. Gillete: Sex differences in the effects of abnormal physiological states on the metabolism of Drug by rat liver microsomes. *The Journal of pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 150, No. 2, pp. 285-291 (1965).
 - 17) Imai, Y., Ito, A. and Sato, R., *J. Biochem.* in Press (1966).
 - 18) 大石誠子: 過酸化脂質測定法, 最新醫學, 33, 660 (1978).
 - 19) Katz, A.I. and Epstein, F.H.: The role of Na^+K^+ activated ATPase in the reabsorption of sodium by kidney. *J. Clin. Invert.* vol. 46(12), pp. 1999-2011 (1967).
 - 20) Boyer, J.L. and Reno, D.: Properties of (Na^+K^+) -activated ATPase in rat liver plasma membrane enriched with bile canaliculi, *Biochem. Biophys. Acta*, vol. 502, pp. 69-72 (1975).
 - 21) Fiske, C.H. and Subba Row, Y.: The colorimetric determination of phosphorous. *J. Bio. Chem.* vol. 66, pp. 375-400 (1975).
 - 22) Traiger, G.J. and Plaa, G.L.: Differences in the potentiation of carbon tetrachloride in rats by ethanol and isopropanol retreatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* vol. 20, pp. 105-112 (1971).
 - 23) J.m. Barnes and R.D. Verschoyle: Toxicity of new pyrethroids insecticide, *Nature (London)* Vol. 248, pp. 710-711 (1974).
 - 24) D.E. Ray and J.E. Cremer: The action of decamethrin on the rat. *Pest. Biochem. Physiol.* vol. 10, pp. 333-340 (1979).
 - 25) 信州大學校 醫學部 (Japan) : Unpublished Data.
 - 26) Bond Howard, Mauger Karen, Defeo John, J.: Interactions in the toxicity of pyrethrum, synergists and other chemicals in mammals. *Pyrethrum: Natur. Insectic. Pap. Int. Symp.*, pp. 177-194 (1972).
 - 27) Dikshith, T.S.S., Datta, K.K., Raizada, R.B. and kushwah, H.S.: Effect of paraquat dichloride in male rabbits. *Indian Journal of Experimental Biology*, vol. 17, Sept., pp. 926-928 (1979).
 - 28) Edward, A. Lock and Pamela, N. Berry: Biochemical changes in the rat cerebellum following cypermethrin and administration. *Toxicology applied Pharmacology.* vol. 59, pp. 508-514 (1981).
 - 29) J.E. Cremer and M.P. Seville, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, submitted (1982).
 - 30) Gray, P. Carlson and Gerald, P. Schoenig: Induction of liver microsomal NADPH and cytochrome P-450 by some new synthetic pyrethroids. *Toxicology and Applied Pharmacology.* vol. 52, pp. 507-512 (1980).
 - 31) J.L. Riviere, Jocelyne Bach and G. Grolleau: Effect of pyrethroid insecticides and N-(3,5 dichlorophenyl) dicarboximide anes quail. (Coturnix coturnix) Bull. *Environ. Contan. Toxicol.* vol. 31, pp. 479-485 (1983).
 - 32) Springfield, A.C., Carlson, G.P. and Defeo, J.J.:

- Liver enlargement and modification of hepatic microsomal drug metabolism in rats by pyrethrum. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* vol. 24, pp. 298-308 (1973).
- 33) Casida, J.E., Engel, J.L., E.G., Kamienski, F.X. and Kuwatsuka, S., *Science*, vol. 153, p. 1130 (1966).
- 34) John, E. Casida: Mixed-function oxidase involvement in the biochemistry of insecticide synergist. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 5, No. 5, pp. 753-772 (1970).
- 35) Yun Pei Sun and Johnson, E.R., *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 8, p. 261 (1960).
- 36) Fukuto, T.R., Metcalf, R.I., Winton, M.Y. and Robert, P.A., *J. Econ. Entomol.*, Vol. 55, p. 341 (1962).
- 37) Lichtenstein, F.P., Schulz, K.R. and Cowley, C.T., *J. Econ. Entomol.*, Vol. 56, p. 485 (1963).
- 38) Brooks, G.T. and Harrison, A., *Biochem. Pharmacol.*, vol.13, p. 827 (1964).
- 39) Esaac, E.G. and Casida, J.E. (1969). Metabolism in relation to mode of action of methylenedioxyphenol synergists, in houseflies. *J. Agr. Food. Chem.*, Vol. 17, pp. 539-550.
- 40) Wilkinson, C.F. and Hicks, L.J. (1969). Microsomal metabolism of the 1,3-benzodioxole ring and its possible significance in synergistic action. *J. Agr. Food. Chem.*, Vol. 17, pp. 829-836.
- 41) Hansch, C. (1968). The use of homolytic, steric, and hydrophobic constants in a structure activity, study of 1,3-benzodioxole synergists. *J. Ned. Chem.* Vol. pp. 920-924.
- 42) Hennessy, H.J. (1965). Hydride-transferring ability of methylenedioxybenzenes as a basis of synergistic activity. *J. Agr. Food. Chem.* Vol. 13, pp. 218-220.
- 43) Wilkinson, C.F. (1971). Insecticide synergists and their mode of action. *Proc. Int. Congr. Pestic. Chem.*, 2nd. (1971) vol. 2, pp. 117-159.
- 44) Brody, T.M. and Akera, T. (1977). Relations among Na^+ , K^+ -ATPase activity transmembrane sodium movement, and cardiac contractility. *Fed. Proc.*, Vol. 36, pp. 2219-2224.
- 45) Nechay, B.R. (1977): Biochemical basis of diuretic action. *J. Clin Pharmacol.*, Vol. 17, pp. 626-641.
- 46) Ahmed, K. ad Thomas, B.S. (1971): The effects of long chain fatty acids on sodium plus potassium ion stimulated adenosine triphosphatase of rat brain. *J Biol. Chem.* Vol. 246, pp. 103-109.
- 47) F. Matsumura: Influence of chlorinated and pyrethroid insenticides on cellular calcium regulatory mechanisms. *Pesticide Chemistry*. Vol. 3, pp. 3-39 (1982).
- 48) Recknagel, R.D. and Glante, F.A., Jr (1973): Carbon tetrachloride hepatotoxicity: An example of lethal clearance. *C.R.E. Crit. Rev. Toxicol.*, vol. 2, pp. 263-297.
- 49) Feuer, G., Golberg, I. and Le Pelley, J.R. (1965): Liver response tests, I. Exploratory studies on glucose-6-phosphatase and other liver enzymes. *Fd. Cosmet. Toxicol.*, vol. 3, pp. 235-249.