

흰쥐에 있어서 사염화탄소에 의한 간 손상이 toluene 대사에 미치는 영향

계명대학교 자연과학대학 공중보건학과
* 안동전문대학 산업안전위생과

최우창 · 차상은* · 윤종국*

— Abstract —

Effect of CCl₄-induced liver damage on the metabolism of toluene in rats

Woo-Chang Choi · Sang-Eun Cha* · Chong-Guk Yoon*

**Dept. of Public Health, College of Natural Science, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea*

** Dept. of Industrial Safety and Hygiene, Andong College*

To evaluate an effect of pathological liver damage on the toluene metabolism, the rats were induced acute liver damage with 3 times CCl₄ injection (0.1 ml of 50 % in olive oil/100 g body wt.) three days. In the present animal model, the injection of toluene(0.3 ml of 50 % in olive oil) showed the more decreased urine hippuric acid throughout 24 hr in the liver damage induced animals(CCl₄-pretreated rats) than normal group. The activities of hepatic aniline hydroxylase, benzylalcohol dehydrogenase and benzaldehyde dehydrogenase were significantly decreased in CCl₄-pretreated rats than the normal group at 24 hr after injection of toluene.

Furthermore, the benzaldehyde dehydrogenase in pooled liver of CCl₄-pretreated rats showed similiar K_m value, but showed the more decreased V_{max} value compared with the normal group by the injection of toluene.

These results suggest that the rats induced liver damage with CCl₄ may reduce the toluene metabolism.

Key Words : CCl₄, toluene metabolism

* To whom all correspondence should be addressed

I. 서 론

최근 산업의 급속한 발전에 따른 산업장 유해물질의 인체 폭로로 작업환경과 근로자의 건강에 심각한 문제를 제기하고 있다. 이같은 산업장 유해 물질 중 xenobiotics의 일종인 toluene은 비교적 그 안전성이 인정되어 산업장에서 benzene의 대체용제로 널리 이용되고 있으나 인체에 폭로시 신경계(Satran과 Dodson, 1963; Knox와 Nelson, 1966; Boor와 Hurtig, 1977; Rees 등, 1987), 순환계(Taylor와 Harris, 1970; Zee-Cheng 등, 1985; Vidrio 등, 1986) 등에 손상을 초래하며, 급성 중독시에는 간손상도 야기됨이 보고(Hayden 등, 1977; Morris, 1989)되고 있어 toluene의 작업환경 중 폭로에 대한 유해성 재평가가 요청되는 실정이다.

Toluene은 주로 간에서 mixed function oxidation system에 의해서 benzylalcohol을 거쳐, benzaldehyde, benzoic acid로 전환된 다음 glycine과 포함되어 hippuric acid로 요 중에 배설된다고 한다(Ellenhorn과 Barceloux, 1988; Rodwell, 1991). 일반적으로 xenobiotics성 중독은 이들 물질 또는 대사 산물에 의하여 야기되며, 생체내 xenobiotics는 친수성 물질의 대사 산물로 되어 체외로 배설된다는 것은 주지의 사실이다.

이같은 xenobiotics의 체내 독성 발현은 생체의 병태생리적 조건중 간손상에 따라서 현저한 차이가 나타난다는 보고(Black과 Billing, 1969; Zilly 등, 1975; Schoene 등, 1978; Motayama, 1979; Vessey, 1980; Williams와 Benet, 1982)가 있으나 간손상시 toluene 대사에 관련된 연구는 거의 없었다. 더우기 toluene과 같은 xenobiotics성 유기용제를 많이 사용하고 있는 산업장 종사자들의 간손상과 같은 병태생리적 조건에 따라서 toluene의 중독현상을 관찰함은 산업장 유기용제 증기의 폭로에 따른 중독과 직업병의 발생 가능성 및 예방관리 측면에서 상당한 의의를 찾을 수 있으리라 생각된다.

한편 사염화탄소는 조직세포의 활면내형질체(smooth

oth endoplasmic reticulum)에 존재하는 지용성 약물 대사에 관여하는 복합 산화기구(mixed function oxidation system)에 의하여 free radical (trichloromethyl radical; $\cdot\text{CCl}_3$)로 전환되어 세포막의 과산화 현상을 야기시켜 조직손상을 일으키는 것으로 알려져 있다(Rao와 Recknagel, 1946; Simon, 1981; Freeman과 Crapo, 1982). 또한 사염화탄소에 의한 cytochrome P-450의 억제작용은 trichloromethyl radical의 직접작용에 기인된다고 한다(Noguchi 등, 1982). 그러나 아직까지 사염화탄소에 의한 간손상이 toluene의 대사효소인 benzylalcohol 및 benzaldehyde dehydrogenase 활성에 어떠한 영향을 미치는지는 알려진 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 사염화탄소에 의한 간손상이 toluene 대사에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위한 일환으로 흰쥐에 사염화탄소를 투여하여 간손상을 유도시킨 다음 toluene 대사의 최종산물인 hippuric acid를 요중에서 측정하는 한편 toluene 대사에 관여하는 cytochrome P-450 type인 aniline hydroxylase(Rahimtula 등, 1978) 및 aminopyrine demethylase(Brown 등, 1954) 활성과 benzylalcohol 및 benzaldehyde dehydrogenase 활성을 간조직 중에서 측정함과 동시에 이들 효소활성 변동의 원인을 구명하고자 benzaldehyde dehydrogenase 효소의 반응속도론적 측면에서 관찰하였다.

II. 재료 및 방법

1. 동물 및 처치

동물은 체중 100g 내외의 외견상 건강한 Sprague-Dawley 종의 숫 흰쥐를 시중에서 구입한 동물 사료(삼양사 제품)로 약 1개월간 사육한 체중 250g 내외의 것을 실험에 사용하였다. 각 실험군은 대조군, toluene 투여군, CCl_4 투여군, CCl_4 를 전치치한 후 toluene을 투여한 군으로 각각 7마리씩 분리 수용하였으며 물과 사료의 양은 제한없이 공급하였다. 급성 간손상의 유도는 CCl_4 를 olive oil과 1:1 혼합액을 만들어 Rubin 등(1963)의 방법에 준해 체중 100g

당 0.1ml를 실험군 각 7마리에 1일 1회 3일간 복강내 주사하였으며 toluene의 투여는 olive oil과 동량 혼합액을 만들어 Pathiratne 등(1986)의 방법에 준하여 체중 100g 당 0.3 ml를 1일 1회 1일만 복강내 주사하였다.

CCl₄를 1일 1회 3일간 투여 하므로서 간손상을 유도한 후, CCl₄ 투여 24시간후 toluene을 투여하였다. 한편 각 군의 대조군은 동량의 olive oil을 복강내 투여 하였으며 각군 모두 마지막 주사 후 24시간 동안의 요를 metabolic cage를 사용하여 채취 하였다.

동물의 처치는 효소 활성의 일중 변동을 고려하여 일정시간에 실시할 수 있도록 시간을 조절하였다. 동물은 ether 마취하에서 복부 정중선을 따라 개복한 후 복부 대동맥으로 부터 채혈하여 실험사 시킨 후, 4°C 생리식염수로 간문맥을 통하여 간을 관류하여 간내에 남아있는 혈액을 제거한 다음 적출하였다. 적출한 간은 생리식염수로 씻은 후 여지로 압박하여 간장내에 남아있는 생리식염수를 가능한 모두 제거한 다음 무게를 칭량하였다. 또한 간은 그 일부를 10% formalin에 고정시켜 병리조직검사에 사용하였으며, 채취한 혈액은 실온에서 30분간 방치한 다음 3000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻고 alanine aminotransferase 활성 측정용 시료로 사용하였다.

한편 metabolic cage를 이용하여 채취한 각 군의 24시간 요는 hippuric acid 측정에 사용하였다.

2. 효소시료의 조제

간조직을 빙냉하에서 절편으로 만들고 그 중 일정량을 칭량한 후 4배량의 0.25M sucrose 용액을 가하여 glass teflon homogenizer로 20%(W/V) 마쇄균 질액을 만들었다. 이 균질액을 600×g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄부분을 제거한 다음, 상층액을 10,000×g에서 20분간 원심분리하였고 다시 그 상층액을 105,000×g에서 1시간 동안 초원심분리하여 cytosol 분획과 micosome 분획을 분리하였다.

3. 효소 활성도 측정

1) Alanine aminotransferase(ALT) 활성도 측정

혈청 ALT 활성도 측정은 Reitman과 Frankel (1957)의 방법에 준해 조제된 kit 시액을 사용하였다. 활성도 단위는 혈청 ml 당 Karmen unit (Karmen, 1955)로 표시하였다.

2) Aniline hydroxylase(AH) 활성도 측정

간조직 중의 AH 활성도 측정은 Bidlack과 Lowry (1982)의 방법에 준하여 측정하였다. 활성도 단위는 간조직 효소액 중에 함유된 단백 1mg이 1시간 동안 반응하여 기질로 부터 생성된 *p*-aminophenol의 양을 n mole로 표시하였다.

3) Aminopyrine demethylase(AD) 활성도 측정

간조직 중 AD 활성도 측정은 Nash 등(1953)의 방법을 수정한 Bidlack과 Lowry(1982)의 방법을 이용하였다. 활성도 단위는 간조직 효소액 중에 함유된 1mg이 1시간 동안 반응하여 기질로 부터 생성된 formaldehyde의 양을 n mole로 표시하였다.

4) Benzylalcohol dehydrogenase(BADH) 활성도 측정

간조직 중 BADH 활성도 측정은 Bergmeyer (1974)의 방법에 준하였다. 활성도 단위는 단백 1 mg이 1분 동안 생성된 NADH 양을 μ mole로 표시하였다.

5) Benzaldehyde dehydrogenase(BALDH) 활성도 측정

간조직 중 BALDH 활성도 측정은 Stachow 등 (1967)의 방법에 준하였다. 활성도 단위는 단백 1 mg이 1분 동안 생성된 NADH 양을 μ mole로 표시하였다.

4. 간조직의 reduced glutathione(GSH) 함량 측정

GSH 함량은 Ellman(1959)의 방법에 준하였다. GSH 함량은 간조직 g당 μ mole로 표시하였다.

5. 간 과산화 지질(lipid peroxide, LPO) 함량 측정

간조직 중 지질 과산화물 함량은 Ogawa 등(1977)의 방법에 준하였다. LPO 함량은 조직 1g 당 n mole로 표시하였다.

6. Hippuric acid 정량

요중 hippuric acid 정량은 high performance liquid chromatograph를 사용하였으며, Kiyoshi 등(1988)의 방법에 따라 측정하였다. 동일 시료 중 creatinine 측정은 jaffe 반응을 이용한 Butler(1976)의 방법에 준하였다. 단위는 hippuric acid g/ creatinine g로 나타내었다.

7. 간조직의 병리조직검사

10% formalin에 고정된 조직편을 paraffin에 포매하여 4 μm의 두께로 박절하고 hematoxylineeosin 염색(Degertekin 등, 1986)을 한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

8. 간조직 단백질 정량

단백질의 정량은 Lowry 등(1951)의 방법에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다.

9. 성적검정

실험 성적의 통계처리는 student's t-test (Scheffler, 1980)을 이용하여 상호비교하였다.

III. 결 과

1. CCl₄를 전처치한 흰쥐의 간무게, 간조직의 glutathione(GSH)과 과산화지질(LPO) 함량, 혈청 ALT 활성 및 간 조직학적 변화

흰쥐에 CCl₄ 투여로 인하여 체중 당 간무게, GSH 및 LPO 함량은 대조군에 비하여 각각 약 1.5, 3 및 2.7 배의 유의한 증가를 보였으며 혈청 ALT 활성은 대조군에 비하여 약 9.4배의 현저한 증가를 나타내었다 (Table 1).

한편 본 논문에서는 histopathological finding을 제시하지 않았지만 olive oil만을 투여한 대조군은 간소엽내 중심정맥(central vein)주위의 세포들이 비교적 잘 보존되어 있으며 toluene 투여군은 대조군과 비교해 별다른 변화를 관찰할 수 없었다. 그러나 CCl₄ 투여군은 중심정맥주위에 괴사세포(necrotic cell)들이 관찰되고 지방소절들이 나타났다. 한편 CCl₄ 전처치 후 toluene을 투여한 군은 CCl₄만 투여한 군과 간조직의 병리조직학적 소견이 유사하게 나타났다.

이상 실험결과를 종합하여 볼 때 CCl₄를 투여한 실험군은 급성 간손상의 모델임을 확인할 수 있다.

2. CCl₄를 전처치한 흰쥐에 toluene 투여시 요 중 hippuric acid 함량에 미치는 영향

Toluene만 투여한 흰쥐에 있어서 요 중 hippuric acid의 함량은 대조군에 비하여 약 14배의 유의한 증가를 보였으며 CCl₄에 의해 간손상된 흰쥐에 toluene을 투여한 실험군은 toluene만 투여한 경우 보다 약 45%의 유의한 감소를 보였다(Table 2).

Table 1. Animal model of liver damage with carbon tetrachloride

Experiments	Groups	
	Control	CCl ₄ treatment
Liver wt. / body wt.(%)	2.87 ± 0.10	4.35 ± 0.15***
G S H ¹⁾	4.01 ± 0.36	11.83 ± 9.63***
L P O ²⁾	15.15 ± 1.65	41.25 ± 7.95**
Serum ALT ³⁾	26.70 ± 7.41	251.00 ± 40.23***

The assay procedure was described in experimental methods.

Each value represents the mean ± S. E. of 7 rats.

Significantly different from control group

(*; p<0.01, ***; p<0.001)

Unit; ¹⁾ μ moles / g of tissue,

²⁾ n moles / g of tissue,

³⁾ karmen unit / ml of serum

Table 2. Effect of toluene treatment on the urine hippuric acid concentration in CCl₄-treatment rats

Groups	Urine hippuric acid concentration
Control	0.63 ± 0.08
CCl ₄	0.64 ± 0.03
Toluene	8.64 ± 1.05 ^{*** a)}
CCl ₄ +Toluene	4.75 ± 0.97 ^{** b)}

The assay procedure was described in experimental methods.

Other abbreviations are the same as in table 1.

^{a)} Significantly different from control group (***; p<0.001)

^{b)} Significantly different from toluene group (**; p<0.01)

Unit ; hippuric acid g / creatinine g

3. CCl₄를 전처치한 실험동물에 toluene 투여가 간조직 중 AH 및 AD 활성에 미치는 영향

CCl₄를 전처치한 군은 대조군에 비하여 AH 및

AD 활성은 각각 44%, 30%의 유의한 감소를 보였다. 또한 toluene만 투여한 군 역시 대조군 보다 AH 활성은 21% 증가되었으며 AD 활성 역시 13% 증가되었다. 특히 CCl₄를 전처치한 후 toluene을 투여한 실험군은 toluene만 투여한 군 보다 AH 활성은 약 42%, AD 활성은 약 19%의 유의한 감소를 보였다 (Table 3).

4. CCl₄를 전처치한 흰쥐에 toluene 투여시 간조직 중 benzylalcohol 및 benzaldehyde dehydrogenase 활성에 미치는 영향

실험동물에 CCl₄를 전처치 하므로써 benzylalcohol dehydrogenase 활성은 대조군에 비하여 약 28% 감소되었으며 benzaldehyde dehydrogenase 활성도는 약 44%의 유의한 감소를 보였다. 실험동물에 toluene을 투여하므로써 benzylalcohol dehydrogenase 활성은 약 19% 증가되었으며, benzaldehyde dehydrogenase 활성도는 약 17% 증가되었다. 또한 CCl₄를 전처치하므로써 benzylalcohol dehydrogenase 활성은 toluene만

Table 3. Effect of pathological liver damage on the hepatic aniline hydroxylase(AH) and aminopyrine demethylase(AD) activities in rats

Enzyme activities	Groups			
	Control	CCl ₄	Toluene	CCl ₄ + Toluene
AH ¹⁾	32.70 ± 1.48	18.17 ± 2.24 ^{**a)}	39.60 ± 2.76 ^{**a)}	13.30 ± 1.73 ^{***b)}
AD ²⁾	35.50 ± 1.83	25.19 ± 1.70 ^{*a)}	40.20 ± 0.52 ^{*a)}	24.40 ± 0.52 ^{**b)}

^{a)} Significantly different from control group (*; p<0.05, **; p<0.01, ***; p<0.001)

^{b)} Significantly different from toluene treated group

Unit ; ¹⁾ n moles p-aminophenol / mg protein / hr

²⁾ n moles HCHO / mg protein / hr

Table 4. Effect of pathological liver damage on the hepatic benzylalcohol and benzaldehyde dehydrogenase activities in rats

Enzyme activities	Groups			
	Control	CCl ₄	Toluene	CCl ₄ + Toluene
BADH	4.70 ± 0.61	3.38 ± 0.75	5.60 ± 0.40	3.47 ± 0.26 ^{***b)}
BALDH	5.50 ± 0.63	3.09 ± 0.51 ^{*a)}	6.46 ± 0.49	3.11 ± 0.22 ^{***b)}

^{a)} Significantly different from control group (*; p<0.05)

^{b)} Significantly different from toluene treated group (***; p<0.001)

Unit ; μ moles NADH / mg protein / min

투여한 군에 비하여 약 30% 유의하게 감소되었으며, benzaldehyde dehydrogenase 활성도는 약 51%의 유의한 감소를 보였다(Table 4).

IV. 고 찰

본 실험에서 간손상을 유도하기 위하여 CCl_4 를 매일 1일 1회 3일간 투여한 뒤 간손상시 증가 된다는 간 무게, 간조직 중 glutathione(Yoon 등, 1994), LPO 함량(Younes, 1983) 및 혈청 ALT 활성치(Yoon 등, 1994)는 대조군 보다 현저히 증가되었으며, 병리조직학적 소견에서 심한 괴사와 지방 변성이 관찰되었다. 따라서 CCl_4 를 전처치한 실험군은 급성 간손상이 확인되었다.

기질농도 변동에 따른 각 실험군 pooled 시료의 효소 활성을 kinetics 측면에서 나타낸 것은 Fig 1과 같다.

즉 대조군, CCl_4 전처치군, toluene 투여군 및 CCl_4 를 전처치한 후 toluene 투여군 모두 유사한 K_m 치를 보였다. 그러나 V_{max} 치는 toluene만 투여한 실험군에서 4군 중 가장 높게 나타났으며, CCl_4 를 전처치한 실험군은 대조군 보다 낮게 나타났을 뿐만 아니라 CCl_4 전처치한 후 toluene 투여군이 toluene만 투여한 군 보다 약 34% 감소되었다.

이런 간손상 실험동물모델에 toluene을 1회 투여 후 24시간 동안 요를 채취하여 toluene의 최종 대사 산물인 hippuric acid를 측정된 결과 대조군에 비하여 약 45%의 유의한 감소를 보였다. 따라서 toluene의 대사율은 요 중 hippuric acid의 함량에 따라 비례하므로 CCl_4 에 의한 간손상이 toluene의 대사율을 억제

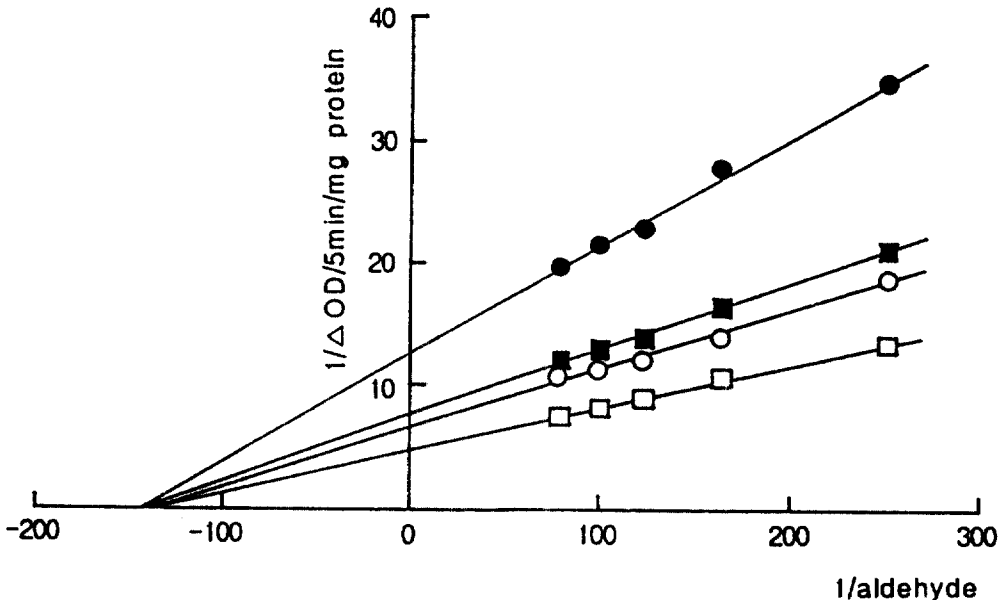


Fig 1. Double reciprocal plots of hepatic benzaldehyde dehydrogenase with benzaldehyde as a substrate.

Each value is the mean of 3 experiments.

Each enzyme specimen was prepared from the pooled liver each group.

○—○; Control, ●—●; CCl_4 , □—□; Toluene, ■—■; CCl_4 + Toluene

시키고 있음을 암시해 주고 있다.

Toluene의 대사율은 toluene 대사에 관여하는 효소 활성화에 영향을 받고 있기 때문에 CCl_4 에 의한 간손상시 toluene 대사에 관여하는 효소 활성을 측정하는 것은 의의가 있다고 사료된다.

본 실험에서 toluene으로 부터 benzylalcohol로 전환시키는데 관여하는 cytochrome P-450 type인 aniline hydroxylase (Rahimtula 등, 1978) 및 aminopyrine demethylase (Brown 등, 1978) 활성이 CCl_4 에 의한 간손상이 유도된 실험군에서 대조군 보다 유의한 감소를 보였으며, 특히 CCl_4 를 전처치한 다음 toluene을 투여한 군은 toluene만 투여한 실험군에 비하여 간조직 aniline hydroxylase 및 aminopyrine demethylase 활성치가 모두 유의한 감소를 보였다. Noguchi 등(1982)은 CCl_4 를 실험동물에 투여시 cytochrome P-450의 함량감소를 보고하였다. 따라서 CCl_4 에 의한 간손상이 toluene으로 부터 benzylalcohol의 생성을 저하 시킴을 시사해 주고 있다.

또한 본 실험에서 benzylalcohol 및 benzaldehyde dehydrogenase 활성은 대조군, CCl_4 투여군, CCl_4 전처치군에 있어서 toluene만 투여한 실험군에 비하여 모두 유의하게 억제 되었으며 그 억제율은 benzaldehyde dehydrogenase 활성이 benzylalcohol dehydrogenase 활성 보다 크게 억제되었다. 그러므로 CCl_4 에 의한 간손상이 toluene 대사에 관여하는 일련의 효소 활성이 억제 되므로써 요 중 마노산 함량이 감소됨을 시사해 주고 있다.

CCl_4 에 의한 간손상시 cytochrome P-450 type인 aniline hydroxylase (Rahimtula 등, 1978) 및 aminopyrine demethylase (Brown 등, 1954) 활성이 억제됨은 CCl_4 로 부터 생성된 free radical인 trichloromethyl ($\cdot CCl_3$)이 cytochrome P-450에 직접 작용하므로써 나타나기 때문인 것으로 보고 (Noguchi 등, 1982)되고 있다. 또한 본 실험에서 benzaldehyde dehydrogenase 활성은 대조군, CCl_4 전처치군, toluene 투여군 및 CCl_4 를 전처치한 후 toluene 투여군 모두 유사한 K_m 치를 보였으나, V_{max} 치는 전

처치군이 대조군 보다 낮게 나타났으며, toluene만 투여한 군에 비하여 CCl_4 를 전처치한 후 toluene 실험군 역시 낮게 나타난 것은 CCl_4 에 의한 간손상이 본 효소 단백질 합성을 억제하기 때문인 것으로 생각된다.

이상 실험 결과와 문헌상의 지견을 종합하여 볼 때 CCl_4 에 의한 급성 간손상이 toluene 대사에 관여하는 효소 활성이 억제되므로써 toluene의 대사율이 저하될 것으로 사료된다.

V. 요약

흰쥐에 있어서 사염화탄소에 의한 간손상이 toluene 대사에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 흰쥐에 CCl_4 를 투여한 후 간기능 검사와 병리조직 검사를 통하여 간손상이 확인되었다. 이같은 간손상 모델 실험동물에 toluene을 투여한 뒤 24시간 후 처치한 다음 요 중 hippuric acid 함량을 측정 한 결과, 간손상이 유도된 후 흰쥐에 toluene을 투여한 실험군에 있어서 요 중 hippuric acid 함량이 toluene만 투여한 군 보다 현저히 감소되었다. 이때 toluene 대사에 관여하는 간조직의 cytochrome P-450에 상응하는 aniline hydroxylase 및 aminopyrine demethylase 활성과 benzylalcohol 및 benzaldehyde dehydrogenase 활성 역시 간손상이 유도된 흰쥐에 있어서 유의하게 감소되었다. 또한 benzaldehyde dehydrogenase 활성의 kinetics를 관찰한 결과, 간손상이 유도된 실험동물 및 대조군 모두 유사한 K_m 치를 보였으나 V_{max} 치는 간손상이 유도된 실험동물에서 낮게 나타났다.

이상 실험결과를 종합하여 볼 때 CCl_4 에 의한 간손상시 toluene 대사가 억제되며 이는 toluene 대사에 관여하는 효소단백합성 억제에 기인된 결과로 사료된다.

참 고 문 헌

- Bergmeyer HU: *Methods of enzymatic analysis*, New York, Academic Press, 1974.
- Bidlack WR and Lowry GL: Multiple drug metabolism: P-nitroanisole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochem Pharmacol* 1982; 31: 311-317.
- Black M and Billing BH: Hepatic bilirubin UDP-glucuronyl transferase activity in liver disease: Gilbert's syndrom. *N Engl J Med*, 1969; 280: 1266-1270.
- Boor JW and Hurtig HI: Persistent cerebellar ataxia after exposure to toluene. *Ann Neurol*, 1977; 2: 440-442.
- Brown RR, Miller JA and Miller EC: The metabolism, of methylated amino azodye. *J Biol Chem*, 1954; 209: 211-222
- Butler AR: The Jaffe reaction identification of the coloured species. *Clin Chim Acta*, 1976; 59: 277-232.
- Degertekin H, Akdamar K, Yates R, Chen I, Ertan A and Vaupel R: Light and electron microscopic studies of diet induced hepatic changes in mice. *Acta Anat*, 1986; 125: 174-179.
- Ellman GL: Tissue sulfhydryl group. *Arch Biochem Biophys*, 1959; 82: 70-77.
- Ellenhorn MJ and Barceloux DG: In *Toluene in Medical Toxicology*, USA, Elsevier Science Pub Co Inc, 1988, 959-963.
- Freeman BA and Crapo JD: Biology of disease : Free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, 1982; 47: 412-426.
- Hayden JW, Peterson RG and Bruckner JV: Toxicology of toluene (methyl benzene) : Review of current literature. *Clin Toxicol*, 1977; 11: 549-559.
- Karman A: A note on the spectrophotometer assay of glutamic oxaloacetic transaminase in human blood serum. *J Clin Invest*. 1955; 34: 131-133.
- Kiyoshi K, Yukio H, Keiko K and Takashi I: Determination of benzoic acid and hippuric acid in human plasma and urine by high performance liquid chromatography. *J Chromatograp*, 1988; 425: 67-75.
- Knox JW and Nelson JR: Permanent encephalopathy from toluene inhalation. *N Engl J Med*, 1966; 275: 1494-1496.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RL: Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951; 193: 265-275.
- Morris RJ: Toluene and hepatotoxicity. *J Occu and Environ Med*, 1989; 31(12): 1014-1015.
- Motayama Y: Studies of human liver bilirubin-glycosyl transferase. bilirubin UDP-xylosyl and UDP-glucuronyl transferase activities in diseased human liver. *Enzyme and Protein*, 1979; 24(3): 158-162.
- Nach T: The colorimetric estimation of formaldehyde by mean of the hantzsch reaction. *J Biol Chem*, 1953; 55: 416-421
- Ogawa M, Sugihala R and Kiri S: Quantitative determination of urinary hippuric acid m-methylhippuric acid as indicator of toluene or p-xylene exposure by high performance liquid chromatography. *Int Arch Occup Environ Health*, 1977; 39(4): 199-206.
- Pathiratne A, Puyear RL and Brammer JD: A comparative study of the effects of benzen, toluene and xylenes on their *in vitro* metabolism and drugmetabolizing enzymes in rat liver. *Toxicol Apple Pharmacol*, 1986; 82(2): 133-141
- Pathiratne A, Puyear RL and Brammer JD: A comparative study of the effects of benzene, toluene, and xylenes on their *in vitro* metabolism and drug-metabolizing enzymes in rat liver. *Toxicol Apple Pharmacol*, 1986a; 82(2): 272-280.
- Rao KS and Recknagel RO: "Early on set lipoper-oxidation in rat liver after carbon tetrachloride administration." *Exp Mol Pathol*, 1946; 9: 271-278.
- Reitman S and Frankel S: A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin Pathol*, 1957; 28: 50-63.
- Rodwell VW: *Conversion of amino acids to specialized products in "Harper's Biochemistry"*. ed 22. Appleton & Lange, 1991, pp 307.
- Rubin E, Hutter F and Popper H: Cell proliferation and fiber formation in chronic carbon tetrachloride intoxication,

morphologic and chemical study. *Am J Pathol*, 1963; 42: 715-728.

Satran R and Dodson V: Toluene habituation. *N Engl J Med*, 1963; 268: 719-721.

Scheffler WC: *Statistics for the Biological Sciences. USA*, Addison-Wesley Publishing Company, 1980.

Schoene B, Fleischman RA and Remmer H: Determination of drug metabolizing enzymes in needle biopsies of human liver. *Eur J Clin Pharmacol*, 1978; 4: 65-68.

Simon RH, Scoggins CM and Patterson D: Hydrogen peroxide cause fetal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals. *J Biol Chem*. 1981; 266: 7181-7186.

Stachow CS, Stevenson IL and Day DD: Purification and properties of nicotinamide adenine dinucleotide phosphatespecific benzaldehyde dehydrogenase from pseudomonas. *J Biol Chem*, 1967; 242: 5294-5300.

Taylor GJ and Harris WS: *Glue sniffing causes heart block in mice*. *Science*, 1970; 170: 866.

Vessey DA: *Hepatology*. Philadelphia, W. B. Saunders Co., 1980.

Vidrio H, Magos GA and Lorenzana-Jimenez M: Electrocardiographic effects of toluene in the anesthetized rat. *Arch Int Pharmacodyn*, 1986; 279: 121-129.

Williams RL and Benet LZ: *Hepatology*. Philadelphia, W. B. Saunders, Co., 1982.

Yoon JG: A modified colorimetric assay for xantine oxidase in rat liver extrats. *keimyung reserch founal*. (keimyung junior college), 1984; 2: 295-308.

Yoon JG, Ban JT and Shin JK: Effect of earthworm flour supplemented diet on the liver damage in CCl₄- treated rats. *동아시아 식생활학회지*, 1994; 4(1): 121-129.

Younes M, Albrecht M and Sieger CP: Interrelation between lipid peroxidation and lysosomal enzyme release in the presence of CCl₄ cumene hydroperoxide or thioacetamide. *Reserch Com Chem Phatol and Pharmacol*. 1983; 40(1): 121-129.

Zee-Cheng CS, Mueller CE and Gibbs HR: Toluene sniffing and severe sinus bradycardia. *Ann Intern Med*, 1985; 103: 482-485.

Zilly W, Richter E and Rietbrock N: Pharmacokinetics and metabolism of digoxin and β -methyl-digoxin-12 alpha-3H in patients with acute hepatitis. *Clin Pharmacol Therap*, 1975; 17: 302-309.