

## Effect of *p*-Phenylenediamine Application to Rat Skin on the Liver Oxygen Free Radical Systems

Hye-Jung Choi, Sang-Hee Lee and Chong-Guk Yoon<sup>†</sup>

Department of Public Health, College of Natural Science, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

To evaluate the influence of hepatic oxygen free radical systems on liver injury by topical *p*-phenylenediamine (PPD) application on rat skin, PPD (25 mg/16.5 cm<sup>2</sup>) was topically applied to the abdominal region 5 times every other day and sacrificed.

By PPD treatment, increasing rate of liver weight/body weight (%), serum activities of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase and decreasing rate of microsomal glucose-6-phosphatase activity were higher in the rats fed tungstate supplemented diet than those fed a standard diet. These findings indicate that group fed tungstate supplemented diet have more severe liver injury compared with group fed standard diet on topical PPD application. However, the activities of oxygen free radical generating enzymes such as xanthine oxidase (XO) and cytochrome P450 dependent aniline hydroxylase and those of oxygen free radical scavenging enzymes were not found to be different between these two animal groups.

In the present study, a novel monitoring method to detect the generating of oxygen free radicals in liver extract was devised. Throughout this method, the oxidized PPD produced by oxygen free radicals was determined colorimetrically.

The increasing rate of PPD oxidation by liver homogenate was higher in tungstate fed animals than in standard diet fed ones. Among the fractionations of liver extract, the mitochondrial and postmitochondrial fractions in the liver extract of tungstate fed animals led to a higher availability of PPD oxidation by PPD treatment compared with standard diet fed ones.

In conclusion, these results suggest that an enhanced liver injury in tungstate fed animals treated with PPD may be due to oxygen free radicals produced in other systems except oxygen free radicals generating from cytosolic XO system. Especially, oxidative availability by PPD can be used for oxygen free radical detection in some tissue.

**Key Words:** *p*-Phenylenediamine, Rat skin, Liver oxygen free radical

### 서 론

두발 염색제 성분의 일종인 *p*-phenylenediamine (PPD)은 염색제의 주된 성분으로 알려져<sup>11)</sup> 있을 뿐만 아니라 사진 현상제, 황산화제, 고무 경화제로도 사용되고 있다<sup>18)</sup>. 지금까지 알려진 생체에 미치는 PPD의 영향으로는 PPD를 염료제로 취급하는 근로자들 사이에서 방광암<sup>6)</sup>이 유발될 뿐만 아니라 직접 접촉 시에는 피부 자극, 피부염 및 건성 결막염 등을 야기시키며<sup>29)</sup> 피하 주사 시에는 종양성<sup>19)</sup>과 돌연변이성<sup>5)</sup>이 있다고 보고되고 있으나, 실험동물의 피부에 PPD를 도포할

때 발암성이 나타나지 않았다는 보고<sup>9)</sup>도 있어 현재까지도 이 물질의 안전성에 대한 논란이 계속되고 있다. 또한 PPD의 생체 내 대사에 대해서는 거의 알려진 바가 없으며 다만 대사물질이 PPD의 trimer인 Bandrowski's base로 보고<sup>10)</sup>되어 있을 뿐이다. PPD는 두발 염색 시 일반적으로 hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)와 혼합하여 사용하고 있으며, hydrogen peroxide에 의해 산화되어 생성된 PPD의 산화물질이 독성이 있는 것으로 알려져 있다<sup>35,36)</sup>.

한편, 독성물질의 생체 내 세포 독성반응은 독성대사산물 뿐만 아니라 이들의 대사과정에서 생성되어지는 oxygen free radical에 기인되어서도 나타난다<sup>31)</sup>고 한다. 또한 oxygen free radical에 의한 조직의 손상은 이들 oxygen free radical의 생성계<sup>12)</sup>와 해독계<sup>26)</sup>의 불균형에 의해 야기되는 것으로 알려져 있다<sup>25)</sup>. 그러나 oxygen free radical은 phagocyte 내에서 살균력을 가지고 있으며<sup>35)</sup> 생체 내에서 방어기전에 관여한다는 보고<sup>33)</sup>도 있어, 상반된 이론에 대하여 상당한 논란의 대상이

\*논문 접수: 2003년 4월 17일

수정재접수: 2003년 5월 27일

<sup>†</sup>별책 요청 저자: 윤종국, (우) 704-200 대구광역시 달서구 신당동 1000, 계명대학교 자연과학대학 공중보건학과

Tel: 053-580-5230, Fax: 053-580-5164

e-mail: gky446@kmu.ac.kr

되고 있다. 근래에 윤 등<sup>1)</sup>과 채순남<sup>3)</sup>은 superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) 생성에 관여하는 xanthine oxidase (XO)<sup>7)</sup>의 합성을 저해시키는 것으로 알려져 있는 식이성 tungstate가 사염화탄소 및 toluene의 간 독성을 경감시킨다고 하였다. 따라서 PPD의 생체 폭로 시 oxygen free radical에 의해 생성된 PPD 산화물질과 oxygen free radical에 대한 생체 조직의 독성 현상기전을 구명하기 위해 XO 결핍 실험동물 모델을 이용하여 PPD의 독성 현상을 관찰함은 의의가 있을 것으로 생각한다.

이에 이 연구에서는 oxygen free radical이 PPD의 독성반응에 어떠한 영향을 미치는지를 검토할 목적으로 XO의 합성을 저해시키는 tungstate를 식이에 첨가시켜 섭취하게 한 실험동물의 피부에 PPD를 도포한 다음, 간 손상 정도를 표준 식이군과 상호 비교 검토하였다. 그리고 간 조직 중 oxygen free radical 대사계 효소들의 활성 및 조직의 분획에 따른 oxygen free radical에 의한 PPD의 산화정도도 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 동물의 사육 및 처치

동물은 생후 6주령 된 체중 200±10 g의 외견상 건강한 Sprague-Dawley 중 수 흰쥐를 대한실험동물센터 (Korea)로부터 구입한 후 사육실 (온도: 25±1°C, 상대습도: 50±5%)에서 1주일 동안 적응시켜 실험에 사용하였다.

각 실험군은 표준 식이 대조군, 표준 식이 PPD 도포군, tungstate 식이 대조군, tungstate 식이 PPD 도포군 모두 4군으로 하여 각 군마다 6마리씩 분리 수용하였으며 실험 기간 동안 물과 사료 (삼양사, Korea)의 양은 제한없이 공급하였다.

PPD의 도포는 Wansee 등의 방법<sup>30)</sup>에 준하여 실험동물 복측 부위의 털을 제거한 다음 2% NH<sub>4</sub>OH에 녹인 2.5% PPD를 1일 1회 2시간씩, 2일 간격으로 5회 도포하였다. 도포한 PPD의 양은 피부 표면적 16.5 cm<sup>2</sup> 당 25 mg으로 하였다. 실험 식이의 섭취는 윤 등의 방법<sup>1)</sup>에 준하여 0.72% (w/w) tungstate를 함유한 식이를 PPD 도포와 더불어 8일간 섭취시켰다. 이상 모든 실험군은 마지막 도포 후부터 희생 전 24시간 동안 물만 공급하고 금식시켰다.

동물의 처치는 효소 활성도의 일중 변동을 고려하여 일정 시간에 실시할 수 있도록 시간을 조절하였으며, ether 마취 하에 복부를 개복한 후 복부대동맥으로부터 채혈하여 실험 사시켰다. 간 문맥을 통해 4°C 생리식염수로 관류하여 장기 내에 남아있는 혈액을 제거한 간은 적출하였고 피부 조직은 털을 제거한 다음 일정량을 적출하였다. 채취한 혈액은 실온에서 30분간 방치한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻고, alanine aminotransferase (ALT) 및 aspartate aminotransferase (AST) 활성 측정용 시료로 사용하였다.

### 2. 효소원의 조제

적출한 간 및 피부 조직 일정량을 칭량한 후 4배량의 0.25 M sucrose 용액을 넣고 glass teflon homogenizer를 이용하여 20% (w/v) 마쇄균질액 (homogenate)을 만들었다. 간 조직 homogenate는 600×g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄부분을 제거한 후, 그 상층액을 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 mitochondria 분획과 postmitochondria 분획 (PMF)을 얻었다. Mitochondria 분획은 catalase (CAT) 활성도 측정에 사용하였고, PMF는 XO, cytochrome P450 dependent aniline hydroxylase (CYPdAH), glucose-6-phosphatase (G6P), superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST) 및 glutathione peroxidase (GPx) 활성도 측정용 시료로 사용하였다.

### 3. 효소 활성도 측정

혈청 중 ALT 및 AST의 활성도는 L-alanine 및 L-aspartate와 α-ketoglutaric acid를 기질로 하여 생성되는 pyruvic acid 및 oxaloacetate가 alkali성에서 2,4-dinitrophenylhydrazine과 작용하여 발색되는 hydrazone의 색조를 비색정량하는 Reitman과 Frankel의 방법<sup>28)</sup>에 준해 제조된 kit 시약을 사용하였다. 활성도 단위는 혈청 ml 당 Karmen<sup>22)</sup> unit로 표시하였다.

간 조직 중 CAT의 활성도 측정은 hydrogen peroxide를 기질로 하여 환원되는 정도를 파장 240 nm에서 그 흡광도를 읽고 분자흡광계수 (E=0.04 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)를 이용하여 활성을 산출하는 Aebi의 방법<sup>4)</sup>에 준하였다. 활성도 단위는 간 조직 중에 함유된 단백질 1 mg이 1분 동안 반응하여 감소되는 hydrogen peroxide 양을 nmole로 표시하였다. CYPdAH의 활성도는 aniline을 기질로 하여 37°C에서 15분간 반응시켜 유리되는 p-aminophenol을 phenol 시약으로 발색시켜 640 nm에서 흡광도를 측정하는 Bidlack과 Lowery의 방법<sup>8)</sup>에 준하여 측정하였다. 활성도 단위는 효소반응액 중에 함유된 단백질 1 mg이 1시간 동안 반응하여 기질로부터 생성된 p-aminophenol의 양을 nmole로 표시하였다. G6P의 활성도는 Hasumura 등의 방법<sup>8)</sup>에 따라 측정하였다. Glucose-6-phosphate를 기질로 하여 30°C에서 20분간 반응시켜서 유리되는 inorganic phosphorus를 Fiske와 Subbarow의 방법<sup>14)</sup>에 따라 발색시킨 다음 680 nm에서 흡광도를 측정하였다. 활성도 단위는 단백질 1 mg이 20분간 반응하여 생성되는 phosphorus의 양을 nmole로 표시하였다. GPx의 활성도는 Paglia와 Valentine의 방법<sup>27)</sup>에 따라 측정하였다. 기질인 hydrogen peroxide 및 glutathione과 조효소인 NADPH를 시료와 함께 25°C에서 5분간 반응시켜 340 nm에서 NADPH의 산화로 인한 흡광도 감소율을 측정하였다. 활성도 단위는 효소반응액 중에 함유된 단백질 1 mg이 1분간 산화시킨 NADPH의 양을 nmole로 표시하였다. GST의 활성도는 Habig 등의 방법<sup>16)</sup>에 따라 측정하였다. 1-chloro-2,4-dinitroben-

zene과 glutathione을 기질로 하여 25°C에서 10분간 반응시켜 생성된 2,4-dinitrobenzene-glutathione conjugate 양을 340 nm에서 측정하였다. 활성도 단위는 효소반응액 중에 함유된 단백질 1 mg이 1분간 반응하여 생성시킨 conjugate의 양을 nmole로 나타내었다. SOD의 활성도는 hematoxylin 자동산화의 억제 정도를 관찰하는 Martin 등의 방법<sup>25)</sup>에 따라 0.1 mM EDTA가 함유된 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 10 µM hematoxylin 및 효소액을 가해 25°C에서 반응시켜 생성된 hematein을 560 nm에서 측정하여 효소의 활성도를 산정하였다. 활성도 단위는 효소액을 넣지 않은 반응액 중의 hematoxylin 자동산화를 50% 억제하는 정도를 1 unit로 나타내었다. XO 활성도는 기질인 xanthine으로부터 생성된 uric acid에 phosphotungstic acid를 가하여 710 nm에서 비색정량하는 Yoon<sup>38)</sup>의 방법에 준하여 측정하였다. 활성도 단위는 효소반응액 중에 함유된 단백질 1 mg이 1분간 반응하여 기질인 xanthine으로부터 생성시킨 uric acid의 양을 혈청 1 당 µmole로 표시하였다.

#### 4. 환원형 glutathione (GSH)

간 조직 중 GSH의 함량은<sup>13)</sup>의 방법에 따라 측정하였다. 간 조직 homogenate 일정량에 4% sulfosalicylic acid 0.5 ml를 넣고 원심분리한 후, 상층액 일정량을 0.1 mM 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) 함유 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0)에 넣고 반응시켜 생성된 p-nitrothiophenol을 측정하였다.

**Table 1.** Effect of dietary tungstate on the hepatic xanthine oxidase (XO) activity in rats

Enzyme	Standard diet	Tungstate suppl. diet
XO (total type)	2.85±0.08	0.94±0.06***

Each value represents the mean±S.E. of 6 rats. Unit: µmoles uric acid formed/min/mg protein. \*\*\*: Significantly different from standard diet group (p<0.001).

**Table 2.** Effects of p-phenylenediamine (PPD) application to skin on the liver weight per body weight (LW/BW, %), serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) and hepatic glucose-6-phosphatase (G6P) activities in rats fed a standard or tungstate supplemented diet

Groups	Parameters	LW/BW (%)	ALT <sup>1)</sup>	AST <sup>1)</sup>	G6P <sup>2)</sup>
Standard diet	Control	2.84±0.02	26.8±2.50	29.9±5.60	1.85±0.24
	PPD	2.81±0.42	33.3±1.81	39.2±2.57	1.62±0.21
Tungstate suppl. diet	Control	2.73±0.07	28.0±4.81	31.2±0.35	1.73±0.22
	PPD	3.08±0.40	103.5±34.50***a,c)	301.3±25.02***a,c)	1.17±0.15

Each value represents the mean±S.E. of 6 rats. Unit: <sup>1)</sup>Karmen unit/ml of serum, <sup>2)</sup>nmoles P<sub>i</sub> formed/min/mg protein. <sup>a)</sup>Significantly different from each control group, <sup>c)</sup>Significantly different from standard diet group treated with PPD (\*\*\*; p<0.001).

GSH 함량은 조직 g 당 µmole로 표시하였다.

#### 5. 단백질 정량

간 조직 중 단백질 함량은 Lowry 등의 방법<sup>24)</sup>에 따라 bovine albumin을 표준품으로 사용하여 측정하였다.

#### 6. p-Phenylenediamine (PPD)의 산화정도 측정

PPD의 hydrogen peroxide 산화에 의한 정색반응은 0.46 M PPD와 1.76 M hydrogen peroxide를 동량 혼합하여 일정시간 반응시킨 다음, 350~700 nm 사이의 파장에서 발색되는 정도를 spectrophotometer로 흡광도를 측정하여 반응 생성물의 최대흡광파장 (maximum wavelength), 반응시간, 당량을 결정하였다.

이 실험조건에서 간 조직의 함량 및 분획에 따른 산화정도는 13 mM PPD, 50 mM potassium phosphate buffer (pH 9.0)와 시료가 혼합된 반응액을 37°C에서 일정시간 반응하여 앞에서 확인된 최대흡광파장에서 흡광도를 측정하였다. PPD의 산화정도의 단위는 µmole/min/mg protein으로 표시하였다.

한편 피부 조직의 homogenate 일정량에 140 µM allopurinol 140 µM xanthine, 50 mM potassium phosphate buffer (pH 9.0)를 첨가하여 superoxide에 의한 PPD의 산화정도를 측정하였다.

#### 7. 성적 검정

실험 결과의 통계처리는 Student's t-test<sup>30)</sup>로 하였으며 유의 수준은 0.05 이하로 하였다.

## 결 과

#### 1. Xanthine oxidase (XO) 활성

표준 식이 및 tungstate 첨가 식이로 성장한 흰쥐의 간 조직 중 XO 활성을 나타낸 것은 Table 1과 같다.

총 XO의 활성은 tungstate 식이군이 표준 식이군에 비하여 67% 정도 현저하게 (p<0.001) 감소하였다.

## 2. 간 조직 및 혈청 중 간 손상 지표

간 손상의 지표를 관찰한 결과는 Table 2와 같다.

체중 당 간 무게의 변동은 표준 식이군의 경우 대조군과 PPD 도포군간에 별다른 차이를 보이지 않았으며, tungstate 식이군의 경우 통계적으로 유의한 차이는 없었으나 PPD 도포군이 대조군에 비해 약 13% 증가하는 경향을 나타내었다.

혈청 ALT 및 AST 활성은 표준 식이군의 경우 대조군에 비해 PPD 도포군이 각각 24% 및 31% 정도 증가하였으며, tungstate 식이군은 대조군에 비하여 PPD 도포군이 각각 3.7배 및 9.7배의 현저한 ( $p<0.001$ ) 증가를 나타내었다.

간 조직 G6P 활성은 표준 식이군 및 tungstate 식이군에서 대조군에 비해 PPD 도포로 인하여 약 12% 및 32% 감소하였다.

## 3. Oxygen free radical 생성계 효소 활성

Table 3은 표준 식이군과 tungstate 식이군에 PPD를 도포하였을 때 oxygen free radical 생성에 관여하는 효소의 일종인 세포질성 XO와 microsome의 CYPdAH 활성도를 나타낸 결

**Table 3.** Effects of *p*-phenylenediamine (PPD) application to skin on the activity of oxygen free radical generating enzymes in rats fed a standard or tungstate supplemented diet

Groups	Enzymes	XO (O type) <sup>1)</sup>	CYPdAH <sup>2)</sup>
		Standard diet	Control
	PPD	1.02±0.13	3.85±0.61
Tungstate suppl. diet	Control	0.20±0.07 <sup>***b)</sup>	6.85±0.58 <sup>b)</sup>
	PPD	0.08±0.01 <sup>***c)</sup>	9.38±0.80 <sup>*a),***c)</sup>

Each value represents the mean±S.E. of 6 rats. Unit: <sup>1)</sup> μmoles uric acid formed/min/mg protein, <sup>2)</sup> nmoles of *p*-aminophenol formed/min/mg protein. <sup>a)</sup> Significantly different from each control group, <sup>b)</sup> Significantly different from standard diet control group, <sup>c)</sup> Significantly different from standard diet group treated with PPD (\*;  $p<0.05$ , \*\*\*;  $p<0.001$ ).

**Table 4.** Effects of *p*-phenylenediamine (PPD) application to skin on the activity of oxygen free radical scavenging enzymes in rats fed a standard or tungstate supplemented diet

Groups	Enzymes	CAT <sup>1)</sup>	SOD <sup>2)</sup>	GST <sup>3)</sup>	GPx <sup>4)</sup>
		Standard diet	Control	46.6±4.21	93.4±8.25
	PPD	60.3±7.25	85.3±9.52	709.2±28.8	18.0±2.77
Tungstate suppl. diet	Control	38.4±3.92	84.8±5.02	599.1±10.5	20.4±2.51
	PPD	50.1±6.52	106.5±17.65	605.4±26.0 <sup>c)</sup>	19.7±5.01

Each value represents the mean±S.E. of 6 rats. Unit: <sup>1)</sup> Reduced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nmoles/min/mg protein, <sup>2)</sup> Unit<sup>#</sup>/mg protein (<sup>#</sup>50% inhibition of autooxidation of hematoxylin), <sup>3)</sup> nmoles 2,4-dinitrobenzene-glutathione conjugate/min/mg protein, <sup>4)</sup> NADPH oxidized nmoles/min/mg protein. <sup>c)</sup> Significantly different from standard diet group treated with PPD (\*;  $p<0.05$ ).

과이다.

간 조직 중 XO의 O type 활성은 표준 식이군의 경우 PPD를 도포함으로써 대조군에 비해 약 12% 증가하였으나, tungstate 식이군에서는 PPD 도포군이 대조군에 비해 오히려 약 60% 감소하였다. 또한 tungstate 식이를 섭취함으로써 표준 식이군에 비해 대조군 및 PPD 도포군이 각각 약 78% 및 92%의 현저한 ( $p<0.001$ ) 감소를 나타내었다.

CYPdAH 활성은 표준 식이군의 경우 PPD를 도포함으로써 대조군에 비해 약 14% 감소하였으나, tungstate 식이군에서는 PPD 도포군이 대조군에 비해 오히려 약 37% 정도 유의하게 ( $p<0.05$ ) 증가하였다. 또한 Tungstate 식이를 섭취함으로써 표준 식이군의 대조군 및 PPD 도포군에 비해 각각 약 52% ( $p<0.05$ ) 및 2.4배 ( $p<0.001$ )로 현저히 증가하였다.

## 4. Oxygen free radical 해독계 효소 활성

Table 4는 표준 식이군과 tungstate 식이군에 PPD를 도포하였을 때 oxygen free radical 해독에 관여하는 효소의 활성을 나타낸 것이다.

CAT 활성은 PPD를 도포함으로써 대조군에 비해 표준 식이군 및 tungstate 식이군이 각각 29% 및 31% 정도 증가하였고, tungstate 식이를 섭취함으로써 표준 식이군에 비해 대조군 및 PPD 도포군이 각각 약 18% 및 17% 감소하였다.

SOD 활성은 tungstate 식이군의 경우 PPD 도포로 인해 대조군에 비해 약 26% 증가하였으나 표준 식이군의 경우는 PPD 도포군과 대조군 사이에 별다른 차이를 나타내지 않았으며, 표준 식이 PPD 도포군에 비해 tungstate 식이 PPD 도포군이 약 25% 증가하였으나 대조군들 사이에는 별다른 차이가 없었다.

GST 활성은 표준 식이군의 경우 PPD를 도포함으로써 대조군에 비해 약 12% 증가하였으나 tungstate 식이군의 경우는 별다른 차이를 나타내지 않았으며, tungstate 식이 PPD 도포군은 표준 식이 PPD 도포군에 비해 약 15% 유의하게 ( $p<0.05$ ) 감소하였으나 각 대조군들 사이에는 별다른 차이를 나

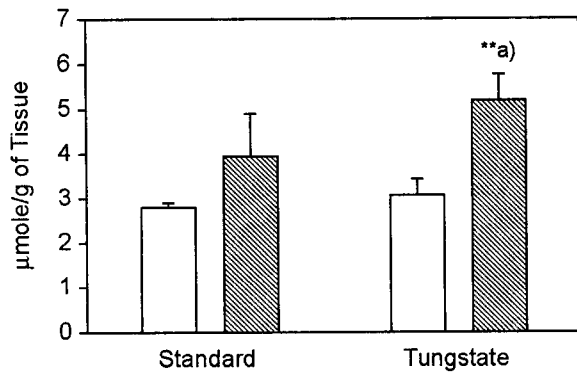


Fig. 1. Effect of *p*-phenylenediamine (PPD) application to skin on the hepatic reduced glutathione (GSH) content in rats fed a standard or tungstate supplemented diet. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of 6 rats. <sup>a)</sup> Significantly different from each control group (\*\*;  $p < 0.01$ ). □: Control, ▨: PPD-treated

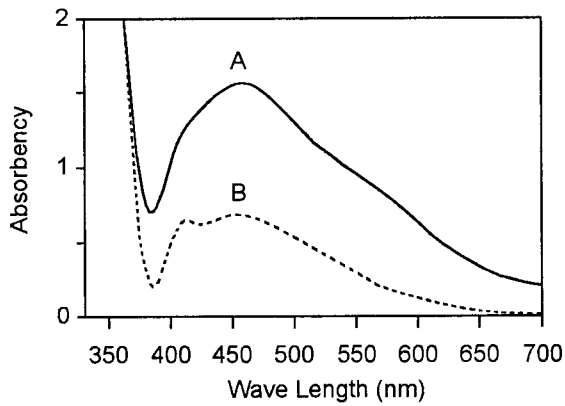


Fig. 2. Spectra of oxidized *p*-phenylenediamine (PPD) or PPD. A: Oxidized PPD, 2 ml of 0.23 M PPD was reacted with 2 ml of 1.76 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. B: PPD, 2 ml of 0.46 M PPD was reacted with 2 ml of distilled water.

타내지 않았다.

GPx 활성은 tungstate 식이를 섭취함으로써 표준 식이군에 비해 대조군이 약 27% 증가하였고 그 외 별다른 차이가 없었다.

#### 5. 환원형 glutathione (GSH) 함량

비단백성 oxygen free radical 해독물질인 GSH 함량을 간 조직에서 측정된 결과를 나타낸 것은 Fig. 1과 같다.

PPD를 도포함으로써 표준 식이군 (3.98 $\pm$ 0.92) 및 tungstate 식이군 (5.22 $\pm$ 0.58) 모두에서 각각의 대조군 (2.82 $\pm$ 0.08 및 3.12 $\pm$ 0.31)에 비해 약 41% 및 67% ( $p < 0.01$ ) 증가하였다. 또한 tungstate 식이를 섭취함으로써 표준 식이군에 비해 대조군 및 PPD 도포군이 각각 11% 및 31% 정도 증가하였으나 통계적인 의의는 없었다.

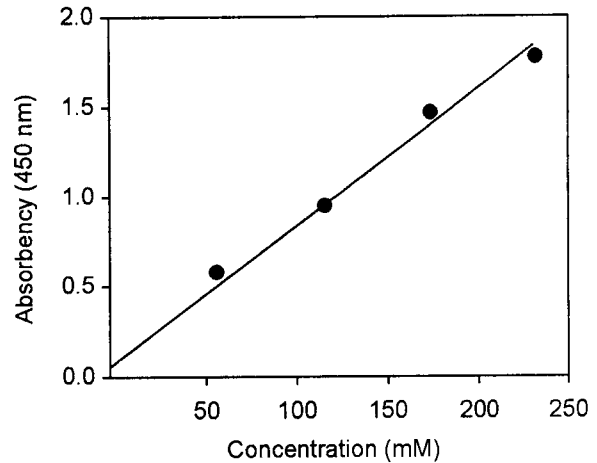


Fig. 3. Relation of the absorbency to concentration of *p*-phenylenediamine (PPD) added constant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on PPD oxidation. Each value represents the mean of 3 experiments. Various concentrations of PPD were reacted with 2 ml of 1.76 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (total reaction volume; 4 ml). C=F $\times$ A, C: Concentration ( $\mu$ M/min), A: Absorbency, F: Factor (30)

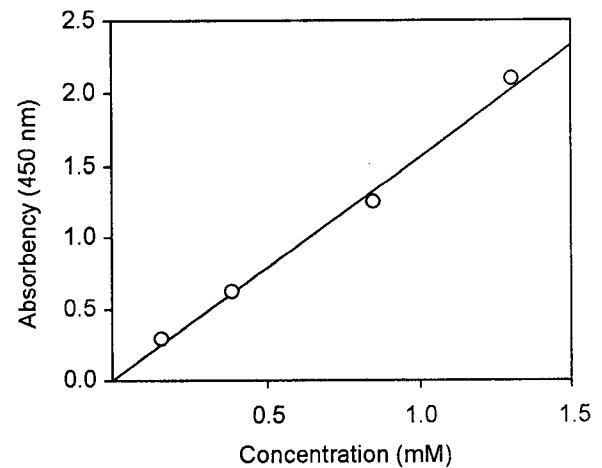


Fig. 4. Relation of the oxidized phenylenediamine (PPD) to the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> added to constant PPD. Each value represents the mean of 3 experiments. Various concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were reacted with 2 ml of 0.46 M PPD (total reaction volume; 4 ml).

#### 6. 시험관 내에서 *p*-phenylenediamine (PPD)의 산화

두발 염색 시 PPD와 과산화수소가 혼합되어 사용함으로써 염색이 되는 점을 착안하여 조직 중 oxygen free radical 측정 가능성을 다음과 같은 실험을 통하여 확인하였다. Fig. 2는 0.23 M PPD 2 ml 및 같은 농도의 PPD 2 ml를 1.76 M hydrogen peroxide 2 ml와 혼합하여 5분간 반응시킨 다음, 350~700 nm 사이의 파장에서 흡광도 변화를 관찰한 것이다.

PPD 자체에 비해 PPD와 hydrogen peroxide를 반응시킴

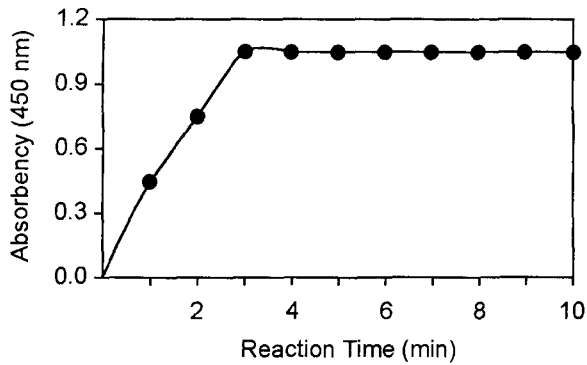


Fig. 5. Time course for *p*-phenylenediamine (PPD) oxidation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Each value represents the mean of 3 experiments. Two ml of 0.46 M PPD was reacted with 2 ml of 1.76 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

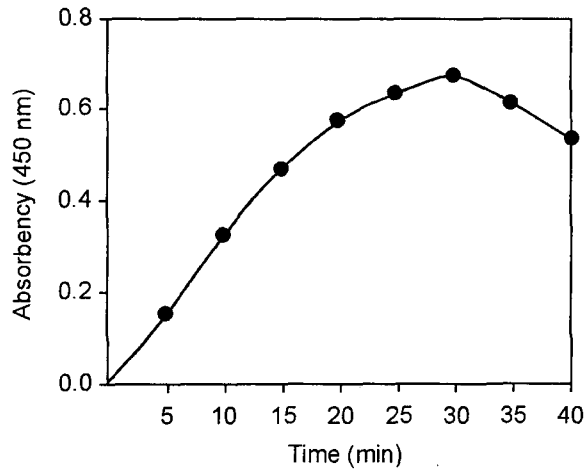


Fig. 6. Time course for *p*-phenylenediamine (PPD) oxidation by hepatic crude homogenate. Each value represents the mean of 3 experiments. The 3.5 ml reaction mixture containing 13 mM PPD, 3.0 mg homogenate protein and 50 mM potassium phosphate buffer (pH 9.0) was incubated at 37°C.

로써 실험에 이용한 전 파장에서 흡광도가 증가하였고 450 nm 파장에서 가장 높은 흡광도를 나타내었다. PPD 자체의 spectra는 PPD의 산화물질과 유사한 변동 곡선을 나타내었으나 PPD의 산화물질 보다 흡광도가 낮게 나타났다. 따라서 이하 실험에서는 파장 450 nm에서 흡광도를 측정하여 PPD의 산화정도를 평가하였다.

Fig. 3는 일정량의 hydrogen peroxide에 PPD의 농도를 높여 가면서 5분간 반응시킨 다음 450 nm에서 PPD의 산화정도를 측정된 결과이고, Fig. 4는 PPD의 농도를 일정하게 하여 PPD의 산화정도를 측정된 결과이다. 이들 결과로부터 PPD ( $r^2=0.99$ ) 및 hydrogen peroxide ( $r^2=0.99$ )의 농도에 따라 흡광도가 비례함을 관찰할 수 있었다.

Fig. 5은 일정량의 PPD와 hydrogen peroxide를 혼합한 다음,

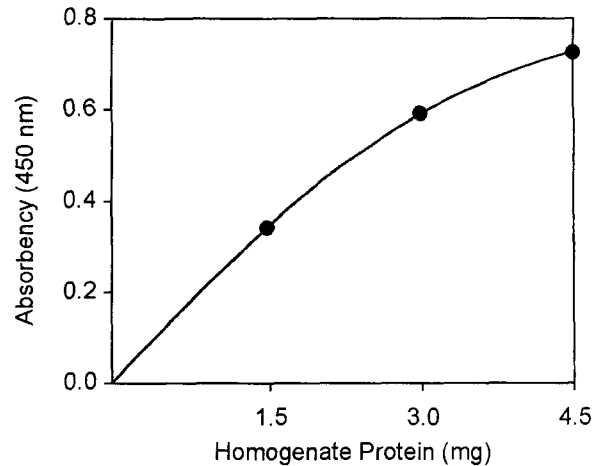


Fig. 7. Effect of liver extract on *p*-phenylenediamine (PPD) oxidation. Each value represents the mean of 3 experiments. The 3.5 ml reaction mixture containing 13 mM PPD, various concentrations of homogenate protein (mg) and 50 mM potassium phosphate buffer (pH 9.0) was incubated at 37°C for 20 minutes.

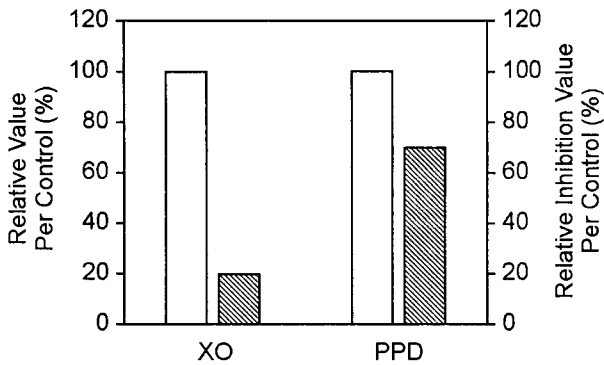
경시별로 PPD의 산화정도를 450 nm 파장에서 관찰한 결과이다.

PPD의 산화는 경시별로 증가하였으며, 3분 정도에서 안정되는 경향을 나타내었다.

#### 7. 간 및 피부 조직에 의한 *p*-phenylenediamine (PPD)의 산화

Hydrogen peroxide에 의한 PPD의 산화 현상이 간 조직에서도 일어나는지를 관찰할 목적으로 PPD와 간 조직 homogenate를 혼합한 다음, 경시별로 PPD의 산화정도를 관찰한 결과는 Fig. 6과 같다.

13 mM PPD, 3.0 mg homogenate 단백질, 50 mM potassium phosphate buffer (pH 9.0)를 함유한 반응액을 37°C에서 반응시킨 후, 시간에 따른 PPD의 산화정도는 30분까지는 시간 의존적으로 점진적인 증가를 보였으며 이후 감소되었다. 따라서 이하 실험에서 간 조직 중 PPD의 산화정도의 측정은 37°C에서 20분간 반응시켰다. 간 조직 homogenate의 함량에 따른 PPD의 산화정도를 측정하여 나타낸 Fig. 7은 Homogenate 단백질을 1.5 mg, 3.0 mg 및 4.5 mg 씩 첨가하였을 때, 양의 점진적 증가에 따라 PPD의 산화정도는 증가하였다. 그리고 PPD의 산화에 또다른 oxygen free radical의 일종인 superoxide도 관여하는지를 알아보기 위하여 CAT 및 SOD의 활성이 낮은 피부 조직 일정량에 xanthine 및 XO의 억제제인 allopurinol을 첨가하여 PPD의 산화정도를 측정된 결과인 Fig. 8에서 allopurinol 첨가에 의해 XO의 활성은 80% 정도 억제되었으며, PPD의 산화는 약 30% 억제되었다.



**Fig. 8.** Inhibition of *p*-phenylenediamine (PPD) oxidation by allopurinol in skin tissue extract. The 3.5 ml reaction mixture containing 13 mM PPD, 140  $\mu$ M allopurinol, 140  $\mu$ M xanthine, 2.0 mg skin homogenate protein and 50 mM potassium phosphate buffer (pH 9.0) was incubated at 37°C for 20 minutes. Allopurinol was not included in the control reaction mixture. □: Control, ▨: Allopurinol-treated

#### 8. 간 세포 분획에 따른 *p*-phenylenediamine (PPD)의 산화

Fig. 9은 간 세포 분획에 따른 oxygen free radical에 의한 PPD의 산화정도를 측정된 것이다.

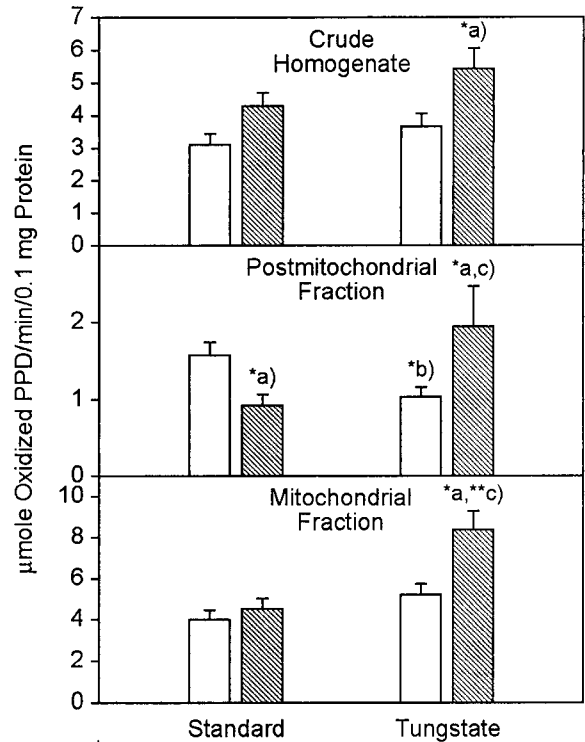
간 조직 homogenate에서는 PPD를 도포함으로써 표준 식이군 및 tungstate 식이군에서 대조군에 비해 각각 약 38% 및 49% ( $p < 0.05$ ) 정도 산화가 증가되었고, tungstate 식이를 섭취함으로써 표준 식이 대조군 및 PPD 도포군에 비해 각각 18% 및 28% 정도 증가하였다.

간 조직 PMF에서는 tungstate 식이 대조군이 표준 식이 대조군보다 PPD 산화정도가 약 34% ( $p < 0.05$ ) 감소되었으나, PPD 도포군에 있어서는 표준 식이군에 비해 tungstate 식이군에서 약 2배의 ( $p < 0.05$ ) 증가를 나타내었다. Tungstate 식이군에서는 대조군에 비해 PPD 도포로 인하여 약 87% 유의하게 ( $p < 0.05$ ) 증가하였다.

간 조직 mitochondria 분획에서 oxygen free radical에 의한 PPD의 산화정도를 관찰하였을 때, 표준 식이군에서는 대조군과 PPD 도포군간에 별다른 차이가 나타나지 않았으나 tungstate 식이에 PPD를 도포한 군이 표준 식이에 PPD를 도포한 군에 비하여 84% ( $p < 0.01$ ), tungstate 식이 대조군에 비해서는 약 60% 유의하게 ( $p < 0.05$ ) 증가하였다.

#### 고 찰

PPD의 간 독성 발현에 oxygen free radical이 어떠한 영향을 미치는지를 검토할 목적으로 oxygen free radical 생성계 효소로 알려져 있는 XO<sup>7)</sup>의 억제제인 tungstate<sup>21)</sup>를 섭취케 하여 XO 결핍 실험동물 모델을 만든 다음, PPD를 피부 도포하여



**Fig. 9.** Effect of *p*-phenylenediamine (PPD) application to skin on the liver PPD oxidized product in rats fed standard or tungstate supplemented diet. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of 6 rats. <sup>a)</sup> Significantly different from each control group, <sup>b)</sup> Significantly different from standard diet control group, <sup>c)</sup> Significantly different from standard diet group treated with PPD (\*;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.01$ ). The 3.5 ml reaction mixture containing 13 mM PPD, 0.1 ml sample and 50 mM potassium phosphate buffer (pH 9.0) was incubated at 37°C for 20 minutes. □: Control, ▨: PPD-treated

간 손상의 정도를 대조군과 상호 비교하였다.

이 실험에서 tungstate 식이군이 표준 식이군에 비하여 종 XO의 활성이 현저히 감소하였다. 따라서 tungstate 식이군은 XO 결핍 모델 실험군이 됨을 확인할 수가 있었다. 이 같은 실험군에 PPD를 피부에 도포하였을 때, 간 손상 시 증가된다는 체중 당 간 무게<sup>2)</sup>, 혈청 ALT 및 AST 활성<sup>32)</sup>은 표준 식이에 비해 tungstate 식이에서 높게 나타났고, 특히 tungstate 식이 PPD 도포군에서 증가의 정도가 크게 나타났다. 그리고 간 손상 시 활성이 감소된다는 조직 중 G6P<sup>17)</sup> 역시 tungstate 식이군에서 표준 식이군에 비해 감소율이 크게 나타났으며 tungstate 식이 PPD 도포군에서 감소율의 정도가 크게 나타났다. 이러한 결과로 보아 tungstate 식이군에서 표준 식이군보다 PPD의 도포로 인한 간 손상이 크게 나타남을 알 수 있었다. 그러나 tungstate 식이에 의한 사염화탄소 및 toluene의 간 손상이 오히려 경미하게 나타난다는 타 연구자들의 보고<sup>1,3)</sup>와는 상반되는 결과로, 화학물질의 종류에 따라 tungstate 식이의 영향이 다르게 나타난다는 것을 암시하고 있다.

PPD에 의한 간 손상이 tungstate 식이군에서 심하게 나타나는 것이 어떠한 원인에 의한 것인지를 검토하고자 oxygen free radical 대사기구의 효소 활성을 관찰하였다. Oxygen free radical 생성에 관여하는 효소들의 일종인 XO의 O type 활성은 표준 식이군에 비해 tungstate 식이로 인하여 현저히 감소하였고, CYPdAH 활성은 증가하는 경향을 나타내었다. Oxygen free radical 해독에 관여하는 효소들의 활성은 표준 식이군 및 tungstate 식이군 모두에서 대조군과 PPD 도포군간에 별다른 차이를 관찰할 수 없었다.

한편, 독성물질에 의한 세포 상해 시에 그 함량이 감소한 다음 일정시간 경과 후에는 증가되며, 그 증가율은 손상의 정도에 비례하는 것으로 알려져 있는 GSH 함량<sup>37)</sup>을 간 조직 중에서 측정된 결과, 증가율이 tungstate 식이군에서 표준 식이군에 비해 높게 나타났다. 이는 tungstate 식이군의 조직 손상이 심화된 결과로 생각된다.

이상에서 보아 표준 식이 PPD 도포군은 대조군에 비해 CYPdAH의 활성은 감소한 반면 XO 활성은 증가되므로서 oxygen free radical의 생성량에 큰 차이를 나타내지 않아 PPD에 의한 간 조직 손상이 나타나지 않은 것으로 생각된다. 그러나 tungstate 식이 PPD 도포군에 있어서는 대조군에 비해 CYPdAH의 활성 증가율보다 XO의 활성 감소율이 현저히 크게 나타난 결과로 보아 oxygen free radical의 생성률이 대조군에 비해 낮게 나타남으로서 조직의 손상이 경미할 것으로 생각되었다. 그러나 오히려 조직의 손상이 tungstate 식이군에서 더 크게 나타난 것은 세포질성 XO 기구 이외 여러 가지 다른 기구에 의해서도 oxygen free radical이 생성된다는 보고<sup>20)</sup>를 감안해 볼 때, 이 실험조건에서 XO 및 CYPdAH 효소 활성 측정만으로는 oxygen free radical에 의한 간 손상을 설명하기가 어려울 것으로 사료된다.

Wanee 등<sup>34)</sup>과 Watanabe 등<sup>36)</sup>은 PPD가 oxygen free radical의 일종인 hydrogen peroxide에 의하여 산화되고 이 산화물질이 PPD에 비하여 강한 독성을 나타낸다고 하였다. 그리고 두발 염색 시 PPD의 발색제로 hydrogen peroxide를 사용한다는 사실을 고려해 볼 때 PPD를 생체 내 oxygen free radical 검색의 지표로 이용할 수 있는지를 검토하고자 하였다. PPD와 hydrogen peroxide를 반응시킴으로서 PPD 자체보다 최대 흡광도가 증가하고 있어 PPD가 hydrogen peroxide에 의해 산화됨을 알 수 있었다. 그리고 hydrogen peroxide에 의한 PPD의 산화정도를 관찰한 결과 hydrogen peroxide의 농도 의존적으로 산화가 일어남을 확인할 수 있었고, 경시별로 PPD의 산화정도를 관찰한 결과 경시별로 PPD의 산화는 증가되었으며 3분 정도에서 안정되는 경향을 관찰할 수 있어 상당히 빠른 속도로 산화가 이루어짐을 알 수 있었다.

한편, hydrogen peroxide에 의한 PPD의 산화가 간 조직에서도 일어나는지를 알아보기 위해 PPD와 간 조직 homogenate

를 혼합한 다음 경시별로 PPD의 산화정도를 관찰한 결과, 30분 정도에서 흡광도가 최대로 나타났다가 감소하였다. 이로 인해 PPD의 산화가 30분까지는 시간 의존적으로 증가함을 알 수 있었다. 또한 간 조직 homogenate의 함량에 따른 PPD의 산화정도는 homogenate의 첨가량에 병행하여 증가하였다.

또다른 oxygen free radical의 일종인 superoxide<sup>20)</sup>도 PPD의 산화를 일으키는지 알아보기 위하여 superoxide 생성에 관여하는 XO<sup>7)</sup>의 경쟁적 억제제인 allopurinol<sup>15)</sup>을 CAT 및 SOD 활성이 낮은 피부 조직 homogenate에 첨가하여 PPD의 산화정도를 관찰하였다. Allopurinol 첨가에 의해 XO 활성은 현저하게 억제되었으며, 이러한 조건 하에서 PPD의 산화는 약 30% 정도 억제되었다. 이로 보아 PPD는 superoxide에 의해서도 산화됨을 알 수 있었다.

이에 이 실험조건에서 PPD의 산화정도를 관찰함으로써 조직 세포에서 oxygen free radical을 monitoring 할 수 있을 것으로 생각되어 간 세포 분획에 따른 oxygen free radical에 의한 PPD의 산화정도를 측정하였다. 여러 산화기구를 포함하고 있는 homogenate 중에서는 PPD의 산화정도가 tungstate 식이로 인하여 표준 식이 대조군과 PPD 도포군보다 모두 높게 나타났다. 따라서 tungstate 식이군에서 표준 식이군보다 간 손상이 심하게 나타난 것은 oxygen free radical에 기인되어 나타난 것으로 사료된다. 그러나 tungstate 식이로 oxygen free radical을 생성하는데 관여하는 XO가 결핍된 실험동물 모델에서 PPD의 산화정도가 높게 나타난 것은 XO가 존재하는 세포질 이외 다른 세포 분획에 존재하는 oxygen free radical 생성기구가 tungstate에 의해 어떠한 영향을 받음으로써 oxygen free radical의 생성률이 높게 유지되어진 결과로 생각된다.

일반적으로 oxygen free radical의 생성기구는 mitochondria 호흡연쇄반응기구, endoplasmic reticulum (ER)의 복합산화기구 및 세포질성 XO에 의해 이루어진다고 보고<sup>20)</sup>되고 있다. 그러므로 간 조직을 PMF 및 mitochondria 분획으로 나누어 oxygen free radical에 의한 PPD의 산화정도를 관찰하였다. PMF에서 tungstate 식이 대조군이 표준 식이 대조군보다 PPD의 산화정도가 유의하게 감소한 것은 tungstate 식이로 인한 세포질성 XO 활성의 저하에 기인된 결과로 생각되나 tungstate 식이 PPD 도포군의 PPD 산화정도가 대조군에 비해 유의하게 증가된 것은 ER에 존재하는 복합산화기구에 기인되어 나타난 것으로 생각되며, 이는 이 실험조건에서 CYPdAH 활성 증가와 관련된 것으로 사료된다. Mitochondria 분획에 있어서 oxygen free radical에 의한 PPD의 산화정도는 tungstate 식이 PPD 도포군이 대조군에 비해 유의한 증가를 보였으나 표준 식이에 있어서는 대조군과 PPD 도포군간에 별다른 차이가 나타나지 않았다. 따라서 mitochondria 분획에 있어서도 PPD의 산화정도는 tungstate 식이군에서 표준 식이군보다 현저히



높게 나타남을 알 수 있었다.

이상 실험 결과를 종합해 볼 때, tungstate 식이군에서 표준 식이군에 비해 피부에 PPD를 도포함으로써 간 손상이 심하게 나타난 것은 oxygen free radical에 기인된 것으로 생각된다. 그리고 tungstate 식이로 인하여 oxygen free radical을 생성하는 XO의 활성이 현저히 저하됨에도 불구하고 표준 식이 PPD 도포군에 비해 tungstate 식이 PPD 도포군에서 간 손상이 심하게 나타난 것은 oxygen free radical 생성률이 표준 식이군보다 높게 나타남을 시사해주고 있으며, 이는 주로 ER의 복합산화기구와 mitochondria의 호흡연쇄반응기구에 기인된 결과로 생각된다. 그러나 PMF 및 mitochondria 분석에서 tungstate 식이군이 표준 식이군에 비해 오히려 oxygen free radical 생성률이 증가되는 원인에 대해서 해석할 수는 없으나 XO 결핍으로 인해 purine체의 분해 대사과정에서 생성되는 xanthine 및 hypoxanthine과 같은 purine 염기가 이들 ER 및 mitochondria의 oxygen free radical 대사에 영향을 미침으로 나타날 수 있는 점을 배제할 수 없으며 이 점에 대하여는 추후 연구 검토해야 할 과제로 남아있다.

## 참 고 문 헌

- 1) 윤종국, 박해숙, 이상일 (1993): 식이성 tungstate가 사염화탄소 투여에 의한 흰쥐 간 손상에 미치는 영향. 한국영양식품학회지, **22(6)**: 678-684.
- 2) 윤종국, 전태원, 이해자 (1999): 간손상 실험동물 모델에서 xylene 투여가 혈청 xanthine oxidase 활성에 미치는 영향. 계명대학교 기초과학연구논집, **18**: 103-108.
- 3) 채순님 (1993): Tungstate 첨가 식이로 성장한 흰쥐에 있어서 toluene 투여시 간독성에 관한 연구. 석사학위논문, 계명대학교 대학원, 13-15.
- 4) Aebi H (1974): Methods of Enzymatic Analysis. Vol. 2, Catalase. New York: Academic Press. pp. 673-684.
- 5) Ames BN, Kammen HO and Yamasaki E (1975): Hair dyes are mutagenic: identification of a variety of mutagenic ingredients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, **72(6)**: 2423-2427.
- 6) Anthony HM and Thomas GM (1970): Tumors of the urinary bladder: An analysis of the occupations of 1,030 patients in Leeds, England. *Journal of the National Cancer Institute*, **45**: 879-895.
- 7) Battelli MG, Lorenzon E and Stripe F (1973): Milk xanthine oxidase type D (dehydrogenase) and type O (oxidase): Purification, interconversion and some properties. *Biochemical Journal*, **131**: 191-198.
- 8) Bidlack WR and Lowery GL (1982): Multiple drug metabolism: p-nitroaniline reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochemical Pharmacology*, **31(3)**: 311-317.
- 9) Burnett C et al. (1975): Long-term toxicity studies on oxidation hair dyes. *Food and Cosmetics Toxicology*, **13(3)**: 353-357.
- 10) Corbett JF (1973): Role of m-difunctional benzene derivatives in oxidative hair dyeing. I. Reaction with p-diamines. *Journal of Social and Cosmetic Chemistry*, **13(3)**: 353-357.
- 11) Corbett JF and Menkart J (1973): Hair coloring. *Cutis*, **12**: 190-197.
- 12) Deneke SM and Fanburg BL (1980): Normobaric oxygen toxicity of the lung. *New England Journal of Medicine*, **303(2)**: 76-86.
- 13) Ellman GL (1959): Tissue sulfhydryl groups. *Archives Biochemistry and Biophysics*, **82**: 70-77.
- 14) Fiske CH and Subbarow Y (1925): The colorimetric determination of phosphorous. *Journal of Biological Chemistry*, **66**: 375-400.
- 15) Haberland A, Luther H and Schimke I (1991): Does allopurinol prevent superoxide radical production by xanthine oxidase (XOD)? *Agents and Actions*, **32(1-2)**: 96-97.
- 16) Habig WH, Pabst MJ and Jakoby WB (1974): Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid and formation. *Journal of Biological Chemistry*, **249(22)**: 7130-7139.
- 17) Hasumura Y, Tescke R and Lieber CS (1974): Increased carbon tetrachloride hepatotoxicity, and its metabolism, after chronic ethanol consumption. *Gastroenterology*, **66**: 415-422.
- 18) Hawley GG (1971): The condensed chemical dictionary, 8th ed. New York: Van Nostrand Reinhold. pp. 393-446.
- 19) Hossack JN and Richardson JC (1977): Examination of the potential mutagenicity of hair dye constituents using the micronucleus test. *Experientia*, **33**: 377-378.
- 20) Jakoby WB and Habig WH (1980): Enzymatic basis of detoxication. Vol. 1, Superoxide dismutases: detoxication of a free radical. New York: Academic Press. pp. 311-332.
- 21) Johnson JL, Rajagopalan KV and Cohen HJ (1974): Molecular basis of the biological function of molybdenum. Effect of tungsten on xanthine oxidase and sulfite oxidase in the rat. *The Journal of Biological Chemistry*, **249(3)**: 859-866.
- 22) Karmen A (1955): A note on the spectrophotometric assay of glutamic oxaloacetic transaminase in human blood serum. *Journal of Clinical Investigation*, **34**: 131-133.
- 23) Leibovitz BE and Siegel BV (1980): Aspects of free radical reaction in biological system: Aging. *Journal of Gerontology*.

- 35: 45-56.
- 24) Lowry OH et al. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**: 265-275.
- 25) Martin JP Jr, Dailey M and Sugarman E (1987): Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. *Archives Biochemistry and Biophysics*, **255** (2): 329-336.
- 26) Oh SM et al. (1982): Effect of oxygen-derived free radicals on brain microsomal Na-K ATPase activity. *Korean Journal of Pharmacology*, **18**: 1-14.
- 27) Paglia ED and Valentine WN (1967): Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **70**: 158-169.
- 28) Reitman S and Frankel S (1957): A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *American Journal of Clinical Pathology*, **28**: 58-63.
- 29) Sax NI (1984): *Dangerous Properties of industrial materials*, 6th ed. New York: Van Nostrand Reinhold. pp. 2184.
- 30) Scheffler WC (1980): *Statistics for the biological sciences*. London: Addison-Wesley. pp. 84-89.
- 31) Strubelt O, Younes M and Pentz R (1987): Enhancement by glutathione depletion of ethanol-induced acute hepatotoxicity *in vitro* and *in vivo*. *Toxicology*, **45**: 213-223.
- 32) Traiger GJ and Plaa GL (1972): Relationship of alcohol metabolism to the potentiation of CCl<sub>4</sub> hepatotoxicity induced by aliphatic alcohols. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **183**(3): 481-488.
- 33) Tubaro E et al. (1976): Xanthine oxidase activation in animal liver during infections processes. *Arzneimittel-Forschung*, **26**: 2185-2189.
- 34) Wansee R et al. (1986): Carcinogenicity of an oxidation product of *p*-Phenylenediamine. *Carcinogenesis*, **7**(12): 1997-2002.
- 35) Warren JS et al. (1990): Role of O<sub>2</sub><sup>-</sup> in neutrophil recruitment into sites of dermal and pulmonary vasculitis. *Free Radical Biology & Medicine*, **8**(2): 163-172.
- 36) Watanabe T, Hirayama T and Fukui S (1990): Mutagenicity of commercial hair dyes and detection of 2,7-diaminophenazine. *Mutation Research*, **244**(4): 303-308.
- 37) Yang CM and Carlson GP (1991): Effects of ethanol on glutathione conjugation in rat liver and lung. *Biochemical Pharmacology*, **41**: 923-929.
- 38) Yoon CG (1984): A modified colorimetric assay for xanthine oxidase in rat liver extracts. *Keimyung Research Journal (Keimyung Junior College)*, **2**: 295-308.
-