

## Effect of Allopurinol on Methylmercuric Chloride-Induced Cytotoxicity in C<sub>6</sub> Cultured Glioma Cells

Yong-Leol Oh and Byoung-Kwan Son<sup>†</sup>

Sanbon Medical Center, Wonkwang University, Gyeongsido, Gunpo 435-040, Korea

It is demonstrated that inorganic mercury has cytotoxic effect on glial cells. Recently, oxygen radicals is involved in methylmercuric chloride (MMC)-induced cytotoxicity. But, the toxic mechanism of MMC is left unknown. The purpose of this study was to examine the cytotoxicity of MMC on C<sub>6</sub> glioma cells. The cytotoxicity was measured by cell viability using XTT assay in C<sub>6</sub> glioma cells. Colorimetric assay is regarded as a very sensitive screening method for the determination of the cell viability on various agents. In this study, MMC decreased cell viability according to the dose- and time dependent manners after C<sub>6</sub> glioma cells were grown with various concentrations of MMC for 48 hours. In the protective effect of allopurinol on MMC-induced cytotoxicity, allopurinol was effective in the prevention of MMC-induced cytotoxicity in these cultures. These results suggest that MMC has highly cytotoxic effect on C<sub>6</sub> glioma cells by the decrease of cell viability, and free radical scavenger such as allopurinol was effective on organic mercury-induced cytotoxicity in these cultures.

**Key Words:** Methylmercuric chloride, Cytotoxicity, Allopurinol

### 서 론

중금속중 인체에 과량 폭로됨으로서 각종 질환과 부작용을 유발하는 것으로는 수은을 비롯하여 납, 크롬, 카드뮴 및 망간과 같은 중금속류들이 알려져 있다 (Bianchi et al., 1980; Park et al., 1996). 이들이 인체내에 노출되어지는 과정을 살펴보면, 각종 산업체의 작업장에서 인체에 폭로되어 지거나 (Chen et al., 1979; Clarkson et al., 1981), 이들을 이용하기 위한 채굴이나 제련과 관련된 산업체의 폐기물을 통해서나 (Fuyuta et al., 1978; Leyton & Layton, 1979), 또는, 중금속으로 오염된 식수나 음식을 통해서 (Chung et al., 1993), 혹은 어류나 육식류에 포함된 중금속류들을 먹이연쇄에 의하여 섭취할 경우 등 다양한 방법으로 인체에 노출되어지고 있다 (Kasuya, 1975; Gale, 1979). 이들은 체외로의 배설되는 반감기가 길뿐만 아니라 분해속도도 느리기 때문에 인체에 노출된 경우 배설이 어렵기 때문에 만성중독증에 빠지기 쉽다 (Ganther, 1980; Peterson, 1981). 가장 두드러진 중금속중독 사건으로는 1950년대에 일본의 미나마타만의 수은중독으로 이는 유기수은이 어패류에 농축되고 이들을 주식으로 하는

사람들에 먹힘으로서 신경질환을 비롯한 인체의 여러 장기에 심각한 손상을 유발하였다 (Tokuomi et al., 1961; Tsubaki & Takahashi, 1986). 특히, 수은은 신경계에 손상을 줌으로서 우울증을 비롯한 건망증, 무기력증, 신경과민과 같은 신경독성과 같은 증상을 나타낸다고 알려져 있다 (Kim, 1971; Greener & Kochen, 1983). 수은중, 메틸수은과 같은 유기수은은 무기수은으로 분해하는 기간이 길뿐 아니라 독성효과도 무기수은보다 훨씬 강하기 때문에 인체에 폭로될 경우 이의 중독으로 인한 심각한 후유증을 물론 각종 병변을 유발하는 병인으로 작용함으로써 이들의 취급은 매우 주의를 요한다 (Watanabe et al., 1982). 무엇보다도 유기수은은 태반을 쉽게 통과할 수 있어 태아에 각종 기형을 유발하는 기형유발인자 (teratogen)로서 잘 알려져 있다 (Fuyuta et al., 1978; Gale, 1979). 이렇듯 독성이 강한 수은은 수은전극제조는 물론 온도계나 수은 등, 도료 및 안료 등 다양한 산업공정의 원료로 사용되고 있어 인간의 생활과는 떼어놓을 수 없는 밀접한 관련을 맺고 있다 (Olson & Massaro, 1977). 최근에 메틸수은과 같은 유기수은이 이의 붕괴시 활성산소를 발생한다는 것이 보고된 바 있다 (Ganther, 1980; Michikawa et al., 1994). 즉, 수은의 독성효과의 하나가 산소유리기를 발생시켜 이로 하여금 세포의 산화적 손상을 유발한다는 것이다 (Ganther, 1980). 활성산소는 hydroxy radical을 비롯하여 superoxide나 hydrogen peroxide와 같은 산소유리기를 생성하여 이들이 세포내 핵산물질의 합성저해나 단백질합성의 저해 또는 항산화계의

\* 논문 접수: 2006년 11월 15일

수정재접수: 2006년 12월 14일

<sup>†</sup> 교신저자: 손병관, (우) 435-040 경기도 군포시 산본동 1142, 원광대학교 의과대학 산본병원

Tel: 031-390-2202, e-mail: sbk1026@hanmail.net

손상 등을 유발시킴으로서 결국 세포의 손상 내지는 세포 고사 (apoptosis)와 같은 퇴행성 변화를 유도한다는 것이다 (Saunders et al., 1987; Rosen et al., 1993). 특히, 활성산소는 세포막에 작용하여 세포막의 지질성분을 과산화시킴으로서 막의 손상은 물론이고 막내의 세포소기관이나 효소계와 같은 세포구성체 손상을 유발하게 된다는 것이다 (Pellegrini-Giampietro et al., 1990). 더욱이 활성산소는 세포막에 위치하고 있는 각종 수용체와도 반응을 하여 세포의 항상성을 깨뜨리며 이로 인해 세포는 퇴행성 변화를 맞이하게 된다 (Hayase et al., 1989). 최근 치매를 비롯한 고혈압, 당뇨와 같은 만성난치성 질환의 병인으로 활성산소가 깊이 관련되어 있다는 보고가 되어지고 있다 (Rosen et al., 1993). 따라서 이들의 치료적 접근방법의 하나로 활성산소를 제거할 수 있는 산소제거제나 또는 항산화효소 등과 같은 물질을 투여하여 병변을 치료하려는 시도가 활발히 진행되고 있다 (Saunders et al., 1987). 이러한 일례의 하나로 항산화제의 하나인 superoxide dismutase (SOD)를 직접 제조하여 이를 환자로 하여금 복용케 함으로서 병변을 치료하려는 시도도 이루어지고 있다 (Hayase et al., 1989). Allopurinol은 항산화제계인 일종으로 xanthine oxidase (XO)의 저해제로 널리 알려져 있으며, 특히, allopurinol은 요산생합성에 있어 처음의 대사과정을 억제시키는 물질로도 알려져 있다 (Elion et al., 1996). 그러나 allopurinol의 항산화기능에 대해서는 많이 알려져 있지 않다. 근래에 각종 세포를 시험관내에서 배양할 수 있는 세포 배양기술이 널리 보급되면서 신경세포를 비롯한 피부세포, 멜라닌세포 등과 같은 다양한 세포배양이 가능하게 되었다 (Borenfreund & Puerner, 1984). 더욱이 이들 배양세포들은 세포주기가 짧아 단시간 내에 실험적인 결과를 얻을 수 있어 배양세포를 재료로한 다양한 독성실험이 많이 행하여지고 있는 실정이다 (Mosmann, 1983). 본 연구는 수은의 신경독성에 대한 기전을 규명하기 위하여 C<sub>6</sub> glioma 세포를 일정시간 동안 배양한 후 메틸수은의 독성효과를 colorimetric assay에 의하여 정량적으로 분석 조사하였으며 동시에 이에 대한 allopurinol의 영향을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 약제 제조

본 실험에 사용한 Methylmercuric chloride (MMC, Sigma Co.)는 각각 1 mM, 10 mM, 100 mM, 1 M의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 다음 실험 당일 최종 농도로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

### 2. 세포배양

배양중 신경세포의 분리는 효소해리술에 의하여 행하였다. C<sub>6</sub> glioma 세포는 혈구계산기를 이용하여 배양액에  $1 \times 10^5$  cells/well의 밀도로 96-multiwell에 넣어 분주하였다. 분주가 완료된 세포는 CO<sub>2</sub> 배양기에서 5일 동안 배양한 후 실험에 사용하였으며, MMC가 포함되지 않은 배양액을 대조군으로 하여 실험군과 비교 조사하였다.

### 3. 메틸수은 (MMC)의 처리

MMC가 배양 C<sub>6</sub> glioma 세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 25  $\mu$ M에서 55  $\mu$ M 까지의 농도로 MMC가 각각 포함된 배양액에서 C<sub>6</sub> glioma 세포를 48시간 동안 배양한 후 이의 독성효과를 조사하였다.

### 4. Allopurinol의 처리

배양이 완료된 세포에 allopurinol이 20~40  $\mu$ M로 포함된 배양액에서 2시간 동안 전처리한 다음 25  $\mu$ M MMC가 포함된 배양액에서 48시간 동안 처리한 후 이의 영향을 XTT assay에 의하여 대조군과 비교 조사하였다.

### 5. XTT 정량

PBS (phosphate buffered saline)에 녹인 1 mg laminin의 저장액을 냉장고에 보관한 후 실험 당일 필요한 양을 희석한 다음 24 well plate에 200  $\mu$ l씩 분주하여 하루밤 동안 건조시켰다. 건조 완료 후 PBS로 3회 세척한 다음 3% BSA (Bovine serum albumin, Sigma Co.)를 각 well당 200  $\mu$ l씩 첨가하여 잘 진탕한 후 다시 이를 PBS로 두 세 번 세척하였다. 배양된 C<sub>6</sub> glioma 세포를  $5 \times 10^6$  cells/ml 밀도로 배양용기에 넣고 24시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 MMC를 각각의 농도를 처리하여 48시간 동안 배양한 다음 PBS로 3회 세척하였다. 세척 완료 후 XTT와 혼합 후 각 배양용기에 200  $\mu$ l씩을 주입하여 4시간 동안 배양한 다음 450 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

### 6. 통계처리

대조군과 실험군의 차이에 대한 통계적 유의성은 Student's t-test로 비교하였다. 통계적 유의수준은 P값이 0.05 미만인 경우로 하였다.

## 결 과

### 1. MMC의 세포생존을 정량

#### 1) 농도별 세포생존율

C<sub>6</sub> glioma 세포에 MMC가 25~55  $\mu$ M의 농도로 각각 포함

**Table 1.** The cell viability of methylmercuric chloride (MMC) on C<sub>6</sub> glioma cells in concentration by XTT assay

Concentration of MMC (μM)	Group	
	Mean ± SD	(% of control)
Control	7.19±0.47	100
25	3.58±0.26	49.8*
35	3.35±0.31	49.4*
55	3.49±0.43	48.5*

C<sub>6</sub> glioma cells were incubated with or without 25~55 μM MMC for 48 hours. The value represent the mean ± SD for triplicate experiments. \*P<0.05 (Student's t-test)

**Table 2.** The cell viability of methylmercuric chloride (MMC) on C<sub>6</sub> glioma cells in incubation time by XTT assay

Incubation time of MMC (hour)	Group	
	Mean ± SD	(% of control)
Control	10.41±0.92	100
24	5.48±0.36	52.6*
48	5.14±0.47	49.4*
72	4.68±0.28	45.0*

C<sub>6</sub> glioma cells were incubated with or without 25 μM MMC for 24~72 hours. The value represent the mean ± SD for triplicate experiments. \*P<0.05 (Student's t-test)

된 배양액에서 48시간 동안 배양한 후 MMC의 독성효과를 XTT 분석법에 의하여 조사하였다. 결과 25 μM MMC의 처리에서는 세포의 생존율이 대조군인 100% (7.19±0.47) 비하여 49.8% (3.58±0.26)로 나타났으며 35 μM의 처리에서는 49.4% (3.35±0.31)로 나타났다. 또한 55 μM MMC의 처리에서는 세포의 생존율이 48.5% (3.49±0.43)로 나타났다. 25 μM에서 55 μM 농도의 처리에서는 대조군에 비하여 모두 유의하게 감소한 것으로 나타났다 (P<0.05) (Table 1).

## 2) 시간별 세포생존율

MMC가 25 μM의 농도로 포함된 배양액에서 C<sub>6</sub> glioma 세포를 24~72시간 동안 배양한 후 MMC의 독성효과를 XTT 분석법에 의하여 조사하였다. 그 결과 24시간 동안 MMC가 포함된 배양액에서 처리한 결과 세포생존율이 대조군인 100% (10.41±0.92)에 비하여 52.6% (5.48±0.36)로 나타났으며 48시간의 처리에서는 49.4% (5.14±0.47)로 나타났다. 또한 72시간 동안의 MMC의 처리에서는 세포생존율이 45.0% (4.68±0.28)로 나타나 24~72시간 동안 처리에서 모두 대조군에 비하여 유의한 세포생존율의 감소를 나타냈다 (P<0.05). 또한, 48시간 MMC의 처리에서 XTT<sub>50</sub> 값을 나타냈다 (Table 2).

## 2. MMC의 독성에 대한 allopurinol의 효과

C<sub>6</sub> glioma 세포에 allopurinol이 20~40 μM의 각각의 농도

**Table 3.** The cell viability of allopurinol on methylmercuric chloride (MMC) on C<sub>6</sub> glioma cells in concentration by XTT assay

Concentration of allopurinol (μM)	Group	
	Mean ± SD	(% of control)
Control	9.49±0.87	100
25 μM Hg	4.33±0.35	45.6
20	5.07±0.53	53.4
40	7.35±0.69	77.4*

C<sub>6</sub> glioma cells were preincubated with or without 20~40 μM allopurinol for 2 hours. The value represent the mean ± SD for triplicate experiments. \*P<0.05 (Student's t-test)

로 포함된 배양액에서 2시간 동안 전처리한 후 다시, MMC가 25 μM의 농도로 포함된 배양액에서 48시간 동안 배양한 후 allopurinol이 MMC의 독성효과에 미치는 영향을 XTT 분석법에 의하여 조사하였다. 결과 25 μM MMC만의 처리에서는 세포생존율이 대조군인 100% (9.46±0.87) 비하여 45.6% (4.33±0.35)로 나타났으며 20 μM의 allopurinol 처리에서는 세포생존율이 53.4% (5.07±0.53)로 나타났다. 또한 40 μM allopurinol의 처리에서는 세포생존율이 77.4% (7.35±0.69)로 나타나 이는 25 μM MMC만을 처리한 실험군에 비하여 세포생존율이 유의하게 증가한 것으로 나타났다 (P<0.05) (Table 3).

## 고 찰

수은은 다른 중금속류와는 달리 상온에서 은백색의 액체 상태로 존재하기 때문에 피부의 접촉이나 구강을 통하여 인체에 노출되기 쉽다 (Clarkson et al., 1981). 특히, 수은의 아말감을 가공하는 공정이나 온도계를 생산하는 공정에서는 수은이 증발하여 흡을 형성함으로써 호흡기를 통하여 폐에 노출되고 이것이 다시 혈류를 타고 인체내에 축적됨으로서 수은중독이 야기되며 이로 인해 인체내 각종 장기에 대해 질환을 유발하게 된다 (Tsubak & Takahashi, 1986). 특히, 수은의 입자가 폐에 노출된 경우 거의 80%는 폐포에서 빠르게 흡수되기 때문에 그만큼 수은중독에 이완될 확률은 매우 높다 (Kasuya, 1975). 지금까지 밝혀진 수은에 의한 표적장기로는 신독성 (neprotoxicity)과 신경독성 (neurotoxicity)으로 신장과 뇌가 주요목표가 된다 (Michikawa et al., 1994). 신장조직에서 수은은 신장의 집합관 (collecting tube)에 가장 많이 침착이 되며 뇌의 경우 주로 중추신경계를 침범하여 특히, 뇌피질을 구성하고 있는 뇌신경세포를 손상시킴으로서 정신적 기능손상은 물론 얼굴과 팔등에 진전 (tremor)과 같은 운동적인 손상도 일으킨다고 한다 (Kim, 1971; Chen et al., 1979). 수은은 주로 대변과 소변으로 배설되며 그 밖에 땀이나 타액, 피부로도 소량이 배설되어 진다 (Ganther, 1980). 그

렇지만 한번에 배설되는 양이 매우 적고 유기수은이 무기수은으로 분해되는 기간이 매우 길기 때문에 체외로의 배설은 오랜 기간을 요하게 된다 (Peterson et al., 1981). 본 연구는 수은의 신경독성이 활성산소의 산화적 손상과 밀접한 관련이 있다는 것에 연관하여 먼저 수은의 독성이 신경교세포에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위하여 C<sub>6</sub> glioma 세포를 메틸수은 (MMC)이 25  $\mu$ M에서 55  $\mu$ M의 농도로 각각 포함된 배양액에서 48시간 동안 배양한 후 MMC가 세포생존율에 미치는 영향을 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 C<sub>6</sub> glioma 세포는 MMC를 처리한 농도와 시간에 비례하여 세포생존율이 대조군에 비하여 모두 유의하게 감소한 것으로 나타났다 ( $P < 0.05$ ). 이러한 본 실험의 결과는 MMC가 배양 신경세포에 대하여 독성효과를 가지고 있다는 것을 제시하고 있다. Borenfreund와 Puerner (1984)는 세포독성판정기준에서 MTT<sub>50</sub>이나 XTT<sub>50</sub>과 같은 중간독성값 (midcytotoxicity value, MCV)이 100  $\mu$ M 이하이면 고독성 (high-toxicity)으로 판정하였으며, 100~1,000  $\mu$ M이면 중간독성 (mid-toxic), 1,000~2,000  $\mu$ M이면 저독성 (low-toxicity), 2,000  $\mu$ M 이상이면 무독성 (non-toxicity)으로 판정하였다. 따라서 본 연구에서는 Borenfreund와 Puerner (1984)에 의하면 MMC는 배양 C<sub>6</sub> glioma 세포에 대하여 고독성인 것으로 나타났다. 이러한 독성효과는 본 실험에서 신경세포에 대하여 세포생존율의 감소를 나타냈다. 이러한 세포생존율의 감소는 MMC가 세포내의 핵산물질의 합성저해를 비롯하여 세포의 단백질합성계에 영향을 주었을 가능성도 있겠지만 (Clarkson et al., 1981), 그 보다는 XTT assay가 사람체의 효소활성과 관련이 깊은 것을 감안할 때 아마도 MMC가 세포내의 효소활성을 저해함으로써 세포생존율을 감소시켰을 가능성이 클 것으로 생각된다 (Watanabe et al., 1982). 한편, MMC의 독성이 활성산소와 관련이 있는가를 알아보기 위하여 활성산소제거제의 하나인 allopurinol을 여러 농도로 배양액에 첨가한 후 C<sub>6</sub> glioma 세포에 MMC를 48시간 처리하기 전에 2시간 동안 전처리한 후 이의 영향을 세포생존율에 의하여 조사하였다. 그 결과 25  $\mu$ M의 MMC만을 처리하였을 경우 세포생존율이 대조군인 100%에 비하여 45.6%로 유의하게 감소한 것으로 나타났다 ( $P < 0.05$ ). 이에 비하여 allopurinol이 20~40  $\mu$ M의 농도로 포함된 배양액에서 2시간 동안 전처리한 경우 세포의 생존율은 50~80%로 나타났다. 특히, 40  $\mu$ M의 allopurinol의 처리에 있어서, MMC만의 처리에서 세포생존율이 45.6%로 나타난 것에 비하여 77.4%로 매우 유의하게 나타났다 ( $P < 0.05$ ). 이러한 현상은 allopurinol이 MMC의 독성을 방어하는데 효과가 있다는 것을 말해주고 있으며 동시에 MMC의 독성이 활성산소와 밀접한 관련이 있음을 제시하고 있다 (Elion et al., 1996). 즉, allopurinol은 MMC에 의하여 형성된 활성산소를 제거해 줌으로써 활성산소의 산화적 손상으로 부터 세포를

방어하였을 것으로 생각된다. 그러나 MMC의 독성에 대한 자세한 기전규명을 위해서는 MMC의 독성이 활성산소에 의하여 유발되는 세포내 칼슘유입을 비롯하여 흥분성아미노산의 분비, 지질과산화반응의 연쇄반응 및 세포내 protein kinase C와 같은 이차신호전달체계와 같은 측면에서 더욱 많은 분석이 필요할 것으로 생각한다.

#### 감사의 글

이 논문은 2005년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.

#### REFERENCES

- Bianchi V, Toso RD, Debetto P, Levis AG, Luciani S, Majone F, Tamino G. Mechanism of chromium toxicity in mammalian cell cultures. *Toxicology* 1980. 5: 219-224.
- Borenfreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J Tiss Cult Meth.* 1984. 9: 7-9.
- Chen WJ, Body RL, Motilet NK. Some effects of continuous low dose congenital exposure to methylmercury on organ in the rat fetus. *Teratology* 1979. 20: 31-36.
- Chung YT, Park ST, Choi MK, Kim JJ, Woo WH, Han DS, Choi BK, So JT. A study on the cytotoxicity of cadmium in vitro. *Korea J Toxicol.* 1993. 9: 45-60.
- Clarkson TW, Magos L, Cox C. Tests of efficacy of antidotes for removal of methylmercury in human poisoning during the Iraq outbreak. *J Pharmacol Exp Ther.* 1981. 218: 74-83.
- Elion GB, Kovensky A, Hitchings GH, Metz E, Rundles RW. Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase. *Biochem Pharmacol.* 1996. 15: 863-880.
- Fuyuta M, Fujimoto T, Hirata S. Embriotoxicity effects of methylmercuric chloride administered to mice and rats during organogenesis. *Teratology* 1978. 18: 353-366.
- Gale TF. Embryonic effects of chromium trioxide in hamster. *Environ Res.* 1978. 16: 101-106.
- Ganther HE. Interaction of vitamin E and selenium with mercury and silver. *Ann NY Acad Sci.* 1980. 355: 212-225.
- Greener Y, Kochen JA. Methylmercuric toxicity in the chick embryo. *Teratology* 1983. 28: 23-28.
- Hayase F, Hirashima S, Okamoto G, Kato H. Scavenger of active oxygens by melanoidin. *Agric Biol Chem.* 1989. 53: 3383-3389.
- Kasuya M. The effect of vitamin E on the toxicity of alkylmercurials on nervous tissue in culture. *Toxicol Appl Phar-*

- macol. 1975. 32: 374-354.
- Kim SU. Neurotoxic effects of alkyl mercury compounds on myelinating cultures of mouse cerebellum. *Exp Neurol*. 1971. 32: 273-246.
- Leyton WM Jr, Layton MW. Cadmium induced limb defects in mice: Strain associated differences in sensitivity. *Teratology* 1979. 19: 229-237.
- Michikawa M, Lim KT, McLarnon JG, Kim SU. Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res*. 1994. 37: 62-70.
- Momann T. Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth*. 1983. 65: 55-63.
- Olsen FC, Massaro EJ. Effects of methylmercury on murine fetal amino acid uptake, protein synthesis and plate closure. *Teratology* 1977. 16: 187-194.
- Park ST, Lim KT, Chung YT, Kim SU. Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. *Neurotoxicol*. 1996. 17: 37-46.
- Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Morroni F. Excitatory amino acid and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci*. 1990. 10: 1035-1041.
- Peterson A, Lewne M, Walum E. Acute toxicity of organic solvents, heavy metals, and DDT tested in cultures of mouse neuroblastoma cells. *Toxicol Lett*. 1981. 9: 101-108.
- Rosen D, Siddique T, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O Regan J, Deng H, Rahmani Z, Krrizus A, et al. Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993. 362: 59-62.
- Saunders RD, Dugan LL, Demediuk P, Means ED, Harrocks LA, Anderson DK. Effects of methyl prednisolone and the combination of alpha-tocopherol and selenium on arachidonic acid metabolism and lipid peroxidation in traumatized spinal cord tissue. *J Neurochem*. 1987. 49: 24-31.
- Tokuomi H, Okajima T, Kanao J, Tsunda M, Ichijasu Y, Misumi H, Shimomura K, Takaba M. Minamata disease. *World Neurology* 1961. 2: 5361-5450.
- Tsubaki T, Takahashi. Recent advances in Minamata disease studies. Kodansha Tokyo. 1986. pp1-146.
- Watanabe T, Shimada T, Endo A. Effect of mercury compounds on ovulation and meiotic and mitotic chromosomes in female golden hamsters. *Teratology* 1982. 25: 381-384.