

Quinone계 화합물의 발암성 조기검색법에 관한 연구

조대현 · 홍진태 · 박정식 · 홍연탁 · 진 강 · 정명희* · 이병무**

국립보건안전연구원
*서울대학교 의과대학
**성균관대학교 약학대학

A SHORT TERM SCREENING METHOD FOR CARCINOGENIC QUINONE COMPOUNDS

Dae-Hyun Cho, Jin-Tae Hong, Jeong-Sik Park, Youn-Tack Hong,
Kang Chin, Myung-Hee Jung* and Byung-Mu Lee**

National Institute of Safety Research, Seoul 112-020, Korea

*College of Medicine, Seoul National University, Seoul, 110-460, Korea

**College of Pharmacy, Sung Kyun Kawn University, Suwon, 440-300, Korea

(Received October 17, 1992)

(Accepted December 1, 1992)

ABSTRACT: To investigate a short term screening method for carcinogenic quinone compounds, 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), an oxidative DNA damage, was determined in the kidney and liver DNA isolated from Sprague-Dawley rats after i.p. injection of 7 mg/kg adriamycin (AM), 7 mg/kg tetrahydropyranladriamycin (THP), and 10 mg/kg daunomycin (DM) by HPLC-electrochemical detector system. 8-OHdG was also determined from rat hepatocytes and calf thymus DNA exposed to AM, DM and THP. When rats were treated with DM and THP, 8-OHdG was significantly increased in the kidney compared to control group, and remained at high level (7.9~9.0, 8-OHdG/dG $\times 10^4$) at the end of experiments (48 hr after treatment). 8-OHdG level in cultured hepatocyte exposed to AM, DM and THP was 1.5~2 fold higher than control at all time points. (1,2,3,4 hr after treatment). From calf thymus DNA exposed to AM, DM and THP, 8-OHdG was 2.5 fold higher than of control. These results suggest that quantitation of 8-OHdG may provide a useful marker for identifying target organ in oxidative chemical carcinogenesis and for short term screening of free radical generating carcinogens.

Key Words: 8-Hydroxydeoxyguanosine, Oxidative DNA damage, Quinone chemicals, Carcinogen, Free radical, Adriamycin.

서 론

의약품, 농약, 식품첨가물, 공업제품, 환경오염물질, 방사선, 자외선 등 많은 발암가능물질에 대한 조기 발암 검색법은 암을 예방하는 궁극적인 차원과 각종화학물의 안전성 스크리닝을 위해서 끊임없이 개발 연구되고 있다. 화학물질의 발암성 여부를 평가하기 위하여 실험동물을 이용한 장기간의 생체시험(*in vivo*)이 미국 FDA, 일본후생성, 유럽 EEC, OECD 등에서 기초로한 방법에 의해 행해지고 있다. 그러나, 이 시험법들은 동물과 인력, 경비 및 시간이 많이 소요되는 등의 단점이 있어 동물개체수를 최소화하고 보다 많은 정보를 단기간 내에 얻을 수 있는 수단으로서 *in vivo* 동물시험의 대체시험 방법의 개발이 절실히 요구되어 왔다.

발암물질은 화학구조적인 특성을 고려하여 polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), alkylating agents, heterocyclic amine, quinoline, chlorinated hydrocarbon, 그리고 quinone계 등 여러 화합물로 나눌 수 있다. 이 중 Adriamycin 같은 물질은 quinone계 화합물로 그 발암기전이 일반적인 발암물질과는 달리 free radical을 형성시켜 DNA에 손상을 가져다 준다. 최근 free radical에 관한 연구가 암 뿐만아니라, 노화 및 기타 장기독성 등 여러 각도에서 이루어지고 있으나 어느 정도 발암에 기여하며 어떠한 작용 기전으로 암을 일으키는 지는 폭넓은 연구가 요구되는 실정이다. Quinone계 화합물은 DNA에 산화적 손상을 일으킬 가능성이 있어 DNA의 oxidative damage 형태인 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)을 지표로하여 이들 화합물들에 의한 8-OHdG의 생성정도를 검색하고, *in vitro* 시험을 통한 실험의 단순화를 도모하기 위하여 hepatocyte 및 enzyme fraction을 이용, Adriamycin (Schwartz, 1975), Daunomycin (Sternberg, Philips *et al.*, 1972) 및 Tetrahydropyranyl adriamycin (THP) (Tone, Kurebe *et al.*, 1987)에 의한 8-OHdG의 생성여부를 검색하여 *in vitro* 시험방법의 가능성 및 *in vivo* 시험을 동시에 실시하여 비교하고 quinone 계 화합물의 조기발암성 또는 단기시험법의 가능성을 추고하고자 본 시험을 실시하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 체중 180~220 g의 SPF(specific pathogen free) Sprague-Dawley계 웅성 rat를 1주간 예비 순화시킨 후 건강한 동물을 실험에 사용하였다. Polycarbonate cage에 3마리씩 수용하고 고형사료 (실험동물용, 신촌사료) 및 수도물을 자유롭게 섭취토록 하였다. 동물사육 조건은 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 5\%$, 환기횟수 15/hr, 명암교대 12시간 (조명 7:00~19:00)으로 하였다.

약물처리 및 DNA 분리

1) *In vivo* 시험

Adriamycin hydrochloride (Sigma, U.S.A.), Daunomycin hydrochloride (Sigma, U.S.A.), 및 Tetrahydropyranyl adriamycin (三樂, Japan)을 각각 7 mg/kg, 10 mg/kg 및 7 mg/kg씩 saline에 녹여 복강투여 하였고, 대조군은 saline만을 약물처리군과 동일하게 2.5 ml/kg씩 복강투여 하였다. 대조군과 약물처리군 모두 군단 5마리로 하였다.

Adriamycin, Daunomycin, Tetrahydropyranyl adriamycin 및 saline 투여 후 각각 24, 30, 36, 48 시간 후 부검하여 liver와 kidney를 분리한 후 liquid nitrogen으로 급속동결한 후 deep freezer에서 보관하였다. 간 및 신장으로부터의 DNA추출은 Marmur's method을 변형하여 실시하였다(Marmur, 1961). 동결한 조직을 digestion buffer (proteinase K 포함)에서 homogenize한 후 50°C 에서 15시간 shaking하며 incubation하였다. 이 homogenate에 phenol-chloro-

form-isoamylalcohol (25 : 24 : 1) 혼합액을 동량넣고 진탕한 후 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하였고, 그 상등액에 1/2 용량의 7.5 M sodium acetate와 2배 용량의 100% ethanol을 넣어 백색의 침전인 핵산물질을 얻었다. 이를 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 버리고 남은 백색 침전물을 1 ml의 TE buffer 용액에 녹이고, ribonuclease를 처리하여 RNA를 제거한 후 다시 phenol-chloroform- isoamylalcohol로 extraction한 후 ethanol precipitation하고, 다시 TE buffer에 녹여 이 중 100 μ l를 취하여 nuclease P1 및 alkaline phosphatase로 DNA를 절단한 후 HPLC-ECD system에 의한 8-OHdG의 분석시료로 사용하였다.

2) *In vitro* 시험

(1) Hepatocyte의 분리 및 배양

Hepatocyte의 분리는 Dickens와 Peterson의 two step perfusion법을 이용하였다. Rat를 urethane (1 g/kg, i.p.)으로 마취하였으며 복부의 털은 제모하여 7.5% iodine tincture로 처리한 후 모든 실험은 aseptic technique으로 수행하였다. 복부의 중앙선을 따라 검상연골까지 복개하고 양측을 잘라 간문맥을 노출시켜서 18 gauge catheter로 cannulation하고 15~20 ml/min의 유속으로 *in situ* perfusion을 시작하였다. 이때 환류액과 혈액이 간으로부터 유출되게 하기 위하여 하대정맥을 잘라준다. 약 100 ml의 perfusion buffer (Calcium, Magnesium free HBSS buffer)를 간을 통해 perfusion하고 흉강(thoracic cavity)을 열고 상대정맥을 16 gauge catheter로 cannulation하고 하대정맥을 묶어주어 환류 완충액이 간을 통과하여 다시 flask로 되돌아 오도록 순환하였다. 이 조작은 37°C 를 유지하고 95% O₂/CO₂를 계속 주입하였다. Perfusion buffer의 재순환을 마친 후 perfusion buffer에 0.05~0.06% 농도의 0.45 μ m membrane filter로 여과한 collagenase를 perfusion buffer가 든 bottle에 첨가하고 15~20분간 perfusion하여 liver의 결합 조직인 collagen을 제거하였다. Collagenase처리가 끝난 후, 간을 collagenase가 포함되지 않은 perfusion buffer (60 ml)가 든 beaker로 옮긴 후 멸균된 가위로 capsule을 파괴하고 간을 가법계 흔들어 주어 hepatocytes를 유리시켰다. Cell suspension은 250 μ m nylon mesh로 여과한 후 여액을 멸균된 50 ml 원심분리 tube로 옮기고 500 g에서 4분간 원심분리하여 hepatocyte를 침전시켰다. 이 침전물을 perfusion buffer로 두번 세척하고 마지막 침전은 culture medium에 resuspension하였다. 끝으로 cell suspension의 viability는 suspension 100 μ l와 0.4% (W/V) trypan Blue (in 0.9% NaCl) 900 μ l의 mixture을 5분간 방치한 후 hemocytometer로 옮긴 후 산 세포와 죽은 세포를 결정하였다.

(2) 배양조건 및 DNA 분리

Cell suspension을 culture medium (Waymouth's MB medium)으로 1.0×10^6 cell/ml가 되게 희석하여 60×15 mm plastic petri dishes에 3 ml씩 cell suspension을 분주하였다. 각 dish들은 collagen으로 미리 coating하여 사용하였다. Hepatocytes를 collagen-precoated culture dish에 inoculation한 후 37°C, 5% CO₂/95% O₂ air incubator에서 배양하였다. Medium은 처음 plating 4시간 후 change하였으며, 각 약물은 2시간 후 처리하고 1, 2, 3 및 4시간 후에 각각 DNA를 분리하기 위해 digestion하였다. Digestion 이후의 방법은 *in vivo*와 동일하게 수행되었다.

(3) Enzyme fraction 분리 및 약물처리

Rat를 경추탈구한 후 복부의 중앙선을 따라 검상연골까지 복개하고 양측을 잘라 간문맥을 노출시켜서 18 gauge catheter로 cannulation하고 15~20 ml/min의 유속으로 saline을 perfusion하며, 하대정맥을 잘라주어 혈액을 제거시킨 후 간을 적출하였다. 간조직 1 g당 3 ml의 0.25 M sucrose를 넣고 4°C 에서 homogenize시킨 다음 9000×g에서 20분간 원심분리하고 그 supernatant를 취해 enzyme fraction으로 하였다. Enzyme fraction 200 μ l를 위해 Calf thymus DNA 100 μ l (0.4 mg/ml)와 TE buffer 190 μ l를 가한 후 각 약물을 10 μ l를 넣어 약물 농도 20 μ M이 되게한 후 37°C shaking water bath에서 incubation하였다. 2시간 후 proteinase K 10 μ l를 넣어 50°C 에서 3시간 incubation한 후 DNA 분리를 위한 phenol-chloroform extraction을 행하였으며,

이후 조작은 *in vivo* 실험 과정과 동일하게 시행하였다.

HPLC-ECD system에 의한 8-OHdG 분석

투여된 약물에 의해 산화적으로 손상된 DNA 형태인 8-OHdG을 검색하기 위하여 HPLC-ECD system (LKB, Sweden)을 사용하였다. Electrochemical detector와 UV detector를 동시 연결하여 사용하였으며, column은 ODS-120T (LKB) 4.6×250 mm column을 사용하였다. Mobile phase는 0.012 M citric acid, 0.025 M sodium acetate, 30 mM sodium hydroxide, 10 mM acetic acid를 포함하는 15% methanol로 pH를 5.1로 맞추어 degassing하여 사용하였으며, flow rate는 0.3 ml/min으로 하였다. UV detector는 254 nm에서 흡광도를 측정하였으며, ECD detector의 oxidation potential volt는 0.45 V로 하여 사용하였다. DNA의 8-OHdG의 정량은 standard를 사용하여 검량선을 작성한 후 그 양에 따라 dG 중의 8-OHdG의 양을 계산하였다.

결 과

Adriamycin (7 mg/kg), Daunomycin (10 mg/kg), 및 Tetrahydropyranyl adriamycin (7 mg/kg)를 Sprague-Dawley rats에 복강투여한 후 신장 및 간장에서 DNA를 추출하여 oxidative DNA adduct의 하나인 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)를 HPLC-ECD system으로 분석하여 *in vivo*에서 이들 약물에 의한 8-OHdG의 생성 정도를 측정하였다. Adriamycin (7 mg/kg)을 투여한 group에서의 8-OHdG 생성율은 kidney에서 최고 10⁴dG base중 12.8 adduct가 생성되었으며, 투여 30시간에서 가장 많이 생성된 후 서서히 감소하는 경향을 나타내었고, liver에서는 대조군과의 차이가 없었다. 또한 kidney에서 liver에서보다 8~10배의 높은 생성율을 나타내었다(Table 1, 2). Daunomycin (10 mg/kg)에 의한 8-OHdG 생성율은 liver 및 kidney 모두에서 유의성있게 증가되었으며 이후 감소하는 경향을 나타내었다. Kidney에서의 생성율이 liver에서 보다 분석시간대별로 3배 정도 높았다.

한편, Tetrahydropyranyl adriamycin (7 mg/kg)에 의한 생성율은 liver에서 30시간 이후에 유의성 있는 생성율 증가를 나타내었고, kidney에서는 대조군에 비해 2~3배 정도 높았다. 또한, liver에서의 8-OHdG의 생성율이 kidney보다 3~4배 가량 더 많이 생성되었다(Table 1, 2).

In vitro 실험방법에 의한 8-OHdG 생성율을 검토하기 위하여 *in vivo*에서 실시한 약물에 대하여 hepatocyte culture 방법으로 liver에 대한 이들 약물의 DNA damage 정도를 분석한 결과 hepatocyte에 직접 이들 약물을 10 μM 농도로 노출시킨 후 8-OHdG의 생성을 약물처리 후 1, 2, 3, 4시간 후 분석한 결과, 대조군에 비하여 모든 투여군에서 2배 정도 많이 생성되었다. 이들 생성율은 시간이 경과함에 따라 감소하는 경향은 크지 않았다 (Table 3).

Table 1. Quantity of 8-OHdG in the liver DNA after i.p. administration of AM, DM and THP in rats.

Group	24	30	36	48(hr)
AM(7 mg/kg)	2.1±1.8	2.5±2.9	1.1±0.7	0.9±1.3
DM(10 mg/kg)	13.3±7.9**	9.8±6.7*	6.9±3.4**	7.0±4.9*
THP(7 mg/kg)	5.1±3.1	5.5±3.3**	6.2±2.6	8.9±6.4
Control(saline)	0.6±0.5	0.5±0.4	0.8±0.6	0.8±0.5

AM: adriamycin, DM: daunomycin, THP: tetrahydropyranyl adriamycin.

Significantly different from control group, the values are mean±S.D. from 5 animals (*: p<0.05, **: p<0.01).

Unit; (8-OHdG/dG)×10⁻⁴.

한편, enzyme fraction을 이용하여 이들 약물의 대사기전에 작용하는 enzyme system이 존재하는 가운데 calf thymus DNA에 이들 약물을 처치하고, 처치 후 2시간 후에 8-OHdG의 생성율을 검색한 결과 control에 비해 2배 가량의 유의한 차의 생성율을 나타내었다 (Table 4).

고 찰

산소 라디칼에 의하여 생체내 주요기능의 정보를 가진 DNA는 여러 형태의 damage를 받는다 (Werns and Lucchesi, 1990; Mario, 1989; Yoshimura *et al.*, 1991). 이 손상된 DNA는 노화, 암발생의 원인이 되고 있다. 활성 산소에 의한 DNA의 손상 형태 중 gnanosine기의 C-8 위치에 hydroxylation된 형태인 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)는 DNA adduct형의 한 가지로 transcription 과정에서 misreading을 인근 염기까지 일으켜 변이를 일으키는 것으로 알려져 있다(Kushino, 1987). 한편, anthracycline계의 anticancer agent로 이용되는 Adriamycin (AM)과 그 유도체 약물인 Daunomycin (DM) 및 Tetrahydropyranyl adriamycin (THP)들은 metabolic reduction으로 mutagenic active oxygen을 생성하는 것으로 알려져 있다(Goodman and Hochs-

Table 2. Quantity of 8-OHdG in the kidney DNA after i.p. administration of AM, DM and THP in rats.

Group	24	30	36	48(hr)
AM(7 mg/kg)	8.8±7.9*	12.8±9.9*	11.0±0.7	9.2±8.0**
DM(10 mg/kg)	11.7±4.1***	6.5±2.5	3.2±2.2*	2.2±1.1*
THP(7 mg/kg)	2.0±1.9	1.8±2.0	1.9±3.0	2.1±2.5
Control(saline)	0.6±0.5	0.6±0.5	0.8±0.7	0.7±0.6

AM: adriamycin, DM: daunomycin, THP: tetrahydropyranyl adriamycin.

Significantly different from control group, the values are mean±S.D. from 5 animals (*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.005).

Unit; (8-OHdG/dG)×10⁻⁴.

Table 3. Quantity of 8-OHdG in the hepatocyte DNA after in vitro treatment of AM, DM and THP.

Group	24	30	36	48(hr)
AM(10 μm)	10.0±4.4	9.6±7.2	8.8±1.6*	8.6±4.5
DM(10 μm)	8.4±4.7	8.3±2.3	8.3±3.8	7.9±3.4
THP(10 μm)	8.9±4.3	8.9±7.0	8.1±4.9	7.5±2.0
Control	6.0±3.5	5.8±3.2	4.7±2.3	4.6±3.3

AM: adriamycin, DM: daunomycin, THP: tetrahydropyranyl adriamycin.

Significantly different from control group, the values are mean±S.D. from 5 assays *: p<0.05.

Unit; (8-OHdG/dG)×10⁻⁴.

Table 4. Quantity of 8-OHdG in the thymus DNA after in vitro treatment of AM, DM and THP

Control	AM(20 μM)	DM(20 μM)	THP(20 μM)
1.2±0.86	3.2±1.1*	3.0±1.0*	3.1±1.1*

AM: adriamycin, DM: daunomycin, THP: tetrahydropyranyl adriamycin.

Significantly different from control group, the values are mean±S.D. from 5 assays *: p<0.05.

Unit; (8-OHdG/dG)×10⁻⁴.

tein, 1977). Quinone 유도체들인 이들 약물은 cytochrome P₄₅₀ reductase의 one-electron reduction에 의해 free radical 생성 중간체인 semiquinone이 되며, 이 중간체는 다시 redox-cycle를 거쳐 quinone으로 되돌아 오는 과정에서 reducing molecular oxygen인 superoxide radical anion (O₂^{-·})을 생성하며 O₂^{-·}는 다시 hydroxy free radical(OH·)를 생성한다(Hanta and Sato, 1975; Chesis *et al.*, 1984; Lin *et al.*, 1982).

본 시험결과 AM이 kidney에서 8-OHdG의 생성이 대조군에 비해 유의성있는 증가를 보였는데는 AM이 renal tumor를 생성한다는 Jang 등의 보고와 연관시켜 볼 때 8-OHdG의 생성과 tumor 생성과의 관계가 있음을 의미하고 있다. 또한 DM에 의한 kidney 및 liver에서 8-OHdG의 생성이 높게 나타났는데 Schwarz와 Sternberg 등은 DM 투여에 의한 실험동물에서의 tumor발생이 8-OHdG의 생성에 의해 이들 tumor의 생성 가능성을 제시해 주고 있다. THP투여에 의한 8-OHdG의 생성은 kidney에서 AM 같은 quinone계 약물에 비해 훨씬 적었는데, 이는 THP가 AM보다 훨씬 낮은 심근독성을 나타낸다는 보고(Unezawa, 1979; Tsuruo *et al.*, 1982; Sridhar *et al.*, 1987)와 THP가 AM보다 혈장에서 조직으로의 이행이 다르게 이루어진 결과 (Tsuruo *et al.*, 1979)라고 사료된다. 간세포를 이용한 *in vitro* 실험에서는 AM, DM 및 THP 투여군에서 8-OHdG 생성이 대조군보다 2~3배 증가하였다. 그러나, control group에서 생성율이 *in vivo* 보다 상당히 높아졌는데 그 이유에 대해서는 앞으로 연구가 더 필요하다고 사료되나 hepatocyte를 이용한 *in vitro* 실험에 의한 8-OHdG 생성정도의 규명에 대한 발암가능 물질의 검색방법도 충분히 가능성이 있다고 판단되어 더 많은 물질 등의 반응성 검색이 요구된다.

또한 표적장기의 배양방법으로 8-OHdG 생성여부의 판정에 의한 표적장기 및 발암성 검색의 model system 개발 가능성이 있음을 의미한다. Enzyme fraction을 이용한 검색방법은 quinone계 화합물들의 8-OHdG 생성기전이 one-electron reduction에 의해 생성된 free radical에 의한다면 이들 enzyme system이 존재하는 liver enzyme fraction만을 이용하여 발암성이 인정된 이들 quinone계 화합물에 의한 8-OHdG의 생성을 규명하여 단기 검색법을 간편화하고 그 가능성을 밝히고자 실시하였다. 그 결과 one-electron reduction에 관여하는 NADPH cytochrome P₄₅₀ reductase가 존재(Stidhar *et al.*, 1987)하고 respiratory chain의 주요 enzyme들이 존재하는 enzyme fraction에 의한 8-OHdG 생성은 약물노출 2시간대에 대조군에 비해 2배의 유의한 증가를 나타내었다.

이상에서 quinone계 화합물의 발암성 단기시험모델에 의한 본 시험조건에서의 결과를 요약하면 첫째, *in vivo* 시험에서 8-OHdG 생성은 신장에서 AM 및 DM 투여군이 대조군에 비해 유의성 있는 생성율의 증가를 나타내었고 간장에서는 DM과 THP 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다. 둘째, hepatocyte에 AM, DM 및 THP를 노출시킨 결과는 대조군에 비해 2~3배의 8-OHdG 생성을 증가를 나타내었고 시간의 경과에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 셋째, microsomal enzyme fraction에 AM, DM 및 THP를 노출시킨 결과는 대조군에 비해 약물처리군이 2배의 유의성 있는 증가를 나타내었고 노출 2시간 이후에 가장 많은 8-OHdG 생성을 나타내었다. 이상의 결과에서 8-OHdG의 생성의 동정은 발암과정의 규명 및 발암성 검색에 중요한 지표로 활용할 수 있으리라 사료되며 *in vitro* 시험방법에 의한 8-OHdG의 생성 검색은 표적장기의 추적과 발암과정의 규명에 이용될 수 있으리라 기대된다.

참 고 문 헌

- Chesis, P.C., Levin, D.E., Smith, M.T., Ernster, L. and Ames, B.N. (1984): Mutagenicity of quinones; pathways of metabolic activation and detoxification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 1696-1700.
- Dickins, M. and Peterson, R.E. (1980): Effects of a hormone supplemented medium

- on cytochrome P-450 content and monooxygenase activities of rat hepatocytes in primary culture. *Biochem. Pharmacol.* **29**, 1231-1238.
- Goodman, J. and Hochstein, P. (1977): Generation of free radicals and lipid peroxidation by redox cycling of adriamycin and daunomycin. *Biochem. Biophys. Research Comm.*, **77**, 797-803.
- Handa, K. and Sato, S. (1975): Generation of free radicals of quinone containing anticancer chemicals in NADPH-microsome system as evidenced by initiation of sulfite oxidation. *Gann*, **66**, 43-47.
- Jang, J.J., Takahashi, M., Hasegawa, R., Furukawa, F., Toyoda, K., Jato, H., Miyagawa, Y. and Hayashi, Y. (1987): Mammary and renal tumor induction by low doses of adriamycin in Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis*, **8**, 1149-1153.
- Kuchino, Y., Mori, F., Kasai, H., Inoue, H., Iwai, S., Miura, K., Ohtsuka, E. and Nishimura, S. (1987): DNA templates containing 8-hydroxy-deoxyguanine are misread both at the modified base and at adjacent residues. *Nature*, **327**, 77-79.
- Lind, C., Hochstein, P. and Ernster, L. (1982): DT-diaphorase as a quinone reductase: A cellular control device against semiquinone and superoxide radical formation. *Arch. Biochem. Biophys.* **216**, 178-185.
- Mario, Comport. (1989): Three Models of Free Radical-induced cell injury. *Chem. Biol. Interactions*, **72**, 1-58.
- Marmur, J. (1961): A procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from microorganism. *J. Mol. Biol.*, **3**, 208-218.
- Schwartz, H.S. (1976): Alkali-labile regions and strand breaks in DNA from cells treated with Daunomycin. *J. Med.* **7**, 33-46.
- Schwartz, H.S. (1975): DNA breaks in P-288 tumor mice after treatment with Daunomycin and Adriamycin. *Res. Commun. Chem. Path. Pharm.*, **10**, 51-64.
- Sridhar, K.S., Samy, T.S., Koch, G., Agarwal, P., Duncan, R.C., Ganz, W., Benedetto, P., Feun, L., Savaraj, N., Gross, J., Krishan, A. and Zubgrad, G. (1987): Phase I study of 4'-O-Tetrahydropyranyladriamycin. *Adv. Ext. Clin. Chemo.*, **22**, 121-26.
- Sternberg, S.S., Philips, F.S. and Cronin, A.P. (1972): Renal tumors and other lesions in rats following a single intravenous injection of Daunomycin. *Cancer Res.*, **32**, 1029-1036.
- Tone, H., Kurebe, M., Takeuchi, T. and Umezawa, H. (1987): Experimental studies on (2''R)-4'-O-Tetrahydropyranyladriamycin(THP). *Adv. Exp. Clin. Chemo.*, **22**, 1-9.
- Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y. (1982): 4'-O-Tetrahydro pyranyl-adriamycin as a potential new antitumor agent. *Cancer Res.* **42**, 1462-1467.
- Umezawa, H., Takahashi, Y., Kinoshita, M., Naganawa, H., Masuda, T., Tatsuta, K. and Takeuchi, T. (1979): Tetrahydropyranyl derivatives of daunomycin and adriamycin. *J. Antibiot.*, **32**, 1082-1084.
- Werns, S.W. and Lucchesi, B.R. (1990): Free radicals and ischemic tissue injury. *TIPS*, **11**, 161-166.
- Yoshimura, Y., Uchiyama, K., Ohsawa, K., Imaeda, K., Ohtani, Y. and Tamura, K. (1991): Oxygen dependence of lipid peroxidation in mice. *J. Toxicol. Sci.*, **16**, 1-9.