

흡입물질이 흰쥐 Lactate Dehydrogenase와 Cholinesterase 활성변화에 미치는 영향

윤수홍 · 박병운 · 하 현 · 박은주

대구효성카톨릭대학교 환경위생연구소

Effects of Volatile Substances on Rat Lactate Dehydrogenase and Cholinesterase

Soo-Hong Yoon, Byoung-Yoon Park, Hun Ha and Eun-Ju Park

*The Korean Institute of Environmental and Hygienic Science,
Taegu Hyosung Catholic University*

ABSTRACT

The effects of volatile substances inhalation on lactate dehydrogenase and cholinesterase in rats were investigated. Male Sprague-Dawley rats were exposed to marketed odorant, ethyl acetate and ethyl ether for 15 days. Enzyme activities were measured in serum and several tissues such as liver, lung, brain, heart, kidney and muscle to find differences of effects according to the organ.

Cholinesterase activity in serum and most of tissues revealed time-dependent decrease in the case of marketed odorant inhalation. Especially in heart and kidney significant decrease was observed. Ethyl acetate exposure to rats revealed also decrease in serum and all tissues by 40% to 60%. Ethyl ether inhalation showed significant decrease by 30% to 50%.

Lactate dehydrogenase activity was markedly increased in serum and similarly in heart, brain and kidney by exposure to marketed odorant. No changes were observed in liver. Ethyl acetate exposure to rats revealed increase in serum by about 200%, compared to normal group and in other tissues by 40% to 70% except in liver and muscle. Ethyl ether inhalation showed significant increase in serum by about 100%. There was no change in liver and slight increase in muscle.

서 론

청소년들 사이에 본드 등의 접착제류나 유기용제 등의 휘발성 물질을 상습적으로 흡입하는 사례들이 날로 증가하고 있으며¹⁾, 또한 값이 저렴하고 구입이 용이하기 때문에 오용, 남용이 심각한 실정이다.

일반적으로는 환경 유해 물질의 감염 경로는 체표면 노출에 의한 경우, 구강 접촉에 의한 경우, 그리고 호흡기계(흡입)를 통한 경우 등 3가지로 구분하는데 그 중에서 특히 흡입의 경우, 그 경로인 폐가 외부의 환경과 체내의 혈액 사이에서 독특하고 밀접한 체계를 유지하기 때문에 독성학적으로 매우 중요하게 여겨진

다.²⁾ 보통 흡입에 의한 독성물질은 건축자재로 사용되는 석면, 산업현장의 유해가스와 매연, 방향제, 탈취제 등이 있는데, 이와같이 무의식적으로 흡입되는 물질들은 시민생활과 건강 및 환경오염 등의 측면에서 주로 논의되는 반면, 의식적으로 흡입되는 물질들, 즉 부탄 가스, 본드와 같은 접착제류, 그리고 유기 용제 등은 심각한 정신적 육체적 파괴라는 관점에서 사회문제 제로 대두되고 있다. 구체적으로 흡입에 사용될 수 있는 생활용품들은 접착제, 분무제, 화장품, 생활연료, 사무용품 등 이루 헤아릴 수 없을 만큼 많으며, 그 중 무의식적으로 흡입되는 것으로는 파리약, 모기약으로 대변되는 분무제와 방향제, 세탁용제 등을 들 수 있고, 의식적으로 흡입하는 것으로는 본드 등의 접착제와 유기용제들을 대표적으로 들 수 있다.

장기간에 걸친 휘발성 물질의 흡입은 중추신경계, 폐 및 간과 신장 등의 신체에 영구적 손상을 초래하며,³⁾ 또한 우발적 범죄를 일으키는 등 사회적 문제로 대두되고 있으나, 아직까지 이에 대한 자세한 연구가 행해지지 않아, 마땅한 대처 방안이 제시되지 못하고 있어 임상적인 측면에서의 연구 필요성이 절실하다고 사료된다.

따라서 국민건강의 임상적 및 사회적 측면에서 유해성 휘발 물질의 흡입에 관한 연구의 일환으로 생활 전반에서 흡입 가능성이 큰 휘발성 물질인 방향제와 그 원료 물질인 ethyl acetate와 ethyl ether를 실험동물에 흡입 시킨 뒤 생화학적 실험을 행하여 생체에 미치는 영향을 밝히고, 나아가 청소년의 정신건강 및 사회문제의 해결방안을 마련하는데 기본적인 근거를 제시하고자 본 실험을 행하였다.

재료 및 방법

1. 시 약

흡입 휘발 물질로 시판 방향제, ethyl acetate, ethyl ether 등과 효소활성 측정을 위하여 pyruvic acid(Wako Chemical, Japan), 2, 4-dinitrophenylhydrazine(Wako Chemical, Japan), NADH(Sigma Co., U.S.A.), sodium barbital(Merck Chemical, Germany), acetylcholine chloride(BDH Chemical Ltd., England), phenol red(Junsei Chemical Co., Japan) 등의 시약을 사용하였다. 기타 시약은 특급 및 1급을 사용하였다.

2. 동물실험

1) 실험 동물

본 실험에 사용된 동물은 체중 150 ± 30 g의 Sprague-Dawley계, male rat 56 마리를 1주일간 사육실 조건에 적응시킨 후, 난피법에 따라 군당 8 마리씩 나누어 실험하였다. 실험기간 동안 사육실 온도는 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 를 유지하였으며 식이는 자유급식 하였다.

2) 실험 계획

무처치군인 normal군을 대조로 하여 단위체적당 일정한 gas 유출 속도 및 포화 농도를 가지는 chamber 안에서 실험하였다. 실험군은 gas 노출시간에 따라 3군으로 구분하고, 각 군마다 격일제로 일정시간 inhalant를 노출시켜 15일간 행하였다. 각 실험군은 다음과 같다.

3) 효소활성도 측정

① 효소시료 조제: 최종 inhalation후 12시간 절식시킨 실험동물을 ether로 마취시키고, 복부동맥으로부터 채혈한 후, 0.9% NaCl 용액으로 관류시킨 간장을 적출하고, 폐, 신장, 심장, 근육 및 뇌를 적출하였다. 얻은 혈액을 상온에서 약 1시간 방치 후 원심분리하여 혈청을 분리하였고, 기타 장기는 0.9% NaCl homogenate($\times 10$)로하여 시료로 사용하였다.

② 효소활성 측정: 시료 중의 Lactate dehydrogenase(이하 LDH)활성은 Bergbroida의 방법⁴⁾으로, Cholinesterase 활성은 Reinhold의 방법⁵⁾에 준하여 측정하였다.

③ 유의성 검정: 실험결과의 유의성은 PCS program 을 이용한 t-test 에 준하여 검정하였다.

Group	Inhalant(Days)	Saturated conc.
Normal		
A-I	Odorant(5days)	0.0893 mg/m ³ /min
A-II	Odorant(10days)	0.0893 mg/m ³ /min
A-III	Odorant(15days)	0.0893 mg/m ³ /min
B-I	Ethyl acetate(5days)	130.54 ml/m ³ /min
B-II	Ethyl acetate(10days)	130.54 ml/m ³ /min
B-III	Ethyl acetate(15days)	130.54 ml/m ³ /min
C-I	Ethyl ether(5days)	0.839 ml/m ³ /min
C-II	Ethyl ether(10days)	0.839 ml/m ³ /min
C-III	Ethyl ether(15days)	0.839 ml/m ³ /min

Experimental animals were inhaled for 5 minutes once in every other day.

결과 및 고찰

생활 전반에서 무의식적 혹은 의식적으로 흡입되어 장애를 일으킬 가능성 큰 유해 휘발물질의 생체내 영향을 밝히기 위해, 일정량의 inhalant를 흡입시킨 실험동물의 각 장기에 있어서 효소활성도의 변화는 Table 1, 2에 나타나 있다.

1. 혈청 중 효소활성의 변화

혈청중 cholinesterase 활성은 1.05 Michel unit 를 나타낸 normal군에 비해 방향제 흡입군(A 군), ethyl acetate 흡입군(B 군)과 ethyl ether 흡입군(C 군)에서 모두 0.70, 0.64, 0.68 Michel unit 로 각각 33%, 39%, 그리고 35%의 활성 감소를 보이고 있다. 또한 이런 활성 감소는 모두 흡입 물질의 time-dependence를 나타냈으며, 그 정도는 ethyl ether 군에 비해 ethyl acetate 군의 감소 폭이 큰 것으로 나타났다(Table 1).

혈청 중의 LDH 활성 변화는 Table 2에서와 같이 실험시작 10일까지는 변화를 보이지 않다가 방향제, ethyl ether와 ethyl acetate의 흡입시간이 길어짐에 따라 현저한 활성의 증가를 보이고 있다. 특히 ethyl acetate의 흡입군의 경우, normal 군과 비교할 때 거의 2배 가까운 증가를 관찰할 수 있다. 또한 ethyl acetate의 흡입군이 ethyl ether 흡입군보다 급격한 활성 증가를 보이고 있어 독성 발현이 보다 급속한 것으로 사료된다.

2. 간장 효소활성의 변화

간장 중의 cholinesterase 활성은 normal군에 비해 방향제 흡입군과 ethyl acetate 흡입군에서는 Table 1에 나타난 것처럼 시간의 경과에 따라 현저한 활성 감소를 보이지만 I군과 II군 사이의 활성의 변화가 II군과 III군 사이에서는 나타나지 않으므로, 간장은 초기 노출에 의해서 가장 큰 독성을 입는 것으로 생각되지만 보다 확실한 결과를 얻기 위해서는 실험기간이 보다 장기화되어야 할 것 같다. Ethyl ether 흡입군에서는 방향제 흡입군과 ethyl acetate 흡입군보다 활성 감소 폭은 크지 않지만 시간의 경과에 따라 꾸준한 활성 감소를 보이고 있다.

간장의 LDH 활성은 ethyl acetate 흡입군과 ethyl ether의 흡입에 의해서는 시간의 경과에 따라 약간 활성이 증가하는 수치를 보이거나 그 변화가 현저하지 않아 정상 범위에 크게 벗어나지 않는 수치였고, 방향제 흡입군에서는 오히려 활성이 약간 감소하는 경향이 나타났다(Table 2).

3. 폐 효소활성의 변화

Table 1에 나타난 바와 같이 폐 조직 중의 cholinesterase 활성은 큰 변화를 보여 흡입 물질의 1차적 흡수 기관 및 독성 부위임을 확인할 수 있었다. Ethyl ether 흡입군은 시간의 경과에 따라 현저한 폭으로 활성의 감소가 일어나 독성이 상당히 크게 작용했음을 짐작할 수 있다. 그러나 방향제 흡입군과 ethyl

Table 1. The effect of volatile substances inhalation on cholinesterase activity in serum and other tissues.

Organ Group	serum	liver	lung	brain	heart	kidney	muscle
Normal	1.05±0.22	1.06±0.33	0.93±0.21	0.84±0.15	0.93±0.28	1.07±0.11	0.88±0.20
A-I	0.95±0.17	0.73±0.17	0.57±0.13	0.75±0.32	0.73±0.22	0.65±0.16	0.77±0.24
A-II	0.83±0.21	0.55±0.15	0.43±0.09	0.71±0.11	0.70±0.08	0.57±0.07	0.70±0.21
A-III	0.70±0.16	0.57±0.07	0.50±0.23	0.63±0.08	0.43±0.05	0.50±0.18	0.52±0.20
B-I	0.92±0.17	0.67±0.25	0.52±0.13	0.69±0.23	0.67±0.20	0.60±0.06	0.71±0.24
B-II	0.76±0.24	0.51±0.07	0.40±0.10	0.65±0.13	0.64±0.02	0.52±0.17	0.64±0.12
B-III	0.64±0.08	0.52±0.17	0.46±0.18	0.58±0.02	0.40±0.17	0.46±0.08	0.48±0.25
C-I	0.97±0.05	0.83±0.14	0.73±0.27	0.83±0.14	0.85±0.29	0.85±0.23	0.85±0.07
C-II	0.70±0.10	0.77±0.16	0.65±0.16	0.58±0.03	0.83±0.29	0.73±0.04	0.74±0.30
C-III	0.68±0.29	0.70±0.03	0.44±0.06	0.43±0.03	0.53±0.58	0.60±0.22	0.42±0.22

Marketed odorant(A), ethyl acetate(B) and ethyl ether(C) were inhaled to rats, according to the different period, I(5 days), II(10 days) and III(15 days).

The assay procedure was described in experimental method. Each value represents the mean±S.D. from 8~10 male rats. Unit: Michel unit

Table 2. The effect of volatile substances inhalation on LDH activity in serum and other tissues.

Organ Group	serum	liver	lung	brain	heart	kidney	muscle
Normal	1.26±0.04	111.34±0.12	13.40±0.70	11.02±0.30	9.33±0.52	12.40±0.26	14.1±0.35
A-I	1.23±0.05	105.52±1.41	14.64±0.74	13.37±0.34	13.02±0.40	15.40±0.94	14.20±0.91
A-II	1.35±0.05	107.04±0.47	14.99±0.59	14.72±0.58	14.93±0.76	15.50±0.35	14.46±0.54
A-III	2.48±0.06	106.15±0.75	15.15±0.84	15.42±0.25	15.05±0.90	16.27±0.53	15.18±0.85
B-I	1.32±0.01	114.70±1.43	15.86±0.50	14.85±0.96	13.86±0.26	16.58±0.90	15.67±0.17
B-II	1.49±0.04	116.39±0.64	16.22±1.00	16.01±0.69	15.76±0.48	16.99±0.75	15.78±0.72
B-III	4.27±0.06	115.19±0.64	16.38±0.94	16.52±0.65	15.93±0.80	17.58±0.97	15.96±0.93
C-I	1.34±0.05	114.69±1.41	15.91±0.74	14.54±0.34	14.15±0.40	16.67±0.94	15.43±0.91
C-II	1.49±0.05	116.35±0.47	16.18±0.59	16.00±0.58	16.23±0.79	16.84±0.34	15.72±0.54
C-III	2.69±0.06	115.38±0.76	16.49±0.84	16.76±0.25	16.36±0.90	17.69±0.53	16.50±0.85

Marketed odorant(A), ethyl acetate(B) and ethyl ether(C) were inhaled to rats, according to the different period, I(5 days), II(10 days) and III(15 days).

The assay procedure was described in experimental method. Each value represents the mean±S.D. from 8~10 male rats. Unit: Berga-Broid unit($\times 10^3$)

acetate 흡입군에서 A-III 군과 B-III군의 경우 A-II 군과 B-II군에 비해 약간 증가된 활성치를 나타내었는데, 이것이 실험 오차에 의한 것인지 폐에서 시간의 경과로 인해 독성의 영향을 받지 않음을 나타내는 것인지에 대해서는 보다 확실히 검토해 볼 필요가 있을 것 같다.

폐 조직의 LDH 활성은 ethyl ether와 ethyl acetate를 흡입함으로써 22%, 23% 증가된 수치를 보이는데 그 정도는 시간이 경과함에 따라 커지고, 방향제 흡입군에서는 normal에 비교할때 약 10% 정도 증가하였다(Table 2).

4. 뇌 효소활성의 변화

Table 1에서와 같이 뇌 조직 중의 cholinesterase 활성은 흡입 물질의 영향을 받아 크게 감소되었다. 방향제 흡입군에서는 활성 감소 정도는 약 25% 이었으며, ethyl acetate 흡입군에서는 초기 흡입에 의해 0.69 Michel unit로 현저히 감소하였다가, 시간의 경과로 의해서는 그 감소폭이 줄어드는 경향을 나타내었다. 그러나 ethyl ether 흡입군에서는 초기 흡입보다는 흡입시간의 경과에 따라 활성 감소의 폭이 커지는 경향을 보이고 있다.

뇌 중의 LDH 활성은 모두 흡입에 의해 활성의 증가를 나타내지만 그 정도는 ethyl ether, ethyl acetate, 방향제의 순으로 꾸준히 활성이 증가 하였다(Table 2).

5. 심장 효소활성의 변화

심장에서의 cholinesterase 활성 역시 방향제, ethyl acetate와 ethyl ether의 흡입에 의해 모두 활성이 감소한 결과가 나타났다(Table 1). 그러나 다른 장기와는 달리 심장에서는 세 물질 모두 즉 A-II, B-II, C-II까지의 활성변화보다 A-III, B-III, C-III 군에로의 변화 폭이 현저한 것으로 나타나, 심장은 시간이 어느 정도 경과하여야만 강한 독성의 발현을 보이는 것으로 사료된다. 초기 노출에 의한 활성 감소는 ethyl ether보다 ethyl acetate 와 방향제 흡입군에서 강하게 나타났다. 또한 심장 심장에서는 방향제, ethyl acetate와 ethyl ether의 흡입에 의해 각 군 모두 LDH의 활성 증가가 60% 이상으로 나타났다(Table 2).

6. 신장 효소활성의 변화

신장의 cholinesterase 활성 역시 강한 독성을 받은 것으로 나타났다. Normal군의 활성치가 1.07 Michel unit인데, 방향제, ethyl acetate, ethyl ether 흡입군은 각각 0.50 Michel unit, 0.46 Michel unit, 0.60 Michel unit로 각각 53%, 57% 그리고 43%의 활성 감소를 나타냈다. 방향제, ethyl acetate와 ethyl ether 모두 흡입시간의 경과에 따라 꾸준한 활성 감소를 나타내었다. 그 감소 정도는 ethyl ether흡입군 보다는 방향제, ethyl acetate 흡입군에서 보다 크게 나타났다(Table 1).

신장의 LDH 활성 역시 흡입에 의한 독성의 발현으로 활성이 증가되었다. 방향제, Ethyl acetate 와 ethyl ether 모두 흡입 시간의 경과에 따라 꾸준한 활성 증가를 나타내었고, 초기 흡입에 의한 증가는 ethyl acetate가 강한 반면 시간의 경과에 따른 증가는 ethyl ether 흡입군이 강하게 나타났다(Table 2).

7. 근육 효소활성의 변화

근육에서의 cholinesterase활성은 normal군에 비해 방향제 흡입군인 A군, ethyl acetate 흡입군인 B 군과 ethyl ether 흡입군인 C군 모두 현저한 활성 감소를 보였다. 이런 활성 감소는 모두 흡입시간이 길어짐에 따라 time-dependence가 현저했으며, 그 정도는 방향제와 ethyl acetate 군에 비해 ethyl ether군의 감소 폭이 큰것으로 나타났다(Table 1). Table 2에 나타난 것과 같이 근육 조직의 LDH 활성은 방향제 흡입군에서 근소한 증가가 나타났으며, ethyl acetate와 ethyl ether 흡입군에서 약간의 증가된 활성치를 보이는데 그 정도는 시간이 경과함에 따라 커지고, ethyl acetate 보다는 ethyl ether 흡입군에서 좀 더 증가하였다. 그러나 전반적으로 그렇게 현저한 변화는 나타나지 않았다.

Cholinesterase는 간장에서 생합성되어 혈액내로 이행되는데,⁶¹⁾ 일정한 효소로서의 특징을 지니지않고 여러가지 isozyme group으로 작용하는 효소이다. 동물조직 중에는 acetylcholine 및 소수의 choline ester만을 분해시키는 true cholinesterase(E.C.: 3.1.1.7, AChE)가 적혈구, 신경세포, 비장, 폐, 뇌, 근육, 신장 등에 존재하고 acetylcholine 이외의 ester도 분해시키는 pseudocholinesterase(E.C.: 3.1.1.8, PChE)가 혈장, 간장, 췌장, 심장 등에 존재하는데,⁸⁾⁻¹²⁾ cholinesterase작용이 억제될 경우, acetylcholine이 체내에 축적되므로 구토, 복통, 설사, 기관지 수축, 기관지 분비 증대와 같은 muscarine형 독성과 피로, 근력저하, 전신성 경련, 호흡 곤란과 같은 nicotine형 독성이 나타나게 된다.¹¹⁾

한편, LDH는 1940년 Starud¹⁴⁾가 소의 heart로부터 분리해 낸 최초로 발견된 isozyme의 하나로 해당과정에서 혐기적 대사의 최종 산물인 pyruvate와 lactate사이의 가역적 산화환원 반응에 관여하며, 포유동물의 신체 각 조직에 광범위하게 분포되어 있다. Market 등¹⁷⁾과 Wieland 등¹⁸⁾에 의하면 조직중에

5개의 isozyme으로 존재하는 복합체이며, 각 조직의 특성에 따라, 그리고 병적 상태에 따라, 그 절대량이 서로 달라 진다¹⁹⁾고 알려져 조직에서의 LDH isozyme pattern은 직접적으로 당질 대사를 통한 energy 대사에 관여할 뿐 아니라 나아가 다른 영양물질의 대사에도 불과분의 관계가 있음을 알 수 있다.

간에서 생합성되어 신경자극 전달에 관여하는 cholinesterase 활성은 체내 독성 물질의 존재에 의해 그 활성이 감소한다는 Schmidt²⁰⁾의 보고와 일치하여, 물질의 흡입에 의하여 혈청과 각 조직에서 현저히 감소하였으며, 해당대사에 관여하는 LDH 활성은 물질의 흡입 시간이 경과함에 따라 조직 특히 심장의 활성 및 분포가 변화한다는 Dawson 등²¹⁾의 보고와 일치하는 결과이다.

결 론

실생활에서 의식 혹은 무의식적으로 흡입되어 부작용을 일으키기 쉬운 본드와 같은 접착제류와 paint thinner 등의 공업생산물들이 인체에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험의 한 과정으로 이들 물질들의 구성성분으로 다량 함유되어 있는 ethyl acetate와 ethyl ether를 중심으로 이들 용매와 시판 방향제를 rat에 일정농도로 일정시간 흡입시킨 뒤, 각 조직에 대하여 효소 생화학적 실험을 행하였다.

시판 방향제 흡입은 cholinesterase 활성을 혈청과 여러 조직에서 time-dependence를 나타내면서 감소시켰는데, 특히 심장과 신장에서 현저하였고, 뇌에서 25% 감소시켰다. LDH 활성은 혈청과 심장에 대해서는 normal 군과 비교해볼 때, 거의 90%와 60%의 증가를 보였다. 간 조직에서는 변화가 나타나지 않았다.

Ethyl acetate의 흡입은 시간의 경과에 따라 혈청과 기타조직의 Cholinesterase 활성을 감소시켰는데 그 효과는 심장과 신장에서 가장 현저하였고, 혈청의 LDH 활성을 normal군과 비교해 볼 때, 2배 정도 증가시켰으며, 심장, 뇌, 신장에서도 상당한 활성의 증가를 나타냈다.

Ethyl ether 흡입 역시 시간의 흐름에 따라 혈청과 각 조직의 cholinesterase 활성을 유의성 있게 감소시켰고, 혈청과 심장 등에서 현저한 LDH 활성의 증가를 유발시켰다. 간조직에서는 활성의 증가가 미약하게 나타났다.

감사의 말씀

본 연구는 1993년 효성여자대학교 특별연구비 지원에 의해 이루어졌음을 감사드립니다.

참고 문헌

1. Anderson H.R., Macnair R.S. and Ramsey J. D. : British Medical J., 290, 304, 1985
2. Hordik L. : Environ. Sci. Technol. 25, 596, 1991
3. Ramsey J.D., Anderson H.R., Bloor K. and Flanagan R.J. : Hum. Toxicol. 8, 261, 1989
4. Berga L. and Broida D. : Sigma Technical Bulletin, 500-8-60, 1960
5. Reinhold J.G. et al. : American, J. Clin. Path. 23, 645, 1953
6. William F.D. and Wayland J.H. : Arch. Environ. Health, 5, 31, 1962
7. 柴田進 : 病態生化學, 158, 1973
8. Hawkins R.D. and Mendel B. : British J. Pharmacol., 2, 173, 1947
9. Adams D.H. and Wittaker V.P. : Biochim. Biophys. Acta., 3, 357, 1949
10. Augustinson K.B. : Acta Physiol. Scand., 15, 1, 1948
11. Witter R.F. : Arch. Environ. Health, 6, 537, 1963
12. Pliz W.Z. : Klin. Chem. Biochem., 5, 1, 1967
13. Alfred Goodman and Gilman: The Pharmacological basis of therapeutics, 6, 91, 1980
14. Straub F.B. : Biochem J., 34, 483, 1980
15. 生物化學研究會 : 生物化學, 1986
16. Bergmeyer H.U. : Method of enzymatic analysis, vol II, 574, 1971
17. Market C.L. and Moller F. : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 45, 753, -1959
18. Wieland T. and Pflider G. : Biochem. Z., 329, 112, 1957
19. Kaplan N.O., Ciotti M., Hamolsky M. and Biber R.E. : Science, 131, 329, 1960
20. Schmidt E. and Schmidt F.W. : Brief guide to practical, 95, 1572, 1975
21. Dawson D.M., Goodfriend T.L. and Kaplan N.O. : Science, 143, 929, -1964