

## 랫트에서 이염화메탄 일회투여가 약물대사활성에 미치는 영향

윤혜은 · 김상겸 · 이희승 · 김영철\*  
서울대학교 약학대학

### Effect of a Single Dichloromethane Administration on Drug Metabolizing Activity in Rats

Hye Eun Yoon, Sang Kyum Kim, Hee Seung Lee and Young Chul Kim\*

College of Pharmacy, Seoul National University  
San 56-1, Shinrim-Dong, Kwanak-Ku, Seoul 151-742, Korea  
(Received October 1, 1996)  
(Accepted October 14, 1996)

**ABSTRACT :** Effects of a single administration of dichloromethane (DCM) on the hepatic drug metabolizing activity were determined using adult female rats. Rats were treated with DCM (3 mmol/kg, ip) and the disappearance of antipyrine (100 mg/kg, iv) or ethanol (2 g/kg, ip) from blood was measured. The blood concentration and half-life of antipyrine was not influenced by DCM administration. And DCM did not alter the blood concentration of ethanol measured for 240 min after the treatment. The effect of DCM treatment on *in vitro* cytochrome P-450-dependent enzyme activities was examined as well. No significant difference in either aniline hydroxylase or aminopyrine N-demethylase was observed in hepatic microsomal fractions of rats treated with DCM 24 hr prior to sacrifice. The present study indicates that acutely given DCM does not alter the metabolism of xenobiotics *in vivo*. The failure of DCM to alter the *in vitro* hepatic microsomal drug metabolizing activity was also noted.

**Key Words :** Dichloromethane, Antipyrine, Ethanol, Cytochrome P-450, Aniline hydroxylase, Aminopyrine N-demethylase

#### I. 서 론

이염화메탄은 사염화탄소, 클로로포름, 삼염화에틸렌 등과 함께 할로젠화 탄화수소류 용매의 하나로서 이 계열의 물질과 유사한 물리화학적 성질을 갖고 있다. 이염화메탄은 타 할로젠화 탄화수소 용매들에 비해 대단히 저독성으로 고농도에서 narcosis 를 유발하나 (Von Oettingen, 1964), 간 및 신장독성 potential 은 매우 낮은 용매이다 (Moskowitz and Shapiro, 1952; Hanke *et al.*, 1974). 이염화메탄은 paint removers 의 주 성분으로, 또 산업용 용매, degreaser, 추출제 등으로 널리 쓰이며 특히 이 계열의 타 용매들의 대체물로서 용도가 확장되고 있다.

이염화메탄은 이 계열의 타 할로젠화 탄화수소류와

구별되는 생체독성을 가지며 이것은 이 용매의 대사결과 생성되는 일산화탄소에 기인한다 (Stewart and Hake, 1976). 이염화메탄은 NADPH와 O<sub>2</sub> 존재하에서 일산화탄소로 대사되며 (Kubic *et al.*, 1974; Kubic and Anders, 1975, 1978), 일부는 간의 cytosol fraction 에서 glutathione 존재하에 formaldehyde, formic acid 를 거쳐 이산화탄소로 대사된다 (Ahmed and Anders, 1976, 1978). 생성된 일산화탄소는 혈액중 hemoglobin 과 결합하여 carboxyhemoglobin (COHb) 을 생성하므로 적혈구의 산소수송능력을 저하시키며 이것이 이염화메탄의 주독성으로 알려져 있다. 최근에 이염화메탄의 일산화탄소로의 대사는 cytochrome P-450 family 중에서 2E1 isozyme 에 의해 매개되는 것으로 보고되었다 (Guengerich *et al.*, 1991; Kim and Kim, 1996).

한편 이염화메탄의 주대사물인 일산화탄소는 *in vitro* 에서 cytochrome P-450 과 가역적인 결합체를 이루어 이 효소계에 의해 매개되는 대사반응을 억제하는 것으로 널리 알려져 있다 (Cooper *et al.*, 1965; Kampff-

\* To whom correspondence should be addressed  
This work was supported in part by a grant from Research Center for New Drug Development (RCNDD), Korea Science and Engineering Foundation (KOSEF).

meyer and Kiese, 1965; Kato, 1966). 일산화탄소가 생체내에서 간세포내의 cytochrome P-450 과 결합하고 또 이 cytochrome 효소에 의존하는 대사반응에 영향을 줄 수 있는지는 분명하지 않다. 그러나 간세포내에서 생성된 일산화탄소는 그 자체로 흡입된 일산화탄소의 경우와 다른 생체 및 세포내 동태를 보일 것으로 예상되며 실제로 이염화메탄으로부터 생성된 일산화탄소는 간내에서 직접적으로 cytochrome P-450 과 결합하여 complex 를 형성하는 것으로 보고된 바 있다 (Takehito *et al.*, 1988). 이 결과는 이염화메탄은 간의 약물대사능력에 변화를 가져올 수 있으며 따라서 xenobiotics 의 대사 및 독성발현에 영향을 줄 수 있음을 암시하고 있다. 따라서 본 실험에서는 급성적으로 투여된 이염화메탄이 *in vitro* 와 *in vivo* 에서의 약물대사 능력에 주는 영향을 측정하였다. 특히 이염화메탄이 cytochrome P-450 효소계 활성화에 미치는 영향을 확인하고자 이 효소계 활성화에 의해 주로 대사되는 antipyrine 과 alcohol dehydrogenase (ADH) 에 의해 분해되는 ethanol 의 혈중농도 감소속도에 주는 영향을 비교하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물

전 실험에 걸쳐 체중 180-250 g 의 자성 Sprague Dawley 랫트 (유한양행 중앙연구소) 를 실험동물로 사용하였다. 고형사료와 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였으며 사육실은 온도  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도  $55 \pm 5\%$  , 그리고 하루 12시간 썩의 주기로 인공명암을 유지하였다.

이염화메탄의 생체내 대사에 대한 효과를 측정하기 위한 실험에서는 이염화메탄 (3 mmol/kg) 을 corn oil 에 용해하여 antipyrine (100 mg/kg, iv) 또는 ethanol (2 g/kg, ip) 과 동시에 복강주사하였다. 이염화메탄 투여가 *in vitro* 약물대사능력에 주는 영향을 측정하기 위한 시험에서는 이염화메탄 (3 mmol/kg) 을 일회 복강주사하고 24시간 경과시 간을 적출하여 간대사능력을 측정하였다.

### 2. 시 약

실험에 사용된 시약들은 NADPH, NADP, antipyrine, aminopyrine, aniline, semicarbazide-hydrochloride, Trisma base, bovine serum albumin, glucose 6-phosphate, 1-aminonaphthol-4-sulfonic acid (이상 Sigma Chemical Co.), ni-

cotinamide, magnesium chloride, zinc sulfate, barium hydroxide (이상 Aldrich Chem. Co.), Folin's phenol reagent, ethanol, potassium tartrate, copper sulfate, sodium dithionite (이상 Merck Chem. Co.), dichloromethane (일본 순정화학) 으로 그 외 실험에 사용된 모든 시약과 용매는 reagent grade 또는 그 이상의 품질이었다.

### 3. Assays

#### 1) Plasma중의 antipyrine 농도측정

Antipyrine의 plasma 중 농도는 Bachmann 등의 방법 (1988) 을 수정하여 측정하였다. 랫트의 orbital sinus 로부터 채혈하여 plasma 100  $\mu\text{l}$  를 취한 후 50  $\mu\text{l}$  의 2 M NaOH 와 internal standard 인 aminopyrine (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 을 함유한 chloroform 200  $\mu\text{l}$  로 antipyrine 을 추출하였다. 시료를 3000 rpm 에서 10분간 원심분리한 후 chloroform 층을 1  $\mu\text{l}$  취해서 flame ionization detector 와 capillary column (DV 1701; J & W Scientific Co.) 을 장착한 가스크로마토그래프 (Varian 3300) 에 주입하였다. Carrier gas 로는  $\text{N}_2$  (30 ml/min) 를 사용하였고 수소와 air 의 속도는 각각 30 ml/min, 300 ml/min로, 칼럼의 온도는  $210^\circ\text{C}$ , 주입부  $240^\circ\text{C}$ , 검출기  $250^\circ\text{C}$  로 유지하였다. Antipyrine 의 농도는 aminopyrine 과의 면적비로 계산된 표준검량선으로부터 구하였다.

#### 2) 혈중 에탄올 농도측정

Ethanol 의 혈중 농도는 Naresh 와 Robert (1972) 의 방법을 수정하여 측정하였다. 랫트의 orbital sinus 로부터 채혈한 혈액 50  $\mu\text{l}$  를 filter paper 를 간 30 ml vial 에 넣고 internal standard 인 1-propanol (3 mg/ml) 을 가하고 알루미늄 캡으로 밀봉하였다. 실온에서 30분간 방치한 후 vial 의 head space gas 100  $\mu\text{l}$  를 취하여 가스 크로마토그래프에 주입하였다. Flame ionization detector 와 capillary column (Carbowax 20 M) 을 장착한 Varian 3300 gas chromatograph를 사용하였다. Carrier gas로는  $\text{N}_2$  (30 ml/min) 를 사용하였고 수소와 air 의 flow rate 는 각각 30 ml/min, 300 ml/min 이었으며 칼럼의 온도는  $80^\circ\text{C}$ , 주입부  $150^\circ\text{C}$ , 검출기  $250^\circ\text{C}$  로 유지하였다. Ethanol 의 농도는 1-propanol 과의 면적비로 계산된 표준검량선으로부터 구하였다.

#### 3) Hepatic Drug Metabolizing Activity

동물의 간대사능력을 측정하기 위하여 hepatic microsomes 의 aniline hydroxylase 와 aminopyrine N-demethylase 활성을 측정하였다.

동물로부터 적출된 간을 분쇄하고 9000 g 에서 20분 간 원심분리하여 얻은 상등액을 105000 g 로 60분간 초원심분리하여 microsomal pellet 을 얻었고 이 microsomes 에 1.15% KCl 완충액을 가하여 suspension 으로 만들었다. Microsomes 중의 protein 량은 Lowry 등의 방법 (1951)을 이용하여 측정하였다.

Aniline hydroxylase 의 활성은 Imai 등의 방법 (1966) 을 수정하여 측정하였다. 비이커에 NADPH 와  $MgCl_2$  로 이루어진 cofactor 용액 1 ml/과 0.1 M Tris-HCl 1 ml microsomal suspension 1 ml 을 가하고 마지막으로  $5 \mu mol/ml$  의 aniline 1 ml 을 가하여  $37^\circ C$  에서 20분간 반응을 시켰다. 10% trichloroacetic acid 2 ml 을 가하여 반응을 종결시키고 원심분리하여 상등액을 취하고 20%  $Na_2CO_3$  1 ml 과 2% phenol 2 ml 을 가하여 발색시켰다. 640 nm 에서 흡광도를 측정하고 표준검량선을 이용하여 활성을 nmol aminophenol formed/mg protein/min 으로 표시하였다.

Aminopyrine N-demethylase 활성은 Nash 의 방법 (1953) 을 수정하여 측정하였다. 비이커에 NADP, glucose-6-phosphate, nicotinamide, semicarbazide 를 함유한 cofactor 용액 1.5 ml 에 microsomal 상등액 1 ml 과 0.5 ml 의 기질을 가하고  $37^\circ C$  에서 15분간 반응시켰다. 15%  $ZnSO_4$  1 ml 을 가하여 반응을 종결시키고  $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$  포화용액 1 ml 을 가한 후 원심분리하고 상등액을 취하여 Nash reagent 로 발색시켰다. 415 nm에서 흡광도를 측정하고 표준검량선을 이용하여 활성을 nmol formaldehyde formed/mg protein/min 으로 표시하였다.

#### 4. 통계처리

실험결과는 평균±표준편차로 표시하였으며 two-tailed Student's *t*-test 로 각군을 비교하였다. 따로 기술하지 않은 한 P value 가 0.05 이하인 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다. Antipyrine 의 혈중농도를 측정 한 실험에서는 각시간대에서의 로그 혈중농도를 linear regression 하여 각 동물에서의 소실속도상수 (ke) 를 구하고 이로부터 반감기를 계산하였다.

### III. 결과 및 고찰

일산화탄소가 *in vitro* 에서 cytochrome P-450 과 complex 를 형성함으로써 이 enzyme 에 의존하는 약물 대사반응을 억제하는 것은 널리 알려져 있다 (Cooper *et al.*, 1965; Kampffmeyer and Kiese, 1965; Kato,

1966). 그러나 동물에게 흡입된 일산화탄소가 체내의 약물대사에 미치는 영향에 관해서는 오랫동안 일치되지 않는 실험결과들이 보고되어 왔다. 일산화탄소에 의해 유발되는 hypoxia 는 생체내의 생리화학적 변화를 유발시키며, 특히  $O_2$  의 availability 를 낮추어 산화적인 pathway 를 거치는 물질의 대사에 억제적으로 작용하는 것으로 보고되었다 (Montgomery and Rubin, 1973; Roth and Rubin, 1976; Jones, 1981). 그러나 흡입에 의해 체내로 침투된 일산화탄소는 혈중의 hemoglobin 과 높은 친화성을 가지므로 세포내로의 흡수는 제한되리라 예상되며 또한 세포내에 존재하는  $O_2$  는 일산화탄소와 cytochrome P-450 과의 결합을 억제할 것으로 보인다. 따라서 흡입된 일산화탄소가 세포내 표적부위와 직접 interaction 할 가능성은 대단히 낮을 것으로 추정된다. 본 실험에서는 cytochrome P-450 의 존성 약물대사효소계에 일산화탄소가 주는 직접적인 영향을 측정하기 위해 약물대사가 가장 활발하게 진행되는 부위에서 일산화탄소로 대사되는 이염화메탄을 투여한 후 간의 약물대사능력에 주는 영향을 측정하였다. 본 실험에서 사용된 3 mmol/kg 용량의 이염화메탄은 랫트에서 약 20분의 혈중 반감기를 가지며 투여 후 약 2-3시간에 혈중 carboxyhemoglobin 농도를 최대 10% 정도로 유의성있게 증가시키고 약 6시간 후에는 정상적인 carboxyhemoglobin 농도로 회복되는 것으로 관찰된 바 있다(Kim and Kim, 1996).

Antipyrine은 개발 초기에는 진통제로 이용되었으나 현재는 *in vivo* 에서 간의 약물대사능력을 측정하는 대표적인 지표물질로 인간과 실험동물에게서 광범위하게 사용되고 있다 (Bachmann and Jaurehui, 1993). Antipyrine 은 특히 간의 cytochrome P-450 의 활성에 의존적으로 대사되며 대사체로는 norantipyrine, 3-hydroxymethyl-antipyrine 과 4-hydroxyantipyrine 등이 측정된다. Phenobarbital inducible form 인 cytochrome P-450 2B, male specific form 인 cytochrome P-450 2C11, 3-methylcholanthrene inducible form 인 cytochrome P-450 1A 등의 cytochrome P-450 isozyme 이 antipyrine 의 대사에 관여한다 (Nakagawa *et al.*, 1987; Leslie *et al.*, 1987). 실제로 인간과 실험동물을 이용한 연구에서 간의 약물대사능력을 변화시키는 다양한 물질은 antipyrine 의 혈중 농도나 반감기에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다(Park and Kitteringham, 1990).

Table 1 은 3 mmol/kg 의 이염화메탄 투여가 혈중 antipyrine의 농도와 반감기에 미치는 영향을 정리한 것이다. 정상동물에게 100 mg/kg 용량의 antipyrine 을 정맥주사 하였을 때 log 농도 대 시간의 그래프에서 an-

**Table 1.** Effect of Dichloromethane on Antipyrine Metabolism *In Vivo*

Treatment	Antipyrine Concentration in Blood ( $\mu\text{g/ml}$ )				Half-life (min)
	t=60 min	t=120 min	t=180 min	t=240 min	
Control	115.3 $\pm$ 34.2	85.9 $\pm$ 16.0	67.8 $\pm$ 20.4	53.0 $\pm$ 10.2	168.3 $\pm$ 24.1
Dichloromethane	118.5 $\pm$ 19.7	83.4 $\pm$ 5.3	65.1 $\pm$ 6.2	49.0 $\pm$ 3.5	150.8 $\pm$ 35.5

Rats were treated with dichloromethane (3 mmol/kg, ip) and antipyrine (100 mg/kg, iv) simultaneously. Control rats were treated with antipyrine only. Each value represents mean $\pm$ SD for 4 rats. Dichloromethane did not affect either antipyrine concentrations at each time point or  $T_{1/2}$  in blood (Student's *t*-test,  $P>0.05$ ).

**Table 2.** Effect of Dichloromethane on Ethanol Clearance from Blood

Treatment	Blood Ethanol Level (mg/dl)				
	t=30 min	t=60 min	t=120 min	t=180 min	t=240 min
Control	183.3 $\pm$ 4.9	149.3 $\pm$ 6.6	109.7 $\pm$ 5.0	87.3 $\pm$ 4.5	50.0 $\pm$ 8.2
Dichloromethane	204.8 $\pm$ 13.0	152.5 $\pm$ 7.6	130.5 $\pm$ 11.9	93.8 $\pm$ 20.5	45.5 $\pm$ 6.3

Rats were treated with dichloromethane (3 mmol/kg, ip) and ethanol (2 g/kg, ip) simultaneously. Control rats were treated with ethanol only. Each value represents mean $\pm$ SD for 4 rats. Dichloromethane did not affect ethanol concentration measured at each time point (Student's *t*-test,  $P>0.05$ )

antipyrine의 혈중농도는 직선적으로 감소하며 약 168분의 반감기를 가지는 것으로 관찰되었다. Antipyrine과 이염화메탄을 동시에 투여하였을 때 투여 후 60, 120, 180, 240분에 측정된 antipyrine의 혈중농도와 반감기에 이염화메탄은 영향을 미치지 못하였다.

Ethanol은 인간과 실험동물에게 다양한 형태의 간독성을 유발시키며 특히 만성적인 노출에 의해서는 간경화를 발생시키는 것으로 널리 알려져 있다 (Lieber, 1988). Ethanol의 대사는 주로 간에서 이루어지며 alcohol dehydrogenase, MEOS (microsomal ethanol oxidizing system) 그리고 catalase가 ethanol의 대사에 관여한다. 특히 alcohol dehydrogenase (ADH)는 주로 cytosol에 존재하며 정상상태에서 ethanol대사의 80-90% 이상을 담당한다. 3 mmol/kg의 이염화메탄 투여가 혈중 ethanol의 농도와 반감기에 미치는 영향은 Table 2와 같다. 정상동물에서 2 g/kg 용량의 ethanol은 농도 대 시간의 그래프에서 직선적으로 감소하며 약 -0.60 mg/dl/min의 기울기를 가지는 것으로 관찰되었다. Ethanol과 이염화메탄을 동시에 투여하였을 때 240분 동안 측정된 혈중농도와 감소속도는 (약 0.67 mg/dl/min) ethanol만을 투여한 동물과 비교했을 때 차이를 보이지 않았다. 이상의 실험결과는 *in vivo*에서 생성된 일산화탄소가 microsomes의 cytochrome P-450에 의해 대사를 받는 antipyrine이나 cytosol의 alcohol dehydrogenase에 의해 대사를 받는 ethanol의 생체내 반감기와 혈액 중의 농도에 영향을 주지 않음을 시사한다.

이염화메탄을 투여하고 24시간 후 간의 microso-

**Table 3.** Effect of Dichloromethane on Microsomal Aniline Hydroxylase and Aminopyrine N-Demethylase Activity

Treatment	Aniline Hydroxylase	Aminopyrine N-Demethylase
	(nmole product formed/mg protein/min)	
Control	0.112 $\pm$ 0.086	2.03 $\pm$ 0.44
Dichloromethane	0.110 $\pm$ 0.037	1.94 $\pm$ 0.91

Rats were treated with dichloromethane (3 mmol/kg, ip) 24 hr prior to sacrifice. Each value represents mean $\pm$ SD for 6 rats. Dichloromethane did not affect aniline hydroxylase or aminopyrine N-demethylase activity (Student's *t*-test,  $P>0.05$ ).

mes을 분리하여 *in vitro*에서의 약물대사능력에 미치는 영향을 측정하였다 (Table 3). Aniline hydroxylation은 cytochrome P-450의 한 isozyme인 cytochrome P-450 2E1 (CYP 2E1)의 활성을 측정하는 지표로 주로 사용된다 (Soucek and Gut, 1992). 이 isozyme은 최근 *in vivo*와 *in vitro*에서 이염화메탄의 대사에 중추적인 역할을 수행하는 것으로 보고되었다 (Guengerich *et al.*, 1991; Kim and Kim, 1996). Aminopyrine N-demethylation은 antipyrine의 대사에 관여하는 isozyme인 cytochrome P-450 1A, 2B와 2C11 등이 매개하는 것으로 보고되었으며 cytochrome P-450의 활성을 측정하는 지표물질로 광범위하게 사용되고 있다 (Imaoka *et al.*, 1988; Leslie *et al.*, 1987). 본 실험에서 3 mmol/kg 용량의 이염화메탄 투여는 간의 microsomes에서 aniline과 aminopyrine의 대사에 영향을 주지 못하였다. 이 결과는 이염화메탄의 흡입에 의해 간의 cytochrome P-450의 함량이 변하지 않았다는 Kurppa와 Vainio (1981)의 결과와 부분적으로 일치하고 있다.

본 실험에서 사용된 이염화메탄은 cytochrome P-450에 의해 대사되어 일산화탄소를 형성하므로 약물대사 효소계에 미치는 영향은 흡입에 의한 일산화탄소에 비해 직접적인 것이라 예상되었다. 그러나 이염화메탄으로부터 대사활성부위에서 생성된 일산화탄소는 *in vivo*에서 cytochrome P-450에 의해 대사되는 antipyrine이나 ADH에 의해 주로 대사되는 ethanol의 혈중농도 및 감소속도에 변화를 유도하지 못하는 것으로 보인다. 또한 이염화메탄 투여 24시간 후 간에서 분리한 microsomes을 이용한 실험에서 이염화메탄은 aminopyrine N-demethylase와 aniline hydroxylase의 활성에도 영향을 주지 못하였다.

최근에 들어와 이염화메탄은 비슷한 물리화학적 성질을 갖고 있는 사염화탄소의 간독성을 현저하게 증가시키는 것으로 보고되었다 (Kim *et al.*, 1989; Kim and Kim, 1993). 사염화탄소의 간독성은 여러 물질들에 의해 증가됨이 보고되어 있으며 대표적인 기전으로는 이 용매의 활성화를 매개하는 cytochrome P-450 의존성 대사반응활성의 유도가 제시되고 있다 (Traiger and Plaa, 1972; Pilon *et al.*, 1986). 그러나 본 실험결과는 이염화메탄에 의한 사염화탄소 간독성의 증폭효과는 사염화탄소 대사활성화의 증가와는 무관한 기전에 의해 유발됨을 암시하고 있다.

본 실험에서 사용된 용량의 이염화메탄은 COHb 농도를 최대 10% 정도로 증가시켜 비교적 가벼운 hypoxia를 유발하는 것으로 관찰된 바 있다 (Kim and Kim, 1996). 본 연구실험은 이염화메탄에 의해 간에서 생성되는 일산화탄소는 간의 약물대사효소계 활성에 직접적인 영향을 주지 않으며 또한 이염화메탄의 체내 대사물인 일산화탄소에 의한 carboxyhemoglobin 형성 및 hypoxia 유발을 통해서도 생체내 약물대사반응에 변화를 주지 않음을 시사하고 있다.

## 참고문헌

- Ahmed, A.E. and Anders, M.W. (1976): Metabolism of dihalomethanes to formaldehyde and inorganic halide, *Drug Metab. Dispos.*, **4**, 357-361.
- Ahmed, A.E. and Anders, M.W. (1978): Metabolism of dihalomethanes to formaldehyde and inorganic halide-II. Studies on the mechanism of the reaction, *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 2021-2025.
- Bachmann, K.A., Yang, C., Jahn, D. and Schwartz, J (1988): The use of single sample clearance estimates to probe hepatic drug metabolism in rats. I., *Xenobiotica*, **18**, 151-159.
- Bachmann K.A. and Jaurehui, L. (1993): Use of single sample clearance estimates of cytochrome P 450 substrates to characterize human hepatic CYP status *in vivo*, *Xenobiotica*, **23**, 307-315.
- Cooper, D.Y., Levin, S., Narassimhulu, S., Rosenthal, O. and Estabrook, R.W. (1965): Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase system, *Science*, **147**, 400-402.
- Guengerich, F.P., Kim, D.H. and Iwasaki, M. (1991): Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects, *Chem. Res. Toxicol.*, **4**, 168-179.
- Hanke, C., Ruppe, K. and Otto, J. (1974): Untersuchungsergebnisse zur toxischen Wirkung von dichloromethan bei fressbodenlegern, *Z. Gesamte. Hyg.*, **20**, 81-84.
- Imai, T., Ito, A. and Sato, R. (1966): Evidence of biochemically different types of vessels in the hepatic microsomal function, *J. Biochem.*, **60**, 417-428.
- Imaoka, I., Inoue, K. and Funae, Y. (1988): Aminopyrine metabolism by multiple forms of cytochrome P-450 rat liver microsomes: Simultaneous quantitation of four aminopyrine metabolites by high-performance liquid chromatography, *Arch. Biochem. Biophys.*, **265**, 159-170.
- Jones, D.P. (1981): Hypoxia and drug metabolism, *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 1019-1023.
- Kampffmeyer, H. and Kiese, M. (1965): The effect of carbon monoxide on the hydroxylation of aniline and N-ethylaniline by microsomal enzymes, *Nunyn-Schmiedebergs Pharmakol.*, **250**, 1-8.
- Kato, R. (1966): Possible role of cytochrome P-450 in the oxidation of drugs in liver microsomes, *J. Biochem.*, **59**, 574-583.
- Kim, D.B. and Kim, Y.C. (1993): Potentiation of carbon tetrachloride toxicity by dichloromethane in adult male rats, *Korean. J. Toxicol.*, **9**, 253-262.
- Kim, S.K. and Kim, Y.C. (1996): Effect of A Single Administration of Benzene, Toluene or m-Xylene on Carboxyhemoglobin Elevation and Metabolism of Dichloromethane in Rats, *J. Appl. Toxicol.*, **16**, 437-444.
- Kim, Y.C., Yoon, H.E. and Yi, M.Y. (1989): Effects of dichloromethane on carbon tetrachloride hepatotoxicity in adult female rats, *Pharmacologist*, **31**, 180.
- Kubic, V.L. and Anders M.W. (1975): Metabolism of dihalomethanes to carbon monoxide, Metabolism of dihalomethanes to carbon monoxide II. In vitro studies, *Drug Metab. Dispos.*, **3**, 104-111.
- Kubic, V.L. and Anders, M. W. (1978): Metabolism of dihalomethanes to carbon monoxide III. Studies

- on the mechanism of the reaction, *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 2349-2355.
- Kubic, V.L., Anders, M.W., Engel, R.R., Barlow, C.H. and Caughey, W.S. (1974): Metabolism of dihalomethanes to carbon monoxide. I. *In vivo* studies, *Drug Metab. Dispos.*, **2**, 53-57.
- Kurppa, K. and Vainio (1981): Effects of intermittent dichloromethane inhalation on blood carboxyhemoglobin concentration and drug metabolizing enzyme in rats. *Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol.*, **32**, 535-544.
- Leslie, B., Park, S.S., Gelboin, H. V. and Vesell, E.S. (1987): Studies on the metabolism of aminopyrine, antipyrine and theophylline using monoclonal antibodies to cytochrome P-450 isozymes purified from rat liver, *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 2359-2367.
- Lieber C.S. (1988): Biochemical and molecular basis for alcohol-induced injury to liver and other tissues, *N. Eng. J. Med.*, **319**, 1639-1650.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin-phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Montgomery, M.R. and Rubin, R.J. (1973): Oxygenation during inhibition of drug metabolism by carbon monoxide or hypoxic hypoxia, *J. Appl. Physiol.*, **35**, 505-509.
- Moskowitz, S. and Shapiro, H. (1952): Fatal exposure to methylene chloride vapor, *Arch. Ind. Hyg. Occup. Med.*, **6**, 116-123.
- Nakagawa, A., Nakamura, K. Maeda, K., Kamataki, T. and Kato, R. (1987): Studies on *in vitro* antipyrine metabolism by <sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N double labeled method, *Life Sci.*, **41**, 133-143.
- Naresh, C. and Robert, H. (1972): Analysis of alcohol
2. A review of gas chromatographic method. *J. Chromatograph. Sci.*, **10**, 263-267.
- Nash, T. (1953): The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction, *Biochem. J.* **55**, 416-421.
- Park, B.K. and Kitteringham, N.R. (1990): Assessment of enzyme induction and enzyme inhibition in humans: toxicological implications, *Xenobiotica*, **20**, 1171-1185.
- Pilon, D., Charbonneau, M., Brodeur, J. and Plaa, G. L. (1986): Metabolites and ketone body production following methyl n-butyl ketone exposure as possible indices of MnBK potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **85**, 49-59.
- Roth, R.A. and Rubin, R.J. (1976): Role of blood flow in carbon monoxide- and hypoxic hypoxia-induced alterations in hexobarbital metabolism in rats, *Drug Metab. Dispos.*, **4**, 460-467.
- Soucek, P. and Gut, I. (1992): Cytochrome P-450 in rats: structures, functions, properties and relevant human forms, *Xenobiotica*, **22**, 83-103.
- Stewart, R.D. and Hake, C.L. (1976): Paint-remover hazard, *J. Amer. Med. Assoc.*, **235**, 398-401.
- Takehito, T. and Yoshifumi, M. (1988): Metabolism of dichloromethane and the subsequent binding of its produce, carbon monoxide, to cytochrome P-450 in perfused rat liver, *Toxicol. lett.*, **40**, 93-96.
- Traiger, G.J. and Plaa, G.L. (1972): Relationship of alcohol metabolism to the potentiation of CCl<sub>4</sub> hepatotoxicity induced by aliphatic alcohols, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **183**, 481-488.
- Von Oettingen, W.F. (1964): The halogenated hydrocarbons of industrial and toxicological importance (Elsevier, Amsterdam).