

## 2-Nitropropane의 독성에 대한 멜라토닌의 억제 효과

김 석 중

식품기능연구팀

### 요약

간 독성 물질인 2-nitropropane (2-NP)을 쥐의 복강내로 주사한 후에 조직에서의 지질산화(lipid peroxidation (LPO), malondialdehyde와 4-hydroxyalkenal의 생성량)와 간 독성의 지표로서 혈청내의 sorbitol dehydrogenase (SDH) 활성을 측정하였다. 수많은 독성 물질에 대하여 방어효과를 보이는 멜라토닌(melatonin)을 2-NP 투여 30분전에 주사하여 2-NP에 대한 방어효과를 조사하였다. 2-NP 투여시에 LPO와 SDH 활성은 시간 (0, 4, 8, 24h) 및 2-NP의 농도 (0, 1, 2, 4 mmol/kg)에 따라 증가하였고, 4 mmol/kg의 2-NP을 투여한 24시간 후에는 간 ( $P<0.001$ ), 폐 ( $P<0.05$ ), 신장 ( $P<0.001$ )에서 LPO가 유의적으로, 혈청에서의 SDH 활성은 470 배 증가하였다. 멜라토닌을 농도에 따라 투여시 (2.5, 5, 10 mg/kg) 간, 폐, 신장에서 LPO가 감소하였고, SDH 활성도 감소하였다. 이 결과는 간에 대해 발암성 물질인 2-NP가 지질산화도 유도할 수 있으며, 약리학적 수준의 멜라토닌이 2-NP의 독성을 감소시킬 수 있음을 나타낸다.

### 1. 서론

2차 nitroalkane인 2-NP는 잉크, 페인트, 광택제, 접착제 등의 제조시 널리 이용되는 중간물질로서<sup>(1)</sup> 담배연기에서도 발견된다<sup>(2)</sup>. 이 물질은 급성 독성물질로서<sup>(3)</sup>, 흡입이나<sup>(4)</sup> 구강투여시<sup>(5)</sup> 간암을 유발하며, 박테리아<sup>(6,7)</sup>나 간세포<sup>(8,9)</sup>에서는 유전독성도 일으킨다. 역학조사 결과 2-NP를 함유하는 유기용제에 노출된 농부들에서 백혈병과 림프종이 확인되었다<sup>(10)</sup>.

2-NP에 대한 대부분의 연구는 간세포 DNA의 손상에 관한 것이고 일부가 신장<sup>(11)</sup> 및 골수<sup>(12)</sup> DNA, 세포 지질<sup>(13)</sup>과 단백질<sup>(14)</sup> 손상에 관한 것이다. 2-NP은 간에서 DNA 절단, 8-hydroxy-guanine이나 8-aminoguanine 같은 염기변환을 일으켜 암을 일으킨다는 사실이 많은 연구자들에 의해 밝혀졌으며<sup>(15-18)</sup> 이는 2-NP이 간에서 대사되면서 활성산소를 생성하기 때문인 것으로 알려졌다<sup>(19,20)</sup>. 2-NP의 독성과 활성산소의 관련성은 활성산소에 의한 지질산화가 이 화합물의 발암성과 관련이 될 수 있다는 추측을 가능케 하므로, 본 연구에서는 2-NP이 *in vivo*에서 지질산화를 유도할

수 있는지에 대하여 조사하였고, 이 같은 2-NP의 독성에 대하여 천연 항산화제인 멜라토닌이 억제효능을 보이는데 대해서 조사하였다.

송과선의 주요 산물인 멜라토닌은 hydroxyl radical ( $\text{HO}\cdot$ )<sup>(21-23)</sup>, peroxyxynitrite anion ( $\text{ONOO}^-$ )<sup>(24,25)</sup>, peroxy radical ( $\text{ROO}\cdot$ )<sup>(26)</sup>과 같은 free radical을 소거하는 작용<sup>(27,28)</sup>을 가지므로 free radical 생성에 의한 *in vitro*, *in vivo*에서의 DNA 염기변환이나 지질산화와 같은 손상을 방어할 수 있는 것으로 나타났다<sup>(29-34)</sup>.

본 연구에서는 간, 폐, 신장에서의 지질산화(LPO)와 간 손상의 지표인 혈청에서의 SDH 활성을 이용하여 2-NP의 독성을 분석하였고, 이에 대한 멜라토닌의 방어효능을 조사하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 실험동물의 처리

Sprague-Dawley계 쥐 ( $140 \pm 10$  g) 수컷을 이용하였다. 2-NP의 농도별 독성을 조사하기 위해 올리브유에 녹인 2-NP을 1, 2, 3, 4 mmol/kg 양으로 쥐의 복강내에 주사하였으며 각 농도 처리 구당 6 마리의 쥐를 사용하였다.

주사 후 24 시간이 지난 다음에 단두법으로 쥐를 희생시키고 각 조직을 채취하였다. 시간에 따른 2-NP의 독성변화를 조사하기 위해서는 4 mmol/kg의 2-NP을 사용하였다. 2-NP의 독성에 대한 멜라토닌의 방어효능을 분석하기 위하여 2.5, 5, 10 mg/kg의 멜라토닌을 2-NP 주사 30분전에 복강내로 주사하였다.

멜라토닌의 효능평가를 하기 위하여 소량의 알콜에 멜라토닌을 먼저 녹인 후에 생리식염수를 첨가하여 농도를 조절한 다음 주사하였다. 대조구에는 올리브유와 생리식염수만을 주사하였다. 채취한 조직은 드라이아이스에서 곧바로 얼린 후에 분석 때까지  $-80^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다. 혈청은 채취한 혈액을  $4^\circ\text{C}$ 의 시험관에서 응고시킨 다음  $3,000$  g에서 원심분리하여 상등액을 취하였다.

### 2.2 조직 균질액의 조제 및 분석

각 조직에 50 mM (pH 7.4, 10% w/v)의 Tris 완충액을 첨가한 후 균질기로 균질화시킨 다음에  $4^\circ\text{C}$ , 10,000g에서 원심분리하여 상등액을 취하였다. LPO kit (Calbiochem, LaJolla, CA)를 사용하여 상등액의 지질산화도를 분석하였으며, 단백질 함량은 Bradford법<sup>(35)</sup>으로 측정하였다. SDH 활성은 Asada 와 Galambos의 방법<sup>(36)</sup>에 기초한 Sigma 사의 kit (Sigma, St. Louis, MO)를 이용하여 측정하였다.

### 2.3 통계처리

실험결과는 ANOVA Student-Newman-Keuls t-test를 이용하였으며  $P < 0.05$ 에서 유의성을 인정하였다.

## 3. 결과

4 mmol/kg의 2-NP을 주사한 후 24 시간이 지난 다음 LPO를 조사하였을 때, 간에서는 초기에 비해 2.4배 ( $P < 0.0001$ , 초기:  $0.51 \pm 0.06$  (SEM) nmol/mg protein) 증가하였으며 폐 ( $P < 0.05$ )와 신장 ( $P < 0.0001$ )에서도 증가하였다. 그리고 SDH 활성도 초기에 비해 470배 증가하였다 (Fig. 1). LPO 및 SDH 활성은 2-NP의 투여 농도 증가에 따라 역시 증가하였다 (Fig. 2).

멜라토닌을 2.5, 5, 10 mg/kg의 농도로 투여 시, 모든 조직에서 LPO 및 SDH 활성은 멜라토닌 농도에 따라 감소하였으며 5, 10 mg/kg의 농도에서는 유사한 효과를 보였다 (Fig. 3). 그리고 폐와 신장에서는 2-NP만을 투여한 군에 비하여 5, 10 mg/kg의 멜라토닌을 투여한 군에서 LPO가 유의적으로 감소하였다.

멜라토닌의 농도를 200 mg/kg 수준으로 높여도 2-NP의 독성에 대한 효과는 유사하였다 (data not shown).

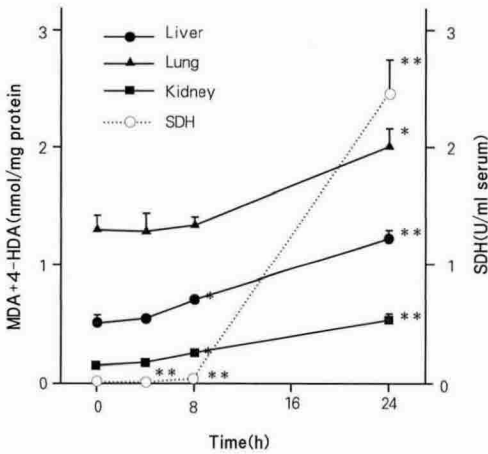


Fig. 1. The levels of lipid peroxidation products (malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxyalkenals (4-HDA)) in rat tissues and sorbitol dehydrogenase (SDH) activity in serum with time after injection of 4 mmol/kg 2-nitropropane (2-NP). Values are means±SEM (N=6). Points marked with a single or double asterisk are significantly higher than 0-time value at  $p < 0.05$  and  $p < 0.0001$ , respectively.

#### 4. 고찰

간암을 유발하는 물질로 알려진 2-NP은 간세포의 DNA와 RNA에 손상을 일으켜 8-hydroxydeoxyguanosine, 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine과 같은 변환된 염기를 생성하고 (15, 18, 37, 38) 간 손상의 지표인 aspartate transaminase와 alanine transaminase와 같은 효소 (39)의 활성도 증가시킨다. 그리고 지질손상과 관련된 연구도 일부 수행되었는데, Haas-Jobelius 등 (40)은 2-NP를 4일간 100 ppm의 양으로 흡입시에는 microsome의 지질산화에 영향이 없다고 보고하였으나 Hasegawa 등 (13)은 100 mg/kg의 2-NP 복강내 주사가 혈청과 간의 지질산화를 증가시

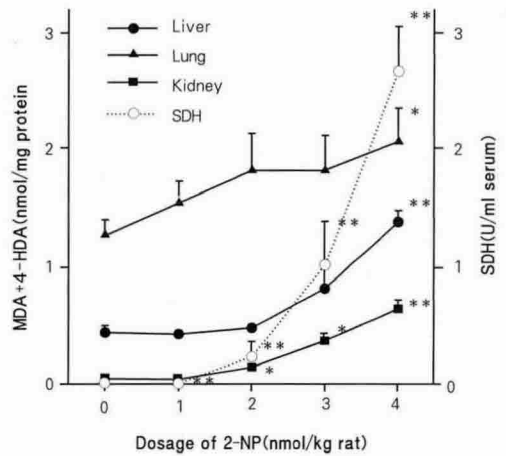


Fig. 2. The induction of MDA and 4-HDA in rat tissues, and SDH activity in serum with increasing doses of 2-NP 24 h after the injection of the secondary nitroalkane. Values are means±SEM (N=6). Points marked with a single or double asterisk are significantly higher than value of non-treated group with  $p < 0.05$  and  $p < 0.0001$ , respectively.

켰다고 보고하였다. 여기서 두 연구결과가 상이한 것은 투여농도와 노출방법의 차이에 기인한 것으로 여겨졌지만 지질산화에 대해서는 여전히 많은 연구가 이루어지지 않은 관계로 본 연구에서는 2-NP의 독성의 지표로서 지질산화를 선정하였다. 그리고 2-NP이 모든 조직에서 광범위하게 지질을 손상시키는지 아니면 주 대상인 간에만 손상을 일으키는 지 확인하기 위하여 간 이외에 폐와 신장을 분석하였다. 간에서는 2-NP이 지질산화를 유의적으로 증가시켰는데, 다른 연구자들 (13, 40)이 사용한 농도보다 높아 지질산화도가 높은 것으로 여겨졌다. 2-NP의 간 독성을 확인하기 위하여 LPO 이외에 간의 손상시 혈액에서 활성이 증가하는 효소 중의 하나인 SDH의 활성을 측정하였는데 2-NP에 의한 뚜렷한 증가를 보였다 (Fig. 1과 2). 폐 (1.8배)와 신장 (3.5배)에서도 지질산화가 크게 증가한 것으로

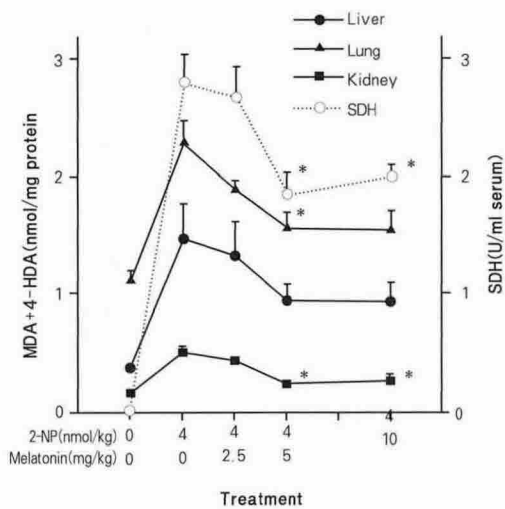


Fig. 3. The suppressive effect of melatonin at increasing doses on MDA and 4-HDA levels and on SDH activity in serum in rats treated with 4 mmol/kg 2-NP. Melatonin was given 30 min before the 2-NP injection, and each parameter was analyzed after 24 h. Values are means  $\pm$  SEM (N=6). Points marked with a single asterisk are significantly lower than values of 2-NP group with a  $p < 0.05$ .

보아 이 두 조직 역시 2-NP에 의해 손상을 받는 대상임을 알 수 있었다. 그러므로 2-NP은 생체내의 모든 조직의 지질에 손상을 줄 수 있다고 여겨졌다.

2-NP의 독성 기작에 대해서는 알려져 있는 것이 많지 않은데, 최근에 대사과정 중에 propane 2-nitrate<sup>(5,41)</sup>, nitric oxide (NO·)<sup>(19)</sup>, ROO· 및 nitrogen dioxide radical<sup>(42)</sup>을 형성하는 것으로 알려졌다. 이 대사물질들은 직접 또는 다음 단계의 대사과정 후에 DNA를 손상시킬 수 있는 물질로 알려져 있다. NO·는 superoxide anion radical (O<sub>2</sub>·<sup>-</sup>)과 반응하여 ONOO<sup>-</sup>을 형성하고<sup>(43)</sup> 이것은 HO·나 유사 radical로 분해될 수 있다<sup>(44,45)</sup>. ONOO·와 HO·는 지질을 산화시킬 수

있으므로<sup>(46)</sup> 2-NP에 의한 NO·의 체내 과잉생산이 2-NP 투여에 의한 지질산화의 증가를 가져오는 것으로 추정된다<sup>(47)</sup>. 세포막의 지질이 산화되면 세포의 기능이 파괴되고, 이것이 심각해지면 세포는 사멸하게 된다. 그러므로 간에서의 지질산화는 간세포를 파괴하게되고 이로서 간에 존재하는 SDH가 유출되어 혈액내에서의 활성이 증가된다고 추정된다. 그리고 2-NP에 의한 지질산화의 유도는 지질의 손상 뿐 아니라 그 산물인 malondialdehyde나 4-hydroxynonenal이 단백질<sup>(48)</sup> 또는 DNA<sup>(49)</sup>들과 반응하여 2차적으로 그 성분들을 손상시킬 수 있다는 점에서도 중요하다.

송과선에서 분비되는 호르몬인 멜라토닌은 최근에 free radical이나 활성산소를 제거하고, 다양한 물리·화학적 요소에 의해 유도되는 지질산화를 억제할 수 있는 것으로 보고되고 있다<sup>(50)</sup>. 그리고 멜라토닌은 NO·에 의해 유도된 지질산화도 억제할 수 있는 것으로 최근에 밝혀졌다<sup>(51)</sup>. 본 연구에서 멜라토닌은 2-NP에 의해 유도된 지질산화를 억제할 수 있으며, SDH 활성으로 측정된 간 기능도 보호할 수 있는 것으로 나타났다. SDH 활성 억제는 멜라토닌이 간세포의 지질산화를 억제시킴으로써 간세포를 보호한 것이 여겨졌다. 멜라토닌은 폐와 신장도 효과적으로 보호할 수 있는데 이는 멜라토닌이 쉽게 이들 장기로 들어가서 보호작용을 할 수 있음을 의미한다. 즉, 멜라토닌은 저분자이면서 독특하게 지용성<sup>(52)</sup>과 수용성<sup>(53)</sup>의 특성을 지니는 관계로 세포의 모든 부위에 쉽게 도달하여 세포를 보호할 수 있다고 알려져 있다<sup>(25,28,50)</sup>. 그리고 멜라토닌이 지질산화를 억제시킬 수 있는 능력은 다양한 radical에 대한 소거능<sup>(24,25,51)</sup> 뿐 아니라 생체막을 안정화시키는 작용<sup>(54,55)</sup>도 관련된 것으로 추정된다.

일부 다른 항산화제도 2-NP의 독성을 줄일 수 있는 것으로 알려져 있는데 녹차, catechin<sup>(13)</sup>, 비타민 E, ellagic acid, epigallocatechin gallate 등<sup>(56)</sup>이 2-NP에 의한 DNA 손상을 줄이는 것으로 알려졌다. 멜라토닌도 간에서 2-NP에 의해 유도된 8-hydroxydeoxyguanosine의 양도 유의적

으로 감소시킬 수 있는 것으로 조사되었다 (data not shown). 그러나 효소활성으로 조사된 간 기능의 보호 작용에서는 멜라토닌이 효과가 있는 반면 비타민 C, E, ellagic acid, epigallocatechin gallate,  $\beta$ -carotene 등의 항산화제는 효과가 없는 것으로 알려졌다<sup>(56)</sup>.

본 연구를 통하여 2-NP이 간, 폐, 신장에서 LPO 및 SDH 활성을 두드러지게 증가시키고, 멜라토닌은 한번의 투여를 통하여서도 효과적으로 2-NP의 독성을 줄일 수 있음이 확인되었다. 그리고 이러한 결과로부터 free radical에 의한 세포손상을 일으키는 독성물질에 대하여 멜라토닌의 약리학 적 임상적용이 가능하리라 여겨진다.

### 감사의 말

본 연구는 한국식품개발연구원, 한국과학재단, The University of Texas Health Science Center at San Antonio의 Reiter 박사 등의 후원으로 이루어진 연구결과의 일부로서 심심한 감사를 드립니다.

### 참고문헌

1. IARC(International Agency for Research on Cancer). Some industrial chemicals and dyestuffs. In: Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to human. WHO, Lyon, pp. 331-343. 1982.
2. Hoffmann, D.:Rathkamp, G. Chemical studies on tobacco smoke. III. Primary and secondary nitroalkanes in cigarette smoke. *Beitr. Tabakforsch-hung.* 4:124-134:1968.
3. Zitting, A.:Savolainen, H.:Nickels, J. Acute effects of 2-nitropropane on rat liver and brain. *Toxicol. Lett.* 9:237-246:1981.

4. Lewis, T.R.:Ulrich, C.E.:Busey, W.M. Subchronic inhalation toxicity of nitromethane and 2-nitropropane. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 2:233-249:1979.
5. Fiala, E.S.:Czerniak, R.:Castonguay, A.:Conaway, C.C.:Rivenson, A. Assay of 1-nitropropane, 2-nitropropane, 1-azoxypropane and 2-azoxypropane for carcinogenicity by gavage in Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis.* 8:1947-1949:1987.
6. Fiala, E.S.:Conaway, C.C.:Biles, W.T.:Johnson, B. Enhanced mutagenicity of 2-nitropropane nitrate with respect to 2-nitropropane-possible involvement of free radical species. *Mutat. Res.* 179:15-22:1987.
7. Dayal, R.:Gescher, A.:Harpur, E.S.:Pratt, I.:Chipman, J.K. Comparison of the hepatotoxicity in mice and the mutagenicity of three nitroalkanes. *Fund. Appl. Toxicol.* 13:341-348:1989.
8. Andrae, U.:Homfeldt, H.:Vogl, L.:Lichtmannegger, J.:Summer, K.H. 2-Nitropropane induces DNA repair synthesis in rat hepatocytes in vitro and in vivo. *Carcinogenesis.* 9:811-815:1988.
9. Davies, J.E.:Mynett, K.:Gescher, A.:Chipman, J.K. DNA modification and repair by 2-nitropropane is extensive in hepatocytes of rats compared to those of human and mice. *Mutat. Res.* 287:157-164:1993.
10. Petrelli, G.:Siepi, G.:Miligi, L.:Vineis, P.:Solvents in pesticides. *Scand. J. Work Environ. Health.* 19:63-65:1993.

11. Guo, N.;Conaway, C.C.;Hussain, N.S.;Fiala, E.S. Sex and organ differences in oxidative DNA and RNA damage due to treatment of Sprague-Dawley rats with acetoxime or 2-nitropropane. *Carcinogenesis*. 11:1659-166:1990.
12. Deng, X.S.;Tuo, J.;Poulsen, H.E.;Loft, S. 2-Nitropropane-induced DNA damage in rat bone marrow. *Mutat. Res.* 391:165-169:1997.
13. Hasegawa, R.;Chujo, T.;Sai-Kato, K.;Umamura, T.;Tanimura, A.;Kurokawa, Y. Preventive effects of green tea against liver oxidative DNA damage and hepatotoxicity in rats treated with 2-nitropropane. *Food Chem. Toxicol.* 33:961-970:1995.
14. Sodum R.S.;Fiala E.S. Amination of tyrosine in liver cytosol protein of male F344 rats treated with 2-nitropropane, 2-nitributane, 3-nitropentane, or acetoxime. *Chem. Res. Toxicol.* 10:1420-1426:1997.
15. Fiala, E.S.;Conaway, C.C.;Mathis, J.E. Oxidative DNA and RNA damage in the livers of Sprague-Dawley rats treated with the hepatocarcinogen 2-intropropane. *Cancer Res.* 49:5518-5522:1989.
16. Robbiano, L.;Mattioli, F.;Brambilla, G. DNA fragmentation by 2-nitropropane in rat tissues, and effects of the modulation of biotransformation processes. *Cancer Lett.* 57:61-66:1991.
17. Sodum, R.S.;Nie, G.;Fiala, E.S. 8-Aminoguanine:a base modification produced in rat liver nucleic acids by the hepatocarcinogen 2-nitropropane. *Chem. Res. Toxicol.* 6:269-276:1993.
18. Adachi, S.;Kawamura, K.;Takemoto, K. Increased susceptibility to oxidative DNA damage in regenerating liver. *Carcinogenesis*. 15:539-543:1994.
19. Kohl, C.;Morgan, P.;Gescher, A. Metabolism of the genotoxicant 2-nitropropane to a nitric oxide species. *Chem. Biol. Interact.* 97:175-184:1995.
20. Kohl, C.;Gescher, A. Denitrification of the genotoxicant 2-nitropropane: relationship to its mechanism of toxicity. *Xenobiotica*. 27:843-852: 1997.
21. Tan, D.-X.;Chen, L.-D.;Poeggeler, B.;Manchester, L.C.;Reiter, R.J. Melatonin:a potent, endogeneous hydroxyl radical scavenger. *Endocr. J.* 1:57-60:1993.
22. Matuszak Z.;Reszka, K.;Chignell, C.F. Reaction of melatonin and related indoles with hydroxyl radicals: EPR and spin trapping investigations. *Free Rad. Biol. Med.* 23:367-372:1997.
23. Stasica, P.;Ulanski, P.;Roriak, J.M. Melatonin as a hydroxyl radical scavenger. *J. Pineal Res.* 41:229-236:1998.
24. Gilad, E.;Guzzocrea, S.;Zingarelli, B.;Salzman, A.L.;Szab, C. Melatonin is a scavenger of peroxyxynitrite. *Life Sci.* 60:PL 169-174:1997.
25. Cuzzocrea, S.;Zingarelli, B.;Gilad, E.;Hoke, P.;Salzman, A.L.;Szabo, C. Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxyxynitrite scavenging activity. *J. Pineal Res.*

- 23:106-116:1997.
26. Pieri, C.:Marra, M.:Moroni, F.:  
Recchioni, R.:Marcheselli, F.  
Melatonin: a peroxy radical scavenger  
more effective than vitamin E. *Life  
Sci.* 55:PL271-276: 1994.
  27. Reiter, R.J.:Poeggeler, B.:Chen, L.-  
D.:Manchester, L.C.:Guerrero, J.M.  
Antioxidant capacity of melatonin:A  
novel action not requiring a receptor.  
*Neuroendocrinol. Lett.* 15:103-116: 1993.
  28. Reiter, R.J. Oxidative processes and  
antioxidant defense mechanisms in  
the aging brain. *FASEB J.* 9:526-533:  
1995.
  29. Melchiorii, D.:Reiter, R.J.:Attia,  
A.:Hara, M.:Burgos, A.:Nistico, G.  
Potent protective effect melatonin on  
in vivo paraquat induced toxicity. *Life  
Sci.* 56:83-88:1995.
  30. Sewerynek, E.M.:Abe, M.:Reiter,  
R.J.:Barlow-Walden, L.R.:Chen, L.-  
D.:McCabe, T.J.:Roman, L.J.:Diaz-  
Lopez, B.Melatonin administration  
prevents lipopolysaccharide-induced  
oxidative damage in phenobarbital-  
treated animals. *J. Cell. Biochem.*,  
58:436-444:1995.
  31. Vijayalaxmi:Reiter, R.J.:Meltz, M.L.  
Melatonin protects human blood  
lymphocytes from radiation-induced  
chromosome damage. *Mutat. Res.*  
346:23-31:1995.
  32. Vijayalaxmi:Reiter, R.J.:Sewerynek,  
E.:Poeggeler, B.:Meltz, M.L. Marked  
reduction of radiation-induced micro-  
nuclei in human blood lymphocytes  
pretreated with melatonin. *Radiat. Res.*  
143:102-106:1995.
  33. De La Lastra, C.A.:Cabeza, J.:Motilva,  
V.:Martin, M.J. Melatonin protects  
against gastric ischemia-reperfusion  
injury in rats. *J. Pineal Res.* 23:47-  
52:1997.
  34. Prince, F.G.:Juknat, A.A.:Maxit,  
A.G.:Cardalda, C.:Batlle, A. Mela-  
tonin's antioxidant protection against  
delta-aminolevulinic acid-induced  
oxidative damage in rat cerebellum.  
*J. Pineal Res.* 23:40-46:1997.
  35. Bradford, M. Rapid and sensitive  
method for quantification of protein  
utilizing the principle of protein-dye  
binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254:  
1972.
  36. Asada, M.:Galambos, J.T. Sorbitol  
dehydrogenase and hepatocellular  
injury:An experimental and clinical  
study. *Gastroenterology.* 44:578-587:  
1963.
  37. Fiala, E.S.:Nie, G.:Sodum, R.:Conaway,  
C.C.:Sohn, O.S. 2-Nitropropane-  
induced liver DNA and RNA base  
modifications:differences between  
Sprague-Dawley rats and New  
Zealand White rabbits. *Cancer Lett.*  
74:9-14:1993.
  38. Hussain, N.S.:Conaway, C.C.:Guo,  
N.:Asaad, W.:Fiala, E.S. Oxidative  
DNA and RNA damage in rat liver  
due to acetoxime: similarity to effects  
of 2-nitropropane. *Carcinogenesis.*  
11:1013-1016:1990.
  39. Prasada, R.S.K.:Hariharag, M.K.  
Biochemical methods of studying  
hepatotoxicity. In:Meeks, R.G.:  
Harrison, S.D.:Bull, R.J. (Eds),  
Hepatotoxicology. CRC Press, Boca

- Raton, pp. 241-326:1991.
40. Haas-Jobelius, M.;Coulston, F.;Korte, F. Effects of short-term inhalation exposure to 1-nitropropane and 2-nitropropane on rat liver enzymes. *Ecotoxicol. Environ. Safety*. 23:253-259:1992.
  41. Kohl, C.;Mynett, K.;Davies, J.E.;Gescher, A.;Chipman, J.K. Propane 2-nitronate is the major genotoxic form of 2-nitropropane. *Mutat. Res.* 321:65-72:1994.
  42. Bors, W.;Michel, C.;Dalke, C.;Stettmaier, K.;Saran, M.;Andrae, U. Radical intermediates during the oxidation of nitropropanes. The formation of NO<sub>2</sub> from 2-nitropropane, its reactivity with nucleosides, and implications for the genotoxicity of 2-nitropropane. *Chem. Res. Toxicol.* 6:302-309:1993.
  43. Lipton, S.A.;Choi, Y.B.;Pan, Z.H.;Lei, S.Z.;Chen, H.S.V.;Sucher, N.J.;Loscalzo, J.;Singel, D.J.;Stamler, J.S. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso compounds. *Nature*. 364:626-632:1993.
  44. Beckman, J.S.;Beckman, T.W.;Chen, J.;Marshall, P.A.;Freeman, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87:1620-1624:1990.
  45. Radi, R.;Beckman, J.S.;Bush, K.M.;Freeman, B.A. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. *J. Biol. Chem.* 266:4244-4250:1991.
  46. Rodenas, J.;Mitjavila, M.T.;Carbonell, T. Simultaneous generation of nitric oxide and superoxide by inflammatory cells in rats. *Free Rad. Biol. Med.* 18:869-875:1994.
  47. Kanner, J.;Harel, S.;Granit, R. Nitric oxide, and inhibitor of lipid oxidation by lipoxygenase, cyclooxygenase and hemoglobin. *Lipids*. 24:46-49:1992.
  48. Mooradian, A.D.;Lung, C.C.;Shah, G.;Mahmoud, S.;Pinnas, J.L. Age-related changes in tissue content of malondialdehyde-modified proteins. *Life Sci*. 55:1561-1566:1994.
  49. Park, J.-W.;Floyd, R.A. Lipid peroxidation products mediate the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA. *Free Rad. Biol. Med.* 12:245-250:1992.
  50. Reiter, R.J.;Tan, D.-X.;Kim, S.J.;Qi, W. Melatonin as a pharmacological agent against oxidative damage to lipids and DNA. *Proc. West Pharmacol. Soc.* 41:229-236:1998.
  51. Escames, G.;Guerrero, J.M.;Reiter, R.J.;Garcia, J.J.;Munoz-Hoyos, A.;Ortiz, G.G.;Oh, C.C. Melatonin and vitamin E limit nitric oxide-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates. *Neurosci. Lett.* 230:147 - 150:1997.
  52. Reiter, R.J.;Tan, D.-X.;Poeggeler, B.;Mendez-Pelaez, A.;Chen, L.-D.;Saarela, S. Melatonin as a free radical scavenger: implications for aging and age-related diseases. *Ann. NY Acad. Sci.* 719:1-12: 1994.
  53. Shida, C.S.;Castrucci, A.M.L.;Lamy-Freund, M.T. High melatonin solu-



- bility in aqueous medium. *J. Pineal Res.* 16:198-201:1994.
54. Garcia, J.J.;Reiter, R.J.;Guerrero, J.M.;Escames, G.;Yu, B.P.;Oh, C.S.;Muñoz-Hyos, A. Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. *FEBS Lett.* 408:297-300:1997.
55. Garcia, J.J.;Reiter, R.J.;Ortiz, G.G.;Oh, C.S.;Tang, L.;Yu, B.P.;Escames, G. Melatonin enhances tamoxifen's ability to prevent the reduction in microsomal membrane fluidity induced by lipid peroxidation. *J. Membrane Biol.* 162:59-65:1998.
56. Takagi, A.;Sai, K.;Umemura, T.;Hasegawa, R.;Kurokawa, Y. Inhibitory effects of vitamin E and ellagic acid on 8-hydroxydeoxy-guanosine formation in liver nuclear DNA of rats treated with 2-nitropropane. *Cancer Lett.* 91:139-144: 1995.
-