

## 오존처리에 의한 Bromate의 생성 및 흰쥐의 신장독성에 미치는 영향

정운용 · 이무강 · 최종원\*

경성대학교 환경문제연구소

### Bromate Formation by Ozonation Process and It's Effect on Renal Toxicity in rat

Unyong Chung, Mukang Lee and Jongwon Choi\*

Environmental Science and Technology Research Center, Kyungsoong University, Busan 608-736, Korea

#### Abstract

In order to investigate the effects of pH and temperature on the formation of bromate ion, which is ozonation by-products of bromine containing natural water. At the same initial pH condition, the increase of pH shown similar trends even if the reaction variables such as temperature and reaction time of ozonation were changed. As pH and temperature were increasing, the bromate concentration was increased but bromine components (HOBr/OBr<sup>-</sup>) were decreased with increasing pH from 3 to 10. Lipid peroxide content in the kidney was increased by bromate which was ingestion with 0.4g/L for 24 weeks in drinking water. Renal cytosolic enzyme system (XO, AO) of bromate group were significantly increased in comparison with those of normal group. But microsomal enzyme system were not affected. BUN level and urinary  $\gamma$ -glutamyltransferase activity were significantly increased in comparison with those of the normal. But, urinary lactate dehydrogenase activity was not affected. Renal glutathione content of rat was significantly decreased in comparison with those of normal rat given bromate. Renal glutathione S-transferase and  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase activities were significantly decreased in bromate-treated group, but change in renal glutathione reductase activity was not significantly different from any other experimental group.

**Key words** – Bromate, Renal toxicity, xanthine oxidase,  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase

#### 서 론

해수를 이용하는 양식장이나 또는 이를 냉각수로 이용하는 발전소등에서 미생물에 의한 오염을 방지하기 위해 오존처리를 하는 경우가 많다. 오존(O<sub>3</sub>)은 산화력이 강한 물질로서, 원형질 등에 직접작용하여 세포를 살상하기 때문에 많은 분야에서 살균제로 사용되고 있다. 특히 정수장의 소독

뿐만 아니라 강한 산화력으로 인한, 탈취, 탈색, 탁도의 제거와, 암모니아 및 아질산의 산화등의 효능을 가지고 있기 때문에 병원미생물의 살균과 배출수의 수질정화를 목적으로 다용도로 사용되고 있다[48]. 해수를 이용하는 양식장인 경우에는 해수중에 존재하는 브롬이온(Br<sup>-</sup>)이나 염소(Cl<sup>-</sup>)이온 등이 오존과 반응하여 oxidant를 생성하기[10,11] 때문에 담수와는 다른 살균기구가 존재할 가능성이 있다[47,51]. 또한 고가(高價)의 오존 처리장치를 양식장에 설치하여도 살균의 기대효과가 얻어지지 않거나, 오존처리를 과잉으로 할 경우에는 양식하는 고기의 사멸을 초래하는 경우가 많으므로

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel : 051-620-4883, Fax : 051-628-6540  
E-mail : jwchoi@star.ks.ac.kr

[11], 적절한 기준을 설정하는 것이 바람직하다. 담수중의 브롬화합물은 지질의 생성, 해수의 침입과 인위적인 요인에 의해 존재하게 된다. 인위적인 요인으로는 농약, 비료, 산업 폐수 및 도시 하수등의 유입에 의한 것이다[27]. 상수원수에 극히 낮은 브롬이온의 농도(지하수: <2 mg/l, 지표수: < 0.8 mg/l)가 포함하고 있을 지라도 오존처리에 의해 유기브롬화물 및 무기브롬화합물의 산화분해에 의해 브롬산화물 및 무기산화물(TRO; Total Residual Oxidant)등을 생성하게 된다. 또한 차아브롬산(Hypobromous acid: HOBr)도 동시에 생성하게 되며, 더욱 산화가 진행되면 Bromate(BrO<sub>3</sub>)를 생성하게 된다[53]. 이러한 TRO 및 BrO<sub>3</sub><sup>-</sup> 등은 장기간 동물이 섭취하면 신장등에 치명적인 영향을 미치는 발암성 물질로 알려져 있다[21,53]. 오존(O<sub>3</sub>)의 산화반응은 유기물과 직접적으로 반응하는 직접반응과 오존이 수중에서 분해되어 생성되는 radical 혹은 과산화물(peroxides) 등이 유기물을 산화 시키는 간접 반응으로 대별 할수 있다. 직접반응인 경우에는 매우 선택적으로 반응하기 때문에 어떤 특정 물질에 대해서는 반응속도가 대단히 느리게 반응하는 경우도 있다. 오존이 강력하고 효율적인 산화제로 알려져 있는 이유는 반응물과 직접 반응하는 경로 이외에도 오존 스스로가 먼저 분해되어 강력한 반응성을 가지는 hydroxyl radical(·OH)를 생성할 수 있기 때문인 것으로 알려져 있다. 이 hydroxyl radical은 매우 반응성이 높아서 오존과 같이 선택적으로 반응하는 것이 아니라 용존해 있는 거의 모든 유기물과는 물론 무기물과도 무차별적으로 반응하며 강력한 산화력을 가지고 있다. Werner등은 수중에서 ozone이 유기물질(M)을 분해시키는 반응경로를 오존과 유기오염물과의 직접반응(direct reaction), 오존이 수중에서 먼저 분해되어 생성된 hydroxyl radical이 유기오염물과 반응하는 간접반응(radical reaction)으로 구분하였다. 이들 두 가지 반응경로(Fig. 1)를 설명할 수 있다[52].

또한 Br<sup>-</sup>을 포함하는 수용액에 오존을 주입하면 Br<sup>-</sup>은 HOBr을 생성하게 되며, pH의 조건에 따라 OBr<sup>-</sup>, HOBr의 형태로 존재하게 된다[51,20]. 이들은 또 다른 O<sub>3</sub> 분자와 반응을 진행하여 BrO<sub>3</sub><sup>-</sup>로 산화됨과 동시에 Br<sup>-</sup>을 생성한다. BrO<sub>3</sub><sup>-</sup>의 생성에 대한 반응식은 다음과 같이 표시할 수 있다 [17,20,23,30].

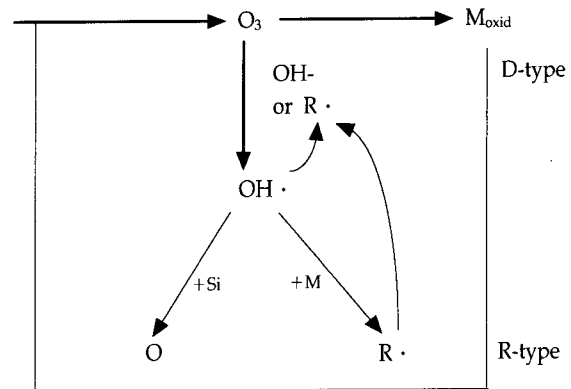
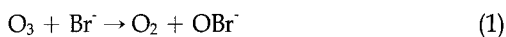
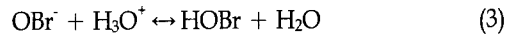
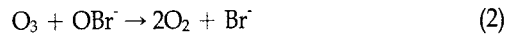


Fig. 1. Reactivity of ozone.



(1)~(3)식에서 중간체인 HOBr의 농도는 pH가 낮을수록 증가하게 되고 (1)~(4)식에서 (2)식의 반응속도가 가장 빠르다는 연구가 보고되고 있으므로[21] (2)식의 반응이 BrO<sub>3</sub><sup>-</sup>의 생성에 큰 영향을 줄 것으로 생각된다.

최근 환경 오염물질을 포함한 외인성 독성 물질은 여러 가지 대상성 질환인 당뇨, 고혈압, 백내장, 고지혈증 및 암의 발생과정과 염증성 질환의 발생 요인을 자극물, 방사선 물질 virus인자 및 화학물질에 의한 것 뿐만 아니라 유전자 효소 및 호르몬의 부조화 등의 내인성 인자가 관여하고 있는 것으로 알려져있다[19,43]. 특히 외인적 요소로서는 체내에 들어오면 필연적으로 다른 물질로 바뀌어지며 이러한 이차성 물질이 대상성 질환의 주요 원인 물질로 알려 지면서 여러 학자들[7,8]에 의하여 많은 연구 대상이 되고 있다. 이차성 물질인 활성 산소는 단백질의 SH기와 반응하여 효소의 반응성을 잃게 하거나 cross-linking bridge의 촉진, DNA, RNA 및 세포막에 손상을 일으켜 세포괴사를 일으키든지 또한 여러 가지 대상성 질환을 초래한다[5,28]. 활성 산소란 분자 혹은 원자의 최외각 전자궤도에 unpair electron을 가진 불안정한 화합물의 총칭으로 생체의 대사과정에서 부산물로 생성되는 물질로서 이는 반응성이 큰 화학물질이며 또한 세포의 거대분자의 훼손에 관여하는 독성 대사물질이다. 이들중 bromate는 화학적 산화제로서 폐수, 맥주, 치즈 및 생활하수에 포함된 오염물이다[35,50]. 체내에 섭취된 bromate는 위장관을 통하여 쉽게 흡수되어지며 이는 비립프관

경로에 의하여 수송되어 활성산소를 생성하여 여러 가지 독성을 일으키는 물질로 특히 신장에 심한 손상을 주는 물질 [14,37]로 알려져있으나 이들에 대한 기전은 확실하게 밝혀져 있지 않은 실정이다. 이에 본 연구에서는 수중에 Br<sup>-</sup>이 존재할 경우 온도와 pH 변화에 따른 bromate(BrO<sub>3</sub><sup>-</sup>)의 생성량을 구명하고 이때 생성되는 bromate가 동물의 신장독성의 발병 기전을 효소학적인 차원에서 구명하므로써 본 오염물질로 야기되는 질병의 예방 및 치료에 기초적인 자료를 제시하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험장치

본 연구에 사용한 실험장치(Fig. 2)로서 오존발생기는 독일제 Fischer 500을 사용하였으며, 순수한 산소기체를 1 l/min으로 주입하면서 오존발생기의 방전전류를 0.7A로 조정하여 오존을 발생 시켰다. 이때 발생한 오존농도는 약 27.28 mg/l 이었다. 또한, 발생한 오존가스는 반응조의 밑 부분에 설치한 glass filter를 개조한 산기관을 통하여 반응조에 주입하여 오존화 반응을 수행하였다. 반응조내의 반응물질은 KBr을 사용하였으며, 반응온도는 15~30℃, 반응시간은 5~40분으로 하였다. 수용액에 염소화합물이나 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>등이 존재할 경우에는 이러한 무기화합물들은 오존과의 반응시에 scavenger로서 작용[3,36]하므로, 본 연구에서 사용한 증류수는 오존화 반응을 수행하기 전에 오존으로 처리하고, 잔류오존이 없어질 때까지

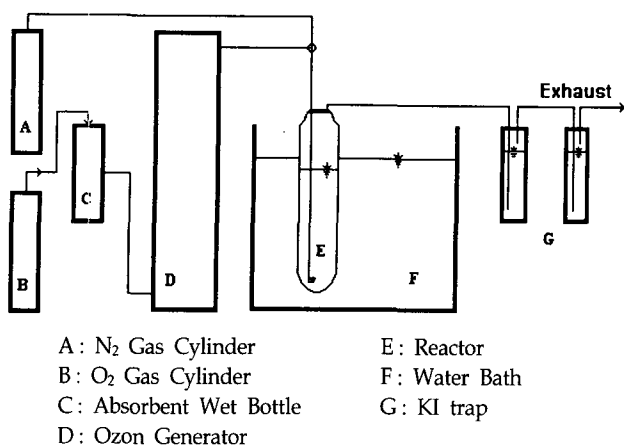


Fig. 2. Experimental apparatus of ozonation.

He가스로 치환한 용액을 실험에 사용하였다. 또한, pH조절은 1N NaOH와 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>용액으로 조절하였다. 반응시간에 따라 생성된 BrO<sub>3</sub><sup>-</sup> 및 차아브롬산은 각 반응시간이 끝난 후, 요오드 적정법[52]을 사용하여 농도를 측정하였다. Br<sup>-</sup>농도는 Standard Method(APHA, 1992)의 Phenol Red Colorimetric Method에 의해 분석을 하였고 UV-Spectrometer는 CECIL 9050을 사용하였다.

### 동물 및 처치

실험동물은 (주) bio-Link(충북, 음성)로부터 분양받아 동물사의 일정한 조건(온도 : 20±2℃, 습도 : 40-60%, 명암 : 12시간 light/dark cycle)하에서 2주가량 충분히 적응시켜 사육한 체중 100-120g의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 사용하였고, 실험 시작 전 24시간 동안 물만 주고 절식하였다. 이때 효소 활성의 일중 변동을 고려하여 실험동물을 일정 시간(오전 10:00-12:00) 내에서 처치하였다. Potassium bromate (KBrO<sub>3</sub>)를 음료수에 0.1, 0.2, 0.4 g/L되게 첨가하여 실험동물에 물대신에 임의되로 섭취케 하였다.

### 혈청 분리 및 효소원의 조제

동물을 CO<sub>2</sub> gas로 가볍게 마취시킨 후, 복부 정중선을 따라 개복하고 복부 대동맥에서 혈액을 채취한 전혈의 일정량을 CBC bottle에 넣고 나머지 혈액은 실온에서 30분간 방치하여 응고시킨 다음, 원심분리기로 600xg에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리시켜 실험에 사용하였다. 신장을 적출하여 생리식염수로 씻은 다음 여지로 간에 남아 있는 혈액 및 기타 이물질을 제거한 다음 신장조직 1g 당 4배 양의 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 가하여 빙냉상에서 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄액을 냉장 원심분리기로 600xg에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 상등액을 10,000xg에서 20분간 원심분리하여 침전물인 mitochondria를 분리하였다. 상등액은 다시 초고속 원심분리기로 105,000xg에서 1시간 원심분리하여 cytosolic 분획으로, 침전물은 동량의 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.4) 용액을 가하여 현탁시킨 시료액을 다시 105,000xg에서 1시간 재원심분리하여 microsomal 분획을 얻었다. 이때 얻은 cytosolic 분획은 xanthine oxidase, aldehyde oxidase 및 glutathione S-transferase의 활성 측정용 효소원으로 사용하였으며, microsomal 분획은

cytochrome P-450, aminopyrine N-demethylase 및 aniline hydroxylase 의 활성 측정용 효소원으로 사용하였다.

효소활성 및 함량 측정

Blood urea nitrogen의 측정은 시판 kit(Iatron Lab. Japan)를 사용하여 urease-indophenol법[47]으로 측정하였다. 뇨중 lactate dehydrogenase의 활성 측정[44]은 6.3M NAD와 50mM L-lactate를 함유하는 환중액(pH 8.9)의 반응액에 뇨를 가하여 340nm에서 흡광도의 증가를 측정하였다.  $\gamma$ -Glutamyltransferase의 활성 측정[46]은 40mM glycylglycine을 함유하는 완충액(pH 8.2)의 반응액에 뇨를 가하여 405nm에서 흡광도를 측정하여 생성되는 p-nitroaniline을 측정하였다. 지질과산화의 함량(MDA) 측정은 Ohkawa 등의 방법[33], glutathione의 농도 측정은 Ward법[50], cytochrome p-450의 함량 측정은 Omura와 Sato 등의 방법[34], Aminopyrine N-demethylase의 활성 측정은 Nash의 방법[32], Aniline hydroxylase의 활성 측정은 Bidladlck과 Lowery의 방법[6], Xanthine oxidase의 활성 측정은 Stirpe과 Della의 방법[45], Aldehyde oxidase의 활성 측정은 Rajagopalan 등의 방법[38], Glutathione S-transferase의 활성 측정은 Habig 등의 방법[22],  $\gamma$ -Glutamylcystein synthetase의 활성 측정은 Richman과 Meister의 방법[40], Glutathione reductase의 활성 측정은 Ferrone등의 방법[15] 및 단백질의 정량은 Lowry 등의 방법[26]에 준하여 측정하였다.

결 과

온도 및 pH 변화에 대한  $BrO_3^-$ 의 생성

수용액의 pH, 반응온도 및 pH변화에 대한  $BrO_3^-$ 의 생성 농도로서(Fig. 3, 4, 5) 반응온도가 15°C일 경우에  $BrO_3^-$ 의 생성량은 반응시간의 증가에 따라 증가를 보이고 있지만, pH 7과 10에서는 변화가 거의 없었으나 pH 3에서 보다는 다소 증가하였다. 반응온도가 20°C와 30°C인 경우에 반응시간에 대한  $BrO_3^-$ 의 생성은 산성영역이나 중성영역 보다는 알칼리성 영역에서 보다 많이 생성됨을 알 수 있었고, 또한 반응온도가 높을수록 생성된  $BrO_3^-$ 농도는 증가를 보였다.

신장중 지질과산화(MDA)생성에 미치는 영향

Potassium bromate를 음료수중에 0, 0.1, 0.2, 0.4g/L로 하

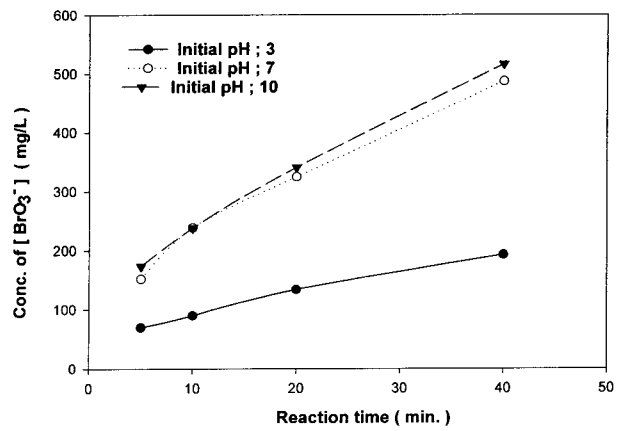


Fig. 3. The variation of [BrO<sub>3</sub><sup>-</sup>] conc. over reaction time. (Reaction temp. ; 15°C)

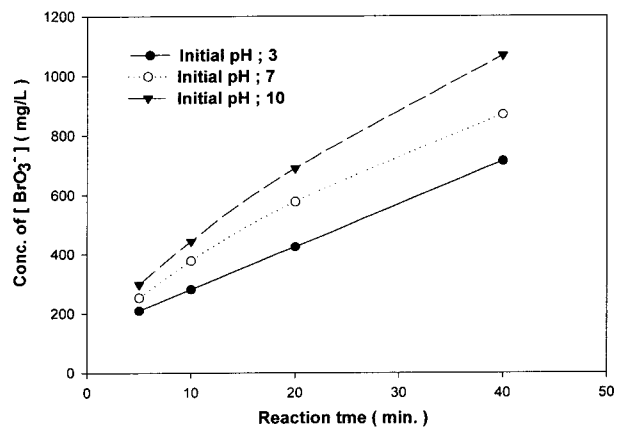


Fig. 4. The variation of [BrO<sub>3</sub><sup>-</sup>] conc. over reaction time. (Reaction temp. ; 20°C)

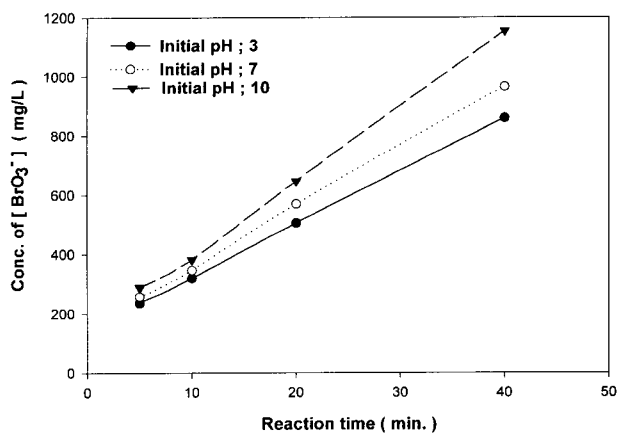


Fig. 5. The variation of [BrO<sub>3</sub><sup>-</sup>] conc. over reaction time. (Reaction temp. ; 30°C)

여 4, 12, 16, 20, 24주 투여하고서 투여 용량과 기간에 변화를 주면서 간, 신장 및 고환중 지질과산화의 함량을 측정한 성적(Fig. 6)이다. 신장중의 MDA의 함량은 점차적으로 증가하여 16주 부터 지질과산화의 함량이 증가하다 24주 투여로서는 현저히 신장조직의 지질과산화의 함량이 증가하였다.

신장 기능 변화에 미치는 영향

숫 흰쥐에서 bromate의 용량별로 24주간 섭취케 하고서 신장의 기능변화에는 어떠한 영향을 주는지를 관찰할 목적으로 혈중 요소질소(BUN), 뇨중 lactate dehydrogenase (LDH) 및  $\gamma$ -glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT)의 활성 변화(Table 1)를 관찰하였다. 뇨중 LDH의 활성은 별다른 영향이 없었으나,  $\gamma$ -GT의 경우에는 bromate의 용량별의 투여로 BUN치와

유사하게 대조군에 비하여 bromate 0.4 g/L를 섭취케 하므로서 약 5배정도 유의성 있는 변화를 관찰 할 수 있었다.

신장중 cytosolic 효소 활성에 미치는 영향

Bromate의 섭취로 인한 신장중의 지질과산화물의 함량이 현저히 증가되는 기전을 추구할 목적으로 신장중 xanthine oxidase 및 aldehyde oxidase의 활성 변동을 관찰하였던바(Fig. 7)대조군의 효소활성은  $0.86 \pm 0.052$  uric acid nmole/mg protein/min 인데 비해 bromate를 용량별(0.1, 0.2, 0.4 g/L)로 투여한 군은 각각  $0.90 \pm 0.048$ ,  $1.23 \pm 0.080$  및  $2.18 \pm 0.24$  uric acid nmole/mg protein/min 로서 대조군 보다 현저히 증가되었다. 한편, aldehyde oxidase의 활성 변동에서도 대조군의 효소활성이  $14.26 \pm 0.79$  pyridone nmole/mg

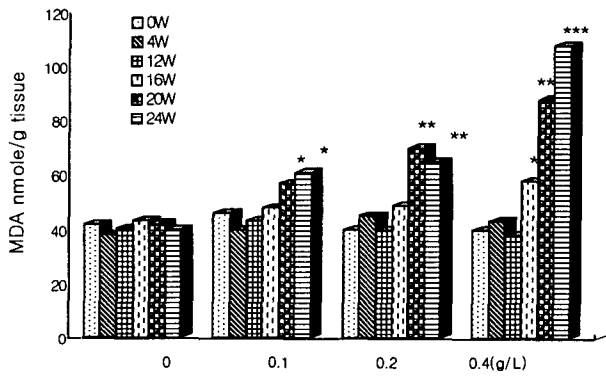


Fig. 6. Effect of renal lipid peroxidation levels on dose and week dependence in bromate.

Rats were orally given with bromate in drinking water daily for several weeks.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values represent means  $\pm$  S.D.(n=10).

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

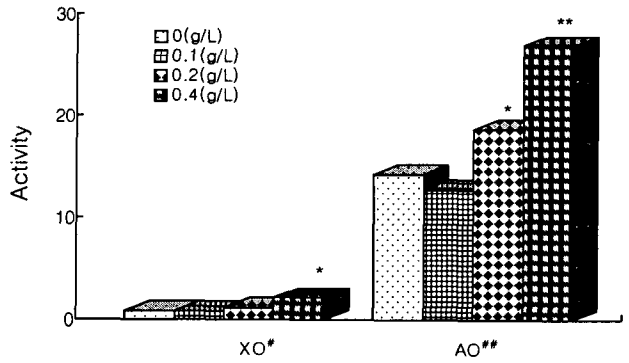


Fig. 7. Effect of renal cytosolic enzyme system activity of rat given bromate.

Rats were given with bromate in drinking water for 24 weeks. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean  $\pm$  S.D.(n=10).

#xanthine oxidase: uric acid nmole/mg protein/min

##aldehyde oxidase: pyridone nmole/mg protein/min.

\*p<0.05, \*\*p<0.01.

Table 1. Parameter of biological value on kidney function test of rats given bromate

Group	Dose (g/L)	BUN	LDH	$\gamma$ -GT
		mg / ml	unit / 24 urine	
Normal	0	$31.2 \pm 6.82^b$	$28.9 \pm 3.62^c$	$21.9 \pm 3.20^b$
Bromate	0.1	$33.4 \pm 7.26^b$	$32.4 \pm 5.32^{bc}$	$27.6 \pm 4.27^b$
	0.2	$45.6 \pm 6.43^b$	$38.9 \pm 4.39^{ab}$	$35.8 \pm 3.57^b$
	0.4	$123.6 \pm 20.6^a$	$46.8 \pm 6.32^a$	$112.4 \pm 26.3^a$

Rats were given with bromate in drinking water for 24 weeks. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean  $\pm$  SD(n=10). Means followed by the same letter are not significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test. BUN: blood urea nitrogen, LDH: lactate dehydrogenase,  $\gamma$ -GT:  $\gamma$ -Glutamyltransferase

오존처리에 의한 Bromate의 생성 및 흰쥐의 신장독성에 미치는 영향

protein/min인데 비해 bromate의 용량별 투여로서 xanthine oxidase의 활성이 대조군 보다 현저히 증가되는 유사성을 보였다.

신장의 microsomal 효소계에 미치는 영향

숫 흰쥐에서 bromate의 용량별로 24주간 섭취케 신장중 microsomal 효소계인 cytochrome p-450, aniline hydroxylase 및 aminopyrine N-demethylase의 활성을 관찰한 성적(Table 2)이다. 대조군의 효소활성에 비하여 본 실험의 조건에서는 bromate의 투여에 의한 변화는 전 실험예와 비교 시 별다른 영향이 없었다.

Glutathione S-transferase활성 및 glutathione 생성계에 미치는 영향

Bromate의 투여에 의한 활성산소의 소거능에 관여하는 glutathione S-transferase의 활성 및 glutathione의 생성계에 미치는 영향을 관찰한 성적(Table 3)으로 대조군의 활성이 168.5±22.13 DNB nmole/mg protein/min 인데 비해 bro-

mate를 용량별로 24주간 0.1 g/L의 투여시 163.4±20.7 DNB nmole/mg protein/min로 별다른 영향이 없었으나 0.2 g/L를 24주간 투여시에는 147.2±17.3 DNB nmole/mg protein/min 로 대조군에 비하여 억제되었으며, 0.4 g/L를 24주간 투여시에는 131.9±19.0 DNB nmole/mg protein/min으로 대조군보다 약 67% 정도 현저한 감소를 보였다. 한편 조직중 glutathione농도는 정상군에서 1.34±0.103  $\mu$  mole/g tissue로 bromate를 0.4 g/L를 24주간 섭취케한 결과 0.57±0.09  $\mu$  mole/g tissue로서 정상군에 비하여 약 43% 정도 현저히 억제되다.  $\gamma$ -Glutamylcystein synthetase의 활성은 대조군의 경우 13.2±2.12 pi nmole/mg protein/min인데 비해 bromate를 0.1, 0.2 및 0.4 g/L를 각각 24주간 투여하였을 때 15.0±1.43 pi nmole/mg protein/min, 11.2±1.98 pi nmole/mg protein/min 및 8.52±0.87 pi nmole/mg protein/min로 용량의존적으로 현저히 감소되었다. 한편, glutathione reductase의 활성도를 관찰한 결과 대조군 26.7±5.67 glutathione nmole/mg protein/min로서 각군에서 유의성있는 변화는 관찰 할 수 없었다.

Table 2. Effects of renal microsomal enzyme system of rats given bromate

Group	Dose(g/L)	Cyto p450 <sup>*</sup>	AH <sup>**</sup>	AD <sup>***</sup>
Normal	0	0.93±0.030 <sup>ns</sup>	0.78±0.060 <sup>ns</sup>	2.96±0.21 <sup>ns</sup>
Bromate	0.1	1.10±0.021	0.88±0.100	3.21±0.37
	0.2	0.98±0.052	0.83±0.160	3.19±0.24
	0.4	1.23±0.072	0.86±0.130	3.36±0.54

Rats were given with bromate in drinking water for 24 weeks. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±SD(n=10). ns : not significant,

\*Cytochrome p450: nmole/mg protein/min, \*\*Aniline hydroxylase: p-aminophenol nmole/mg protein/min, \*\*\*Aminopyrine N-demethylase HCHO nmole/mg protein/min

Table 3. Effects of renal glutathione S-transferase and glutathione biosynthesis enzyme activities of rats given bromate

Group	Dose(g/L)	GST <sup>*</sup>	Glutathione <sup>**</sup>	GR <sup>***</sup>	$\gamma$ -GCS <sup>****</sup>
Normal	0	168.5±22.1 <sup>a</sup>	1.34±0.13 <sup>a</sup>	26.7±5.67 <sup>a</sup>	13.2±2.12 <sup>a,b</sup>
Bromate	0.1	163.4±20.7 <sup>a</sup>	1.28±0.28 <sup>a</sup>	28.9±6.30 <sup>a</sup>	15.0±1.43 <sup>a</sup>
	0.2	147.2±17.3 <sup>b</sup>	1.02±0.11 <sup>b</sup>	25.3±5.12 <sup>a</sup>	11.2±1.98 <sup>b,c</sup>
	0.4	131.9±19.0 <sup>b,c</sup>	0.57±0.09 <sup>c</sup>	23.8±6.21 <sup>a</sup>	8.52±0.87 <sup>c</sup>

Rats were given with bromate in drinking water for 24 weeks. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±SD(n=10). Means followed by the same letter are not significantly different(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

\*glutathione S-transferase: 1,2-dinitro-4-nitrobenzene(DNB) nmole/mg protein/min, \*\*glutathione reductase:  $\mu$  mole/g of tissue, \*\*\*  $\gamma$ -glutamylcystein synthetase: glutathione nmole/mg protein/min, \*\*\*\*pi nmole/mg protein/min

## 고 찰

오존은 산화력이 강한 물질로서 원형질등에 직접작용하여 세포를 살상하기 때문에 많은 분야에서 살균제로 사용되고 있으며 해수를 이용한 양식장인 경우에는 해수중에 존재하는 브롬(Br) 이나 염소(Cl)이온 등이 오존과 반응하여 oxidant를 생성한다. Oxidant인 bromate의 생성에 있어서 오존(O<sub>3</sub>)과 Br<sup>-</sup>의 화학반응은 해수나 담수 속에 있는 다른 성분과의 반응성을 비교해 보면 Br<sup>-</sup>과의 반응이 더 빠르게 일어나는 것으로 알려져 있다. Br<sup>-</sup>의 오존 처리시 반응온도 및 pH에 대한 영향을 관찰하였던바, 반응온도가 낮을 때(15°C)에는 초기 pH 7, 10인 경우 반응시간에 따른 bromate의 생성은 비슷한 농도를 나타내고 있으나 pH 3인 산성영역에서는 bromate의 생성이 현저히 적음을 알수 있다. 이것은 (4)식과 같이 OBr<sup>-</sup>/HOBr의 비가 극히 적으므로 HOBr의 생성이 많아 지는 것으로 생각된다. 반응온도가 20°C에서는 반응시간에 따른 bromate의 생성은 산성, 중성, 알칼리성 영역에서 공히 증가 하고 있지만 산성영역에서의 생성이 가장 적고 생성량의 차이도 크다. 또한 반응온도 30°C에서는 20°C에서와 같은 경향을 보이고 있으나 용액의 액성에 따른 생성량의 차이가 크게 줄어들고 있음을 알수 있다. 이로볼 때 반응온도가 높아지며는 용액의 액성에는 관계 없이 bromate의 생성은 오존과의 반응시간에 비례하여 증가함을 알수 있었다. 완충용액이 첨가되지 않은 상태에서의 반응은 반응시간에 따라 용액의 pH가 모두 8~10으로 상승하기 때문이지만 초기 pH가 3인경우는 pH가 약 8, 초기 pH가 7인 경우는 약 9.8, 초기 pH가 10인경우는 pH가 약 9.5로 되므로 최종 pH에 있어서 약간의 차이가 나타나기 때문에 bromate의 생성에 약간의 차이를 보이고 있다고 사료 된다 [9]. 오존을 처리하므로서 bromate가 생성되는것을 확인하고서 실험동물에 어떠한 영향을 주는가를 관찰하고자 인위적으로 bromate를 음료수중에 0.1, 0.2, 0.4 g/L의 농도로 4, 12, 16, 20 및 24주간 실험동물에 섭취케 하고서 신장중의 지질과산화의 함량을 검색하였던바 용량의존 및 투여 일수의 변동에 따라 정상군보다 지질과산화 함량이 용량 및 기간의 차이는 있으나 현저히 증가되었다. 또한 신장 기능의 이상 상태를 추구할 목적으로 bromate (0.1, 0.2, 0.4 g/L)를 24주간 투여하고서 신장 기능의 지표인 blood urea nitrogen (BUN), lactate dehydrogenase (LDH) 및  $\gamma$ -gutanyltrans-

ferase ( $\gamma$ -GT)의 활성을 관찰하였다. BUN의 경우 bromate의 섭취로 정상군에 비하여 현저히 증가되었다. 요소는 주로 간(일부 신장)에서 urea cycle 종말 대사산물로 간, 신장이외의 조직에서 생성된 ammonia는 glutamine으로 합성되어 간으로 운송된다. 간에서는 glutaminase의 작용으로 ammonia가 유리되고, 이 ammonia는 이산화탄소와 carbamylphosphate가 합성된다[47]. Carbamylphosphate는 요소회로로 들어가 arginase의 작용으로 arginine으로부터 요소를 생성한다. 생성된 요소는 혈류로 들어가 사구체를 거쳐 요로 배설된다. BUN치의 변동은 섭취단백량, 요소 합성 및 배설등 세가지 요인에 의하여 좌우되며, 임상적으로 소화관의 출혈, 신혈류량 감소, 신장질환 및 요로 폐쇄의 질환에서 BUN치가 증가되는 것으로 알려져 있다[44]. 한편, 생체내에서 해당계의 최종단계에서 작용하는 효소로 L-lactate와 pyruvate로 전환하는 가역 반응을 촉매하는 뇨중 LDH의 활성[24]은 각 실험군에서 별다른 영향이 없었다. LDH의 증가는 혈액, 심장, 근육, 간 및 위암과 폐암같은 악성종양에서 증가되는 점을 감안 할 때, 본 연구에서 bromate의 용량별 투여는 간조직중 malondialdehyde함량에 변화가 없는 점 [9]과 일치하였다. 따라서 이와같은 bromate의 장기 투여는 간장에는 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.  $\gamma$ -GT[18]는  $\gamma$ -glutamyl기를 다른 peptide나 1-amino acid로 전이하는 효소이다. 이는 신장에 가장 풍부하게 함유되고 있는 효소로서 임상적으로는 신장질환, 심장질환 및 간질환에서 증가되고 있는 실정이다. 본 실험에서의  $\gamma$ -GT의 활성은 bromate의 용량별 투여로서 현저히 증가되었으며, 이와같은 BUN 및  $\gamma$ -GT의 활성 증가는 bromate의 투여로서 야기되는 것은 신세뇨관의 근위세뇨관 병변보다는 원위세뇨관의 brush border membrane에 손상을 초래하므로서 나타나는 결과로 생각된다. Bromate의 신장에대한 손상 초래 기전을 추구할 목적으로 신장 조직의 glutathione 농도를 측정하였을 때 bromate의 투여로 glutathione농도는 정상군에 비하여 현저히 억제되었다. 친전자성 물질들과 활성 산소 및 과산화물의 최종 무독화 과정에서 glutathione이 필수적으로 요구되며 이 물질의 함량 여부에 따라 독성 발현의 유무를 추구할 수 있다[13,24]. 이로보아 본 연구에서 bromate의 투여는 glutathione의 함량을 현저히 억제시키며, bromate의 투여에 의하여 생성되는 독성 물질의 체내에서 무독화가 저지되어 신장 조직의 원위세뇨관에 침해를 주어 신

독성을 야기하는 것으로 생각된다. 과산화지질의 생성은 병태생리 현상이나 조직 손상 정도를 나타내는 지표로 활용되고 있는 점[15,16,18]을 감안 할 때, 생체막 구성성분인 인지질의 불포화지방산은 활성 산소종과 같은 free radical에 의해 과산화반응이 개시되며 이는 연쇄적으로 진행된다. 그러므로 free radical에 의한 지질의 과산화반응은 세포막의 투과성을 항진시킬 뿐만 아니라, 전반적인 세포독성을 초래하며 노화현상이나 이에 따른 여러 가지 질환의 병리 현상을 유도하며 발암과정에도 관여 할 것으로 생각되고 있다[2,29,31,38,42]. 이러한 점으로 미루어 볼 때 bromate의 투여로 신장독성이 유발되는 독성 생성의 기전을 뒷받침하는 실험결과라고 생각된다. 또한, free radical의 생성에 관여하는 xanthine oxidase와 aldehyde oxidase활성에 대한 bromate의 영향을 관찰하였을 때 xanthine oxidase 및 aldehyde oxidase의 활성이 대조군보다 현저히 증가되었다. 이는 cytosol 분획에 존재하는 molybdenum 함유 산화 효소로서 생화학적 반응을 촉매하는 과정에서 반응액 중의 산소분자를 전자 수용체로 활용하고 있으므로 superoxide anion, hydrogen peroxide 및 최종적으로 hydroxyl radical을 생성하며[4,41], bromate의 투여는 이러한 효소의 활성을 증가시키며 신조직중 지질과산화의 함량을 현저히 증가시킨 결과로 생각된다. 친전자성 물질을 비롯한 활성산소 및 과산화 물질들의 최종 무독화 과정에는 필연적으로 glutathione이 요구되어지며 이물질의 세포내 함량 유지에는 합성계 효소와 해독 반응후 생성되는 산화형 glutathione의 환원형 효소가 관여하고 있다[6]. Bromate의 투여에 따른 신조직중 glutathione의 함량의 감소기전을 추구하기 위하여 glutathione을 환원형 glutathione으로 환원시키는 glutathione reductase와 glutathione의 합성에 관여하는  $\gamma$ -glutamylcystein synthetase의 활성을 관찰하였다. 그 결과 glutathione reductase에는 별다른 영향이 없었으나  $\gamma$ -glutamylcystein synthetase의 활성은 0.4 g/L를 24주간 섭취케 하므로써 대조군에 비하여 현저히 억제하였다. 또한 endogeneous reactant인 glutathione을 이용[1,25]하여 체내 독성 물질과 과산화물을 전이 분해시키는 효소인 glutathione S-transferase의 활성은 bromate의 투여로 현저히 감소됨을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 glutathione의 합성에 관여하는  $\gamma$ -glutamylcystein synthetase의 활성 감소 및 bromate의 투여로 생성되는 독성물질의 결합에 glutathione의 이용을 저하로 말미암아

glutathione의 함량이 감소하게 되고, 이에 따라 glutathione S-transferase의 활성 감소 현상이 나타나는 것으로 생각된다. 이로보아 흰쥐에 bromate의 투여로써 신장 조직의 지질과산화의 생성이 현저히 증가되어 독성이 현저히 증가되는 것은 신조직중 glutathione의 함량 변동은 glutathione의 합성에 관여하는  $\gamma$ -glutamylcystein synthetase의 활성에 영향을 주어 나타나는 결과로 생각된다.

## 요 약

브롬(Br)이온을 포함하는 지표수 또는 해수를 상수원 또는 어류양식용 물로 사용할 경우 소독,살균을 위하여 오존(O<sub>3</sub>)을 많이 사용한다. 이때 물속에 포함되어 있는브롬(Br)이온과 오존과의 반응에 의하여 독성물질인 Bromate(BrO<sub>3</sub>)가 산화 부산물로서 생성된다. 이 bromate의 생성반응에 대한 용액의 pH와 반응온도의 영향 및 bromate를 음용수중에 함유시키고 실험동물에 섭취시켰을때의 생체독성에 미치는 기전을 관찰하였다.

Bromate의 생성은 반응온도가 증가할수록 증가되지만, 낮은온도(15℃)에서는 용액의 초기 pH가 3 인 경우는 초기 pH가 7, 10 인 용액의 경우보다 훨씬 적은 생성량을 나타내었다. Bromate를 음용수중에 0, 0.1, 0.2, 0.4g/L로하여 4, 12, 16, 20, 24주 투여하고서 신조직중의 지질과산화의 함량이 증가되었으며, 혈중 노소질소의 활성 및 노중  $\gamma$ -glutamyltransferase의 활성은 대조군에 비하여 bromate의 투여로 현저히 증가되었으며, 노중 lactate dehydrogenase의 활성에는 별다른 영향이 없었다. Bromate의 투여로 xanthine oxidase 및 aldehyde oxidase의 활성은 bromate의 투여로 현저히 증가되었으며 glutathione의 농도 및 glutathione S-transferase의 활성도 대조군 보다 현저히 억제 되었다. Glutathione의 생성계에 미치는  $\gamma$ -glutamylcystein synthetase의 활성은 대조군에 비해 bromate의 투여로 억제되었으며 glutathione reductase의 활성은 별다른 영향이 없었다.

## 감사의 글

이 논문은 2002학년도 경성대학교 환경문제연구소 특별 지원금에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.



## 참고 문헌

1. Ahokas, J.T., F.A. Nichollas, P.J. Ravenscroft and B.T. Emmerson. 1985. Inhibition of purified rat liver glutathione S-transferase isozymes by diuretic drugs. *Biochem. Pharmacol.* **34**, 2157-2161.
2. Babior, B.M., R.S. Kipnes and J.T. Curnutte. 1973. Biological defense mechanisms : The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.* **52**, 741-744.
3. Byvoet, P., J.U. Balis, S.A. Shelley, M.R. Montgomery and M.J. Barber. 1995. Detection of hydroxyl radicals upon interaction of ozone with aqueous media or extracellular surfactant: the role of trace iron. *Arch. Biochem. Biophys.* **319(2)**, 464-469
4. Halliwell, B. 1987. Oxidants and human disease : Some new concepts. *Fase. J.* **1**, 358-364.
5. Beauchamp, C. and I. Fridovich. 1970. A mechanism for the production of ethylene from methionine : The generation of the hydroxyl radical by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **24**, 4641.
6. Bidlack, W.R. and G. L. Lowery. 1982. Multiple drug metabolism : P-nitroaniline reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 311-317.
7. Cross, C.E., H. Barry, T. B. Edward, A. P. William, N. A. Bruce, L. S. Robert, M. M. Joe and H. Denham. 1987. Oxygen radicals and human disease. *Ann. Intern. Med.* **107**, 526-545.
8. Croci, T. and G. M. Williams. 1985. Activities of several phase I and phase II xenobiotics biotransformation enzymes in cultured hepatocytes from male and female rats, *Biochem. Pharmacol.* **34**, 3029-3035.
9. Chung, U.Y. 2001. The effect of bromate ion formation by ozonation process and mechanism of biological toxicity due to bromate in rat. pp. 55-57. Ph. D. thesis, Kyungshung University, Busan.
10. David, J. and L.S. Vernon. 1980. Water chemistry. pp. 354. John Wiley & Sons. New York.
11. da Silva, M.V., P.A. Gibbs and R.M. Kirby. 1998. Sensorial and microbial effects of gaseous ozone on fresh scad. *J. Appl. Microbiol.* **84(5)**, 802-810.
12. Dutta, P., J. Seirafi, D. Halpin, J. Pinto and R. Rivlin. 1995. Acute ethanol exposure alters hepatic glutathione metabolism in riboflavin deficiency. *Alcohol.* **12(1)**, 43-47.
13. El-Sokkary, G.H. 2002. Melatonin protects against oxidative stress induced by kidney carcinogen KBrO<sub>3</sub>. *Neuroendocrinol. Lett.* **21(6)**, 461-468.
14. Ferrone, S., A. Zanella and G. Sirchia. 1970. Erythrocyte glutathione reductase activity in chronic renal disease. *Scand. J. Haematol.* **7(6)**, 409-412.
15. Freeman, B.A. and J. D. Crapo. 1982. Biology of disease : Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* **47**, 412-426.
16. Goldberg, D.M. and J.V. Martin. 1975. Role of gamma-glutamyl transpeptidase activity in the diagnosis of hepatobiliary disease. *Digestion.* **12(4)**, 232-246.
17. Gordan G., H.T. John. and J.J. Leaffaber. 1994. Ozonation Products of Bromine and Chlorine in Seawater Aquaria. *Wat. Res.* **28(5)**, 1087-1094.
18. Granger, D.N. and D. A. Parks. 1983. Role of oxygen radicals in the pathogenesis of intestinal ischemia. *The Pharmacologist.* **25**, 159-164.
19. Grever, M. R., V. N. Thompson, S. D. Balcerzak and A. L. Jr. Sagone. 1980. The effect of oxidant stress on human lymphocyte cytotoxicity. *Blood.* **56**, 284-288.
20. Gunten, U. V. and J. Hoigne. 1994. Bromate Formation during Ozonation of Bromide containing Water: Interaction of Ozone and Hydroxyl radical Reaction. *Environ. Sci. Tech.* **28**, 1234-1242.
21. Haag, W. R., J. Hoine and H. Bader. 1984. Improved Ammonia Oxidation by Ozone in the Presence of Bromide Ion During Water Treatment. *Wat. Res.* **18(9)**, 1125-1128.
22. Habig, W.H., M.J. Pabist and W.B. Jakoby. 1974. Glutathione S-transferase : The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130-7139.
23. Johannes. S. and J. Hoine. 1985. Decomposition of Ozone in Water in the Presence of Organic Solutes Acting as Promoters and Inhibitors of Radical chain Reaction. *Environ. Sci. Technol.* **19(12)**, 1206-1213.
24. Kudiasheva, A.G. and A.I. Taskaev. 1984. Level of dehydrogenase activity in chipmunks under normal conditions and during chronic external gamma-irradiation. *Radiobiologia.* **24(2)**, 230-233.
25. Lawrence, R.A. and R.F. Burk, 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **71**, 952-958.
26. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Rendall. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

27. Mari A. A. Takako and M. Yasumoto. 1996. Bromate ion Formation Inhibition by Coexisting Organic Matters in Ozonation Process. *Japan Society on Water Environment*. **19(11)**, 930-936.
28. Mccord, J. M. 1974. Free radicals and inflammation : Protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science*. **185**, 529-531.
29. Milan, L., R. Jozef, K. Vilian, P. Peter and V. Ladislav. 1989. Free Radicals in Chemistry and Biology. pp.29-31, 283-284, CRC press. New York.
30. Mohamed S. S. 1990. Chlorine-Ozone Interactions : Formation of Chlorate. *Wat. Res.* **30(9)**, 2160-2170.
31. Nakagawa, H., K. Shuto, M. Isaji and K. Watanabe. 1981. Proteinase inhibitors suppress the formation of granulation tissue in the carrageenin-induced inflammation. *J. Pharmacobio. Dyn.* **4**, 429-435.
32. Nash, T. 1953. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the hentsch reaction. *J. Biol. Chem.* **55**, 416-412.
33. Ohkawa, H., N. Ohishi and K. Yaki. 1979. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351-358.
34. Omura, T. and R. Sato. 1964. The carbon monoxide binding pigments of liver microsomes. In : Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* **239**, 2370-2378.
35. Pinkernell, U. and U.V. Gunten. 2001. Bromate minimization during ozonation: mechanistic considerations. *Environ. Sci. Technol.* **35(12)**, 2525-2531.
36. Powell, J.J., J. Van de Water and M.E. Gershwin. 1999. Evidence for the role of environmental agents in the initiation or progression of autoimmune conditions. *Environ. Health Perspect.* **5**, 667-672.
37. Quick, C.A., R.A. Chole and M. Mauer. 1975. Deafness and renal failure due to potassium bromate poisoning. *Arch. Otolaryngol.* **101(8)**, 494-495.
38. Rajagopalan, K. V., P. Handler, G. Palmer and H. Beinert. 1968. Studies of aldehyde oxidase by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **243(14)**, 3784-3796.
39. Reinke, L. A., M. J. Meyer and K. A. Notley, 1986. Diminished rates of glucuronidation and sulfation in perfused rat liver after chronic ethanol administration. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 439-447.
40. Richman, P.G. and A. Meister. 1975. Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J. Biol. Chem.* **250(4)**, 1422-1426.
41. Ross, D. 1989. Mechanistic toxicology : A radical perspective. *J. Pharm. Pharmacol.* **41**, 505-511.
42. Schalkwijk, J., W.B. Vandenberg, L.B.A. Vandeputte and L.B.A. Loosten. 1987. An experimental model for hydrogen peroxide induced tissue damage : Effect on cartilage and other articular tissues. *Int. J. Tiss. React.* **IX(1)**, 39-43.
43. Simon, R. H., C. M. Scoggin and D. Patterson. 1981. Hydrogen peroxide causes the fetal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* **266**, 7181-7186.
44. Straus, B., M. Prejac, I. Cepelak, B. Kunovic and K. Lipovac. 1975. Changes in the urinary enzyme activity in some kidney diseases. *Vojnosanit Pregl.* **32(2)**, 134-137.
45. Stirpe, F. and C.E. Della. 1969. The regulation of rat liver xanthine oxidase : Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (Type D) to oxidase (Type O). *J. Biol. Chem.* **244**, 3855-3863.
46. Szasz, F. 1969. A kinetic photometric method for serum  $\gamma$ -glutamyltransferase. *Clin. Chem.* **15**, 124-136.
47. Uchida, K. and K. Tejima. 1974. Use of a mixture of a phenol reagent and a urease solution in the urease-indophenol method (analysis of blood urea nitrogen). *Rinsho. Byori.* **22(10)**, pp. 207.
48. Verde, L., F. Meucci and G.C. Vanini. 1969. On the behavior of anionic detergents in ozone-treated water. *Ig. Mod.* **62(3)**, 277-285.
49. Wang B. and Y. Jin. 1988. Removal of Aromatic Nitro Compounds From Water by Ozone. *Ozone Science & Engineering.* **10**, 1-23.
50. Ward, J.P. 1975. Urinary gamma-glutamyl transpeptidase, an indicator of renal ischaemic injury and homogate rejection. *Br. J. Urol.* **47(7)**, 765-70.
51. Weinberg, H.S., H. Yamada and R.J. Joyce. 1998. New, sensitive and selective method for determining sub-microgram/l levels of bromate in drinking water. *J. Chromatogr.* **804(1)**, 137-142.
52. Werner R.H. and J. Hoigne. 1983. Ozonation of Bromide-Containing Waters; Kinetics of Formation of hypobromous Acid and Bromate. *Environ. Sci. Technol.* **17(5)**, 261-267.
53. Yuji K. 1990. Toxicity and Carcinogenicity of Potassium Bromate, - A New Renal Calcinogen, *Environmental Health Perspectives.* **87**, 309-335.

(Received June 5, 2002; Accepted July 9, 2002)