

흰쥐의 6가 크롬 흡입폭로에 의한 산화적 손상에 관한 연구

맹승희 · 유일재 · 김현영 · 임철홍 · 이용목 · 정호근 · 정해원*

한국산업안전공단, 산업안전보건연구원, 산업화학물질연구센터

*서울대학교 보건대학원

Oxidative Damage in rats by Inhalation Exposure to Hexavalent Chromium

Seung Hee Maeng, Il Je Yu, Hyeon Yeong Kim, Cheol Hong Lim, Yong Mook Lee, Ho Keun Chung and Hai Won Chung*

Center for Occupational Toxicology, Occupational Safety and Health Research Institute, KOSHA

*School of Public Health, Seoul National University

(Received October 25, 2002 / Accepted November 20, 2002)

ABSTRACT : According to the epidemiological studies in chromium workers, hexavalent chromium is associated with the risk of lung cancer. Cellular oxidative damages by reactive oxygen species produced by hexavalent chromium exposure may play an important role in the carcinogenesis process. We investigated the availabilities of malondialdehyde measurement for the assessments of oxidative damages from chromium exposure with an experimental inhalation study *in vivo*. Lipid peroxidation, one kind of cellular oxidative damage, was measured in blood plasma of the rats which inhaled the hexavalent chromium mist for 1, 2 and 3 weeks. The concentrations of malondialdehyde (MDA), the metabolite of lipid peroxidation, in all exposed groups were higher than those of controls with dose-dependant manner. The levels of MDA were also correlated with urine chromium levels of the rats. Therefore, MDA as an indicator of lipid peroxidation could be proper biologic marker for the assessment of the oxidative damage from chromium exposure, which might be involved in carcinogenesis.

Keywords : Hexavalent chromium, Lipid peroxidation, Inhalation, Rat

서 론

크롬은 지각에 풍부한 금속원소로서 3가 크롬은 사람에게 있어서는 일일 섭취량 50-60 µg 정도를 필요로 하는 당과 지방대사에 필요한 필수영양소 중의 하나이기도 하다 (Anderson, 1997). 그러나 오염된 환경이나 스테인레스 용접 공정, 도금산업과 주물 산업, 금속제조업, 단열재 제조업, 색소 제조 및 취급업, 목재보존제 제조 및 취급업 등의 크롬 사용 작업장에서 공기 중 다량 방출되는 6가 크롬은 흡입, 피부접촉 및 섭취의 경로를 통해 인체에 흡수되어 피부염, 알레르기성 피부염, 비중격 천공, 폐암 등 사람들에게 나타날 수 있는 잠재적 건강 유해성이 보고되기도 하였다 (WHO, 1938).

크롬 폭로에 의한 생물학적 영향을 결정하는 주요 요인은

생물유용성(bioavailability), 화학물질의 종류(chemical speciation), 수용성, 세포 내 환원, DNA와 크롬의 상호작용으로 이들 요인에 따라 세포독성 및 유전독성의 효과가 좌우된다. 3가 크롬은 체내에 들어온 후 세포막 투과가 쉽지 않으나 6가 크롬은 양이온 막 전달체(anionic membrane transporter)를 통해 세포 내에 침투되어 3가 크롬으로 환원되는데, 세포 내로 일단 들어온 6가 크롬 자체는 DNA, RNA, 단백질, 지질과 같은 거대분자(macromolecule)와 반응하지 않으나 환원되어 생긴 3가 크롬이나 환원중간산물인 4가 크롬과 5가 크롬은 거대분자와 공유 결합하여 반응하게 되는 것으로 보고되어 있다(Singh, *et al.*, 1998).

즉, 6가 크롬은 대사적으로 환원이 일어나면서 일시적으로 산화상태인 5가 크롬과 4가 크롬을 발생시키고 동시에 활성 산소종(ROS, reactive oxygen species)의 형태로 산화적 스트레스(oxidative stress)를 발생시킨다. 이러한 활성산소종(ROS), 중간 산화상태의 5가 크롬 및 4가 크롬 그리고 궁

*To whom correspondence should be addressed

극적 환원형태인 3가 크롬과 같은 환원물은 DNA와 상호작용을 할 수 있어 다양한 범위의 유전독성효과를 초래하며, 6가 크롬의 세포내 대사적 환원이 어떤 유전적 상호작용을 일으키기 위한 전제조건이 된다(Kortenkamp, *et al.*, 1991; Snow, 1992).

현재까지 보고에 의하면 크롬에 의해 유도될 수 있는 genomic DNA의 구조적 손상은 산화적 DNA 손상의 한 형태인 8-oxodeoxyguanosine, DNA-DNA 가교형성(DDC), Cr-DNA adduct, single-strand break, DNA-단백질 가교형성(DPC) 및 염색체이상 등을 들 수 있으며 이러한 DNA의 병변은 다양한 기능적 손상을 초래하는데 DNA polymerase의 포획과 DNA 복제 저해, RNA polymerase 포획과 전사(transcription)의 저해, DNA topoisomerase의 저해 및 돌연변이(mutagenesis) 등이 보고되어 있다(Bridgewater, *et al.*, 1994; Manning, 1992; Tsou, *et al.*, 1996; Xu, *et al.*, 1996).

6가 크롬이 사람에게 있어서 암 발생 특히 폐암과 관련있는 것이 보고됨에 따라 미국 환경청(EPA, Environmental Protection Agency)과 국제 암 연구소(IARC, International Agency for Research on Cancer)에서는 흡입된 6가 크롬을 인체에 암을 유발하는 물질(human carcinogen)로 정해 놓고 있다.

우리나라 노동부(1998)는 공기 중 수용성 및 비수용성 6가 크롬의 노출기준을 0.05 mg/m³로 정하였고 미국 산업위생전문가협회(American Conference of Governmental Industrial Hygienists, ACGIH, 2000)에서는 비수용성 6가 크롬에 대해서는 노출기준을 0.01 mg/m³으로 권장하였으며, 또한 이 두 가지 6가 크롬에 대하여 “인체에 암을 유발시키는 물질”인 “A1”으로 분류하고 있다. 또한 미국 국립산업안전보건연구원(National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH, 1994)에서는 발암성 물질인 6가 크롬에 대하여 0.001 mg/m³를 노출기준으로 권고하고 있다.

크롬에 의해 유도될 수 있는 genomic DNA와 관련하여 사람 집단을 대상으로 한 보고는 비교적 적은데 6가 크롬에 대한 연구마다 그 결과도 상이하고, 폭로상태가 서로 다르고 폭로조건이 불확실한 연구도 있었지만 조기생물학적효과(early biological effective)의 지표로서, Giemsa염색을 하여 관찰하는 구조적 염색체이상과 자매 염색체교환의 빈도가 폭로군이 비폭로군에 비해 증가하는 양상을 나타내는 보고들이 있었다(De Flora, *et al.*, 1990).

한편, 생물학적 효과량(biologically effective dose) 지표라 할 수 있는 DNA-단백질 가교형성(DNA-protein cross link) 혹은 산화적 손상(oxidative stress)의 파라미터들을 이용한 크롬연구도 있었으나 이들 또한 그 결과가 서로 상이하여 아직 논란의 여지가 많다. Popp 등(1991)은 스테인레스 스틸

용접근로자에게서 DNA-단백질 가교형성에 있어 대조군에 비하여 유의한 결과를 보고한 반면, Zhitkovich 등(1996)은 크롬 도금업자들에서 유의하지 않은 결과를 보고하였다. 또한 Gao 등(1994)은 크롬생산 근로자에서 염색체 single strand breakage와 8-hydroxydeoxyguanosine(8-OHdG)을 관찰하여 유의한 결과를 보고하였다.

현재까지의 보고에 의하면 6가 크롬은 세포 내에서 과산화수소와 반응하여 tetraperoxochromium(V)을 만들며 이것은 superoxide에 의해 유도되는 Fenton-type의 반응을 거쳐 hydroxy radical을 생성한다(Kawanishi, *et al.*, 1986). 과산화수소가 존재하는 상황에서 6가 크롬은 DNA single strand break를 유발하며 8-OH-dG를 생성하지만 glutathione이 존재하는 상황에서는 다량의 chromium-DNA adduct를 생성한다(Aiyar, *et al.*, 1989). 이들은 6가 크롬의 발암성은 6가 크롬이 환원되면서 생성되는 반응성이 강한 중간 대사산물인 5가 크롬이나 hydroxy radical에 의한 것으로 생각하였다.

활성산소에 의한 산화적 손상의 하나로서 세포 내에 생성된 지질과산화(lipid peroxidation)를 지표로 한 보고가 있는데(Herman, *et al.*, 1999, Kasai, *et al.*, 1986), 지질 과산화는 그 반응산물인 malondialdehyde(MDA)의 농도로써 평가되어지는데 세포 수준에서의 산화적 손상을 반영하며 크롬에 대해서는 주로 실험동물의 간세포에서 연구가 소수 이루어져 있고(Bagchi, *et al.*, 1997; Susa, *et al.*, 1997), 사람집단을 대상으로 한 연구로는 최근 망간폭로근로자의 혈장에 있어서 MDA의 농도가 대조군에 비해 유의했음이 보고되었다(Yiin, *et al.*, 1996). MDA는 지방산의 산화 중 생성되는 과산화물의 분해산물 중의 하나로 발암성을 지닌 glycyaldehyde 및 β -propiolactone 등과 구조가 비슷하며, 주로 아미노기와 높은 반응성에 의해 DNA와 반응하여 유전적 손상을 가져와 발암성과 돌연변이 유발성을 나타내는 것으로 보고되고 있다(Shamberger, *et al.*, 1974).

본 연구에서는 크롬에 의한 질병 발생의 초기 단계를 지적할 수 있는 세포수준에서의 생물학적 효과 혹은 반응 지표(biologically effective or response marker)의 좀더 유용성 있는 적용방법의 필요성이 인지되고 또 이들 방법이 크롬 폭로된 사람집단에 있어서 적용할 만한지의 여부를 판단하기 위한 목적으로, 즉 6가 크롬화합물의 산화적 손상을 평가하기 위하여 사람이 크롬에 가장 빈번하게 노출될 수 있는 경로인 흡입의 방법으로 실험동물에 6가 크롬화합물을 폭로시켜 혈액 내의 지질과산화의 반응산물인 MDA의 양을 측정함으로써 6가 크롬에 의한 산화적 손상을 평가, 이 지표가 크롬 폭로 근로자들의 독성지표로서 활용 가능성이 있는지의 여부를 탐구하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 사육환경

실험동물은 10주령의 특정 병원체 부재동물(specific pathogen free, SPF)인 Sprague-Dawley계의 흰쥐를 대한동물실험센터에서 분양 받아 barrier system의 청정동물실에서 1주간 순화시킨 후 건강하고 발육 양호한 동물을 사용하였다.

순화시킨 동물들은 체중을 지표로 하여 체중편차가 최소화 되도록 해서 대조군, 저농도 폭로군 및 고농도 폭로군으로 구분하여 각 군당 20마리씩 하여 3대의 흡입챔버(inhalation chamber)내에 5연식 금망 케이지를 사용하여 군별, 동물별로 각각 개별 수용하였다. 이들은 다시 각각 1주간 폭로군, 2주간 폭로군, 3주간 폭로군으로 구분하였다. 폭로물질의 농도는 정화된 청정공기를 이용하여 희석 조절하였으며, 사육 환경의 온도는 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도는 35-60%, 환기횟수는 11-12/시간, 압력은 -9~-11 mmAq (음압), 조명은 150-300 Lux로 12시간으로 하였으며, 사용한 사료는 실험용 멸균사료(제일제당 주식회사)를, 음수는 멸균 정제수를 자동급수로 하여 자유롭게 섭취하도록 하였다.

크롬화합물의 폭로방법

내부용적 1 m^3 의 흡입챔버(Model No. SIS-20RG, SIBATA Co., LTD, Japan)와 미스트 발생장치 등을 이용하여 전신 폭로시켰다(Fig. 1).

군별 폭로농도는 급성 독성의 예비실험을 통해 설정하였는데 저농도는 0.18 mg/m^3 , 고농도는 0.9 mg/m^3 를 목표농도로 하였다.

흡입 폭로방법은 미스트 발생장치(Model No. VG-4R, SIBATA Co., LTD, Japan)를 이용하여 크롬산 나트륨을 증류수에 용해시켜 분사시킨 후 청정공기와 일정농도로 혼합하여 흡입챔버 내로 공급함으로써 실험동물에 전신 폭로시켰다. 폭로시간은 1일 6시간, 주 5일로 하되 각 농도당 5-6마리씩 하여 1주간, 2주간 및 3주간 후에 희생시키는 것으로 하였다.

폭로중의 챔버내 환경조건들은 챔버내에 부착된 센서와 환경제어장치(Model No. ICS-20RG, SIBATA Co., LTD, Japan)를 이용하여 30분에 1회씩 측정토록 하였으며 측정치는 자동 기록되도록 하였다.

챔버내 크롬농도의 측정

흡입챔버내 공기중 크롬의 농도를 측정하기 위해서는

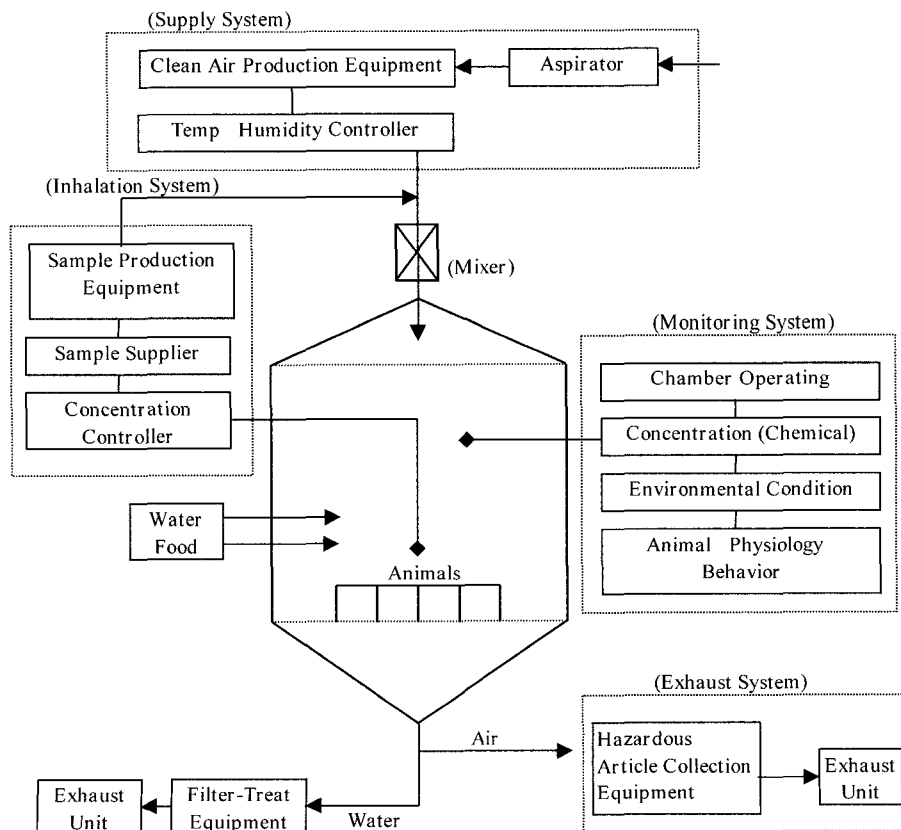


Fig. 1. System for inhalation toxicity experiments.

PVC 여과지(pore size 5.0 μm, 37 mm)를 개인 시료 채취기(Personal air sampler, Gillian, USA)에 이용하여 흰쥐의 호흡기 위치에서 매일 평균 유속 1.5 l/min으로 4시간 동안 공기 중 시료를 채취하였다.

6가 크롬 농도의 분석은 Wang 등(1999)의 분석방법인 'ultrasonication and strong anion-exchange solid phase extraction method'에 의해 실시하였다. 즉 채취한 시료를 15 ml 플라스틱 원심분리관에 옮겨서 10 ml 0.05 M(NH₄)₂SO₄/0.05 M NH₄OH(pH 8) 완충용액 10 ml을 첨가한 후 실온에서 30분 동안 초음파 분산기에서 분해시켰다. 초음파 분해 후 상등액의 3 ml을 strong anion-exchange 카트리지에 넣었다. 이것을 3 ml의 증류수로 세척한 후 6가 크롬은 유속 2 ml/ml에서 0.5 M(NH₄)₂SO₄/0.1 M NH₄OH(pH 8) 완충용액 3 ml씩 3회 첨가한 9 ml에서 용리시켰다. 분리시킨 용출액을 37% HCl용액 100 μl를 첨가하여 산성화시켰다. 여기에 20 mM diphenylcarbazide 2 ml를 첨가한 후 형성된 6가 크롬 복합체를 540 nm에서 UV-Spectrophotometer (Ceil 3000, England)로 측정하였다.

크롬 폭로 흰쥐의 전혈 및 적혈구 중 크롬 농도 측정

전혈 및 적혈구 중 크롬의 농도측정은 Panev 등(1996) 및 Nomiyama 등(1980)의 방법에 준하여 실시하였다. 이를 위해 먼저 전혈 3 ml을 헤파린 처리된 vacutainer에 채혈하여 전혈 중 크롬농도측정에 사용하였고, 적혈구내 농도를 측정하기 위해서는 전혈 5 ml을 15 ml vacutainer에 채혈하여 같은 양의 normal saline용액과 혼합하여 완전히 세척한 다음 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 상등액을 제거하였다. 동일한 과정을 5회 반복한 후 2.5 ml의 초순수를 첨가한 후 적혈구 중 크롬 측정 시료로 사용하였다. 적혈구 중 크롬농도의 측정은 1.25%(NH₄)₂HPO₄와 1% Triton X-100으로 조제한 희석액 600 μl와 1% HNO₃ 200 μl를 취하여 여기에 적혈구 시료 200 μl를 혼합한 후 크롬바탕보정장치와 자동시료 주입장치가 부착된 흑연로 원자 흡수 분광광도계(GF-AAS, SIMAA 6000, German)로 측정하였다. 전혈 시료의 전처리를 위해 1.25%(NH₄)₂HPO₄와 1% Triton X-100용액을 사용하였다.

GF-AAS는 건조 3단계[1단계: 50~80°C(40초), 2단계: 80~120°C(10초), 3단계: 120~400°C(30초)], 회화 3단계[1단계: 400~600°C(40초), 2단계: 600°C(10초), 3단계: 700°C(5초)], 원자화 단계 2,900°C(5초)로 온도프로그램을 설정하였으며 분석파장은 357.9 nm로 분석하였다.

표준용액조제는 1000 ppm(Sigma)의 크롬원액을 1% HNO₃로 희석하여 0.5, 1.0, 1.5 μg/dl로 조제하여 만들었다.

크롬 폭로 흰쥐의 요중 크롬농도 측정

요중 크롬은 Nomiyama 등(1980)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉 흡입폭로 종료 후 약 15 ml을 채취하여 농질산 2 ml을 주입한 후 microwave oven에서 유기물질을 완전히 분해시켰다. 산처리된 시료 0.2 ml를 10% 질산 200 μl와 600 μl의 1% Triton X-100에 잘 혼합한 후 혈중 크롬 분석방법과 동일한 기기와 온도 프로그램조건, 파장으로 분석하였다.

표준용액의 조제는 크롬액 1000 ppm 원액을 1%의 HNO₃로 희석하여 4, 8, 16, 24 μg/l 표준용액을 만들었다. 요중 크롬의 농도는 요중 크레아틴으로 보정하여 μg/g creatinine으로 표시하였다.

요중 크레아틴은 요시료를 원심분리 시킨 후 상등액을 생화학분석기(Olympus AU 400, Japan)를 이용하여 Jaffe method로 분석하였다. 요중 크롬농도의 검출한계는 0.10 μg/l 이었다.

흰쥐 혈액에서의 지질과산화의 측정

크롬에 의해 반복 흡입 폭로시킨 흰쥐의 혈액내 형성된 지질과산화의 수준은 혈액내 지질과산화물(plasma lipoperoxide)을 인산으로 가수분해시켜 그 산물인 malondialdehyde(MDA)를 분석하여 측정하는데 시험관내에서 thiobarbitic acid와 adduct를 형성시켜 측정하는 것으로 Nielsen 등(1997)의 방법에 준하여 실시하였다.

(1) 사용시약

MDA 측정에 사용한 trichloroacetic acid 및 thiobarbituric acid는 Sigma제를 사용하였으며, 염산은 Merk제를 사용하였다.

(2) 측정절차

헤파린 처리된 vacutainer에 크롬 흡입폭로된 흰쥐의 복대동맥에서 채취한 혈액을 2,500 g에서 5분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다.

분리한 혈장과 TCA-TBA-HCl 조제시약(15% w/v trichloroacetic acid; 0.375% w/v thiobarbituric acid; 0.25 N HCl)을 1:2로 혼합하여 끓는 물 속에서 열을 가해 반응시킨다. 반응이 끝나면 이를 식힌 후 1,000 g에서 10분간 원심분리한 후 535 nm의 파장에서 형광 분광분석계(UV-spectrophotometer, Beckman U650)을 이용하여 MDA 농도를 측정하였다. 이 때 반응물의 농도는 분자흡수계수(molar absorption coefficient)를 1.56×10⁵ M⁻¹Cm⁻¹로 하여 다음의 계산식으로 산출하였다.

$$\text{Molar concentration, } C_m \text{ (S)} = \frac{E(s) - E(RB)}{\epsilon d} \frac{F_v}{S_v}$$

E(s): sample extinction

E(RB): reagent blank extinction

ε: molar extinction coefficient, 1.56×10⁵ M⁻¹Cm⁻¹

Fv: final volume
Sv: sample volume

통계적 분석

본 연구에서 대조군과 폭로군 간의 변수들의 차이 및 변수들간의 상관관계를 통계학적으로 검정하기 위해 SPSS 10.0 프로그램을 이용, Kruskal-Wallis ANOVA, Dunn's multiple comparison, Pearson's Correlation Analysis 등을 이용하였다.

결 과

흡입 챔버내의 공기중 크롬농도

흡입챔버내 공기중 6가 크롬농도를 측정된 결과, 각 농도군에 있어 폭로기간에 따른 농도차이는 통계학적으로 유의하지 않았다(Table 1).

그러나 당초 실험물질인 크롬산 나트륨의 목표 폭로농도는 0.18 mg/m³ 및 0.90 mg/m³이었으므로 실제 폭로된 측정농도는 목표농도보다 약 10% 낮게 측정되었다.

크롬 흡입폭로된 흰쥐에서의 전혈, 적혈구중 크롬농도 및 요중 크롬 농도

크롬산 나트륨(Na₂CrO₄ · 4H₂O)을 농도별 및 폭로기간에 따라 흡입 폭로시킨 흰쥐의 혈중 및 요중 크롬 농도를 측정

Table 1. Airborne hexavalent chromium concentrations measured from sodium chromate mist-exposed inhalation chambers by exposure duration and chromium concentration

Exposure duration (week)	No. of samples	Chromium concentration (mg/m ³)	
		GM (GSD)	
		Low exposure	High exposure
1	5	0.151 (1.15)	0.813 (1.32)
2	7	0.148 (1.35)	0.776 (1.32)
3	5	0.155 (1.26)	0.794 (1.32)
total	17	0.166 (1.20)	0.794 (1.29)

low exposure, 0.18 mg/m³; high exposure, 0.9 mg/m³
GM: geometric mean GSD; geometric standard deviation

한 결과 Table 2와 같았다.

크롬 폭로 저농도군(0.18 mg/m³)에서 살펴보면, 전혈 및 적혈구 중 크롬의 농도는 폭로기간에 따라 증가하는 경향을 보였으나 각 군간의 차이는 통계적으로 유의하지 않았다. 한편 요중 크롬 농도의 경우 1주 폭로군에서 189.19 µg/g creatinine으로 가장 높게 나타났으며 각 군간의 차이 또한 통계적으로 유의하였다.

크롬 폭로 고농도군(0.9 mg/m³)에서 살펴보면 전혈 및 적혈구 중 크롬의 농도는 폭로기간이 길수록 높게 나타났으며 그 차이도 통계적으로 유의하였다. 또한 요중 크롬의 농도는 저농도에서와 마찬가지로 1주 폭로군에서의 농도가 가장 높

Table 2. Mean chromium concentrations in whole blood, erythrocytes, and urine of rats exposed to sodium chromate

Exposure duration (week)	N ^a	GM (GSD)					
		Cr in blood (µg/l)		Cr in erythrocytes (µg/l)		Cr in urine* (µg/g creatinine)	
		low exposure	high exposure	low exposure	high exposure	lowexposure	high exposure
1	5	19.87(1.17)	175.07(1.10)	27.78(1.26)	273.59(1.12)	189.19(1.10)	934.76(1.05)
2	5	24.23(1.15)	255.21(1.12)	36.80(1.20)	419.08(1.10)	145.20(1.12)	385.74(1.10)
3	6	28.03(1.55)	269.22(1.17)	46.36(1.66)	437.93(1.15)	163.42(1.07)	840.43(1.10)

a, number of studied
*, p<0.001, ANOVA test
low exposure, 0.18 mg/m³; high exposure, 0.9 mg/m³
GM: geometric mean GSD; geometric standard deviation

Table 3. Correlation coefficient matrix among selected study variables of rats exposed to sodium chromate

	Log Cr-A	Log Cr-WB	Log Cr-E	Log Cr-U
Log Cr-A	1.000			
Log Cr-WB	0.942**	1.000		
Log Cr-E	0.946**	0.994	1.000	
Log Cr-U	0.824**	0.798**	0.825**	1.000

Log Cr-A, Log hexavalent chromium in air (mg/m³)
Log Cr-WB, Log hexavalent chromium in whole blood (µg/l)
Log Cr-E, Log hexavalent chromium in erythrocytes (µg/l)
Log Cr-U, Log hexavalent chromium in urine (µg/g creatinine)
**, p<0.01, Pearson's Correlation

Table 4. The Malondialdehyde (MDA) concentration in the blood plasma of the rats inhaled with $\text{Na}_2\text{CrO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($\mu\text{mol/l}$)

Exposure duration (week)	N ^c	MDA ($\mu\text{mol/l}$, mean \pm SD)		
		(% to control mean value)		
		control	low exposure	high exposure
1 ^b	5	4.51 \pm 0.50 (100.0 \pm 11.2)	5.63 \pm 0.24 (124.8 \pm 5.4)*	5.94 \pm 0.62 (131.8 \pm 13.7)*
2 ^a	5	2.35 \pm 0.22 (100.0 \pm 9.5)	2.81 \pm 1.10 (119.8 \pm 11.7)	3.14 \pm 1.21 (135.4 \pm 24.6)*
3	6	3.44 \pm 0.33 (100.0 \pm 9.70)	4.09 \pm 0.37 (118.9 \pm 10.7)*	4.13 \pm 0.21 (119.9 \pm 6.0)*

*, $p < 0.05$, Multiple comparison versus control (Dunn's method)

^a, $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$, Multiple regression by dose variable

^c, number of animals studied low exposure, 0.18 mg/m^3 ; high exposure, 0.9 mg/m^3

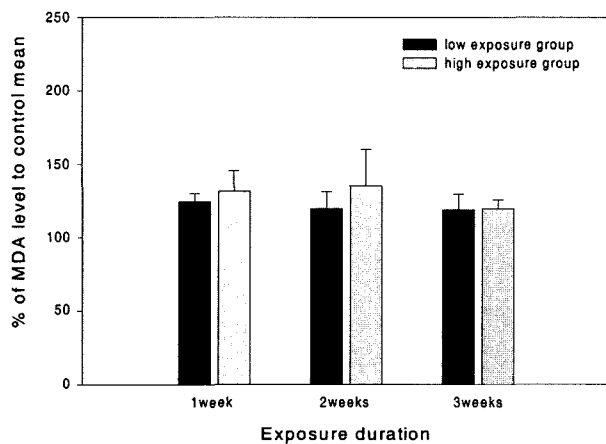


Fig. 2. The Malondialdehyde (MDA) levels in the blood plasma of the rats inhaled with $\text{Na}_2\text{CrO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($\mu\text{mol/l}$).

*, $p < 0.05$, Multiple Comparison versus control (Dunn's method) low exposure, 0.18 mg/m^3 ; high exposure, 0.9 mg/m^3 .

있고 각 군간의 농도는 통계적으로 유의하게 차이를 나타내었다. 즉 요중 크롬은 폭로초기에 농도가 상승하였다가 일단 배설되고 시간이 지남에 따라 배설율이 낮아짐을 나타내었다.

크롬산 나트륨을 흡입 폭로시켜 챔버내 공기중 6가 크롬, 전혈, 적혈구 및 요중 크롬 농도간의 상관관계를 분석한 결과 Table 3과 같았다. 각 항목은 모두 서로 상관성이 높게 나타났는데 특히 전혈 중 크롬 농도와 공기중 6가 크롬의 상관정도 및 적혈구 중 크롬농도와 공기중 6가 크롬 농도의 상관정도는 거의 비슷하여($R^2=0.942$ 및 0.946) 혈중 크롬측정은 전혈이나 적혈구 어느 쪽 하나의 매질을 택하여 측정하여도 상등함을 보여주었다.

흰쥐 혈액에서의 Malondialdehyde(MDA)의 측정

크롬 흡입폭로에 의한 지질과산화의 정도를 파악하기 위해 크롬산 나트륨을 흡입폭로시킨 흰쥐의 혈장 내의 MDA를

측정한 결과, Table 4 및 Fig. 2와 같았다.

1주간 크롬산 나트륨에 흡입 폭로시킨 흰쥐에 있어서 저농도군 및 고농도군에서 생성된 MDA농도는 각각 $5.63 \mu\text{mol/l}$ 및 $5.94 \mu\text{mol/l}$ 로 대조군의 것에 비해 각각 24.8%, 31.8% 정도 통계적으로 유의하게 상승하였으며 양반응 관계를 나타내었다($R^2=0.61$, $p < 0.01$).

2주간 흡입 폭로시킨 흰쥐에 있어서는 저농도군 및 고농도군에서 생성된 MDA농도는 각각 $2.81 \mu\text{mol/l}$ 및 $3.14 \mu\text{mol/l}$ 로 대조군에 비해 각각 19.8%, 35.4% 정도 상승한 양상을 나타내었으나 고농도군에서만 통계적 유의성을 나타내었으며 폭로 농도에 따른 양반응 관계 또한 보여 주었다($R^2=0.59$, $p < 0.05$).

3주간 흡입 폭로시킨 흰쥐에 있어서는 저농도군 및 고농도군에서 생성된 MDA농도는 각각 $4.08 \mu\text{mol/l}$ 및 $4.12 \mu\text{mol/l}$ 로 대조군의 것에 비해 각각 11.9%, 19.9% 정도 통계적으로 유의하게 상승하였으며 수치적으로 양반응 관계를 나타내었으나 통계적으로는 유의하지 않았다.

이와 같은 결과로써 6가 크롬을 흡입시킨 흰쥐에 있어서 혈액내 MDA는 폭로 후 2주정도까지는 양반응 관계와 함께 대조군에 비해 유의하게 생성되지만 3주 이후에는 대조군 수준으로 회복되는 양상을 나타내어 6가 크롬폭로에 의한 지질과산화 현상은 폭로초기에 대해서는 유용한 지표가 될 수 있었다.

흰쥐에서 각 노출변수와 MDA농도와의 상관성

크롬산 나트륨을 흡입 폭로시킨 흰쥐에 대해 측정한 혈중 크롬, 적혈구내 크롬, 요중 크롬농도의 폭로변수들과 혈액내 MDA농도의 상관성을 Pearson Correlation Analysis를 실시한 결과, 1주 폭로군에서 MDA와 요중 크롬농도와 상관성($R^2=0.62$, $p < 0.01$)이 관찰되었다. 2주 폭로군과 3주 폭로군에서는 MDA의 농도는 노출 변수들과 상관관계를 나타내지

Table 5. Correlation coefficient matrix between MDA levels and exposure variables of rats

	Log Cr-A	Log Cr-WB	Log Cr-E	Log Cr-U
Log MDA-1week	0.324	0.518	0.531	0.620**
Log MDA-2week	0.442	0.336	0.376	0.358
Log MDA-3week	0.346	0.499	0.158	0.527

Lcg Cr-A, Log hexavalent chromium in air (mg/m³)
 Lcg Cr-WB, Log hexavalent chromium in whole blood (µg/l)
 Lcg Cr-E, Log hexavalent chromium in erythrocytes (µg/l)
 Lcg Cr-U, Log hexavalent chromium in urine (µg/g creatinine)
 Lcg MDA-1week, Log MDA in blood plasma (µmol/l) after 1week exposure
 Lcg MDA-2week, Log MDA in blood plasma (µmol/l) after 2week exposure
 Lcg MDA-3week, Log MDA in blood plasma (µmol/l) after 3week exposure

** . p<0.01, Pearson's Correlation

없었다(Table 5). 이로써 MDA는 실험동물에 있어서의 크롬 폭로 후 초기에 내적 폭로량 즉 요중 크롬을 어느 정도 반영하는 지표라고 간주되었다.

고 찰

크롬에 노출된 사람의 체내에 흡수된 크롬 양은 크롬화합물의 노출수준, 크롬의 원자가, 체내에서의 용해정도 및 물질의 환원능력, 입자의 크기 등에 의해 영향을 받는다. 한편 크롬 화합물의 생물학적 노출의 평가에 이용되어 왔던 기존의 요중 및 혈중 크롬농도는 크롬 노출로 인한 체내 부하의 유해성 평가보다는 개인의 식이 습관이나 일반 생활환경의 오염원을 포함한 최근 총크롬 노출량을 반영하며 3가 크롬과 6가 크롬의 노출을 구별할 수 없어 6가 크롬에 직업적으로 노출된 근로자의 노출평가도구로 부적합하다는 것이 지적되기도 하였다(Harzdorf & Lewalter, 1997; Lukanova, et al., 1996).

크롬 특히 6가 크롬은 시험관내(*in vitro*) 혹은 생체내(*in vivo*) 연구방법에 따른 몇몇의 연구보고에 따르면 유전적 수준(genomic level) 혹은 세포수준에서 유전자변이(gene mutation), DNA 병변, 거대분자합성의 저해, 세포주기변화, apoptosis, premature terminal growth arrest, 신생조직변형(reoplastic transformation), 산화적 손상 등을 일으키는 것으로 보고되고 있다(Bridgewater, et al., 1994; De Flora & Wetterhahn, 1989; Elias, et al., 1989).

6가 크롬에 의한 발암성에 대해서는 실험동물과 사람에 대한 역학조사에서 그 유의성이 제시되어 왔는데, 크롬 폭로 작업장 근로자나 환경적으로 폭로된 사람들에게 대해 실시한 역학조사결과에 따르면 크롬 폭로자들에게 있어서 비중격 천공,

호흡기도 및 피부궤양 등의 장애 뿐 아니라 폭로 후 오랜 시간 후에 폐암을 비롯한 호흡기계 암을 유발하는 것으로 보고되어 있다(Ishikawa, et al., 1994; Kortenkamp, 1997; Sorhan et al., 1998).

이러한 유해성이 있는 크롬에 폭로되는 사람의 건강보호를 위해 산업장에서는 노출기준을 설정해 놓고 환경적으로 관리하고 있다(노동부, 1998; NIOSH, 1994; ACGIH, 2000). 공기 중 총크롬 및 6가 크롬농도 이외에 크롬폭로의 내적 폭로지표인 요중 크롬과 혈중 크롬농도 또한 폭로를 확인하는 방법은 되나 그 자체만으로 잠재적인 발암의 위험성에 대한 지표가 될 수 없다는 제한점을 가지고 있다.

따라서 크롬에의 폭로와 암 발생 위험과의 관계 설립이 필요하다고 여겨져 그 동안 6가 크롬의 효과를 모니터링하기 위한 세포학적인 감시 연구가 이루어져 왔다. 주로 크롬 폭로근로자의 혈액 림프구를 이용한 염색체이상이나 자매염색체 교환을 실시함으로써 초기 생물학적 효과지표(early biological effect marker)와 내적 폭로지표(internal exposure marker)의 상대적 민감도에 대한 평가가 가능하게 되었다(Choi, et al., 1987; Nagaya, 1986; Nagaya et al., 1991; Sbrana et al., 1990). 그러나 대부분의 연구에서는 내적 폭로지표를 주로 크레아티닌으로 보정한 요중 크롬을 채택하였으며 연구 결과의 대부분은 폭로군과 대조군에 있어서 염색체이상 혹은 자매염색체이상의 빈도 차이가 없었고 통계적으로 유의한 증가를 나타낸 연구보고는 소수이었다.

따라서 크롬 폭로 후 오랜 시간이 지난 뒤 발생할 수 있는 질병에 이르는 생물학적 변화 중 조기단계에 감지할 수 있는 좀더 유용한 생물학적 효과 또는 반응 지표(biologically effective or response marker, Shulte & Perera, 1997)의 필요성이 강조되어 왔다.

본 연구에서는 폭로지표보다는 좀더 발암 위험과 질병 스펙트럼 상 가까운, 좀 더 유용한 세포학적 지표를 찾음으로써 이들 지표가 크롬 폭로 사람집단에 있어서 적용할 만 한지의 여부를 판단하기 위하여, 크롬에 의한 암 발생에 기여할 것이라고 여겨지는 산화적 손상 중 지질과산화 현상을 실험동물 수준에서 살펴보았다.

먼저 흡입챔버를 이용하여 크롬산 나트륨을 미스트의 상태로 흡입폭로시킨 흰쥐에 대해 전혈, 적혈구 및 요중 크롬농도를 측정된 결과 실험적으로 폭로시켰던 공기 중 농도와 좋은 상관관계를 나타내었는데 이때 챔버 내 폭로농도와 전혈과의 상관성과 적혈구와의 상관성은 거의 같게 나타났다. 즉 혈액 내에서 측정하는 크롬의 폭로량은 전혈과 적혈구에서 상동함을 나타내었다.

유전 독성은 정상적으로는 암에 이르는 신생물 변형(neoplastic transformation)에 대한 전제조건으로 여겨지고 있다. 크롬은

다양한 범위의 유전 독성 병변을 나타내고 이들 중 어떤 것들은 세포주기 포획 그리고 apoptosis와 같은 세포반응과도 관련된다. Manning과 Patierno(1996)의 보고에 따르면 발암 과정(carcinogenesis)과 apoptosis는 산화적 스트레스(oxidative stress)와 같은 자극에 따라 일어나기도 하며 공통적으로 myc, bcl-w 및 p53과 같은 조절 유전자(common regulatory gene)를 공유하고 있다고 하였다.

6가 크롬은 LD50의 50%의 농도일 때 효과적으로 reactive oxygen species를 형성하여 산화적 세포 및 DNA 손상을 초래하는 것으로 보고하고 있다. 이들은 또한 LD50의 50%의 농도로 크롬산 나트륨을 경구로 투여한 실험동물에서 세포내 지질 과산화와 함께 간세포 핵내 DNA-single strand break를 관찰하였다(Bagchi, *et al.*, 1997). 지질과산화는 oxygen free radical에 의해 조직에 손상을 일으키는 일반적인 기전의 하나로 다양한 질병과 관련되어 있는 것으로 알려져 있으며(Wong, 1987), 그의 지질 과산화 산물인 Malondialdehyde (MDA)는 지닌 glycyaldehyde 및 β -propiolactone과 구조가 비슷하여 주로 아미노기와 높은 반응성에 의해 유전적 손상을 가져올 수 있음이 보고되었다(Shamberger, *et al.*, 1974). 따라서 MDA의 농도측정으로 크롬 폭로에 의한 암 발생의 초기단계의 세포수준에서의 산화적 손상을 나타낼 수 있는 지를 발견하기 위해 상기와 동일한 크롬산 나트륨 미스트에 흡입 폭로된 흰쥐의 혈장 내에서 MDA 농도를 측정하였다. 그 결과 1주, 2주, 3주간 흡입폭로시킨 흰쥐에서의 MDA농도는 대조군에 비해 모두 상승되었음을 나타내었고 동시에 흡입시켰던 공기 중 크롬의 농도와 양반응 관계도 관찰되었다. 이러한 결과는 Bagchi 등(1995)이 크롬산 나트륨을 만성적으로 폭로시킨 흰쥐의 요에서 측정했던 지질 과산화물을 관찰한 결과와 일치하였다.

금속이온은 일반적으로 개체 내에서 많은 산화환원반응물을 만들어 내고 있다. Sunderman 등(1989)은 염화니켈을 투여한 흰쥐의 폐포 대식세포에서 지질과산화가 증가한 것을 보고하는 등 납을 투여한 몇몇 동물실험에서도 표적장기에서 지질과산화현상이 증가함을 보고하였다(Levander, *et al.*, 1977). 이들 연구보고와 함께 금속이온은 산소라디칼을 포함한 자유라디칼의 생성에 기여하는 것으로 알려졌다. 본 연구에 있어서 6가 크롬에 노출되었던 흰쥐의 혈장내 지질과산화물이 유의하게 증가한 것도 이들 금속이온에 의한 자유라디칼 생성에 따른 것으로 추론할 수 있었다.

또한 본 연구에 있어서 노출기간 2주까지는 흡입노출농도에 따른 용량반응을 나타내었는데 이러한 실험적 관찰결과를 토대로, 크롬 폭로에 의한 MDA생성은 크롬 폭로 사람집단에 적용할 만한 의미가 있다고 여겨졌다. 단지 3주 노출군에 있어서 용량반응정도가 미약한 것을 볼 때 장기간 노출

을 반영하기엔 다소 무리가 있다고 생각되었다. 노출지표와의 상관관계를 분석한 결과에 있어어도 1주 노출군에서 측정된 MDA농도가 흰쥐의 요에서 분석한 크롬농도와 상관성을 나타내었고, 2, 3주 노출군에서의 유의성을 관찰되지 않았다. 또 본 연구에서의 측정매질이었던 혈액내의 크롬농도와 상관관계를 나타내지는 않았고 요중 크롬과 상관성을 나타낸 것은 크롬에 의한 지질 과산화의 대사체를 측정하는데 있어 요가 더 적절할 수 있을 가능성을 나타내었다.

본 연구결과, 크롬에 의한 지질 과산화는 실험동물에 있어서는 크롬 폭로에 대한 유용한 반응지표로 관찰되었으며, 앞으로 크롬에 폭로된 사람집단에서는 대조군과의 비교에서는 유용성을 나타낼 가능성이 검토되었다.

참고문헌

- 노동부 고시 제 97-65호, 화학물질 및 물리적 인자의 노출기준 (1998)
- Aiyar, J. K.M. Borges, R.A. floyd, K.E. Wetterhahn (1989): Role of chromium (V), glutathione thiol radical and hydroxyl radical intermediates in chromium(VI)-induced DNA damage. *Toxicol. Environ. Chem.* **22**, 135-148.
- American Conference of Governmental Industrial Hygienist (ACGIH) (2000): Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Indices for 1999-2000. ACGIH, Cincinnati, OH.
- Anderson, R.A. (1997): Chromium as an essential nutrient for humans. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **26**, 35-41.
- Bagchi, D., E.A. Hassoun, and M. Bagchi (1995): Oxidative stress induced by chronic administration of sodium dichromate [Cr(VI)] to rats. *Comp. Biochem. Physiol.* **110C**, 281-287.
- Bagchi, D., P.J. Vuchetich, M. Bagchi, E.A. Hassoun, M.X. Tran, L. Tang, S.H. Stohs (1997): Induction of oxidative stress by chronic administration of sodium dichromate (chromium VI) and cadmium chloride (Cadmium II) to rat. *Free Radical Biology & Medicine* **22**, 471-478.
- Bridgewater, L.C., F.C.R. Manning and S.R. Patierno (1994): Base-specific arrest of *in vitro* DNA replication by carcinogenic chromium: relationship to DNA interstrand crosslinking. *Carcinogenesis* **14**, 2421-2427.
- Choi, Y.J., Y.W. Kim and C.W. Cha (1987): A study on sister chromatid exchanges in lymphocytes in some metal plating workers. *Korea University Medical Journal* **24**, 249-257.
- De Flora, S. and K.E. Watterhahn (1989): Mechanisms of chromium metabolism and genotoxicity. *Life Chem. Rep.* **7**, 169-244.
- De Flora, S., M. Bagnasco, D. Serra, P. Zancchi (1990): Genotoxicity of chromium compounds, A Review. *Mutation Research* **238**, 99-172.
- Elias, Z., O. Poirot, H. Pezerat, H. Suquet, O., Schneider, M.C. Daniere, F. Terzetti, F. Baruthio, M. Fournier and C. Cavalier (1989): Cytotoxic and neoplastic transforming effects of industrial hexavalent chromium pigments in Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* **10**, 2043-2052.

- Gao, M., L.S. Levy, S.P. Faux, C.T. AW, R.A. Braithwaite and S.S. Brown (1994): The use of molecular epidemiological techniques in a pilot study on workers exposed to chromium. *Occupational and Environmental Medicine* **51**, 663-668.
- Harzendorf, C. and J. Lewalter: Analytical methodology for biological monitoring of chromium. *Regul. Toxicol. and Pharmacol.* **26**, 586-593 ().
- Herman, A., D. Brahram, O.D. Lars, G. Mikael, M. Ase, S.L. Hansen, O. Henrik, N. Flemming, N. Per Sabros, R. Edith, W. Hakan and E.K. Lisbeth (1999): Biomarkers for exposure to ambient air pollution - Comparison of carcinogen-DNA adduct levels with other exposure markers and markers for oxidative stress. *Environ. Health Perspectives* **107**, 223-238.
- Ishikawa, Y., K. Nakagawa, Y. Satoh, T. Kitagawa, H. Sugano, T. Hirano and E. Tsuchiya (1994): Characteristics of chromate workers' cancer, chromium lung deposition and precancerous bronchial lesions: an autopsy study. *Br. J. Cancer* **70**, 160-166.
- Kasai, H., P.F. Crain, Y. Kuchino, S. Nishimura, A. Ootsuyama and H. Tanooka (1986): Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis* **7**, 1849-1851.
- Kawanishi, S., S. Inoue, S. Sano (1986): Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate (VI) in the presence of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* **261**, 5952-5958.
- Krcenkamp, A., P. O'Brien and D. Beyersmann (1991): The reduction of chromate is a prerequisite of chromium binding to cell nuclei. *Carcinogenesis* **12**, 1143-1144.
- Krcenkamp, A.: Review (1997): Problems in the biological monitoring of chromium (VI) exposed individuals, *Biomarkers* **2**, 73-80.
- Levander, O.A., Morris, V.C., Ferretti, R.J. (1977): Filterability of erythrocytes from vitamin E-deficient, lead-poisoned rats. *J. Nutr.* **107**, 363-72.
- Lukanova, A., P. Toniolo, A. Ihtkovich, V. Nikalova, T. Panev, T. Popov, E. Taioli, M. Costa (1996): Occupational exposure to Cr (VI): Comparison with between chromium levels in lymphocytes, erythrocytes, and urine. *International Archives of Occupational and Environmental Health* **69**, 39-44.
- Manning, F.C.R., J. Xu and S.R. Patierno (1992): Transcriptional inhibition by carcinogenic chromate: relationship to DNA Damage. *Mol. Carcinog.* **6**, 270-279.
- Manning, F.C.R. and S.R. Patierno (1996): Apoptosis: inhibitor or instigator of carcinogenesis. *Cancer Invest.* **14**, 455-465.
- Nagaya, T. (1986): No increase in sister-chromatid exchange frequency in lymphocytes of chromium platers. *Mutation Research* **170**, 129-132.
- Nagaya, T., N. Ishikawa, H. Hata and T. Otobe (1991): Sister-chromatid exchanges in lymphocytes from 12 chromium platers: a 5-year follow-up study. *Toxicology Letters* **58**, 329-335.
- National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) (1994): NIOSH recommendations for Occupational Safety and Health. Compendium of Policy Document and Statements. NIOSH, Cincinnati, OH. pp. 63-64.
- Nielsen, F., B.B. Mikkelsen, J.B. Nielsen, H.R. Anderson, P. Grandjean (1997): Plasma-malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin. Chem* **43**, 1209-1214.
- Nomiyama, H., M. Yotoryama and K. Nomiyama (1980): Normal chromium levels in urine and blood in Japanese subjects determined by the direct flameless atomic absorption spectrophotometer and chemical forms of chromium in urine after exposure to hexavalent chromium. *Am. Ind. Hyg. Assoc.* **41**, 98-102.
- Panev, T., T. Popov, E. Taioli and M. Costa (1996): Occupational exposure to Cr(VI): Comparison with between chromium levels in lymphocytes, erythrocytes, and urine. *Int. Arch. Occup. Health* **69**, 39-44.
- Popp, W., C. Vahrenholz, W. Schmieding, E. Krewet and K. Norpoth (1991): Investigations of the frequency of DNA strand breakage and cross-linking and of sister chromatid exchange in the lymphocytes of electrical welders exposed to chromium- and nickel-containing fumes. *International Archives of Occupational and Environmental Health* **63**, 115-120.
- Sbrana, I., S., Caretto, D. Lascialfari, G. Rossi, M. Marchi and N. Loprieno (1990): Chromosomal monitoring of chromium-exposed workers. *Mutation Research* **242**, 305-312.
- Shamberger, R.J., T.L. Andrione and C.E. Willis (1974): Antioxidants and cancer. VI. malondialdehyde has initiating activity as a carcinogen. *J. Nat. Cancer Inst.* **53**, 1771-1773.
- Shulte, P.A. and F.P. Perera (1997): A conceptual and historical framework for molecular epidemiology. In: *Molecular Epidemiology Part I, Academic Press Inc., New York*, pp. 3-44.
- Singh, J., D.L. Carlisle, D.E. Pritchard, S.R. Patierno (1998): Chromium-induced genotoxicity and apoptosis: Relationship to chromium carcinogenesis (review). *Oncol. Rep.* **5**, 1307-1318.
- Snow, E.T.: Metal carcinogenesis (1992): mechanistic implications. *Pharmacol. Ther.* **53**, 31-65.
- Sorhan, T., D.C. Burges, L. Hamilton, J.M. Harrington (1998): Lung cancer mortality in nickel/chromium platers, 1946-1995. *Occup. Environ. Med.* **55**, 236-242.
- Sunderman, F.W., Hopper, S.M., Lin, S.M., Plowman, M.C., Stojanovic, T., Wong, S.H.Y., Zaharia, O., Ziebkka, A. (1989): Toxicity to alveolar macrophages in rats following parenteral injection of nickel chloride. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **100**, 107-118.
- Susa, N., S. Ueno, Y. Furukawa, J. Ueda and M. Sugiyama (1997): Potent protective effect of melatonin on chromium (VI)-induced DNA single strand break, cytotoxicity and lipid peroxidation in primary cultures of rat hepatocytes. *Toxicol. & Applied Pharmacol.* **144**, 377-384.
- Tsou, T-C, C-L Chen, T-Y Liu and J-L Yang (1996): Induction of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA by chromium (III) plus hydrogen peroxide and its prevention by scavengers. *Carcinogenesis* **17**, 103-108.
- Wang, J., K. Ashley and D. Marlow (1999): Field method for the determination of hexavalent chromium by ultrasonication and strong anion-exchange solid phase Extraction. *Analytical Chemistry* **71**, 1027-1032.
- World Health Organization (WHO) (1988): *Environmental Health Criteria 61: Chromium*. WHO, Geneva.
- Wong, S.H.Y., J.A. Knight, S.M. Hopfer, O. Zaharla, C.N. Leach Jr. and F.W. Sundermann (1987): Lipoperoxides in plasma as

- measured by liquid chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin. Chem.* **33**, 214-220.
- Xu, J., G.J. Bubley, B. Detrick, L.J. Blankenship and S.R. Patierno (1996): Chromium(VI) treatment of normal human lung cells results in guanine-specific DNA polymerase arrest, DNA-DNA crosslinks and S-phase blockade of the cell cycle. *Carcinogenesis* **17**, 1511-1517.
- Yiin, S.J., T.H. Lin and T.S. Shih (1996): Lipid peroxidation in workers exposed to manganese. *Scand. J. Work Environ. Health* **22**, 381-6.
- Zhitkovich, A., A. Lukanova, T. Popov, E., Taioli, H. Cohen, M. Costa and P. Toniolo (1996): DNA-protein crosslinks in peripheral lymphocytes of individuals exposed to hexavalent chromium compounds. *Biomarker* **1**, 86-93.