

Effect of Aging on the Xylene Metabolism in CCl₄-Induced Liver Damaged Rats

Hyun-Hee Kim and Chong-Guk Yoon[†]

Department of Public Health, Keimyung University, Taegu, 704-701, Korea

To investigate an effect of aging on the xylene metabolism in liver damaged animals, a study was conducted. 50% carbon tetrachloride (CCl₄) in olive oil (0.1 ml/100 g body weight) was intraperitoneally given to 5-week and 12-week rats 12 times every other day and then one dose of 50% xylene in olive oil (0.25 ml/100 g body weight) was intraperitoneally given to the rats, and after 24 hr, the animals were sacrificed. On the basis of the functional findings in rat liver, ie, serum levels of alanine aminotransferase activity, liver protein and malonedialdehyde contents, 5-week rats showed less liver damage than 12-week rats. The increasing rate of urinary methylhippuric acid concentration to the control was significantly higher in 5-week rats than 12-week rats in case of xylene treatment after induction of liver damage. On the other hand, liver damaged 5-week rats showed significant rise of hepatic cytochrome P450 content compared with the liver damaged 12-week rats by the xylene treatment. And increasing rate of hepatic alcohol or aldehyde dehydrogenase activities to each liver damaged animals was higher tendency in 5-week rats than 12-week rats by the xylene treatment.

In conclusion, 5-week rats showed greater metabolic rate of xylene than 10-week rats in case of liver injury because 5-week rats led to a slight liver damaged compared with 12-week rats.

Key Words: Aging, Liver damaged rats, Xylene metabolism

서 론

최근 산업의 급속한 발전에 따른 산업화학물질 사용의 계속적인 증가와 이로 인한 환경오염으로 인간의 건강은 위협을 받고 있으며, 이들 산업화학 및 환경오염물질의 인체에 폭로 시 연령, 성별, 병태생리적 현상에 따라서 생체 내 중독 현상이 달리 나타난다고 한다¹⁾. 특히 이들 환경화학물질이 연령에 따라 생체 내 중독현상이 다양하게 나타날 수 있기 때문에²⁾ 이에 대한 특단의 예방대책이 강구되어야 할 것으로 사료된다.

이와 같은 환경화학물질 중 산업화학물질로서 xylene은 산업장에서 유기용제로 많이 사용되고 있으나, 인체에 폭로 시 신경계³⁾, 조혈계²⁾ 및 간손상^{4,17)} 등이 야기되고 있어 이의 유해성 재평가가 요구되고 있다.

한편 xenobiotics의 대사가 연령에 따라 상당한 차이가 나타나고 있음이 보고되고 있으며, 최근 윤 등²⁾은 실험동물에 있어서 CCl₄에 의한 간손상이 연령에 따라 차이가 나타남을

관찰하였으며, 이 등¹⁾은 xylene에 의한 독성이 실험동물의 연령에 따라 달리 나타남을 보고하였다. 또한 이 등¹⁾은 CCl₄에 의한 간손상이 xylene 대사에 상당한 영향을 미침을 관찰하였다. 그러므로 연령에 따라 간손상이 달리 나타난다면 이에 따른 xylene 대사에도 영향을 미칠 것으로 생각되며 이에 대한 확인은 연령에 따른 병태생리적 기초자료제시에 의의가 있을 것으로 사료된다.

이에 본 연구에서는 5 및 12주령의 연령을 달리한 흰쥐에 CCl₄를 투여하여 간손상을 유도한 다음 xylene을 투여한 후 처치하며 요 중 xylene의 대사산물인 *m*-methylhippuric acid 함량을 측정하는 한편 xylene 대사에 관여하는 cytochrome P450 함량과 alcohol 및 aldehyde dehydrogenase 활성을 측정하여 이들 결과를 연령에 따라 상호비교 검토하고자 한다.

재료 및 방법

1. 동물의 사육 및 처치

실험동물은 각각 5주 및 12주간 성장시킨 의견상 건강한 SD계의 수컷흰쥐를 사용하였다. 각 실험군은 성장기간별로 5주령, 12주령과 이에 따른 CCl₄ 투여군 및 CCl₄를 전처치하여 간손상을 유도한 후 xylene 투여군 모두 6군으로 분리수

*논문 접수: 2001년 7월 10일

수정재접수: 2001년 9월 13일

[†]별책 요청 저자: 윤종국

Table 1. Effect of aging on the liver weight/body weight (L.W/B.W, %), levels of serum ALT activity, contents of hepatic protein and malondialdehyde (MDA) in CCl₄-treated rats

Parameters	5-week Rats		12-week Rats	
	Control	CCl ₄ -treated	Control	CCl ₄ -treated
L.W/B.W (%)	3.45±0.30	4.30±0.47	2.31±0.21 ^{a)}	3.53±0.36 ^{b)}
Protein ¹⁾	158.25±12.15	142.59±12.60	163.38±13.69	131.57±12.50
Serum ALT ²⁾	27.35±3.25	182.33±25.48 ^{***b)}	30.60±4.47	273.40±28.50 ^{***b)}
MAD ³⁾	0.60±0.07	1.09±0.15 ^{b)}	0.87±0.10	2.01±0.25 ^{b)}

Each value represents the mean±S.E. of 6 rats. ^{a)}Significantly different from control group of 5-week rats. ^{b)}Significantly different from each group's control. (ˆ; p<0.05, **; p<0.01, ***; p<0.001) Unit: ¹⁾mg/g of tissue, ²⁾Karmen unit/ml of serum, ³⁾nmoles/mg protein

용하였다. 물과 사료의 양은 제한없이 공급하였다.

CCl₄에 의한 간손상 유도는 CCl₄를 olive oil과 동량 혼합하여 체중 100 g 당 0.1 mL를 복강으로 1일 1회 2일 간격으로 12회 투여하였다. 간손상 유도 실험동물에 xylene 투여는 xylene과 olive oil의 동량 혼합액을 마지막 CCl₄ 투여 24시간 후 체중 100 g 당 0.25 mL 씩 복강으로 1회 주사한 다음, 24시간 후에 처치하였다. 대조군은 olive oil을 복강으로 투여하였다. 한편 대사 cage를 사용하여 xylene 투여 후 24시간 동안 요를 채취하여 *m*-methylhippuric acid 측정에 이용하였다.

동물의 처치는 ether 마취 하에 복부 정중선을 따라 개복한 다음 복부 대동맥으로부터 채혈하여 실혈사시킨 후, 4℃ 생리식염수로 간을 관류시켜 간조직 내에 남아있는 혈액을 제거한 다음 적출하였다. 적출한 간은 생리식염수로 씻은 다음 여지로 압박하여 간조직 내 남아있는 생리식염수를 가능한 모두 제거한 다음, 무게를 칭량하였다. 채취한 혈액은 3000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻어 alanine aminotransferase (ALT) 활성 측정에 사용하였다.

2. 효소원의 조제

적출한 간조직의 일정량을 칭량한 후 4배량의 0.25 M sucrose 용액을 가하여 빙냉 하에 glass teflon homogenizer로 마쇄균질액 (20% w/v)을 만들었다. 이 균질액을 600×g에서 10분간 원심분리한 다음 핵 및 미미쇄 부분을 제거한 후 상층액을 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상층액을 105,000×g에서 1시간 동안 초원심분리하여 상층액은 cytosol 분획으로, 침전물은 원층용액에 부유시켜 microsome 분획으로 하였다. Cytosol 분획은 alcohol 및 aldehyde dehydrogenase 활성도 측정용 시료로 사용하였고, microsome 분획은 cytochrome P450 함량 측정에 사용하였다.

3. 효소활성도 측정

혈청 ALT 활성 측정은 Reitman과 Frankel의 방법¹⁶⁾에 따라 조제된 kit 시액을 사용하였으며 단위는 혈청 ml 당 Karmen unit⁸⁾로 표시하였다. 간조직 중 alcohol dehydrogenase (ADH)

활성 측정은 Bergmeyer의 방법¹⁾에 따라 기질인 3-methylbenzylalcohol과 효소시료를 함께 37℃에서 10분간 반응시켜 생성된 NADH를 340 nm에서 흡광도를 측정하였으며, aldehyde dehydrogenase (ALDH) 활성 측정은 Stachow 등의 방법²⁰⁾에 준하였다. 즉 기질인 methylbenzaldehyde와 효소시료를 함께 25℃에서 5분간 반응시켜 생성된 NADH의 흡광도를 측정하였다. ADH 및 ALDH의 활성 단위는 단백질 1 mg이 1분 동안 반응하여 생성되는 NADH의 양을 μmole로 표시하였다.

4. 간조직 중 cytochrome P450 (CYP) 함량 측정

CYP의 함량 측정은 Omura와 Sato의 방법¹⁴⁾에 준하여 측정하였다. 즉 microsome 분획 부유액에 CO gas를 통기시킨 후 소량의 sodium dithionite를 넣고 또다시 CO gas를 통기시킨 후 파장 400~500 nm에서 microsomal 부유액에 CO bound microsome의 spectrum 차이를 그렸다. 또한 450~490 nm에서 흡광도의 차이를 CYP CO complex에 의한 흡광량으로 하고 CYP CO complex의 mole 흡광계수 91 mM⁻¹cm⁻¹을 이용하여 CYP의 양을 계산하였다. Microsomal CYP의 양은 단백질 1 mg 당 nmole로 표시하였다.

5. Malondialdehyde (MDA) 함량 측정

간조직 중 MDA 함량은 Ohkawa 등의 방법¹³⁾에 준하여 마쇄균질액 (20% w/v)의 MDA를 산성조건 하에 thiobarbituric acid와 반응시켜 생성된 물질을 532 nm에서 측정하였다. MDA의 함량은 간조직 g 당 nmole로 표시하였다.

6. 요 중 *m*-methylhippuric acid 정량

요 중 *m*-methylhippuric acid 정량은 high pressure liquid chromatograph를 사용하였으며, Kubota 등의 방법⁹⁾에 따라 소변 200 μl를 acetonitrile로 3배 희석한 다음 원침하여 얻은 상층액 5 μl를 colum에 주입한 후 이동상은 water-methanol-acetic acid (80:20:0.20, V/V/V)를 사용하였고, 유속은 1 ml/min으로 조정하여 분리한 *m*-methylhippuric acid를 UV-detector로 235 nm 파장에서 측정하였다. 이때 *m*-methylhippuric acid 농도 산

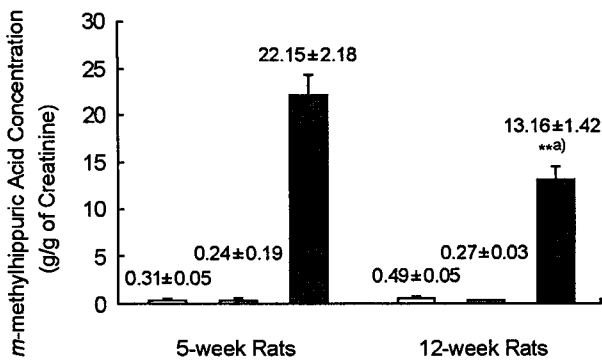


Fig. 1. Effect of aging on the urinary *m*-methylhippuric acid concentration in liver damaged rats treated with xylene. Each value represents the mean±S.E. of 6 rats and was expressed above each bar. ^a)Significantly different from damaged liver 5-week rats treated with xylene. (**; $p<0.01$), □: Control ▨: CCl₄-treated group ■: Xylene-treated group

출은 standard를 사용하여 작성된 chromatogram의 면적을 사용하여 비례식으로 산출하였으며, 동일 시료 중 creatinine 측정은 Jaffe 반응을 이용한 Butler의 방법²⁾에 준하였다. 단위는 g *m*-methylhippuric acid/g creatinine으로 나타내었다.

7. 간조직 중 단백질 정량

단백질 정량은 Lowry 등의 방법¹²⁾에 준해 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다.

8. 실험 데이터 검정

실험 데이터의 통계처리는 Student's *t*-test¹⁸⁾로 하였으며 유의수준은 0.05 이하로 하였다.

결 과

1. 성장기간에 따른 흰쥐에 CCl₄ 투여에 의한 간손상의 차이

5주령 및 12주령 흰쥐에 CCl₄ 투여에 의한 체중 당 간 무게, 간조직 중 단백질 및 MDA 함량과 혈청 ALT 활성을 나타낸 것이 Table 1과 같다. 체중 당 간 무게는 5주령이 12주령 보다 약 50%의 유의한 ($p<0.05$) 증가를 보였다. CCl₄ 투여로 인한 간조직의 단백질 함량의 감소율에 있어서 12주령은 약 19%, 5주령은 약 10% 감소되어 12주령이 5주령 보다 높게 나타남을 알 수 있었다. 그리고 CCl₄ 투여로 인한 혈청 중 ALT 활성 증가율은 5주령은 약 7배, 12주령은 약 9배의 현저한 증가를 나타내서 12주령이 5주령 보다 높게 나타났다. 간조직 중 MDA 함량에 있어서 CCl₄ 투여로 인하여 12주령에 있어서는 약 131% 유의한 ($p<0.01$) 증가를 보였으며, 5주령에서는 약 82%의 유의한 ($p<0.05$) 증가를 보였다. 따라서 간조직 중 MDA 함량 증가율 역시 12주령이 5주령 보다 높게 나타

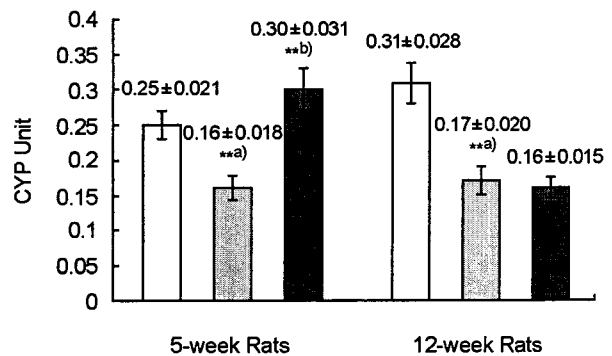


Fig. 2. Effect of aging on the hepatic cytochrome P450 contents in damaged liver rats treated with xylene. ^a)Significantly different from each control, ^b)Significantly different from damaged liver rats. (**; $p<0.01$), Unit: nmols/mg protein. □: Control ▨: CCl₄-treated group ■: Xylene-treated group

남을 알 수 있었다.

2. 요 중 *m*-methylhippuric acid 함량

5 및 12주령의 간손상 모델 실험동물에 xylene을 투여했을 때 채취한 요 중 *m*-methylhippuric acid 함량을 나타낸 것이 Fig. 1과 같다. 즉 5주령 간손상 실험동물에 xylene 투여함으로써 요 중 *m*-methylhippuric acid 함량은 12주령 간손상 실험동물의 xylene 투여한 경우 보다 약 68%의 유의한 ($p<0.01$) 증가를 보였다.

3. 간조직 중 cytochrome P450 (CYP) 함량

5 및 12주령의 간손상 모델 실험동물에 xylene 투여시 간조직 중 단백질 함량에 따른 CYP 함량을 나타낸 것은 Fig. 2와 같다. 5주령과 12주령 대조군의 CYP 함량을 비교해 볼 때 12주령이 5주령 보다 약 24% 증가되었으며 통계적인 의미는 없었다. 5주령에 있어서 CCl₄에 의한 간손상 실험군은 대조군에 비해서 CYP 함량이 약 36% 유의하게 ($p<0.01$) 감소되었으며, xylene을 투여한 군은 간손상군에 비해서 약 88%의 유의한 ($p<0.01$) 증가를 보였다. 12주령에 있어서는 CCl₄를 투여함으로써 CYP 함량이 약 45%의 유의한 ($p<0.01$) 감소를 보였으나 xylene 투여시에는 간손상군과 별다른 차이를 볼 수 없었다.

4. 간조직 중 ADH 및 ALDH 활성

5 및 12주령의 간손상 실험동물에 xylene 투여시 간조직 중 ADH 및 ALDH 활성을 나타낸 것은 Fig. 3과 같다. ADH 활성에 있어서 5주령 흰쥐는 간손상군이 대조군 보다 약 23% 감소되는 경향을 보였다. Xylene을 투여군에서는 약 11% 증가를 보였으며, 이는 12주령 보다는 다소 높은 활성치를 나타내었다. 한편 ALDH 활성에 있어서는 5주령 흰쥐에 있어

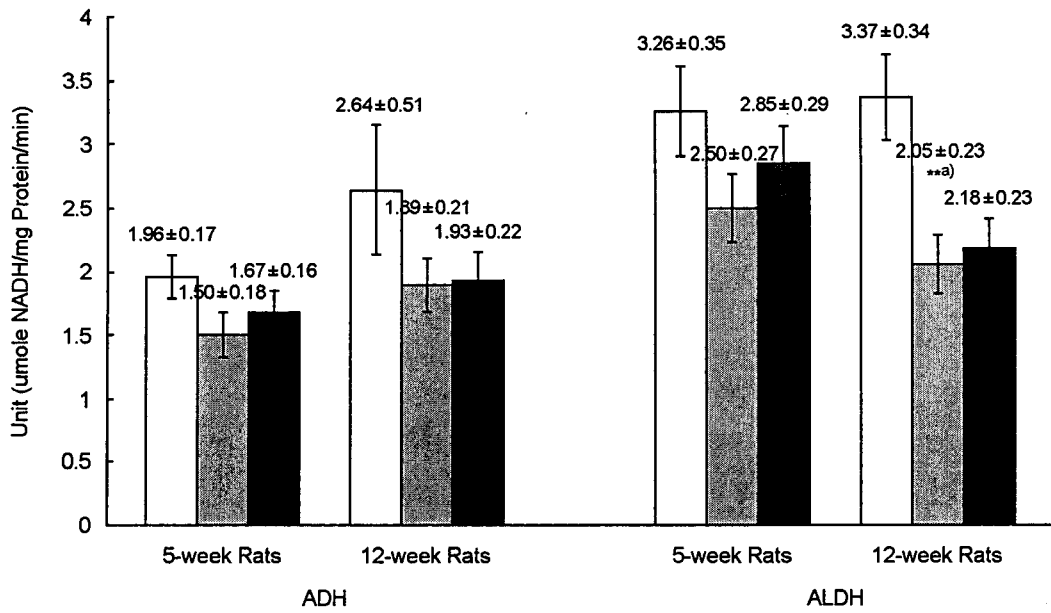


Fig. 3. Effect of aging on the hepatic alcohol or aldehyde dehydrogenase (ADH, ALDH) activity in damaged liver rats treated with xylene. ^aSignificantly different from each group's control. (**; $p < 0.01$), Unit: $\mu\text{mole NADH/mg protein/min}$. □: Control ▨: CCl_4 -treated group ■: Xylene-treated group

Table 2. Comparison of 5-week rats with 12-week rats in the hepatic cytochrome P450 (CYP) content, alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity as unit per 100 g B.W

Parameters	Groups	
	5-week rats	12-week rats
CYP (nmole/100 g B.W)	90.68±8.50	78.75±8.12
ADH (activity ¹⁾ /100 g B.W)	710.29±73.55	670.86±70.55
ALDH (activity ¹⁾ /100 g B.W)	1180.94±125.90	855.61±93.50

Each value represents the mean±S.E. of 6 rats.
Activity¹⁾: $\mu\text{mole NADH/min/liver}$

서 간손상군이 대조군 보다 약 23% 감소되는 경향을 보였으며 xylene을 투여군에서는 약 14% 증가되는 경향을 보였다. 그리고 12주령에 있어서는 간손상군이 대조군 보다 약 39%의 유의한 ($p < 0.01$) 감소를 보였으나 xylene 투여한 경우에는 간손상군과 별다른 차이를 볼 수 없었다.

5. 체중 100 g 당 CYP 함량, ADH 및 ALDH 활성

간조직 중 CYP 함량의 총량과 ADH 및 ALDH의 총활성을 체중 100 g 당으로 환산하여 나타낸 것이 Table 2와 같다. CYP 함량은 12주령이 5주령 보다 약 13% 감소되었으며, ADH 활성은 5주령이 12주령 간에는 별다른 차이를 볼 수 없었으며 ALDH 활성은 5주령이 12주령 보다 약 28% 증가 되었으나 통계학적인 의의는 없었다.

고 찰

산업화학물질의 생체 내 독성반응은 연령에 상당한 영향을 받고 있음이 알려져 있다. 최근 윤 등²³⁾은 CCl_4 에 의한 간손상이 실험동물의 연령이 높은 경우에 심하게 나타남을 관찰하였다. 본 실험에서 12주령 흰쥐에 있어서 간손상 시 증가된다는 체중 당 간무게, 혈청 ALT 및 MDA의 증가율과 간손상 시 감소된다는 간조직 중 단백질 함량 감소율²³⁾이 5주령 보다 높게 나타남이 관찰되었다. 따라서 12주령이 5주령 보다 CCl_4 에 의한 간손상이 심하게 나타남을 알 수 있었다. 이는 윤 등²³⁾의 결과와 유사하였다.

한편 xylene은 생체 내에서 CYP에 의하여 methylbenzylalcohol로 대사되며, methylbenzylalcohol은 ADH에 의하여 methylbenzaldehyde가 생성되며 이는 methylbenzoic acid로 된 다음 glycine과 포함되어 m-methylhippuric acid로 되어 요 중 배설된다고 한다^{19,21)}.

최근 이 등¹¹⁾은 연령이 다른 흰쥐에 xylene 투여시 연령이 높은 경우 요 중 m-methylhippuric acid 배설율이 낮게 나타남을 관찰하였다. 한편 이 등¹⁰⁾은 CCl_4 에 의한 간손상 시 xylene의 대사율이 저하된다고 하였다. 따라서 본 실험조건에서 간손상이 경미한 5주령 흰쥐에서 간손상이 심한 12주령에 비하여 m-methylhippuric acid 배설율이 높게 나타날 것으로 생각된다. 이를 검토하고자 연령에 따른 간손상 실험동물의 요 중 m-methylhippuric acid 함량을 측정하고, 5주령에서 12

주령 보다 높게 나타났다.

일반적으로 내·외인적인 모물질로부터 대사된 최종대사 생성물질의 양은 모물질의 대사과정에 관련된 효소활성의 영향을 받고 있다³⁾. 특히 이 등¹⁰⁾은 xylene으로부터 생성되는 요 중 *m*-methylhippuric acid 량이 xylene 대사에 관여하는 CYP 함량과 ADH 및 ALDH 활성과 관련이 있다고 하였다. 따라서 본 실험조건에서 간손상이 경미한 5주령 흰쥐에 있어서 요 중 *m*-methylhippuric acid 함량이 12주령 보다 높게 나타나는 현상은 xylene 대사 효소에 영향을 받을 것으로 사료된다.

본 실험에서 연령에 따른 CCl₄에 의한 간손상의 실험동물에 xylene로부터 methylbenzylalcohol 생성에 관여하는 CYP 함량은 5주령이 12주령 보다 유의하게 높게 나타났다. 따라서 5주령의 간손상 실험동물에 있어서 methylbenzylalcohol 생성율이 12주령 보다 높게 나타남을 알 수 있었다. 또한 간조직 중 ADH 및 ALDH 활성 증가율 역시 5주령의 간손상 실험동물이 12주령 보다 높게 나타나는 경향을 보였다. 따라서 연령에 따른 간손상 실험동물에 있어서 xylene으로부터 *m*-methylhippuric acid 생성은 xylene 대사에 관여하는 효소활성에 영향을 받고 있으며 이때 CYP가 가장 큰 영향을 미치고 있음을 알 수 있다.

한편 본 실험에서 CYP 함량에 있어서 CCl₄를 처치하지 않은 대조군에 있어서 5주령이 12주령 보다 감소되는 경향을 나타내었으나 통계학적 의의는 없었다. 이는 타 연구자들의 보고^{4,9)}와 유사하였으며, 더욱이 효소활성 단위를 효소시료 단백질에 대한 비활성도를 간장기의 총 CYP 함량을 측정하여 체중 백분율로 환산한 경우에는 5주령이 12주령 보다 오히려 높은치를 나타내었다. 그리고 ADH, ALDH 활성 역시 두 대조군 사이에서 단백질에 대한 비활성도에 있어서는 12주령에서 5주령 보다 높게 나타났지만 간 총활성도에 대한 체중 백분율로 환산한 경우에는 5주령이 12주령 보다 오히려 높게 나타나는 경향을 보였다.

이상 실험 결과를 종합해 볼 때 CCl₄에 의한 간손상이 연령에 따라 달리 나타나며 이에 따른 xylen 대사율 역시 연령에 상당한 영향을 미침을 알 수 있으며 이는 xylene 대사에 관여하는 CYP 함량과 더불어 ADH, ALDH 활성에 기인되어 나타나기 때문일 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 계명대학교 대학원 학술연구논문 연구비에 의해 수행된 연구 결과이며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) Bergmeyer HU (1974): Methods of enzymatic analysis. Academic Press. New York.
- 2) Butler AR (1975): The jaffe reaction. Identification of the coloroued species. *Clin Chim Acta*, **59(2)**: 227-232.
- 3) Dixon M and Webb EC (1979): Enzyme biosynthesis. In "Enzymes (Dixon M and Webb EC, 3th ed.) pp. 570-618, Longman Press. London.
- 4) Horbach GJ, Van Asten JG, Rietjens IM, Kremers P and Van Bezooijen CF (1992): The effect of age on inducibility of various types of rat liver cytochrome P-450. *Xenobiotica*, **22(5)**: 515-522.
- 5) Hodgson E (1987): Modification of metabolism. In "Modern Toxicology (Hodgson E and Levi PE, ed) pp. 85-121. Elsevier Press. New York.
- 6) Imaoka S, Fujita S and Funae Y (1991): Age-dependent expression of cytochrome P-450s in rat liver. *Biochim Biophys Acta*, **1097(3)**: 187-192.
- 7) Gamberale F, Annwall G and Hultengren M (1978): Exposure to xylene and ethylbenzene. III. Effects on central nervous functions. *Scand J Work Environ Health*, **4(3)**: 204-211.
- 8) Karmen A (1955): A note on the spectrophotometer assay of glutamic oxalacetic transaminase in human blood serum. *J Clin Invest*, **34**: 131-133.
- 9) Kubota K, Horai Y, Kushida K and Ishizaki T (1988): Determination of benzoic acid and hippuric acid in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, **425(1)**: 67-75.
- 10) Lee HJ, Cho HG and Yoon CG (1999): Effect of CCl₄-induced liver damage on the metabolism of xylene in rats. *Kor J Env Hlth Soc*, **25(1)**: 102-108.
- 11) Lee HJ, Lee SH, Jeon TW, Lee SI and Yoon CG (2000): A study on the effect of aging on the xylene toxicity in rats. *Kor J Biomed Lab Sci*, **6(3)**: 193-199.
- 12) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**: 265-275.
- 13) Ohkawa H, Ohishi N and Yagi K (1979): Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, **95(2)**: 351-358.
- 14) Omura T and Sato R (1964): The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes: Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem*, **239(7)**: 2370-2378.
- 15) Rana SV and Kumar S (1993): Effect of xylene, toluene and methyl alcohol on liver collagenesis in rats. *Indian J Exp Biol*, **31(9)**: 782-784.
- 16) Reitman S and Frankel S (1957): A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol*, **28**: 56-63.

- 17) Rydzynski K, Korsak Z, Jedlinska U and Sokal JA (1992): The toxic effects of combined exposure to toluene and m-xylene in animals. IV. Liver ultrastructure after subchronic inhalatory exposure. *Pol J Occup Med Environ Health*, **5(1)**: 35-42.
 - 18) Scheffler WC (1980): Statistics for the biological sciences. pp. 84-89 Addison-Wesley Co. USA.
 - 19) Sedivec V and Flek J (1976): The absorption, metabolism, and excretion of xylenes in man. *Int Arch Occup Environ Health*, **37(3)**: 205-217.
 - 20) Stachow CS, Stevenson IL and Day D (1967): Purification and properties of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific benzaldehyde dehydrogenase from pseudomonas. *J Biol Chem*, **242(22)**: 5294-5300.
 - 21) Van Doorn R, Bos RP, Brouns RM, Leijdekkers CM and Henderson PT (1980): Effect of toluene and xylenes on liver glutathione and their urinary excretion as mercapturic acids in the rat. *Arch Toxicol*, **43(4)**: 293-304.
 - 22) Wronska Nofer T, Rosin J and Bartosz G (1991): Interaction of ethanol and xylene in their effects on erythrocytes and other haematological parameters in the rat. *J Appl Toxicol*, **11(4)**: 289-292.
 - 23) Yoon CG, Lee MK and Lee SI (1998): Effect of growth on the enzyme activities of oxygen free radical generating and scavenging system in CCl₄-treated rats. *Kor J Gerontol*, **8(1)**: 35-42.
-