

## Alcohol투여가 흰쥐 성장과정에 따른 UDP-Glucuronyltransferase 활성에 미치는 영향

이화여자대학교 의과대학 소아과학교실

김 경 희

= Abstract =

### Comparison of the Glucuronidation Ability of Liver Microsomes from Rats Treated with Alcohol

Kyung Hee Kim

*Department of Pediatrics, College of Medicine, Ewha Womans University*

Glucuronidation is low or undetectable in embryonic and early fetal tissues and changes to adult levels at rates depending on the acceptor, tissue and species.

The present investigation examined the effects of maternal consumption of alcohol during pregnancy and lactation development of UDP-glucuronosyltransferase activity toward 1-naphthol, 4-nitrophenol 4-methylumbelliferone and bilirubin of neonatal to adult rat liver microsomes.

Conjugation of 1-naphthol and 4-nitrophenol was higher at birth and decreased to adult levels by 21 days of age. Glucuronidation of bilirubin increased from birth to adult activity 21 days of age. Administration of alcohol on days 21 after birth increased UDPGT activity toward 1-naphthol and bilirubin compare to control, whereas alcohol decreased the development of UDPGT activity toward 1-naphthol 4-nitrophenol, 4-methylumbelliferone and bilirubin. The concentration of UDP-glucuronic acid was 50% of adult levels at birth and increased to adult value by 21 days of age. In the administration of alcohol, the concentration of UDP-glucuronic acid was low compare to control. Thus, development of UDPGT activity toward alcohol appears to be different than that for other acceptors, suggesting there may be a separate UDPGT in rat liver that is responsible for the conjugation of alcohol.

### 서 론

Glucuronide의 형성은 다양한 지용성 내인적 화합물(endogenous compound)과 이물질(Xenobiotics)의 생화학적 변화와 제거에 중요한 과정이다<sup>1)2)</sup>. 이 반응과정은 multiple enzyme form의

UDP-glucuronosyltransferase(UDPGT)에 의하여 촉매되어지며 이 효소의 촉매작용은 phospholipid가 있어야 하고 마이크로솜 막속에 UDPGT활성도의 잠복기간 그리고 홀몬이나 이물질 유도체들이 서로 다른 유도성질등에 의하여 다양하게 일어나는 것이 특징이다<sup>2)3)4)</sup>.

Hepatic UDP-glucuronosyltransferase와 mixed-function oxidase(MFO)와 같은 효소계의 활성은 일반적으로 태어난 후 3주와 6주사이에 성숙수준으로 발달하게 된다. 그러나, 간조직 효소 활성의 발달하는 양상은 종족과 기질 그리고 성별에 따라서 다르다<sup>5)6)</sup>. 태아와 신생아는 이물질 투여로 오는 독성 작용을 측정할 수 있는 내인적과 외인적 화합물들과 glucuronide를 형성하는 용량이 제한되어 있다. 그러므로 다른 화합물과 glucuronide를 형성하는 능력을 발달시키는 과정이 설치류의 태아와 신생아의 간 조직 마이크로솜에서 연구되어 왔다<sup>7)8)</sup>. 흰쥐에서 UDP-glucuronosyltransferase활성의 발달은 2개의 독특한 모양으로 나타난다<sup>9)10)</sup>. 즉 late-fetal군과 neonatal군이다. Late-fetal군에서 2-aminophenol을 예로 glucuronidation되는 정도는 태어나기 바로 직전에 성숙한 군에서 갖고 있는 활성도보다도 더 높다. 이 활성도는 태어난지 며칠 후 성숙군이 갖고 있는 활성도로 낮아진다. 이와는 반대로 neonatal군에서 bilirubin을 예로 glucuronidation되는 정도는 태어나기 전에는 무시할 정도로 낮으나(어미의 10% 또는 이보다 낮다) 태어난 후 서서히 증가하기 시작한다.

본 연구는 태생 19, 20 및 21일과 신생 1일, 7일, 14일, 21일, 35일 및 49일된 흰쥐와 임신 및 수유기에 알코올을 먹은 어미에서 태어난 신생흰쥐의 간조직 마이크로솜에서 UDP-glucuronosyltransferase활성도를 4개의 다른 기질 즉, 1-naphthol, P-nitrophenol, 4-methylumbelliferone 및 bilirubin으로 측정하였다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 실험동물

1) 정상조건으로 사육한 체중 250g내외의 성숙한 흰쥐 (sprague-Dawley)를 교배하여 임신시켰다. 흰쥐의 교배 방법은 임신한 경험이 없는 암 흰쥐를 표준질 도막법에 의하여 발정기로 판정되면 수 흰쥐와 동거시키고 다음날 오전에 질전(vaginal plug)이 확인되면 이 날을 임신 제 1일로 산정하였다. 흰쥐들은 정상 흰쥐와 알코올을 먹는 흰쥐로 구분하여 사육하였다.

(1) 정상흰쥐 : 전체 임신기(평균 21일) 및 수

유기(출산후 3주간)에 규정사료 및 물을 자유롭게 공급하였다.

(2) 알코올을 먹이는 흰쥐 : 임신 및 수유기에 규정사료를 자유롭게 공급 하였으며 임신 제1일부터 출산까지 그리고 수유기에도 12%의 알코올을 주었다(ad libitum).

### 2) 신생흰쥐

신생흰쥐는 어미 흰쥐의 실험조건에 따라 대조군과 실험군으로 구별하여 비슷한 체중의 흰쥐를 각각 10마리씩 사용하였다.(총 180마리).

(1) 대조군 : 정상흰쥐에서 출생하고 수유기에도 정상흰쥐의 젖으로 성장하였다.

태아 19일, 20일 및 21일과 출생 1일, 7일, 14일, 21일, 35일 및 49일된간 조직을 사용하였다.

(2) 실험군 : 알코올을 먹은 흰쥐에서 출생하고 수유기에도 알코올을 먹은 어미흰쥐 젖을 먹고 성장하였고 49일까지 계속 알코올을 주었다. 태생 19일, 20일 및 21일과 출생 1일, 7일, 14일, 21일, 35일 및 49일된 간조직을 사용하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) Microsome의 분리

Microsome의 분리는 흰쥐에서 절제한 간조직을 homogenizer를 사용하여 0.25M sucrose용액으로 25% homogenate를 만들었다. 이를 9,000g에서 20분간 원심분리하고 다시 그 상층액을 9,000g에서 10분간 원심분리하여 침전되는 핵과 mitochondria층을 제거하였다. 이 상층액을 다시 105,000g에서 1시간동안 초원심분리기(Beckman Model L8-80)로 원심분리하여 침전된 microsome을 분리하였고, 0.25M sucrose로 1g/ml되게 균질용액을 만들었다.

#### 2) 단백질 정량방법

단백질 함량측정은 Lowry등<sup>11)</sup>의 방법으로 발색하여 700nm에서 spectrophotometer (Spectronic 2,000 Bauch and Lomb)로 측정하였다. 표준 단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

#### 3) UDP-Glucuronosyltransferase의 측정방법

UDP-Glucuronosyltransferase활성은 기질로써 P-nitrophenol을 사용하였을때 Burchell<sup>13)</sup>의 방법

으로 incubation 혼합물은 25 Mmole의 Tris-Hcl buffer (pH 7.4)와 0.1Mmole의 UDP-glucuronic acid 그리고 microsome(1.0~2.0mg)과 10분간 37°C에서 incubation 한후 405nm에서 그 흡광도를 측정하였다. Bilirubin을 사용하였을때는 Van Roy와 Heirwegh<sup>14)</sup>의 방법으로 incubation 혼합물은 0.1M Tris-HCl (pH 7.4), 5mM Mgcl<sub>2</sub>, 0.3mM bilirubin, 3mM UDP-glucuronic acid 그리고, microsome (2 mg의 protein)과 10분간 37°C에서 incubation 한후 530nm에서 그 흡광도를 측정하였다. 1-naphtol을 사용하였을때, Bock과 White<sup>15)</sup>의 방법으로 incubation 혼합물은 0.1M Tris-HCl buffer(pH 7.4), 5 mM Mgcl<sub>2</sub>, 0.5mM 1-naphtol, 3mM UDP-glucuronic acid 그리고, microsome (1mg protein)과 2분간 37°C에서 incubation 한후 그 fluorescence를 emission 330nm와 excitaion 290nm에서 측정하였다. 4-methylumbelliferone을 사용하였을때 Lilienblum등<sup>16)</sup>의 방법으로 incubation 혼합물은 0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.4), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM 4-methylumbelliferone, 3mM UDP-Glucuronic acid 그리고, Microsome (0.5Mg와 Protein)과 30분간 37°C에서 incubation 한후 emission 365nm와 excitation 315 nm에서 glucuronide의 fluorescence를 측정하였다.

### 실험 결과

3-Methylcholanthrene (3-MS)에 의하여 conjugation 이 자극되는 aglycone인 1-naphtol, 4-nitrophenol 및 4-methylumbelliferone에 대한 UDPGT의 활성을 나이별로 측정 하였고 동시에 알코올 투여에 의한 효과도 측정하여 Fig. 1, 2 및 3에 나타내었다. Acceptor로써 1-naphtol, 4-nitrophenol 과 4-methylumbelliferone의 glucuronidation은 정상군에서 태생 20일과 21일에 거의 성숙수준에 도달했다. 그리고 출생후 1일에서 7일까지 감소하다가 다시 14일에 활성화 되어 49일된 성숙원주의 활성도와 거의 비슷하였다. UDPGT의 활성은 14일에 가장 높았고 21일부터 35일사이에 활성도가 감소 하였다가 다시 성숙 수준으로 증가 되었다. Bilirubin에 대한 UDPGT의 활성은 Fig. 4에 나타내었다. Bilirubin의 glucuronidation은 phenobarbital(PB)에 의하여 자극되어 증가된다. 정상군에서

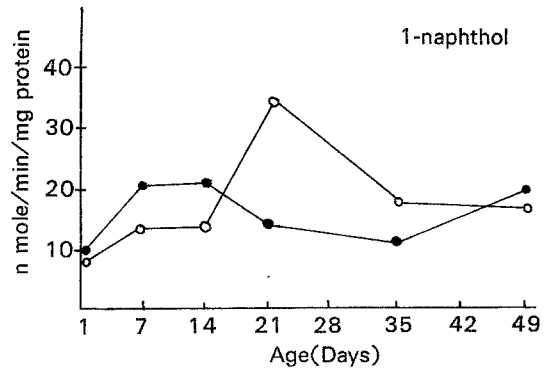


Fig. 1. Postnatal development of UDP-glucuronosyltransferase activity in hepatic rat microsomes. (●-●, control ; ○-○, alcohol treated)

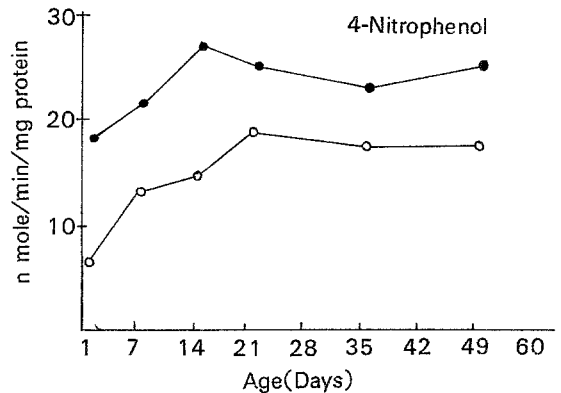


Fig. 2. Postnatal development of UDP-glucuronosyltransferase activity in hepatic rat microsomes. (●-●, control ; ○-○, alcohol treated)

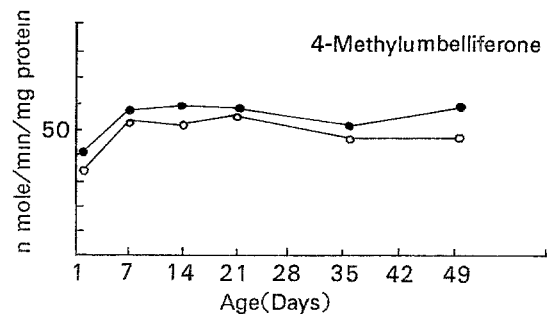


Fig. 3. Postnatal development of UDP-glucuronosyltransferase activity in hepatic rat microsomes. (●-●, control ; ○-○, alcohol treated)

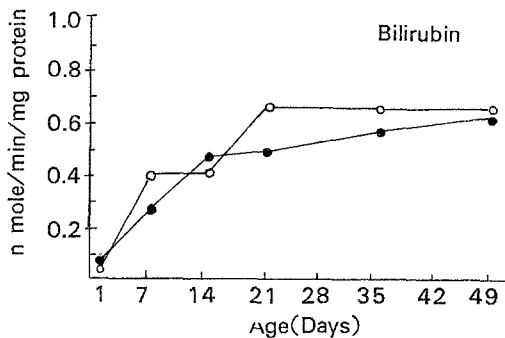


Fig. 4. Postnatal development of UDP-glucuronosyltransferase activity in hepatic rat microsomes. (●-●, control ; ○-○, alcohol treated)

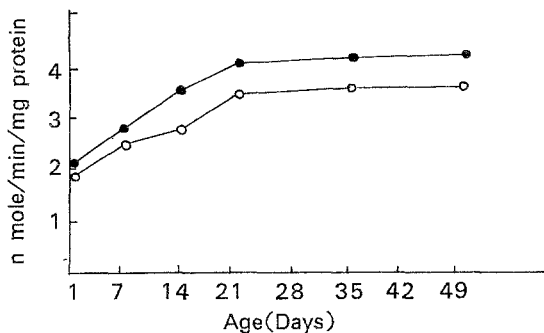


Fig. 5. UDP-glucuronic acid (UDPGA) concentration in Postnatal rat liver (●-●, control ; ○-○, alcohol treated)

태어난 직후는 매우 낮으나 출생후 계속해서 증가하여 성숙수준이 된다. 알코올이 투여된 어미에서 태어나서 그 어미의 젖으로 자란 새끼 흰쥐의 나이에 따른 glucuronidation은 태생 20일과 21일 이미 성숙 수준에 있으며 정상군과 달리 출생 21일에 이르러 가장 활성이 증가되었고 35일에는 감소하여 성숙수준이 되었다. 이때 UDPGT의 활성도는 정상군에 비교하여 낮은 활성도로 억제됨을 나타내었다. 알코올 투여군에서 bilirubin에 대한 UDPGT의 활성이 나이에 따라 계속 증가되었으나 정상군과 비교해서 낮은 활성도를 나타내었다. UDP-glucuronic acid (UDPGA)의 농도는 출생후 1~7일에 성숙 흰쥐의 50% 이상 되었다가 21일에는 성숙흰쥐의 농도와 같아졌다. 알코올 투여군도 같은 경향이었으나 정상군보다 농도가 낮았다.

## 고 찰

신생흰쥐에서 어떤 aglycone의 glucuronide형성이 낮은 것은 성장하는 동안 UDPGT의 독특한 형(specific form)이 다르게 나타나기 때문이라고 알려져왔다<sup>2)</sup>. 발달 집단(developmental clusters)의 개념은 개체 발생(ontogenetic development) 동안 독특한 형의 다른 효소 활성이 발현되는 현

Table 1. Fetal and postnatal development of UDP-glucuronosyltransferase activity in rat liver microsomes

Age(Days)	UDPGT activity (nmole/min/mg pvoein)			
	1-Naphthol	4-Nitrophenol	4-Methyl Umbelliferone	Bilirubin
Gestatal 19	14.12± 2.21	10.75± 0.87	14.70± 1.18	ND
Gestatal 20	19.69± 1.56	20.29± 0.92	19.97± 0.63	ND
Gestatal 21	19.51± 1.48	19.12± 0.46	25.11± 2.59	0.047± 0.04
Postnatal 1	9.81± 1.61	8.42± 0.46	24.64± 1.82	0.068± 0.03
Postnatal 7	20.0± 2.12	20.17± 2.92	56.95± 1.67	0.28 ± 0.04
Postnatal 14	20.12± 3.04	27.20± 4.22	57.27± 0.95	0.47 ± 0.06
Postnatal 21	14.15± 0.93	25.23± 1.38	57.27± 2.15	0.49 ± 0.08
Postnatal 35	11.80± 1.24	23.25± 1.38	50.05± 1.95	0.53 ± 0.05
Postnatal 49	19.51± 1.56	25.51± 2.44	56.88± 1.13	0.63 ± 0.09

.Each value represents the mean± S.D. of 6 individual experiments.

Table 2. Fetal and postnatal development of UDP-glucuronosyltransferase activity in alcohol treated rat liver microsomes

Age(Days)	UDPGT activity (nmole/min/mg pvoein)			
	1-Naphthol	4-Nitrophenol	4-Methyl Umbelliferone	Bilirubin
Gestatal 19	64362±1.44	6.75±0.66	12.67±0.84	ND
Gestatal 20	15.82±0.75	14.89±2.47	18.09±1.16	ND
Gestatal 21	16.49±0.68	18.66±3.15	33.24±2.14	0.038±0.004
Postnatal 1	8.01±2.04	18.66±1.45 <sup>a</sup>	24.70±1.18	0.042±0.0012 <sup>b</sup>
Postnatal 7	13.52±1.43 <sup>b</sup>	20.15±0.94	53.19±2.58	0.409±0.029 <sup>a</sup>
Postnatal 4	13.58±0.98 <sup>b</sup>	27.31±2.35	51.07±4.74 <sup>c</sup>	0.416±0.085
Postnatal 21	34.45±1.48 <sup>a</sup>	25.03±4.06	57.10±2.15	0.669±0.071 <sup>a</sup>
Postnatal 35	17.64±2.91 <sup>b</sup>	25.30±2.09	45.11±1.77 <sup>c</sup>	0.650±0.081 <sup>a</sup>
Postnatal 49	16.53±1.67 <sup>c</sup>	25.65±3.95 <sup>a</sup>	45.02±1.55 <sup>b</sup>	0.645±0.083

.Each value represents the mean±S.D. of 6 individual experiments.

- a. significantly different from normal value P<0.001
- b. significantly different from normal value P<0.01
- c. significantly different from normal value P<0.05

Table 3. UDP-glucuronosyl/Acid (UDPGA) concentration in Postnatal rat livers

Age(Days)	UDPGA(nmoles/mg protein)	
	Normal rat	Alcohol treated rat
1	2.15±0.09	1.93±0.07
7	2.8215±0.07	2.51±0.06
14	3.57±0.08	2.79±0.05 <sup>b</sup>
21	4.09±0.09	3.48±0.08 <sup>c</sup>
35	4.13±0.07	3.59±0.09 <sup>c</sup>
49	4.21±0.06	3.58±0.08 <sup>b</sup>

.Each value represents the mean±S.D. of 6 individual experiments.

- B. Significantly different from 1 day after birth value P<0.01
- C. Significantly different from 1 day after birth value P<0.05

상을 설명하는 것이다. Greengard<sup>17)</sup>는 생의 특정 기간동안에 효소의 활성이 급격히 증가하는 집단을 late fetal, neonatal 그리고 weaning이라는 용어로 제시하였다.

Glucuronic acid의 acceptor는 2개의 군으로 분류하였다. 즉 특이한 기질에 대한 UDPGT활성의 유도성과 발달이다. 여러 연구 결과는 acceptor에

대한 UDPGT활성은 late fetal과 neonatal집단이 된다<sup>18)21)</sup>. 특히 4-methylumbelliferone, 1-naphthol, P-nitrophenol, 4-aminobenzoate, 2-aminophenol 그리고, serotonin은 태생20일과 출생 2일된 neonate의 간조직에 거의 성숙수준으로 존재한다고 보고하였다. 이와 같은 acceptor는 late fetal 또는 group 1 aglycone으로 분류되어진다. Wishart는 bilirubin, chloramphenicol<sup>10)20)</sup>, estradiol, morphine 그리고, testosterone은 group 2 또는 neonatal aglycone으로 분류되며, 태어나자마자 거의 측정되지 않는다고 하였다.

흰쥐 간조직 microsome의 UDPGT활성은 유도성을 기초로하여 group이 분류되어 왔다. Acceptor에 대한 활성은 3-MC를 투여하면 group 1(late fetal)이 3~6배 증가하고, group 2(neonatal)는 Phenobarbital (PB)투여로 2~5배 증가되며, group 3는 Pregnenolone-16-cargonitrile (PCN)투여로 8~12배 증가된다. Group 1 aglycone은 1-naphthol, 4-nitrophenol 및 4-methylumbelliferone을 포함하는<sup>22)23)</sup> 반면 group 2는 bilirubin을 포함시켰다.

본 연구에서는 group 1 (late fetal)에서 aglycone으로 1-naphthol, 4-nitrophenol 그리고, 4-methylumbelliferone을 이용하여 태생 20일과 21일에

UDPGT의 활성이 출생 35일에 비해서 각각 90%, 87% 및 50%로 late fetal group에 속하는 것을 확인하였다. 알코올을 투여한 군에서는 낮은 값으로 경향은 같았다. 그리고, group 2(neonatal)에서는 bilirubin이 출생직후의 UDPGT활성을 측정할 수 없었다. 이와 같은 결과들은 3-MC에 의하여 유도되는 late fetal, group 1의 aglycone과 PB에 의하여 유도되는 neonatal, group 2의 aglycone들과의 glucuronidation에 대한 좀더 자세한 정보를 제공한다. 그리고 임신기간 뿐 아니라 장기간 알코올 투여는 비특이성으로 glucuronidation의 억제를 나타냈다. UDPGT의 활성은 glucuronidation에 영향을 미치는 UDP-glucuronic acid (UDPGA)의 공급에 따라 변화된다. 사용할 수 있는 UDPGA는 glucuronidation 반응에 양이 제한된 cofactor로 존재 하므로 동물이 많은양의 Xenobiotics에 노출되면 UDPGA의 수용 능력도 제한된다<sup>24)</sup>.

Glucuronidation의 변화로 초래되는 여러질병과 관련해서 UDPGT의 활성이 낮아지기 때문에<sup>25)26)</sup> UDPGT활성과 UDPGA의 농도는 glucuronidation 능력을 측정 하는데 중요한 factor이다. 본 연구에서 측정된 UDPGA의 농도는 알코올 투여군이 정상군보다 낮은치를 나타내었으며 이는 UDPGT의 활성도 낮다는 것을 알 수 있었다.

Glucuronic acid와 약물들의 conjugation은 어떤 유전적인 손상과 영양실조로 neonate에서 감소된다. 예를 들면 Crigler-Najjar syndrome 환자에서 bilirubin의 glucuronidation이 감소한다. 또 다른 예로써 Gray baby syndrome에서 생체내에 chloramphenicol이 축적되면서 chloramphenicol의 conjugation이 감소된다<sup>2)</sup>. 장기간 알코올 투여로 오는 conjugation의 감소는 중요한 문제점으로 생각되며 앞으로 좀 더 자세한 관찰이 필요하다고 본다.

## References

- 1) TA Mittinen and E Leskinen : *In Metabolic Conjugation and Metabolic Hydrolysis* (Ed. WH Fishman). p157 Academic Press New York(1970)
- 2) GJ Dutton : *In Glucuronidation of Drugs and Other Compounds* (Eds. GJ. Dutton) p99. CRC Press, Boca Raton, FL 1980

- 3) CB Kasper and D Henton : *In Enzymatic Basis of Detoxication* (Ed. W Jacoby). 2 : 3, Academic Press New York 1980
- 4) B Burchell : *In Reviews of Biochemical Toxicology* (Eds. E. Hodgson J.B. Bend and RM Philpot). 12 : 1, PI Elsevier/North-Holland New York 1981
- 5) BM Asseal : *Pharmacokinetics and Drug Distribution during Postnatal Development* : *Pharmacol Ther* 1982 : 18 : 159-197
- 6) T Cresteil, P Beaune, C Celier, JP heroux and FP Guengerich : *cytochrome p-450 isoenzyme content and monooxygenase activities in Rat Liver* : *Effect of ontogenesis and pretreatment of phenobarbital and 3-methylcholanthrene*. *J Pharmacol Exp Ther* 1986 : 236 : 269-276
- 7) GJ Dutton : *Developmental aspects of drug conjugation with special reference to glucuronidation*. *A Rev Pharmac Toxic* 1978 : 18 : 17
- 8) GJ Dutton and JEA Leakey : *The perinatal development of drug-metabolizing enzymes* : *What factors trigger their onset ?* *Durg Res* 1981 25 : 189-273,
- 9) GW Lucier and OS McDaniel : *Steroid and Non-Steroid UDP-glucuronosyltransferase* : *Glucuronidation of synthetic estrogen as steroids*. *J Steroid Biochem* 1977 : 8 : 867-872
- 10) GJ Wishart : *Demonstration of functional heterogeneity of hepatic uridine diphosphate glucuronosyltransferase activities after administration of 3-methylcholanthrene and phenobarbital to rats*. *Biochem J* 1978 : 174 : 671-672
- 11) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Rndall RT : *Protein measurement with the folin phenol reagent*. *J Biol Chem* 1951 : 193265-275
- 12) Omura T and Sato R : *Carbon Monoxide binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification and properties*. *J Biol Chem* 1964 : 239 : 2370-2378
- 13) Burchell B and Weatherhill P : *P-Nitrophenol UDP-glucuronosyltransferase (rat liver)*. *Methods in Enzymology* 1981 : 77 : : 169-177
- 14) Van Roy FP and Heiywegy KPM : *Determination of bilirubin as acceptor* *Pharmacol J* 1968 : 107 :

- 15) Book KW and White INH : *UDP-glucuronosyltransferase in perfused rat liver and in Microsomes : Influence of phenobarbital and 3-methylcholanthrene. Eur J Biochem 1974 : 46 : 415-459*
- 16) Lilienblum W, Walli AK and Bock KW : *Differential Induction of Rat Liver Microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities by various inducing agents. Biocnem Pharmac 1982 : 31 : 907-913*
- 17) O Greemgard : *Enzymatic differentiation in mammalian tissues. Essays Biochem 1971 : 7 : 159-205*
- 18) WS Young and PS Lietman : *Chloramphenicol glucuronosyltransferase : assay, ontogeny, and inducibility. J Pharmacol Exp Ther 1978 : 204 : 203-211*
- 19) GW Lucier, BR Sonawane OS McDaniel, and GER Hook : *Postnatal stimulation of hepatic microsomal enzymes following administration of TCDD to pregnant rats. Chem Biol Interat 1975 : 11 : 15-26*
- 20) GW Lucier, BR Sonawane and OS McDaniel : *Glucuronidation and deglucuronidation reactions in hepatic and extrahepatic tissues during perinatal development. Drug Metab Dispos 1977 : 5 : 279-287*
- 21) JB Watkins, Z Gregus, TN Thempson and CD Klaassen : *Induction studies on the functional heterogeneity of UDP-glucuronosyltransferase. Toxicol. Appl pharmacol 1982 : 64 : 439-448*
- 22) KW Bock, D Josting, W Lilienblum and H Pfeil : *Purification of rat liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase : separation of two enzyme forms inducible by 3-methylcholanthrene and phenobarbital. Eur J Biochem 1976 : 98 : 19-26*
- 23) JJ Hjelle, GA Hazelton and CD : *Klaassen, Acetaminophen decreases adenosine-3 phosphate-s<sup>2</sup>-phosphosulfate and uridine diphosphoglucuronic and in rat liver Drug Metb. Dispos 1985 : 13 : 35-41*
- 24) W Spivak : *Bilirubin metabolism. Pediatr Ann 1985 : 14 : 451-457*
- 25) SJ Borghoff, SA Stefanski and LS Birbaum : *The effect of age on the glucuronidation and toxicity of 4, 4'-thiobis (6-t-butyl-m-cresol). Toxicol Apple Pharmacol 1988 : 92 : 453-466*