

알록산 유도 당뇨흰쥐의 폐에서 황산화계의 변화

최형호* · 고광삼 · 임동윤

조선대학교 의과대학

(Received September 12, 1995)

The Changes of Antioxidant Enzymes in the Lung of Alloxan-induced Diabetic Rats

Hyung-Ho Choi*, Kwang-Sam Koh and Dong-Yoon Lim

College of Medicine, Chosun University, Kwang Ju 501-759, Korea

Abstract—The present study was attempted to investigate the mechanism of oxidative cellular injuries which occur in diabetic rats by determining changes of antioxidant enzymes activity in the lung of alloxan-induced diabetic rats, the contents of glutathione in the lung, liver, blood samples, and γ -glutamylcysteine synthetase activities in the liver. Superoxide dismutase activities (SOD), including Cu, Zn-SOD and Mn-SOD, decreased in the lung of diabetic rats compared with those of normal control rats. However, activities of catalase and glutathione peroxidase (GPX) activities were not affected in the lung of diabetic rats. In diabetic rats, glutathione contents in the lung, liver, and blood samples, as well as the activities of γ -glutamylcysteine synthetase in the livers which is known to be the key enzyme of glutathione biosynthesis, decreased significantly. From these experimental results, it is thought that the decrease in SOD activities in the lung, glutathione contents and γ -glutamylcysteine synthetase activities in some tissues in alloxan-induced diabetic rats may be the crucial cause of vulnerability to oxidative cellular injuries.

Keywords □ Superoxide Dismutase, Cellular Injury, Alloxan-Induced Diabetes.

Superoxide dismutase (SOD), catalase, peroxidase 등 항산화 효소와 ceruloplasmin, transferrin, lactoferrin, albumin, haptoglobulin 등 비효소계 항산화 단백질 및 glutathione, tocopherol, β -carotene, ascorbic acid, uric acid, bilirubin 등 비단백성 항산화 물질은 생체에서 생성된 유리기의 소거에 관여하는 물질이기 때문에, 계속적으로 서서히 진행되는 황산화계의 기능의 감소는 점진적인 세포손상을 초래하여 세포노화를 촉진시키고, 동맥경화증, 퇴행성 관절염, 당뇨병, 암 등의 발생에도 관련이 깊은 것으로 알려져 있다.¹⁻⁵⁾

Streptozotocin과 alloxan은 췌장의 β -cell을 선택

적으로 파괴시켜 당뇨를 유발하는데, alloxan의 독성기전은 superoxide radicals의 생성으로 인한 세포 손상과 밀접한 관련이 있으며, 또한 free radicals에 의한 세포손상은 당뇨병의 발생과 당뇨 합병증, 즉 혈관장애, 망막증 (retinopathy), 신증 (nephropathy) 등의 발생과 깊은 연관이 있는 것으로 알려져 왔다.⁶⁻⁹⁾ Streptozotocin 유발 당뇨 흰쥐의 적혈구 glutathione peroxidase (GPX) 활성도는 증가되고, 간 glutathione 량은 감소되며, 간, 신장 및 적혈구에서 copper and zinc-containing superoxide dismutase (Cu, Zn-SOD) 활성도가 감소되고, manganese containing superoxide dismutase (Mn-SOD) 활성도는 증가되어 있으며, 췌장에서 catalase 와 Cu,Zn-SOD 활성이 유의하게 증가된다는 보고가 있다.⁹⁻¹²⁾ 그러나 현재까지 당뇨모델에서 폐를 이용한 항산화 효소에 대한

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 062-220-3659 (팩스) 062-227-4693

연구는 알려진 바가 많지 않다.

당뇨병 환자에서 적혈구 SOD 활성도가 증가하는 반면 GPX 활성도 변화는 없으나, 소아 인슐린 의존성 당뇨병 환자(IDDM)에서 적혈구 Cu,Zn-SOD 및 GPX 활성이 감소하는 것으로 보고된 바 있으나¹³⁾, 당뇨병환자의 적혈구 glutathione 량 및 GPX 활성도가 감소되었고 다형핵 백혈구(polymorphonuclear leukocytes)의 superoxide anion 생성량이 증가되어 있고 Cu,Zn-SOD 및 Mn-SOD 활성도가 유의하게 감소된다는 보고도 있어 당뇨병 환자의 항산화계는 장기에 따라 변화의 유형이 서로 다르게 나타남을 알 수 있다.¹³⁻¹⁵⁾ 비효소계 항산화 물질인 glutathione은 γ -glutamylcysteine synthetase와 glutathione synthetase에 의해서 glutamic acid, cysteine 및 glycine으로부터 합성되는 tripeptide로서, 여러가지 해독반응, 단백질이나 DNA의 합성, amino acid의 이동반응 및 thiol기의 저장등 생물학적으로 중요한 여러가지 반응에 직접 관여한다고 한다.¹⁶⁾ 본 실험에서는 alloxan 을 투여하여 당뇨병이 유발된 흰쥐의 폐에서 catalase, SOD 및 GPX 활성도와 glutathione 량을 측정하여 항산화계의 변화를 관찰하고, glutathione 및 γ -glutamylcysteine synthetase 활성을 측정하여, 당뇨병에서 비효소계 항산화 물질인 glutathione 량의 변화에 미치는 γ -glutamylcysteine synthetase의 영향을 관찰하고자 하였다.

실험 방법

실험동물의 처치 - 실험동물은 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐로, 정상 대조군과 alloxan 투여 당뇨군으로 나누어, 당뇨군은 alloxan (50 mg/kg)을 2일 간격으로 3회 복강내로 주사하여 당뇨병을 유발시키고 3주 후에 혈당을 측정하여 혈당량 180 mg/dl blood 이상인 흰쥐를 당뇨군으로 분류하고, 간과 폐를 적출하여 dry ice-ethanol 용액에 즉시 냉동시키고, 정상대조군도 같은 방법으로 간과 폐를 처치하여 -80°C 냉동고에 보존하였다.

조효소액의 조제 - 적출된 간과 폐조직 일정량을 미리 냉각된 10배 (W/V)의 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)를 가하여, polytron homogenizer로 균질화시키고, 4°C에서 10,000×g로 30분간 원심분리하여 상층액을 효소활성 측정의 조효소액으로 사용하였

다.

또한 간과 폐조직에 동량 (W/V)의 10 % (W/V) sulfosalicylic acid(SSA)를 가하고, 조직을 마쇄시켜 10,000×g로 4°C에서 15 분간 원심분리하여 상등액을 glutathione 정량 시료로 사용하였다. 하대정맥으로부터 혈액을 채취하여 동량의 20% (V/V) SSA를 혼합하여 10,000×g로 4°C에서 15분간 원심분리하여 상등액을 혈액 glutathione 정량 시료로 사용하였다.

항산화효소 활성도 측정 - SOD 활성도는 Crapo 등의 방법¹⁷⁾으로 cytochrome C를 이용해서 측정하여 cytochrome C의 환원 속도를 50% 억제하는 효소의 양을 1 unit로 표시하였다. Mn-SOD 활성도는 효소반응액에 KCN을 최종농도가 2 mM이 되게 가하여 상기와 같은 방법으로 측정하였다.

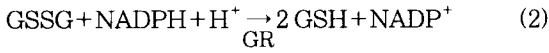
Catalase 활성도는 Aebi의 방법¹⁸⁾에 따라 H₂O₂량을 측정하였고, 효소의 활성도는 1분 동안에 1 μ M의 H₂O₂를 분해키는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

GPX 활성은 Flohe 등의 방법¹⁹⁾에 의해 측정했다. 즉 1 mM EDTA를 함유한 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 2.5 ml에 3 mM GSH, 20 mM NaN₃, glutathione reductase 0.72 U, NADPH 0.45 mM과 조효소 용액 10 μ l를 넣고 37°C에서 5분간 방치한 후 0.45 mM H₂O₂를 가하여 340 nm에서 3분 동안 흡광도의 변화를 측정하였으며, 비효소적 반응은 상기와 같은 조건에서 단지 0.45 mM H₂O₂를 가하지 않고 반응시켜 흡광도의 변화를 측정하였고, 효소활성도는 비효소적 반응에 의한 흡광도 변화를 감한 값을 다음식에 의해서 계산하였다.

$$A = 0.868 \left(\frac{[\text{NADPH}]}{[\text{GSH}]_t} \right) (V_i / V_s)$$

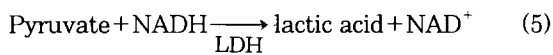
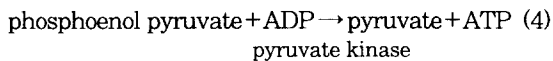
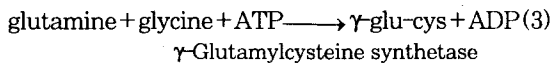
여기서 A: 효소 활성도, [NADPH]: NADPH농도 변화, [GSH]_t: GSH의 처음농도, t: 반응 시간, V_i: 반응액의 용량 및 V_s: 효소액의 용량이다.

Glutathione 정량 - Glutathione 정량은 Tietze²⁰⁾의 DTNB-GSSG reductase recycling 방법에 의해 측정하였다. 이 방법은 조직내 총 glutathione (GSSG + GSH)의 정량에 이용되는 예민한 방법으로 측정원리는 GSH와 DTNB가 반응하여 GSSG 와 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB)를 형성하고 (1), GSSG 와 NADPH가 glutathione reductase (GR)의 작용으로 GSH로 환원되는 (2) 재순환 반응 (recyclic reaction)을 이용하여,



TNB 생성량이 GSSG+GSH 량과 비례하므로 TNB 량을 405 nm에서 측정하여 계산 하였다. Oxidized glutathione (GSSG)은 반응식 (2)를 이용하여 NADPH가 산화되는 정도를 측정하였다. 즉, 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, 1 mM EDTA, 50 uM NADPH와 sample 100 u를 25°C로 한 다음, glutathione reductase를 0.2 U/ml되게 하고 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여, GSSG standard를 calibration한 다음 계산하였다.

γ-Glutamylcysteine synthetase 활성도 측정 - γ-Glutamylcysteine synthetase 활성도는 Meister 등²¹⁾의 방법에 의해서 측정하였다. 측정방법의 원리는 glutamine 과 cysteine이 γ-glutamylcysteine synthetase의 작용으로 ATP를 소모 하면서 γ-glutamylcysteine을 합성한다.(3) 이때 생성된 ADP는 phosphoenolpyruvate가 pyruvate kinase에 의해서 pyruvate로 전환 될때 ADP가 ATP로 전환되고 (4), pyruvate 는 LDH에 의해서 NADH를 NAD⁺로 산화시키면서 lactic acid로 전환된다.(5) 따라서 NADH가 NAD⁺로 산화된 량을 자외선 분광흡광 광도계를 이용하여 340 nm에서 흡광도를 측정하여 계산 하였다.



효소활성도는 NADH 흡광계수 6.22/mM/Cm을 이용하여 단위 시간당 산화되는 NADH의 μmole 수로 표시하였다.

단백질 정량 - 단백질의 정량은 Lowry 등²²⁾의 방법에 의해서 600 nm에서 흡광도를 측정하고 표준 단백 시료를 같은 방법으로 측정하여 단백질량을 계산하였다.

이상의 실험결과와 유의성 검정은 Student's *t*-test를 이용하여 상호비교, 검정하였다.

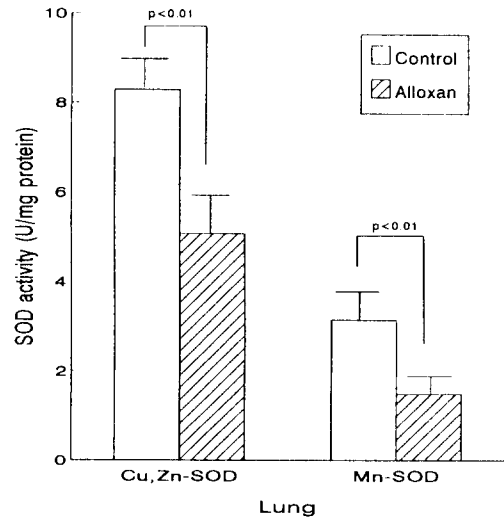


Fig. 1 — The SOD activity in the lung of alloxan-induced diabetic rats. Rats were treated by intraperitoneal injection of alloxan (50 mg/kg) 2 times every 2 days. Three weeks after the final injection, they were sacrificed by cervical dislocation. Cu,Zn-SOD and Mn-SOD activities were determined by Crapo's method. Results are expressed as mean ± S.D. from 7 rats. Statistical difference were calculated by comparing enzyme activities between control and alloxan-treated groups.

결 과

Alloxan으로 유발시킨 당뇨 흰쥐의 폐 SOD 활성도 변화 - Alloxan을 복강으로 투여하여 3주 후 당뇨가 유발된 7마리 흰쥐의 폐 SOD 활성도를 측정한 결과, 당뇨 흰쥐의 폐 Cu,Zn-SOD 활성도는 5.08 ± 0.92 U/mg protein이었고, 정상 흰쥐의 폐 Cu,Zn-SOD 활성도는 8.29 ± 0.72 U/mg protein으로, 폐 Cu,Zn-SOD 활성도는 당뇨 흰쥐에서 감소되었다(p < 0.01).

또한 당뇨 흰쥐의 폐 Mn-SOD 활성도는 1.50 ± 0.35 U/mg protein이었고, 정상 흰쥐의 폐 Mn-SOD 활성도는 3.15 ± 0.45 U/mg protein으로, Mn-SOD 활성도는 당뇨군의 폐에서 낮은 활성도를 나타냈다(Fig.1).

Alloxan으로 유발시킨 당뇨 흰쥐의 폐 catalase 활성도 변화 - Alloxan을 복강으로 투여하여 3주 후 당뇨가 유발된 7마리 흰쥐의 폐 catalase 활성도를 측정한 결과, 당뇨 흰쥐의 폐 catalase 활성도는 89.72 ± 6.29 mU/mg protein이었고, 정상 흰쥐의 폐 catalase 활성도는 94.10 ± 7.33 mU/mg protein으로, 폐 cata-

Table I—The activity of catalase in the lung of alloxan-treated rats

	Enzyme activity (mU/mg protein)	
	Control	Alloxan
Catalase	94.10±7.33	89.72±6.29

Catalase activity was determined by Abei's method. The other methods and legends are the same as in Fig. 1. Values are mean±S.D., n=7.

Table II—The activity of GPX in the lung of alloxan-treated rats

	Enzyme activity (mU/mg protein)	
	Control	Alloxan
CPX	116.87±8.51	124.36±6.83

CPX (glutathione peroxidase) activity was determined by Flohe's method, others are the same as Fig. 1. Values are mean±S.D., n=7.

lase 활성도는 당뇨군에서 약간 감소하였으나 두 비교군 사이에 유의한 차이를 나타내지는 않았다(Table I).

Alloxan으로 유발시킨 당뇨 흰쥐의 폐 GPX 활성도 변화 - Alloxan을 복강으로 투여하여 3주 후 당뇨가 유발된 7마리 흰쥐의 폐 GPX 활성도를 측정된 결과, 당뇨 흰쥐의 폐 GPX 활성도는 124.36±6.83 mU/mg protein이었고, 정상 흰쥐의 폐 GPX 활성도는 116.87±8.51 mU/mg protein으로, 폐 GPX 활성도는 당뇨군에서 약간 증가하였으나 두 비교군 사이에 유의한 차이를 나타내지는 않았다(Table II).

Alloxan으로 유발시킨 당뇨 흰쥐에서 간, 폐, 및 혈액의 glutathione 량 변화 - Alloxan을 복강으로 투여하여 3주 후, 당뇨가 유발된 흰쥐의 간, 폐, 및 혈액에서 glutathione량을 측정된 결과, 당뇨 흰쥐 간의 총 glutathione량은 15.98±2.55 μmole/g tissue로 정상 흰쥐 간의 총 glutathione량 24.94±3.75 μmole/g tissue에 비하여 약 35.9%가 감소되었고, 당뇨군의 산화 glutathione량은 2.66±0.34 μmole/g tissue로 정상 대조군의 산화 glutathione량 4.37±0.47 μmole/g tissue에 비하여 약 39.1%가 감소 되었으나, 총 glutathione에 대한 산화 glutathione량의 비율은 거의 변화가 없었다(Table III).

당뇨 흰쥐 폐의 총 glutathione량은 3.37±1.02 μmole/g tissue로 정상 흰쥐 폐의 총 glutathione량 5.19±0.63 μmole/g tissue에 비하여 약 35.1%가 감소되었고, 당뇨군의 산화 glutathione량은 0.32±0.06 μmole/g tissue로 정상 대조군의 산화 glutathione량

Table III—The glutathione levels in the livers of alloxan-treated rats

Groups	Glutathione contents(μmole/g tissue)		GSSG/(GSH+GSSG) (%)
	GSH+GSSG	GSSG	
Control	24.94±3.75	4.37±0.47	17.5
Alloxan	15.98±2.55*	2.66±0.34*	16.7

The amount of glutathione was determined by Tietze's method. Values are mean±S.D., n=7

*: P<0.01 vs control

Table IV—The glutathione levels in the lung of alloxan-treated rats

Groups	Glutathione contents(μmole/g tissue)		GSSG/(GSH+GSSG) (%)
	GSH+GSSG	GSSG	
Control	5.19±0.63	0.16±0.05	3.1
Alloxan	3.37±1.02*	0.32±0.06*	9.5

The amount of glutathione was determined by Tietze's method. Values are mean±S.D., n=7

*: P<0.01 vs control

Table V—The glutathione levels in each of the blood samples from alloxan-treated rats

Groups	Glutathione contents(μmole/g tissue)		GSSG/(GSH+GSSG) (%)
	GSH+GSSG	GSSG	
Control	5.15±0.90	0.26±0.01	5.1
Alloxan	2.98±0.37*	0.33±0.10*	11.1

The amount of glutathione was determined by Tietze's method. Values are mean±S.D., n=7

*: P<0.01 vs control

0.16±0.05 μmole/g tissue에 비하여 약 2배가 증가 되었으며, 당뇨군에서 총 glutathione에 대한 산화 glutathione량의 비율은 정상 대조군에 비해서 3.1배가 증가되었다(Table IV).

당뇨 흰쥐 혈액의 총 glutathione량은 2.98±0.37 μmole/ml blood로 정상 대조군 혈액의 총 glutathione량 5.15±0.90 μmole/ml blood에 비하여 약 42.1%가 감소되었고, 당뇨군의 산화 glutathione량은 0.33±0.10 μmole/ml blood로 정상 대조군의 0.26±0.01 μmole/ml blood에 비하여 약 26.9%가 증가 되었으며, 당뇨군의 총 glutathione에 대한 산화 glutathione량의 비율은 정상 대조군에 비해서 약 2.2배가 증가 되었다(Table V).

Alloxan으로 유발시킨 당뇨 흰쥐에서 간의 γ-glutamylcysteine synthetase 활성도 변화 - Alloxan을 복강으로 투여하여 3주 후 당뇨가 유발된 흰쥐의 간 γ-glutamylcysteine synthetase 활성도를 측정된 결과, 28.46±2.30 U/mg protein이었고, 정상 흰쥐의 간

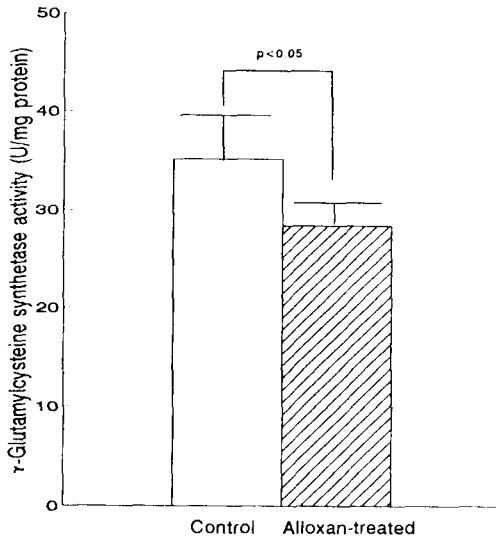


Fig. 2 — The activity of γ -glutamylcysteine synthetase in the liver of alloxan diabetic rats. Values are mean \pm S.D., n=7.

γ -glutamylcysteine synthetase 활성도는 35.19 ± 3.62 U/mg protein이어서, 효소 활성도는 대조군에 비하여 당뇨군에서 약 19%가 감소된 효소 활성도를 나타냈다(Fig. 2).

고 찰

유리산소는 SOD에 의해 H_2O_2 와 O_2 로, H_2O_2 는 catalase와 GPX에 의해 H_2O 로 전환되므로 SOD, catalase 및 GPX는 유리산소의 독성으로부터 세포를 보호하는 매우 중요한 효소이며, 이들 효소의 활성이 감소되면 산소유리기에 의한 DNA나 단백질 및 지질 손상이 초래된다고 한다.¹⁻⁵⁾ 사람체막 호흡사슬에서 생성되는 superoxide와 과산화수소는 산소분압이 증가하거나, 호흡사슬 구성물이 환원상태 일때, uncouplers(protochlores, ionophores 및 Ca^{++})등에 의해서 생성량이 증가된다.²³⁾ 폐는 산소의 분압이 높아 폐 세포내에서 생성되는 산소유리기가 많고, 활성화된 탐식세포(activated phagocytes)에서 생성되는 rad-

icals 량도 많아서 폐내의 항산화계는 폐손상과 밀접한 연관이 있다.²⁴⁾

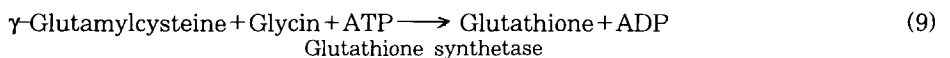
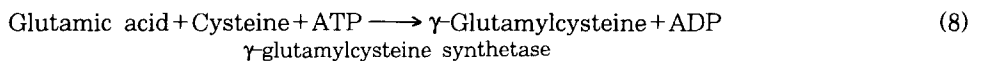
본 실험에서 Alloxan 투여로 당뇨가 유발된 흰쥐의 폐 Cu, Zn-SOD 활성도는 정상 대조군에 비하여 당뇨군에서 38.7%가 감소된 효소 활성을 나타냈으며, Mn-SOD 활성도는 간 과 폐에서 모두 당뇨군에서 유의하게 낮은 효소 활성도를 나타냈고, 폐 catalase와 GPX 활성도는 당뇨군과 대조군 사이에 유의한 차이를 나타내지 않았다.

Loven등은 streptozotocin 당뇨 흰쥐의 간, 신장 및 적혈구 Cu, Zn-SOD활성도는 감소되었으나, Mn-SOD 활성도는 증가된것으로 보고하였으며¹²⁾ Woh-aieb 등은 streptozotocin 당뇨 흰쥐의 췌장 Cu, Zn-SOD와 catalase 활성은 감소되었고, GPX 활성은 변화가 없었으며, 간 Cu, Zn-SOD, catalase 및 GPX 활성이 모두 감소되었고, 심장에서 catalase 활성은 증가되었으나 Cu, Zn-SOD와 GPX 활성 변화는 없어서, streptozotocin 당뇨 흰쥐에서 항산화효소 활성의 변화는 장기에따라 달랐는데²⁵⁾, 본 실험결과 alloxan 당뇨흰쥐의 폐 항산화효소 활성도 변화가 항산화효소의 종류에 따라서 다르게 나타남을 알 수 있다.

Glutathione(L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycine)은 세포내에 널리 분포되어 있는 tripeptide로서, 세포내 -SH(thiol group)중 많은 부분을 차지하는 물질이며, 생리적 기능은 단백질이나 DNA의 합성, γ -glutamyl amino acid 등과 같은 물질의 이동, 효소활성의 조절 및 활성산소나 유리기에 의한 세포손상예방 등 생물학적으로 중요한 여러반응에 직접 또는 간접적으로 관여한다고 한다.^{16, 26, 27)}

Alloxan 당뇨흰쥐의 간, 폐 및 혈액에서 glutathione 량을 측정한 결과, 총 glutathione 량은 정상 대조군에 비하여 당뇨 흰쥐의 간에서 약 36.1%, 폐에서 약 35.1%, 혈액에서 약 42.0%가 각각 감소되었다.

Glutathione은 γ -glutamylcysteine synthetase (8)와 glutathione synthetase (9)에 의해서 glutamic acid, cysteine 및 glycine을 기질로 이용하여 세포내에서 합성된다.^{18, 27)}



γ -Glutamylcysteine synthetase 활성은 생리상태에서 GSH에 의해서 조절되며, 생쥐나 흰쥐에 실험적으로 γ -glutamylcysteine synthetase 활성 억제제인 buthionine sulfoximine을 주사하면 간, 신장 및 혈액 등에서 glutathione 양이 급속히 저하되므로, buthionine sulfoximine은 세포내 glutathione을 저하시킬 목적으로 유용하게 쓰이고 있는데, γ -glutamylcysteine synthetase 활성이 저하되면 간이나 혈액의 glutathione 양이 급격히 감소되며, 담즙이나 뇌의 GSH 량도 감소된다.^{16, 28, 29)} 또한 흰쥐에 sodium selenite를 투여하면 γ -glutamylcysteine synthetase 활성도가 증가되어 glutathione 양이 증가된다는 보고도 있다.³⁰⁾

본 실험 결과 alloxan 당뇨병쥐의 간 γ -glutamylcysteine synthetase 활성도는 정상흰쥐의 간에 비하여 약 19%가 감소된것으로 나타났다. 따라서 간과 혈액 및 폐 glutathione 량 감소는 간 γ -glutamylcysteine synthetase 활성도가 감소됨으로 인해 간에서 glutathione 합성량이 저하되어 간, 혈액 및 폐 glutathione 양이 저하된것으로 생각된다.

세포내에서 소모되는 산소의 95% 이상이 사립체에서 이용되는데, 이중 96~99%가 cytochrome oxidase에 의해서 소모되고, 나머지 1~4%가 superoxide나 과산화수소로 전환되는데²³⁾, 폐는 산소분압이 높아서 superoxide나 과산화 수소의 생성량이 많을 것으로 사료된다. Alloxan 당뇨병에서 폐 SOD 활성 감소와 glutathione 량의 감소는 세포내에 생성된 superoxide의 제거 및 catalase에 비해서 Km value가 낮은 GPX의 활성에 필요한 glutathione의 감소로 인한 과산화 수소의 소거가 충분치 못하여, alloxan 투여 당뇨병쥐의 폐에서 산소유리기의 세포손상에 대한 감수성이 증가 되는 요인으로 작용할 것으로 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 1993년도 조선대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었음을 밝히는 바입니다.

문헌

1) Fridovich, I.: Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* **247**, 1

(1986).

- 2) Miquel, J.: Historical introduction to free radical and antioxidant biomedical research, In *CRC handbook of free radical and antioxidants in biomedicine*, vol I, Miquel, J. Quintanilha, A. T. and Weber, H. eds, CRC Press, Florida p. 3 (1989).
- 3) Proctor, P. H.: Free radicals and human disease, *CRC handbook of free radical and antioxidants in biomedicine*, vol I, Miquel, J. Quintanilha, A. T. and Weber, H. eds, CRC Press, Florida p. 209 (1989).
- 4) Lippman, R. D.: Free radical-induced lipoperoxidation and aging, In *CRC handbook of free radical and antioxidants in biomedicine*, vol I, Miquel, J. Quintanilha, A. T. and Weber, H. eds, CRC Press, Florida p. 187 (1989).
- 5) Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C.: Roles of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods enzymology*, Fleischer, S. and Packer, L. eds. Academic Press, Inc. New York **186**, 1 (1990).
- 6) Crouch, R. K., Gandy, S. E., Kimsey, G., Galbraith, R. A., Galbraith, G. M. P. and Buse, M. G.: The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes* **30**, 235 (1981).
- 7) Lensen, S. and Panten, U.: Alloxan: history and mechanism of action, *Diabetologia* **31**, 337 (1988).
- 8) Stocker, R. and Frei, B.: Endogenous antioxidant defences in human blood plasma, In *Oxidative stress* Sies H ed, Academic Press, New York p. 213 (1981).
- 9) Godin, D. V., Wohaiab, S. A., Garnett, M. E. and Goumeniouk, A. D.: Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetics. *Molecular and Cellular Biochemistry* **84**, 223 (1988).
- 10) Matkovich, B., Varga, S. I., Szabo, L. and Witas, H.: The effect of diabetes on the activities of the peroxide metabolism enzymes. *Horm. Metab. Res.* **14**, 77 (1982).
- 11) Loven, D. P., Schedl, H. P., Oberley, L. W., Wilson, H. D., Bruch, L. and Niehaus, C. N.: Superoxide dismutase activity in the intestinal mucosa of the streptozotocin-diabetic rat. *En-*

- doocrinology* **111**, 737 (1982).
- 12) Loven, D., Schedl, H., Wilson, H., Daabees, T. T., Stegink, L. D., Diekus, M. and Oberley, L.: Effect of insulin and oral glutathione on glutathione levels and superoxide dismutase activities in organs of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes* **35**, 503 (1986).
 - 13) Bruno, H., Stefan, I. Mark, L. and Gosta H.: CuZn superoxide dismutase, Mn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in lymphocyte and erythrocytes in insulin-dependent diabetic children. *Acta Endocrinologica* **102**, 235 (1983).
 - 14) Uzel, N., Sivas, A., Uysal, M. and Oz, H.: Erythrocyte lipid peroxidation and glutathione peroxidase activities in patients with diabetes mellitus. *Horm. Metabol. Res.* **19**, 89 (1987).
 - 15) Nath, N., Chari, S. N. and Rathi, A. B.: Superoxide dismutase in diabetic polymorphonuclear leukocytes. *Diabetes* **33**, 586 (1984).
 - 16) Meister, A. and Anderson, M. E.: Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* **52**, 711 (1983).
 - 17) Crapo, C. H., McCord, J. M. and Fridovich, I.: Preparation and assay of superoxide dismutase. *Methods in enzymol.* ed. Fleischer, S. and Packner, L. Academic press, New York **53**, 382 (1978).
 - 18) Aebi, H.: Catalase. *Methods of Enzymatic Analysis*, Bergmeyer, H.U. Bergmeyer, J. and GraB1, M. eds, 3rd ed, Verlag chemie, **2**, 673 (1974).
 - 19) Flohe, L., Wolfgang, A. and Gunzler, W. A.: Assay of glutathione peroxidase. *Methods in enzymatic analysis*, Packer, L. ed. New York, Academic Press, Inc. **105**, 114 (1984).
 - 20) Tietze, F.: Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal. Biochem.* **27**, 502 (1969).
 - 21) Tate, S. S. and Meister, A.: γ -glutamyltranspeptidase from kidney. In: Meister A, ed. *Methods in enzymol*, New York; Academic press **113**, 400 (1985).
 - 22) Lowry, O. H., Rosenbrough, N.J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 256 (1951).
 - 23) Boveris, A. and Cadenas, E.: Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Superoxide dismutase*, vol II, Oberley LW, ed., CRC Press, Florida p. 15 (1982).
 - 24) Fridovich, I.: Antioxidant defenses in the lung. *Ann. Rev. Physiol.* **48**, 693 (1986).
 - 25) Wohaieb, S. A. and Goddin, D. V.: Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozotocin-induced diabetes in rat. Effect of insulin treatment. *Diabetes* **36**, 1014 (1987).
 - 26) Griffith, O. W., Bridges, R. J. and Meister, A.: Evidence that the gamma-glutamyl cycle functions in vivo using intracellular glutathione: effects of amino acids and selective inhibition of enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**, 5405 (1978).
 - 27) Seelig, G. F. and Meister, A.: Glutathione biosynthesis: γ -glutamylcysteine synthetase from rat kidney. In *Methods in enzymol*, Meister. A. ed., New York, Academic press, **113**, 379 (1985).
 - 28) Griffith, O. W., Anderson, M. E. and Meister, A.: Inhibition of glutathione biosynthesis by prothionine sulfoximine (S-n-propyl homocysteine sulfoximine), a selective inhibitor of gamma-glutamylcysteine synthetase. *J. Biol. Chem.* **254**, 1205 (1979).
 - 29) Griffith, O. W. and Meister, A.: Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J. Biol. Chem.* **254**, 7558 (1979).
 - 30) Chung, A. S. and Maines, M. D.: Effect of selenium on glutathione metabolism. Induction of gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione reductase in the rat liver. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 3217 (1981).