

연령증가에 따른 마이크로솜 막지질 과산화수준의 변화와 해독효소계의 관계

조중후 · 황대우¹ · 박상열*

전북대학교 수의과대학, 생체안정성연구소,

¹(주)성보사이언스텍

(게재승인: 2003년 11월 28일)

Correlation between microsomal lipid peroxidation levels and drug metabolizing enzymes in rats on various ages

Jong-Hoo Cho, DaeWoo Hwang¹, and Sang-Youel Park*

Bio-Safety Research Institute, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University,
Chonju 561-756, Korea

¹SungBo Science Tech., Seoul 133-848, Korea

(Accepted: November 28, 2003)

Abstract : The studies were carried out on the correlation between microsomal lipid peroxidation level and drug metabolizing enzyme activities in rat liver microsomal suspensions on various ages (2-week-old, 2, 4, 8, and 12-month-old). The lipid peroxidation levels of liver homogenates tended to be elevated in a 4-month-old rat livers, but it was a little decreased in 8 and 12-month-old rat livers. The lipid peroxidation levels and microsomal cytochrome P450 and NADPH-cytochrome c reductase activity showed a direct correlation ($r=0.72$ and $r=0.64$), respectively. The activities of cytochrome P450-dependent aminopyrine-N-demethylase and benzpyrene hydroxylase in rat liver microsomes were increased by ages up to 8-month-old rats and maintained in 12-month-old rats. The correlation between lipid peroxidation levels and these cytochrome-dependent enzyme activities showed a high direct correlation ($r=0.97$ and $r=0.81$), respectively.

Key words : microsome, cytochrome P450, drug metabolizing enzymes

서 론

세포의 소기관인 소포체(endoplasmic reticulum), 특히 라이보솜(ribosome) 입자가 부착되어있는 조면소포체(rough surfaced endoplasmic reticulum)는 지질대사뿐 아니라 약물이나 농약과 같은 이물질들을 수용성물질로 전환시켜 체외로 배설을 촉진시키는 해독효소계인 monooxygenase 시스템을 가지고 있는 소기관으로, 세포를 균질화시키면 과쇄되어 분리되는 입자를 마이크로솜(microsome)이라고 한다. 마이크로솜의 monooxygenase

시스템은 NADPH의 전자를 사용하여 cytochrome P450을 환원시켜 지용성의 이물질과 결합을 용이하게 할 뿐 아니라 결합한 이물질에 단원자 산소를 결합시켜 수산기를 형성함으로써 수용성물질로 전환되어 요증으로 이물질의 배설을 용이하게 한다 [1-4].

마이크로솜은 소포체막의 과쇄물이며 다른 생체막과 같이 불포화지방산을 많이 포함하고 있는 인지질을 주성분으로 하고 있다 [5]. 따라서 마이크로솜의 전자전달 과정과 산소와 반응하는 과정에서 반응성 산소종들이 생성되어 반응성 막지질과산화물을 유발시킬 수 있음이

이 논문은 2003년도 전북대학교 생체안정성연구소의 일부 지원으로 연구되었음

*Corresponding author: Sang-Youel Park

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea
[Tel: 82-63-270-3886. Fax: 82-63-270-3780, E-mail: sympark@chonbuk.ac.kr]

시험관내 실험과 [6-8] 생체실험에서 확인되었다 [9-11]. 그러나 마이크로솜 막지질 과산화에 대한 시험관내 실험에서 마이크로솜의 기능저하가 확인되었음에도 불구하고 생체실험에서는 마이크로솜의 기능에 영향이 없었거나 오히려 기능을 상승시켰다는 보고들이 있다 [12-14].

생체에서 조직이 산소를 이용하는 한 반응성 산소종들의 생성은 확실하며 따라서 마이크로솜 막지질의 과산화에 의한 손상은 충분히 예견되고 증명되었다. 그러나 손상정도에 따라 기능에 미치는 영향도 다를 것으로 예상되며 상반된 보고들이 이를 뒷받침 한다. 반응성 산소종이 반응할 수 있는 연령은 막지질 과산화수준과 밀접한 관계가 있을 것이며 이는 랫트에서 연령 증가에 따라 막지질 과산화산물의 조직축적량이 증가한다는 많은 학자들의 보고에서 밝혀졌다 [15, 16].

이에 따라 본 연구에서 랫트의 연령증가에 따라 중요한 대사기능을 수행하는 간세포 마이크로솜 막지질의 과산화수준을 다양한 방법으로 측정하고, 막지질 과산화수준 변화에 따른 마이크로솜 기능의 상관성을 밝히 고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

이유 직후의 Sprague-Dawley계 수컷 랫트 30마리를 전북대학교 생체안정성연구소에서 분양받아 삼양사료(주)에서 제조한 마우스사료를 물과 함께 제한없이 급여 하면서 실험동물실에서 사육하였다. 2주령, 2, 4, 8, 및 12개월령에 도달하였을 때 6두씩 두부 타격으로 치사시켜 간장을 채취하여 실험에 사용하였다.

분석시약 및 분석기기

마이크로솜의 cytochrome P450과 NADPH-cytochrome c reductase 활성 측정을 위한 1,2,4-aminonaphthol sulfonic acid, cytochrome c 및 NADPH와 마이크로솜의 약물대사 측정을 위한 aminopyrine과 benzpyrene은 Sigma (U.S.A.) 제품을 사용하였고, malondialdehyde 측정을 위한 thiobarbituric acid (TBA)와 trichloroacetic acid (TCA)는 Lancaster (England) 제품, 기타 일반 시약은 Junsei (Japan) 제품의 1급 시약을 사용하였다.

분석기기로 균질마쇄기는 SMT process homogenizer (SMT Co., Japan)와 teflon-pestle homogenizer (Wheaton, U.S.A.)를 사용하였고, 마이크로솜의 분리를 위해서는 super speed centrifuge (Vision, Korea)를 사용하였으며, 흡광도 측정은 UV-2100 spectrophotometer (Shimadzu, Japan)를 사용하였고, 형광 스펙트럼과 형광강도의 측정은 spectrofluorometer (SFM25, Italy)를 사용하였다.

간세포 마이크로솜의 분리

랫트를 치사시킨 후 즉시 간장을 제거하여 세절하고 냉장 Tris 완충액(0.25 M sucrose, 20 mM nicotinamide, 27 mM KCl, pH 7.4)으로 3회 이상 세척하여 결체조직과 응고된 혈액을 제거하였다. 세척한 조직에 다시 같은 Tris 완충액 30 ml를 가하여 SMT process homogenizer로 1분간 조직을 파쇄시킨 후 다시 teflon-pestle homogenizer를 사용하여 0-4°C를 유지하면서 4회 stroke를 실시하여 균질부유액을 실험에 사용하였다. 마이크로솜의 분리는 Cain과 Skilleter [17]의 방법과 Lee와 Lee [18]의 방법을 준용하여 균질부유액으로부터 mitochondria를 분리하여 제거하고 Omura와 Sato [19]의 방법에 준하여 마이크로솜을 분리하였다. 전 과정을 요약하면 균질부유액을 460×g에서 5분간 원심분리하여 세포 파쇄물과 핵 침전물을 분리하여 제거하고 상청액을 다시 4,300×g에서 10분간 원심분리하여 미세한 파쇄물침전을 제거하였다. 얻어진 상청액을 12,500×g에서 30분간 원심분리하여 미토콘드리아 침전물을 분리하여 제거한 후 얻어진 상청액을 100,500×g에서 90분간 원심분리하여 마이크로솜 침전물을 분리하였다. 마이크로솜 침전물을 Tris 완충액에 부유시켜 다시 한번 teflon-pestle homogenizer를 사용하여 마이크로솜 균질부유액을 얻었다. 위와 같이 얻어진 간 균질액과 마이크로솜 부유액은 단백질농도를 측정하여 필요에 따라 즉시 적절한 농도로 희석하여 실험에 사용하였으며, 부득이 보관할 필요가 있을 때는 냉동보관하여 3일 이내에 실험에 사용하였다.

막지질 과산화수준의 측정

(1) Malondialdehyde (MDA)의 측정

Keller 등 [20]의 방법에 준하여 다음과 같이 측정하였다. TBA 시약(15% TCA, 0.375% TBA, 0.25 N HCl) 2 ml와 균질액 또는 마이크로솜 부유액(1 mg protein/ml) 1 ml, 그리고 10 μl의 10% BHT를 가하여 혼합하고 자비수조중에서 15분간 가열한 후 냉각시킨 반응액을 3,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 얻어진 상청액의 형광강도를 여기파장 515 nm와 방사파장 553 nm에서 측정하였다. 표준품으로 tetramethoxypropane을 상기와 같은 방법으로 처리하여 얻은 MDA 표준 형광곡선으로부터 MDA 양을 산출하였다.

(2) 형광강도의 측정

간 균질액과 마이크로솜 부유액을 Tris 완충액으로 희석하여(2 mg protein/ml) 여기파장 342 nm와 방사파장 455 nm에서 상대적 형광강도를 측정하여 비교하였다.

마이크로솜 활성의 측정

(1) Cytochrome P450 측정

마이크로솜 부유액중 cytochrome P450 양은 Omura와 Sato(19)의 방법으로 측정하였다. 즉, 마이크로솜 부유액(2 mg protein/ml, 0.15M KPO₄ 완충액) 5 ml에 sodium dithionite를 소량 가하고 잘 혼합하여 2.5 ml 씩 두 개의 비색관에 나누어 넣고 한쪽 비색관에 일산화탄소를 포화시켜 그렇지 않은 비색관을 대조로하여 파장 380 nm와 500 nm 사이의 흡광 스펙트럼을 작성하였다. 450 nm와 490 nm에서의 흡광도 차이로부터 cytochrome P450의 extinction coefficient, 91 mM⁻¹cm⁻¹을 이용하여 농도를 산출하였다(nmol cytochrome P450/mg protein).

(2) NADPH-cytochrome c reductase 활성 측정

마이크로솜 부유액의 NADPH- cytochrome c reductase 활성은 Lake [21]의 방법으로 측정하였다. 요약하면, cytochrome c 용액(5 mg cytochrome c/ml, 0.3 M 인산완충액, pH 7.5) 0.2 ml에 0.3 M 인산완충액 0.8 ml, 9.5 mM NADPH 10 µl, 마이크로솜 부유액(5 mg protein/ml) 10 µl를 1 ml 비색관에서 혼합하여 1분 후 파장 550 nm에서 1분간 흡광도 변화를 측정하였다. 1분간의 흡광도 변화로부터 환원 cytochrome c의 extinction coefficient, 21 × 10³ µmol min⁻¹mg⁻¹ protein을 이용하여 환원되는 cytochrome c의 nm/min/mg protein으로 활성을 표시하였다.

(3) Aminopyrine N-demethylase 활성 측정

Wills [22]의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 0.05 M Tris-HCl 완충액(pH 7.5) 3 ml, 마이크로솜 부유액(5 mg protein/ml) 1 ml, 9.5 mM NADPH 20 µl, 그리고 0.1 M aminopyrine 1 µl를 혼합하여 37°C의 수조에서 반응시키면서 5분 간격으로 4회에 걸쳐 반응액 1 ml 씩 취하여 10% TCA 1 ml와 혼합하였다. 혼합액을 실온에서 15분간 방치한 후 Nash 시약 [23] 2 ml와 혼합하여 60°C 항온수조에서 15분간 반응시킨 후 2,500 r.p.m.에서 15분간 원심분리하여 상층액중의 흡광도를 파장 412 nm에서 측정하였다. 효소에 의하여 생성된 formaldehyde 양을 표준곡선으로부터 산출하여 활성을 생성 formaldehyde µmol/min/mg protein으로 표시하였다.

(4) Benzpyrene hydroxylase 활성 측정

Watanabe 등 [24]의 방법에 준하여 측정하였다. 요약하면, 마이크로솜 부유액(2.5 mg protein/ml) 0.2 ml, 0.05 M Tris-HCl 완충액(pH 7.5) 0.8 ml, 9.5 mM NADPH 10 µl, 그리고 0.01 M benzpyrene-acetone 용액 10 µl를 잘 혼합한 후 37°C에서 15분간 반응시켰다. 반응을 정지시키기 위하여 acetone 1 ml를 첨가하고, 다시 hexane 3 ml를 첨가하여 10분간 추출하였다. Hexane 1 ml를 취하여 1 N NaOH 3 ml와 혼합하고 1분간 진탕하여 4,000 r.p.m.에서 5분간 원심분리하였다. NaOH 층을 분리하여 여기 파장 396 nm, 방사파장 522 nm에서 산화된 benzpyrene

의 형광강도를 측정하였다. 활성도는 산화된 benzpyrene의 nmol/min/mg protein으로 표시하였다.

통계학적분석

본 실험에서 얻어진 실험 관측치는 시험관내 실험에서는 6회 반복실험의 평균±표준편차로 나타내었으며 생체실험은 랫트 6마리에서의 평균±표준편차로 나타내었다. 유의성 검정은 Student t-검정에 의하였으며, 상관분석법에 의하여 회귀방정식과 상관계수(r)를 구하였다.

결 과

랫트 연령증가에 따른 간장과 마이크로솜의 막지질 과산화수준 변화

(1) MDA 양의 변화

간 균질액과 마이크로솜 부유액의 지질 과산화 생성물인 MDA 함량 변화는 Fig. 1과 같다. 간 균질액은 4개월까지 증가한 후 12개월까지 완만한 감소경향을 보였고 마이크로솜 부유액은 12개월째에 다소 증가하는 경향을 보였으나 전 실험기간중 유의한 변화를 보이지 않았다.

(2) 형광강도의 변화

지질 과산화 생성물은 형광성이 있으므로 형광강도의 증가는 지질과산화의 증가를 의미한다. 2주령부터 시작하여 12개월령에 이르기까지 간 균질액과 마이크로솜 부유액의 연령증가에 따른 형광강도의 변화는 Fig. 2와 같다. 간 균질액은 8개월령에 이를 때까지 유의하게 증가되었으며 이후 12개월령에서는 더 이상의 증가없이

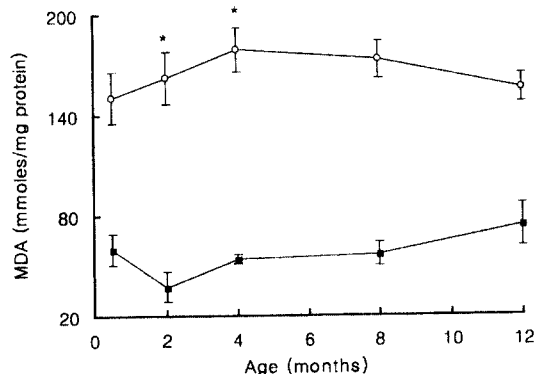


Fig. 1. Age-related changes of MDA in rat liver homogenates and microsomes. —○—: homogenates; —■—: microsomes; MDA, malondialdehyde. Each value is the mean ± SD for 6 separate experiments. *P<0.05 vs. 2-week-old rats.

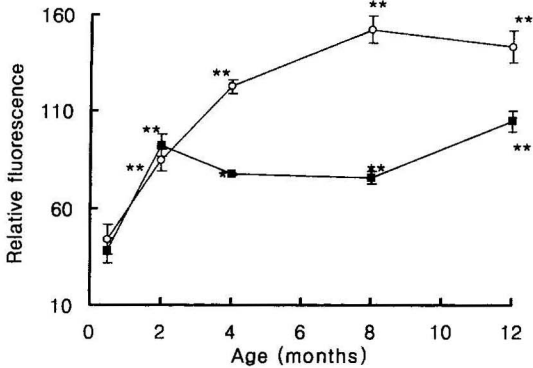


Fig. 2. Age-related increase in relative fluorescence of rat liver homogenates and microsomes. —○—: homogenates; —■—: microsomes. Each value is the mean ± SD for 6 separate experiments. **P<0.01 vs. 2-week-old rats.

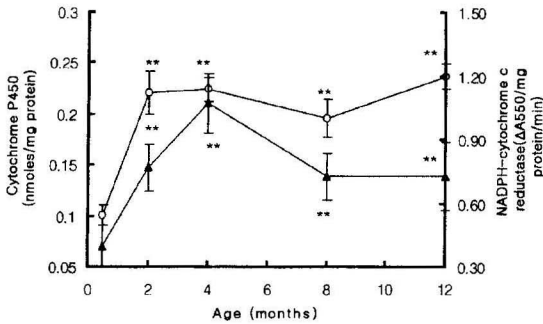


Fig. 3. Dependence of cytochrome P450 and NADPH-cytochrome c reductase of microsomes prepared from 2-week, 2, 4, 8 and 12-month-old rat liver. —○—: cytochrome P450; —▲—: NADPH-cytochrome c reductase. Each value is the mean ± SD for 6 separate experiments. **P<0.01 vs. 2-week-old rats.

평형상태를 유지하였다. 마이크로솜 부유액은 2개월령까지 유의한 증가를 보였으나 이후 12개월령까지 평형상태를 유지하였다.

연령증가에 따른 마이크로솜 해독효소계의 활성 변화

(1) 연령증가에 따른 마이크로솜의 cytochrome P450 과 NADPH-cytochrome c reductase 활성 변화

연령에 따른 cytochrome P450과 NADPH-cytochrome c reductase 활성의 변화는 Fig. 3과 같다. Cytochrome P450은 2개월령까지 급격히 증가하여 이후 더 큰 변동 없이 12개월령까지 유지되었으며 NADPH-cytochrome c reductase 활성은 4개월령까지 계속 증가한 후 8개월령

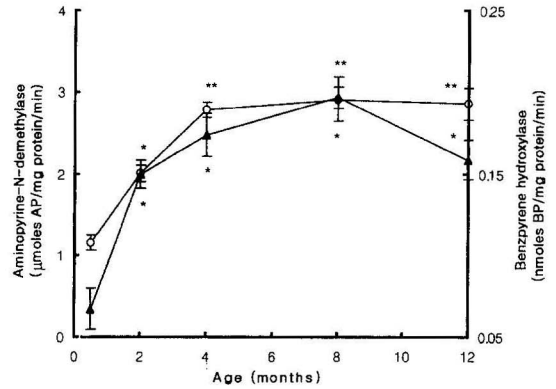


Fig. 4. Dependence of aminopyrine-N-demethylase and benzpyrene hydroxylase of microsomes prepared from 2-week, 2, 4, 8, 12-month-old rat liver. —○—: aminopyrine-N-demethylase. —▲—: benzpyrene hydroxylase. Each value is the mean ± SD for 6 separate experiments. *P<0.05 vs. 2-week-old rats, **P<0.01 vs. 2-week-old rats.

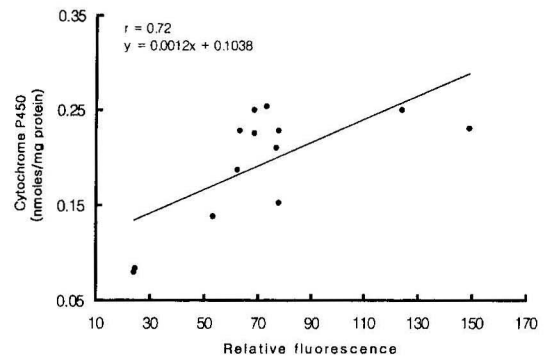


Fig. 5. Relationship between relative fluorescence and cytochrome P450 of microsomal suspension.

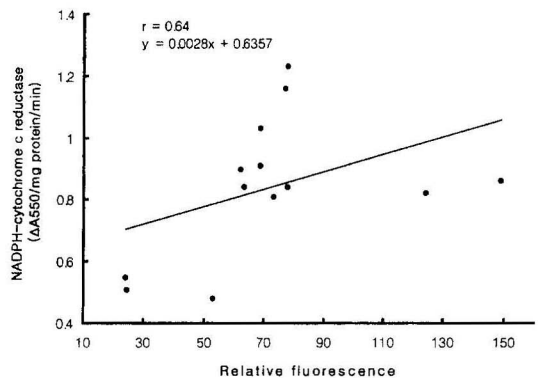


Fig. 6. Relationship between relative fluorescence and NADPH-cytochrome c reductase activity of microsomal suspension.

에서 활성이 떨어져 12개월령까지 유지되었다.

(2) 연령에 따른 간장 마이크로솜의 cytochrome P450-의존 aminopyrine-N-demethylase와 benzpyrene hydroxylase 활성의 변화는 Fig. 4와 같다. Aminopyrine-N-demethylase 활성은 4개월령까지 증가한 후 12개월령까지 동일한 수준을 유지하였으며 benzpyrene hydroxylase 활성은 8개월령까지 증가한 후 12개월령에서 활성저하를 보였다.

마이크로솜의 막지질 과산화수준과 기능과의 관계

마이크로솜 막지질 과산화수준과 cytochrome P450 및 NADPH-cytochrome c reductase 활성간의 상관성은 Fig. 5 및 Fig. 6과 같다. Cytochrome P450과 NADPH-cytochrome c reductase 활성 모두 막지질 과산화수준의 증가와 함께 증가하여 각각 $r=0.72$ 와 $r=0.64$ 의 정상관성을 나타내었다.

마이크로솜 막지질 과산화수준과 aminopyrine-N-demethylase 및 benzpyrene hydroxylase 활성간의 상관성

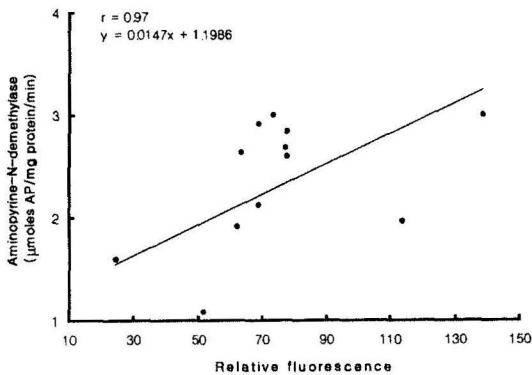


Fig. 7. Relationship between relative fluorescence and aminopyrine-N-demethylase of microsomal suspension.

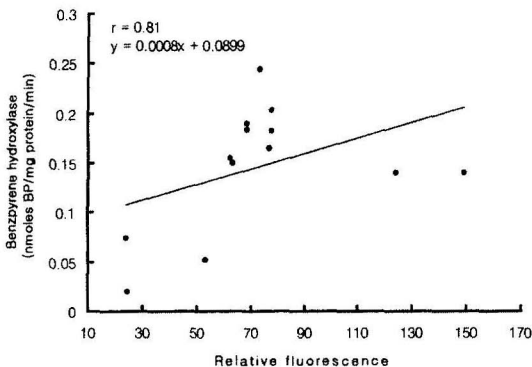


Fig. 8. Relationship between relative fluorescence and benzpyrene hydroxylase of microsomal suspension.

은 Fig. 7과 Fig. 8과 같다. Aminopyrine-N-demethylase와 benzpyrene hydroxylase 활성 모두 막지질 과산화수준의 증가와 함께 증가하여 각각 $r=0.97$ 과 $r=0.81$ 의 높은 정상관성을 보였다.

고 찰

랫트를 사육하면서 2주령, 2, 4, 8, 및 12개월까지 연령증가에 따라 5회에 걸쳐 간 균질액과 마이크로솜 부유액의 지질 과산화수준은 측정방법에 따라 차이를 보였다. 두 방법이 모두 비슷한 경향으로 4개월령 내지 8개월령까지 지질과산화수준이 증가하는 경향을 보였으나 관용법인 MDA 측정법은 근소한 증가를 보인 반면에 형광강도 측정법은 보다 명확한 차이를 보여 신빙성이 있는 것으로 판단되었다. 따라서 형광강도 측정법을 지질 과산화수준의 변화를 판단하는 기준법으로 활용하였다. 형광강도 측정법에 의하면 간균질액의 막지질 과산화수준은 연령의 증가에 따라 증가하였으나 연령이 증가할수록 과산화수준의 증가는 점차 감소하여 8개월 이후 평형을 유지하는 쌍곡선형태의 경향을 보였다. 마이크로솜의 지질과산화는 많은 시험관내 실험과 생체실험들에 의하여 확인되었다. 그러나 본 실험에서 연령에 따른 마이크로솜 막지질 과산화수준은 간균질액과는 완전히 다른 경향으로 2개월 후 과산화수준의 변동이 거의 없었으며 아마도 간세포의 다른 막지질과 달리 과산화되는 경향이 낮은 것은 지방산 조성이나 구조의 차이와 함께 생체의 다양한 항산화작용에 의한 영향으로 생각된다.

Cytochrome P450은 2개월령까지 지질과산화수준의 증가와 같은 경향으로 증가하여 이후 12개월령까지 평형을 유지하였으며, NADPH-cytochrome reductase 활성은 4개월령까지 증가한 후 8개월령에 오히려 감소하여 12개월령까지 같은 수준을 유지한 것으로 보아 monooxygenase 관련 효소들이라도 효소에 따라 다른 영향을 받는 것으로 생각된다. 그러나 역시 막지질 과산화수준에 따라 효소활성을 달리하는 경향을 보였으므로 마이크로솜 막지질 과산화수준과 cytochrome P450 및 NADPH-cytochrome reductase 활성간의 상관성을 조사한 바 지질과산화수준에 따라 동반 증가하거나 감소하는 정상관의 관계를 나타내었다. 그러나 상관계수는 높지 않았다. Aminopyrine-N-demethylase 활성과 benzpyrene hydroxylase 활성도 cytochrome P450 및 NADPH-cytochrome reductase 활성과 완전히 일치하지 않았으나 4개월령에 최고활성에 도달하여 이후 12개월령까지 대체로 비슷한 활성을 유지하는 유사함을 보였다. 마이크로솜 막지질 과산화수준과의 상관성도 정상

관을 나타내었으며 비교적 높은 상관계수를 나타내었다. Gram과 Fouts [13]은 연령증가에 따른 지질과산화수준의 증가가 마이크로솜 기능에 큰 영향을 주지 않았다고 보고한 반면에 Handler와 Brian [2] 그리고 Ando 등 [5]은 연령증가에 수반하여 마이크로솜 기능이 저하되었다고 상반된 결과를 보고하였다. 그러나 본 실험의 결과들을 종합하면 마이크로솜의 모든 monooxygenase 시스템과 관련된 효소들의 활성은 마이크로솜 막지질 과산화수준에 따라 변화되는 것으로 보이나 시험관내 실험과 달리 생체에서는 연령증가에 비례하여 과산화물질이 생성되지 않고, 일정한 연령 이후에는 비교적 과산화물질의 생성이 억제될 뿐 아니라 monooxygenase 활성도 거의 일정하게 유지되는 것으로 보이며, 이는 생체내 항산화 방어기전에 의하여 마이크로솜의 기능이 비교적 잘 보호되는 것으로 생각된다. 따라서 연령증가와 관련하여 마이크로솜 막지질 과산화수준을 평가하는 것과 monooxygenase 시스템을 연령과 비례하여 판단하는 것은 적절치 않을 것으로 생각된다. 여기에 일관적인 개체차이와 환경을 고려할 때 연령과 과산화수준 및 마이크로솜 기능의 관계를 확실히 정립하기는 매우 어려운 것으로 생각된다.

결 론

Sprague-Dawley계 랫트를 사육하면서 2주령, 2, 4, 8, 및 12월령이 되었을 때 간장을 채취하여 제조한 간균질액과 마이크로솜 부유액의 막지질 과산화수준과 마이크로솜 기능과 관련된 효소들의 활성을 측정하여 상관성을 밝혔다. 간균질액과 마이크로솜 부유액의 연령별 과산화수준의 변화는 다른 경향으로 간균질액은 8월령에 이를 때까지 증가하여 12월령까지 유지되는 경향이었으나 마이크로솜은 2월령까지 증가한 후 12월령까지 큰 변화없이 유지되는 경향을 보였다.

마이크로솜의 cytochrome P450의 양과 NADPH-cytochrome c reductase의 활성은 4월령까지 증가하였으나 이후 다소 감소하여 유지되는 경향을 보였으며, 과산화수준과의 상관성은 각각 $r = 0.72$ 와 $r = 0.64$ 로서 비교적 낮은 정상관을 나타내었다. Cytochrome P450-의존 aminopyrine-N-demethylase 활성과 benzpyrene hydroxylase 활성은 8월령까지 증가하여 유지되는 경향을 보였으며 마이크로솜의 막지질 과산화수준과의 상관성은 각각 $r = 0.97$ 과 $r = 0.81$ 로서 매우 높은 정상관을 나타내었다.

참고문헌

1. Gustafsson, J. A. and Ingelman-Sundberg, M.

- Multiple forms of cytochrome P450 in rat liver microsomes. *Eur. J. Biochem.* 1976, **64**, 35-43.
2. Handler, J. A. and Brian, W. R. Effect of aging on mixed function oxidation and conjugation by isolated perfused rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 1997, **54**, 159-164.
3. Longmire, A. W., Swift, L. L., Roberts, L. J., Awad, J. A., Burk, R. F. and Morrow, J. D. Effect of oxygen tension on the generation of F2-isoprostanes and malonaldehyde in peroxidizing rat liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 1994, **47**, 1173-1177.
4. Venditti, P., Danielle, C. M., De Leo, T. and Di Meo, S. Effect of phenobarbital treatment on characteristics determining susceptibility to oxidants of homogenates, mitochondria and microsomes from rat liver. *Cell Physiol. Biochem.* 1998, **8**, 328-338.
5. Ando, M., Katagiri, K., Yamamoto, S., Wakmatsu, K., Kawahara, I., Asanuma, S., Usuda, M. and Sasaki, K. Age-related effects of heat stress on protective enzymes for peroxides and microsomal monooxygenase in rat liver. *Environ. Health Perspect.* 1997, **105**, 726-733.
6. Bondy, S. C. and Naderi, S. Contribution of hepatic cytochrome P450 system to the generation of reactive oxygen species. *Biochem. Pharmacol.* 1994, **48**, 155-159.
7. Devasagayam, T. P. Senescence-associated decrease of NADPH-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes. *FEBS Lett.* 1986, **205**, 246-250.
8. Gonzales, F. J. The molecular biology of the cytochrome P450s. *Pharmacol. Rev.* 1989, **40**, 243-288.
9. Fernandez, V., Kriz, A. and Videla, L. A. Age-dependent changes in *in vivo* ethanol metabolism and in the activity of hepatic enzymes involved ethanol oxidation and microsomal functions. *Cell Biochem. Funct.* 1988, **6**, 7-12.
10. Hayashi, T. and Miyazawa, T. Age-associated oxidative damage in microsomal and plasma membrane lipids of rat hepatocytes. *Mech. Ageing Dev.* 1998, **100**, 231-242.
11. Jacobson, M. Levin, W. Lu, A. Y. H. Connay, A. H. and Kuntzman, A. R. The rate of pentobarbital and acetanilide metabolism by liver microsomes: a function of lipid peroxidation and degradation of cytochrome P450 heme. *Drug metab. Dispos.* 1973, **1**, 766-774.
12. Ginter, E., Kosinova, A., Hudcovova, X. and Mlynarcikova, U. Parabolic response of hepatic

- microsomal hydroxylating system and lipids to graded doses of ascorbic acid in guinea pigs on low and high α -tocopherol intake. *J. Nutr.* 1984, **114**, 482-492.
13. **Gram, T. E. and Fouts, J. R.** Effect of α -tocopherol upon lipid peroxidation and drug metabolism in hepatic microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1966, **114**, 331-335.
 14. **Gut, J., Kawato, S., Cherry, R. J., Winterhalter, K. H. and Richiter, C.** Lipid peroxidation decreases the rotational mobility of cytochrome P450 in rat liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1985, **817**, 217-218.
 15. **Chio, K. S., Reiss, U., Fletcher, B. and Tappel, A. L.** Peroxidation of subcellular organelles: Formation of lipofuscin-like fluorescent pigments. *Science* 1969, **116**, 1535-1536.
 16. **Tappel, A., Fletcher, B. and Deamer, D.** Effect of antioxidants and nutrients on lipid peroxidation fluorescent products and aging parameters in the mouse. *J. Geront.* 1973, **28**, 415-424.
 17. **Cain, K. and Skilleter, D. N.** Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: Snell, K and Mullock, B. (ed). *Biochemical toxicology. A practice approach.* pp. 217-254, Oxford IRL Press, 1987.
 18. **Lee, S. J. and Lee, J. Y.** Mitochondrial activities of bovine tissues for external electron transport. *Kor. Biochem. J.* 1993, **25**, 717-719.
 19. **Omura, T. and Sato, R.** The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 1964, **239**, 2370-2377.
 20. **Keller, J. N., Kindy, M. S., Holtsberg, F. W., St Clair, D. K., Yen, H. C., Germeyer, A., Steiner, S. M., Bruce-Keller, A. J. and Hutchins, J. B.** Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *J. Neurosci.* 1998, **18**, 687-697.
 21. **Lake, B. G.** Preparation and characterization of microsomal fractions for studies of xenobiotic metabolism. In Snell, K and Mullock, B. (ed). *Biochemical toxicology. A practice approach.* pp. 200-201, Oxford IRL Press, 1987.
 22. **Wills, E. D.** Lipid peroxide formation in microsomes. *Biochem. J.* 1969, **113**, 333-341.
 23. **Nash, T.** The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Handzsch reaction. *Biochem. J.* 1953, **55**, 416-421.
 24. **Watanabe, M., Tanaka, M., Tateishi, T., Nakura, H., Kumai, T. and Kobayashi, S.** Effects of the estrous cycle and the gender difference on hepatic drug metabolizing enzyme activities. *Pharmacol. Res.* 1997, **35**, 477-480.