

# **Anti-ageing Effects of Cysteine-containing Peptides Derived from Milk Whey Protein**

**Steffi Dudek and David C. Clark**

---

DMV International, P.O.Box 13, 5460 BA Veghel,  
The Netherlands



# Anti-ageing Effects of Cysteine-containing Peptides Derived from Milk Whey Protein

Steffi Dudek and David C. Clark

DMV International, P.O.Box 13, 5460 BA Veghel,  
The Netherlands

## Abstract

The trend towards ageing populations has been observed over many years in Europe and the US but has accelerated significantly in developed countries in Asia including Japan and South Korea. In the latter country the elderly population (65+) has increased 5-fold between 1960 and 2000 and this group will comprise 40% of the population by 2050. This creates a new socio-economic group with specific demands and considerable spending power. As ageing occurs a range of changes occur in the body that can be moderated by adjustments in nutrition. A significant body of evidence points to changes in the balance of glutathione synthesis and utilisation as people age. Glutathione is the most important natural anti-oxidant of the body and the amounts present can become limited by available cysteine in the diet. A cysteine-enriched peptide product, Cysteine Peption™ has been developed by DMV International for dietary supplement and food applications. A qualitative consumer trial has indicated benefits including improved sleep and more energy. Animal and clinical trials will be described that provide indications on bioavailability and possible mechanisms of action of Cysteine Peption™ with particular focus on the ageing population.

## Introduction

The ageing of populations is a common trend in Europe, US and developed Asian countries. A combination of factors including economic development, industrialisation, decreasing birth rates and increased life expectancy due to improved nutrition and medical care have all contributed to this trend. Between 1960 and 2000 the population of South Korea has approximately doubled to 47 million. In this period, the elderly population (65+ years) has increased almost five-fold to 3.4 million [1]. Consequently, the proportion of elderly people in

---

Contact details : [steffi.dudek@dmv-international.com](mailto:steffi.dudek@dmv-international.com); [david.clark@dmv-international.com](mailto:david.clark@dmv-international.com); Tel:  
+31 413 372222

the total population has increased from 2.9% to 7.2%. The growth in the elderly community in South Korea is still accelerating. The proportion of population aged 60+ increased from 10.4% in 1998 to 12.3% in 2003 (Euromonitor). For comparison, in France it took 114 years for the percentage elderly to grow from 7% to 14% of the total population. On the other hand in Japan it took only 24 years. Recent estimates suggest that in South Korea it will take a shocking short 19 years, which would make it the fastest ageing country in the world. Further projections show that by 2050 40% of the population of South Korea will be over 65 years old (CSR Asia Weekly) and would surpass Japan as the most aged society in the world. These changes in population demographics are also accompanied by social changes. More and more elderly South Koreans are not living with their children but are choosing to live independently in retirement communities and have created a so called 'silver industry' of affluent silver-haired consumers with considerable disposable income. A study published by the Samsung Economic Research Institute forecasted that the silver industry was worth 27 trillion won in 2005 compared to 17 trillion won in 2000.

Ageing is characterized by a generalized impairment of physiological functions, which results in a decrease in ability to respond to a wide range of stress, an increased risk of development of age-associated diseases and an increased likelihood of death [2]. The risk of development of cardiovascular and heart diseases as well as cancer increases with age. Cellular senescence (impairment of the ability to proliferate) accompanies the ageing process, and very old individuals may develop muscular atrophy and muscle wasting.

A shift in the thiol/disulphide redox status (REDST) of the intracellular glutathione pool and the plasma cyst(e)ine and albumin pools, accompanied with a decrease in plasma thiol concentration has been found to be associated with ageing [3]. The reasons for this shift are very complex, but there is increasing evidence that a downward spiral exists which encompasses lower insulin responsiveness, leading to reduction in muscular protein synthesis, which in turn lowers the muscular cysteine clearance. Free cysteine is oxidized in the blood - resulting in the formation of reactive oxygen species (ROS). This depletion of plasma cysteine reduces the intracellular availability of sulphur containing amino acids to the tissues as its uptake by most cells is in the cysteine form. The oxidative shift in the thiol REDST leads to a dysregulation of redox-mediated signaling, which amongst other consequences affects insulin sensitivity, but also the regulation of the serum albumin synthesis and the oxygen transport capacity of the blood [3]. This in turn compromises muscular protein synthesis leading to a lower clearance accompanied with a higher plasma cysteine oxidation - and so forth.

When considering supportive nutrition for healthy ageing, it is logical to either improve cysteine availability and/or to re-establish the thiol REDST associated with younger ages. These simple supports are not as trivial as they sound, because increasing the concentration of available free cysteine has to take into account that it must not lead to further depletion of the thiol-related redox-status.

Indeed, evidence exists that the administration of N-acetylcysteine (NAC) or other cysteine precursors diminished the symptoms of age-associated diseases in animals, and also showed promise in human clinical trials with cancer or HIV patients [4]. NAC is normally used for the treatment of a number of respiratory diseases and as a remedy after acetaminophen overdosing. However, high doses of NAC were also shown to act as pro-oxidant in healthy subjects [5].

Free cysteine is toxic and auto-oxidizes rapidly in the plasma, producing potentially toxic reactive oxygen species (ROS), especially in the presence of iron [6]. To avoid the intracellular toxicity of free cysteine, almost all of the non-protein cysteine is stored as glutathione (GSH). GSH is the major sulphhydryl-containing compound in cells.

Glutathione is a tripeptide ( $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl-glycine) which is synthesized in all cells. GSH cannot be taken up directly by most cells and needs to be degraded before membrane trafficking of the constituent amino acids. The limiting amino acid cysteine originates either from GSH itself, from dietary proteins or from methionine, which may be transformed into cysteine in the trans-sulphuration pathway. The GSH concentration in the liver is 5-10 mM [7], whilst in the plasma the GSH content is about 2  $\mu$ M [8]. The cellular cysteine concentration is much lower than the  $K_m$  values for the rate-limiting enzyme for the GSH synthesis,  $\gamma$ -glutamyl-cysteine synthetase. Therefore, already a moderate increase in intracellular cysteine is assumed to promote increased GSH synthesis [7].

Theoretically, the reducing capacity of the redox couple GSH/GSSG increases with the total GSH concentration [9]. This fact underlines the impact of the oxidative shift in the GSH-related REDST associated with the depletion of the absolute GSH concentration in elder subjects on their oxidative stress resistance. In other words, a preventive approach should both improve the redox status and increase the intracellular concentration of the redox buffers like GSH.

The liver is by far the organ with the highest synthetic capacity for GSH and manages most part of the intra-organ exchange of GSH [10]. About 34 % of the blood passes through the intestinal system and the liver. The blood derived from the small intestine has to pass through the liver before it delivers its nutrients to the other parts of the body. In contrast to most other cell types, the liver is also able to absorb cystine, also referred to as cysteine disulfide, the oxidized form of cysteine. This fact may explain the pre-eminent role of the liver as a target organ for nutritional interventions in order to increase the systemic cysteine availability. It also points to the fact that liver dysfunction, either by infection, alcohol or other toxic damage, or as a consequence of adiposity, may disturb the systemic availability of cysteine and GSH as well as their redox status.

Glutathione is not only the store for systemic cysteine, but fulfills the following roles :

- The body's most abundant antioxidant and radical scavenger.
- A ligand for electrophiles in the liver detoxification system.  
Conjugation with GSH lowers the toxicity of xenobiotics and facilitates their excretion, but results in a net loss of GSH from the system.
- The major thiol-disulfide redox buffer. In this role, GSH modulates biological processes like *signal transduction*, e.g. those involved in the insulin responsiveness [11]; affects the *cell cycle regulation*, which has e.g. an impact on wound healing and repair [12] and is involved in the regulation of the *immune activity*.

Broad evidence exists showing that GSH is depleted in pathological states like cancer, HIV, hepatitis or diabetes [13, 14]. Inflammatory states like in arthritis induce oxidative stress which induce an oxidative shift of the GSH related REDST. Increasing amounts of prescribed medications for elder people, e.g. pain relievers, exert an additional exogenous stress factor on the GSH pool due to excretion losses after biotransformation of the drugs.

## Development of Cysteine Peption™ for healthy ageing

In order to provide a safe cysteine source for conversion by the body into glutathione by the body, DMV International developed Cysteine Peption™. This is a milk derived protein hydrolysate contains the highest cysteine concentration among available food proteins (6.5 % on protein). We hypothesize that Cysteine Peption™ would be an ideal nutritional supplement for “successful ageing”-products because :

- The high cysteine content allows a convenient cysteine supply without a high additional protein load.
- Cysteine Peption™ is transformed into glutathione in the liver, the physiological cysteine storage form. The benefits for elderly subjects are obvious: increased GSH synthesis will increase the systemic cysteine availability and at the same time improve GSH dependent functions, like detoxification.
- Cysteine Peption™ is safe. More than 90 % of the cysteine exists as cysteine disulfide, thus Cysteine Peption™ doesn't exert an inherent pro-oxidant potential or toxicity. Since the synthesis of glutathione is feed back regulated, an overdose of cysteine or over-synthesis of GSH is not possible.
- Easily digestible proteins have shown benefits to counteract age-associated protein loss in elder subjects [15]. Cysteine Peption™, a protein hydrolysate, perfectly matches the characteristics of an easily digestible protein source.
- Cysteine Peption™ is applicable in different consumer product™ types, from pills and clinical

formula to functional food products. It is therefore a very adaptable ingredient to design a whole range of different consumer products that meet the special needs of the elderly.

## Animal data

The objective of our animal trials was to establish a link between Cysteine Peption™ consumption and liver glutathione levels and to assess whether there was evidence that Cysteine Peption™ provided any form of protection to the liver against toxic and oxidative damage.

Rats were fed for 14 days with a standard diet containing 20% casein protein in which the protein was partially replaced by Cysteine Peption™ or N-acetyl cysteine (NAC). The latter is used as a antidote against acetaminophen poisoning. The concentration of -SH in the liver was assessed for animals receiving different sulphur content in their diet and the results are shown in Fig. 1.

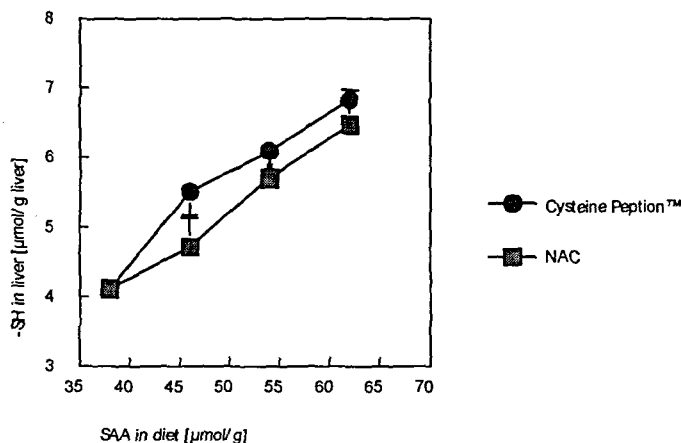


Fig. 1. Liver sulfhydryls [μmol/per gram liver tissue], depending on the concentration sulfur containing amino acids in the diet.

The results show that liver -SH was directly proportional to the Cysteine Peption™ or NAC content of the diet. In a second study, rats were fed a 20% casein or 14% casein plus 6% Cysteine Peption™ diet for 14 days. Six rats from each diet group were tested for liver GSH, immediately before an aminoacetophen (paracetamol) overdose (300mg/kg body weight; approx. 100mg/rat) was administered, at the beginning of a fasting period of 12 hours. Nine rats from each diet group were sacrificed and liver GSH was measured. Subsequently, the remaining 9 rats in each diet group were re-fed and subsequently sacrificed 12 hours later and the GSH was again measured. Histological assessments were made on the livers from the different cohorts with particular attention to the levels of vacuolated and necrotic cells and to

the immune activity in the tissue as shown by the presence or absence of leucocyte clusters.

The experiment showed that increasing amounts of Cysteine Peption™ in the diet increases the glutathione concentration in rat livers up to a certain level but that the increased GSH could not prevent liver damage in rats if high concentrations of acetaminophen (APAP) were administered. However, in the recovery period, the GSH levels in the Cysteine Peption™ group were much higher than in the control group and exceeded the start level significantly. In line with this observation, the histology analysis indicated a better restoration of the tissue integrity in the Cysteine Peption™ group. (Fig. 2)

Our results support the hypothesis that Cysteine Peption™ has the potential to contribute to long term liver prevention and recovery after liver injury. Especially elder people should profit from Cysteine Peption™ because their bodies increasingly lose their ability to respond to toxic stress. Medications or alcohol ingestion, latent inflammations or heavy metal burden further stress the already compromised cysteine and glutathione concentration and their redox status.

The results of these studies provide indications that Cysteine Peption™ can support healthy liver function and contribute to the re-establishment of the cysteine and GSH homeostasis.

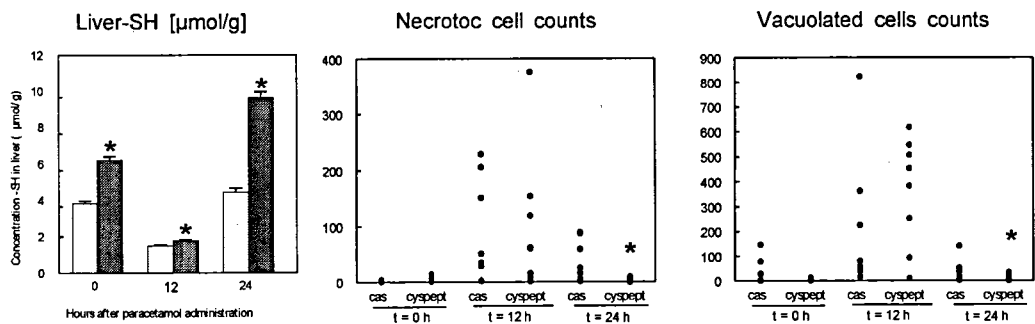


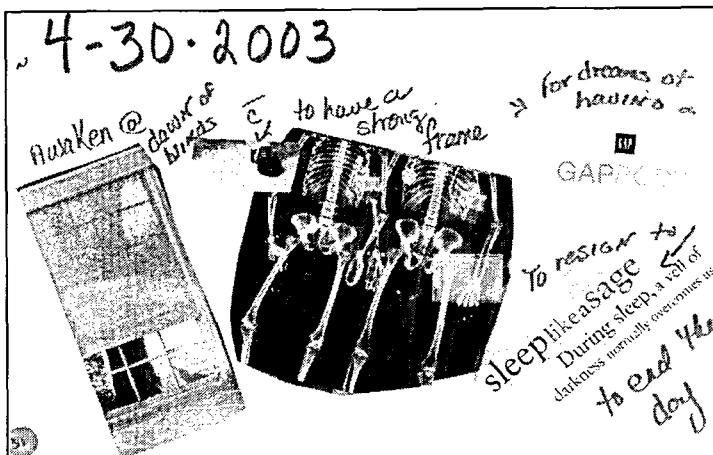
Fig. 2. Toxic challenge of rats with acetaminophen, animals fed with a casein diet or diet enriched with Cysteine Peptide. T = 0, 12 and 24 h after challenge.

### Consumer study

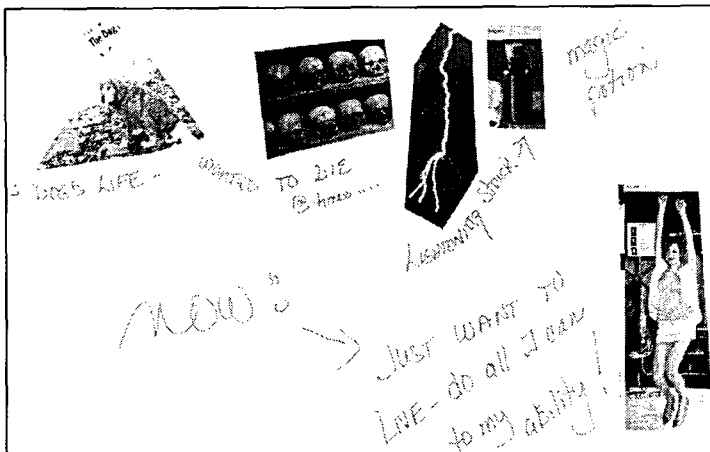
A small-scale qualitative consumer research study was conducted in the US with 13 consumers older than 50 years in order to assess benefits experienced with Cysteine Peption™. Suitable subjects were chosen via a questionnaire in which age was one of the primary selection criteria. In this blind study, consumers took a daily dosage of Cysteine Peption™ of 3.3g per day in tablet form for 4 weeks, equivalent to 200mg of peptide bound cysteine per day. The effects were assessed by comparing their self-reported health and well being before and after taking Cysteine Peption™ through means of collages created with pictures that represented their feelings. An example of pre-use and post use results for a typical subject are shown in Fig. 3 (a and b).



In this blinded study, the subjects only were aware that the product was from a dairy company. In the pre-use, 'ideal health' collage (Fig. 3(a)) the subject apparently assumed the tablets of dairy ingredient would contribute to her having strong bones. She described wanting to wake up at the beginning of the day, her ambition to have a 'GAP BODY' suitable for wearing fashionable clothes and that she wanted to sleep well at the end of the day. In the follow up post use (Fig. 3(b)), she revealed how she really felt about herself and her health. She described about having a 'dog's life' and that sometimes she wanted to die. Lightning struck as a result of the magic potion she had taken (Cysteine Peption) and now she wanted to live and do all she can within her ability. This type of result was typical of those found. In summary, 9 out of 13 consumers reported that they felt more energetic, more motivated, and some reported improved sleeping patterns. The outcome of this consumer study was critical in our decision on design of the subsequent human clinical trial.



Pre-use of Cysteine Peption™



Post-use of Cysteine Peption™

Fig. 3. Consumer study: pre-and post use statements of a 55 years old woman before and after ingestion of Cysteine Peption™ for 4 weeks.

## Human study

Ethanol is a suitable model to study the effects of Cysteine Peption™ in healthy humans. Ethanol metabolism induces toxic and oxidative stress, which results in lipid peroxidation. Lipid peroxidation causes inflammation, and is one of the initial events in the generation of atherosclerotic plaques, which are involved in the development of CVD.

## The metabolism of alcohol

Three routes of ethanol metabolism exist in the human body (Fig. 4).

- The oxidation of alcohol by alcohol dehydrogenase (ADH) in the liver, and, with less relevance, in the stomach. The oxidation product acetaldehyde is very toxic.
- The microsomal cytochrome P450 system (MEOS) especially at higher alcohol concentrations. This route is accompanied with the formation of free radicals and ROS, which contribute to an oxidative shift of the thiol REDST and a depletion of the GSH pool. Lipid peroxidation, DNA and protein damage are typical consequences. Alcohol furthermore induces CYP2E1, which may affect the toxicity of certain drugs like acetaminophen or other hepatotoxic agents [16, 17].
- the oxidation by catalase (minor importance)

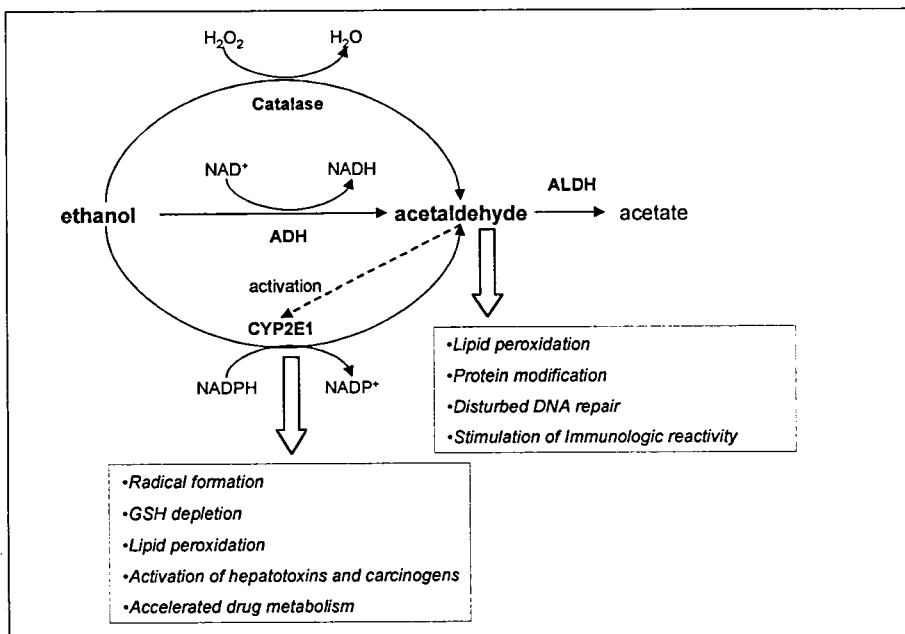


Fig. 4. The main routes of alcohol metabolism.

In a very recent human clinical study, 20 healthy male volunteers received 40 g alcohol and 3.3 g Cysteine Peption™ or 40 g alcohol and 3.3 g placebo for three weeks, respectively. A mix of amino acids, corresponding to the composition of Cysteine Peption™ without cysteine, was used as the placebo. It was shown in previous experiments, that this amount of alcohol specifically induced an increase in urine F2-isoprostanes (F2IP), a product of lipid peroxidation. Lipid peroxidation may initiate tissue damage, which induces inflammation. C-reactive protein (CRP) is a marker for systemic inflammation and an independent predictor of cardiovascular events in healthy individuals. It was our hypothesis that Cysteine Peption™, by supporting liver GSH synthesis, would prevent lipid peroxidation and toxic damage following alcohol ingestion. Since the alcohol ingestion was far below a toxic level, we didn't expect a response in biomarkers of severe damage such as liver enzymes. Urine F2IP and plasma C-reactive protein (hsCRP), were the main parameters of interest.

The preliminary results showed, that the parallel ingestion of Cysteine Peption™ and alcohol led to lower hsCRP levels as compared with the placebo (Fig. 5). It was already known that low alcohol intake may lower the hsCRP values under certain conditions [19]. Apparently, Cysteine Peption™ amplified this effect. CRP responds very sensitively to nutritional interventions and glycaemic load. In our study, the subjects were under diet control, thus a treatment effect is very probable. In the given study configuration, the F2-isoprostanes did not respond to either treatment or placebo, suggesting that the F2IP marker was not sufficiently sensitive to detect an effect of Cysteine peption on lipid peroxidation in this study design. Since the analysis is not yet fully completed, no further interpretation may be given at the moment. More studies are required to understand the effect of Cysteine Peption™ on lipid peroxidation and inflammation in more detail.

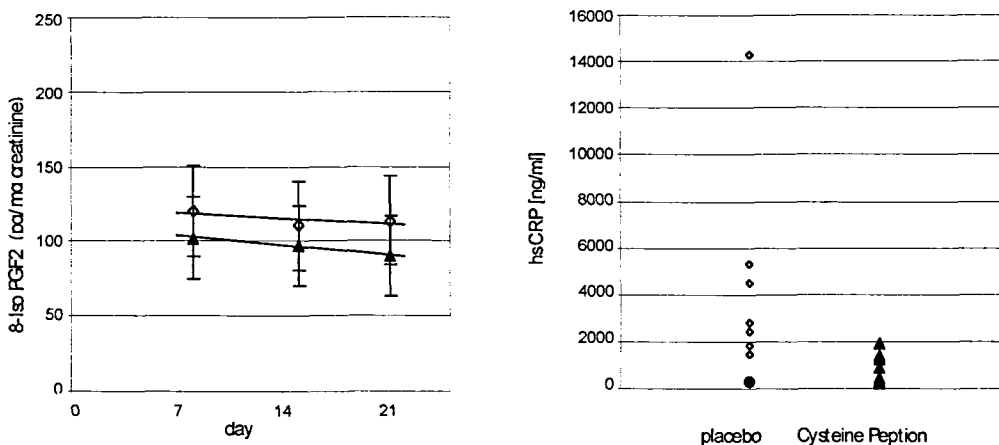


Fig. 5. Human study (20 healthy male subjects, mean BMI 26.9, mean age 43) F2-Isoprostane and hsCRP levels after 3 weeks alcohol ingestion and parallel administration of either placebo or Cysteine Peption™.

## Conclusions

Influencing cysteine availability by nutritional intervention in ageing subjects is not trivial. More studies are needed to investigate the effects of Cysteine Peption™ on cysteine-or GSH dependent physiological functions with emphasis on ageing associated conditions and direct liver support. Nevertheless, the results of a consumer trial were very persuasive and the majority of participants consistently reported benefits. Animal studies have established a link between cysteine intake and liver glutathione levels. Whilst the elevated glutathione levels did not prevent oxidative damage to the liver in a severe challenge test, it did accelerate recovery of the tissue. Very preliminary data suggests a protective role of Cysteine Peption™ in the inflammatory pathways. Further clinical trials are necessary to establish a solid link between detoxification pathways and benefits such as improved sleep and energy levels reported by elderly consumers.

## Acknowledgements

We would like to acknowledge the involvement of Corinne Sprong, NIZO Food Research and Len Roza, TNO, Zeist in the execution of the animal and human clinical trial work associated with this study.

## References

1. Y-H. Park, L.C.P.G.M. de Groot and W. A. van Staveren, WA, Dietary intake and anthropology of Korean elderly people: a literature review. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.*, 12 (3):234-242, 2003.
  2. T. B. Kirkwood. Human senescence. *Bioessays* 18(12):1009-1016, 1996.
  3. W. Droge. Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *Exp. Gerontol.* 37(12):1333-1345, 2002.
  4. V. Hack, R. Breitkreutz, R. Kinscherf, H. Rohrer, P. Bartsch, F. Taut, A. Benner, and W. Droge. The redox state as a correlate of senescence and wasting and as a target for therapeutic intervention. *Blood* 92(1):59-67, 1998.
  5. H. A. Kleinveld, P. N. Demacker and A. F. Stalenhoef. Failure of N-acetylcysteine to reduce low-density lipoprotein oxidizability in healthy subjects. *Eur. J. Clin Pharmacol.* 43 (6):639-642, 1992.
- A. Meister; Strategies for increasing cellular glutathione. In: *Biothiols in Health and Disease*, L. Packer and E. Cadenas (eds.), Marcel Dekker New York, Basel, Honkong 1995, pp. 165-188.

6. S. Park, and J. A. Imlay. High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the Fenton reaction. *J. Bacteriol.* 185 (6):1942-1950, 2003. A. Meister; Strategies for increasing cellular glutathione. In: *Biothiols in Health and Disease*, L. Packer and E. Cadenas (eds.), Marcel Dekker New York, Basel, Honkong 1995, pp. 165-188.
7. D. P. Jones, J. L. Carlson, P. S. Samiec, P. Sternberg, Jr., V. C. Mody, Jr., R. L. Reed, and L. A. Brown. Glutathione measurement in human plasma. Evaluation of sample collection, storage and derivatization conditions for analysis of dansyl derivatives by HPLC. *Clin. Chim. Acta* 275(2):175-184, 1998.
8. F. Q. Schafer, and G. R. Buettner. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* 30 (11):1191-1212, 2001.
9. L. D. DeLeve, and N. Kaplowitz. Importance and regulation of hepatic glutathione. *Semin. Liver Dis.* 10 (4):251-266, 1990.
10. W. Hildebrandt, A. Hamann, H. Krakowski-Roosen, R. Kinscherf, K. Dugi, R. Sauer, S. Lacher, N. Nobel, A. Bodens, V. Bellou, L. Edler, P. Nawroth, and W. Droge. Effect of thiol antioxidant on body fat and insulin reactivity. *J. Mol. Med.* 82(5):336-344, 2004.
- B. P. Mudge, C. Harris, R. R. Gilmont, B. S. Adamson, and R. S. Rees. Role of glutathione redox dysfunction in diabetic wounds. *Wound. Repair Regen.* 10(1):52-58, 2002.
- C. K. Sen. Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *Journal of Nutritional Biochemistry* 8:660-672, 1997.
- D. Darmaun, S. D. Smith, S. Sweeten, B. K. Sager, S. Welch, and N. Mauras. Evidence for accelerated rates of glutathione utilization and glutathione depletion in adolescents with poorly controlled type 1 diabetes. *Diabetes* 54(1):190-196, 2005.
11. M. Dangin, C. Guillet, C. Garcia-Rodenas, P. Gachon, C. Bouteloup Demange, K. Reiffers-Magnani, J. Fauquant, O. Ballevre, and B. Beaufriere. The rate of protein digestion affects protein gain differently during aging in humans. *J. Physiol* 549 (Pt 2):635-644, 2003.
12. C. S. Lieber. Alcohol and the liver: metabolism of alcohol and its role in hepatic and extrahepatic diseases. *Mt. Sinai J. Med.* 67(1):84-94, 2000.
13. Klotz, U.; Ammon, E. Clinical and toxicological consequences of the inductive potential of ethanol. *Eur J Clin Pharmacol.* 1998 Mar; 54(1):7-12.
14. L. J. Roberts, K. P. Moore, W. E. Zackert, J. A. Oates, and J. D. Morrow. Identification of the major urinary metabolite of the F2-isoprostane 8-iso-prostaglandin F2alpha in humans. *J Biol. Chem.* 271 (34):20617-20620, 1996.
15. P. M. Clifton. Diet and C-reactive protein. *Curr. Atheroscler. Rep.* 5 (6):431-436, 2003.

# 유청 유래 시스테인 함유 펩타이드의 항노화효과

Steffi Dudek and David C. Clark

DMV International, P.O.Box 13, 5460 BA Veghel,  
The Netherlands

## 요 약

노인 인구 증가는 유럽과 미국에 걸쳐 몇 년간 관찰되어 왔지만, 일본과 한국과 같은 개발도상국에서도 증가 추세가 현저히 나타나고 있다. 개발도상국에서는 2000년, 65세 이상 노인의 인구 비율이 1960년에 비해 약 5배 정도 증가했으며, 2050년에는 전체 인구의 40% 정도를 차지할 것으로 예상되고 있다. 이런 급격한 인구 변화는 이들이 특정 권리와 구매력을 지니는 새로운 사회경제적 집단으로 성장하게 하는 계기가 되었다. 노화가 일어나면, 식이요법으로 어느 정도 조절할 수 있는 인체의 변화가 다양하게 일어난다. 그 중 대표적인 것은 글루타치온 합성과 이용의 균형에 변화가 생기는 것이다. 글루타치온은 인체에서 가장 중요한 항산화 물질이고, 식이 내 시스테인 아미노산에 의해 체내 함량이 결정될 수 있다. 시스테인이 풍부한 펩티드 제품이 기능성 식품 및 식품원료로 개발되었다. 소비자 조사 결과, 이 제품은 숙면과 활력을 제공하는 등 장점이 있음이 밝혀졌다. 동물 임상 실험 결과를 통해 특별히 노인 인구를 대상으로 하여 시스테인 펩타이드의 생리 활성과 대사 과정을 소개하고자 한다.

## 서 론

인구의 노령화는 유럽과 미국, 선진 아시아 국가에서 나타나는 일반적인 추세이다. 영양섭취 및 의료 서비스가 개선됨에 따라 경제 성장, 산업화, 출산을 저하, 기대수명의 증가 등이 복합적으로 이런 추세에 영향을 미치고 있다. 1960년부터 2000년까지 한국의 총 인구는 약 2배 증가하여 4,700만이 되었다. 이기간 동안 65세 이상 노인 인구는 거의 5배 증가하여 340만 명이 되었다 [1]. 결과적으로 총 인구에 대한 노인 인구의 비율이 2.9%에서 7.2%로 증가했다. 한국의 노인 인구는 여전히 증가 추세에 있다. 60세 이상 노인 인구의 비율은 1998년 10.4%에서 2003년 12.3%로 증가했다. 국가간에 비교를 하자면, 프랑스에서는 노인 인구가 총 인구의 7%에서 14%로 증가를 하는데 약 114년이 걸렸다. 하지만, 일본에서는 단지 24년이 걸렸을 뿐이다. 최근 통계치를 추정하자면, 놀랍게도 한국은 19년이라는 더 짧은 시간이 걸렸을 뿐이어서, 전 세계에서 가장 빠

---

Contact details : [steffi.dudek@dmv-international.com](mailto:steffi.dudek@dmv-international.com); [david.clark@dmv-international.com](mailto:david.clark@dmv-international.com); Tel: +31 413 372222

른 속도로 노령화가 되어가고 있는 국가로 꼽히고 있다. 향후 인구 추세를 연구한 CSR Asia Weekly 에 의하면, 2050년이 되면 65세 이상 인구가 40%에 육박하여 세계에서 가장 노령화된 국가인 일본을 뛰어 넘을 것으로 예상하고 있다. 이런 인구 변화는 또한 사회적인 변화를 초래하였다. 더 많은 한국 노인들이 자녀들과 함께 살지 않고, 퇴직자 집단을 이루어 독립적으로 살거나 충분한 재산을 지니고 있는 부유한 소비자로서 소위 '실버산업' 이라는 용어를 창출해 내기도 했다. 삼성경제연구소의 한 보고서에 의하면, 실버산업은 2000년 1조7,000억 원에 비해 2005년에는 2조 7,000억 원에 이를 것으로 예상하고 있다.

노화는 생리적인 기능이 전반적으로 저하되어 있는 것으로 특징지을 수 있다. 그 결과 광범위한 스트레스에 반응하는 능력이 저하되고, 노화 관련 질환에 걸리거나 사망할 위험성이 높아진다 [2]. 나이가 들어감에 따라 암과 심혈관계 질환, 심장 질환에 걸릴 위험성도 높아진다. 노화의 과정에는 세포의 노화도 포함되는데, 더 이상 세포가 분열할 수 있는 능력이 줄어드는 것과 관련이 있어 고령의 노인들에게 근육의 퇴화 및 약화가 일어날 수 있다.

나이가 들면, 세포 내 글루타치온과 혈장 시스테인 및 알부민 풀의 thiol/disulphide redox status (REDST)의 전환과 더불어 혈장 내 thiol 농도가 감소하게 된다 [3]. 이런 REDST의 전환이 일어나는 원인은 아주 다양하지만, 인슐린 반응이 떨어지면, 근육 내 단백질 합성이 떨어지고, 그 결과 근육 내 시스테인 제거율이 떨어지는 것을 주요 원인으로 보는 경우가 많다. 유리 시스테인 (free cysteine)은 혈액 속에서 산화되어 활성 산소 (ROS, reactive oxygen species)를 형성한다. 혈장 시스테인이 고갈되면, 대부분의 세포가 시스테인의 형태로 아미노산을 받아들이기 때문에 세포 내에서 합합 아미노산이 조직으로 유입되는 활용률을 저하시킬 수 있다. Thiol REDST의 산화상태로의 전환은 산화 환원 중재 신호를 조절하지 못하는 결과를 낳고, 그 결과 인슐린 민감도에 영향을 미칠 뿐만 아니라 혈청 알부민 합성 및 혈액 내 산소 운반 조절에도 영향을 준다 [3]. 이는 반대로 근육 단백질 합성에 영향을 미쳐 혈장 시스테인 제거율을 낮추고, 산화율은 높이는 등 반응이 일어나게 된다.

건강한 노화를 위한 영양보충 시 시스테인 이용율을 높이거나 더 젊었을 때의 상태로 thiol REDST를 회복시키는 것이 논리적이다. 간단한 영양보충을 통해 자유 시스테인의 농도가 올라가면서 thiol과 관련된 산화환원 상태에 영향을 미치지 않아야 한다는 것을 고려해야 하기 때문에 이것이 말처럼 하찮은 것만은 아니다.

실제로 N-acetylcysteine (NAC)나 다른 시스테인 전구체를 섭취했을 때 노화 관련 질환의 증상을 줄일 수 있다는 증거가 있고, 암 또는 인체 면역 결핍 바이러스 감염 환자를 대상으로 한 인체 임상 실험에서도 좋은 결과를 보이고 있다 [4]. NAC는 일반적으로 호흡기계 질환 및 아세트아미노펜 과용으로 인한 부작용의 치료에 사용된다. 하지만, NAC를 과다 복용하는 것은 또한 건강한 대상자들에게 산화물질 전구체로서의 역할을 할 수도 있다 [5].

유리 시스테인은 독성이 있고, 혈장에서 빠르게 자동 산화되어 특히 철분이 있는 경우 활성 산소 (ROS)를 생산할 수 있다 [6]. 유리 시스테인에 의한 세포 내 독성을 피하기 위해 단백질을 구성하지 않는 시스테인은 거의 모두 글루타치온 (GSH)으로 저장된다. GSH는 세포 내 주요 합합 화학물질이다.

글루타치온은 모든 세포에서 합성되는 트리펩티드 ( $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl-glycine)이다. GSH는

세포에 직접 유입될 수 없고, 세포막을 통과하기 이전에 반드시 단위 아미노산의 형태로 분해되어야 한다. 제한 아미노산인 시스테인은 주로 GSH 자체, 식이 단백질 또는 합황 아미노산의 대사 과정에서 유래된 메치오닌에서 유래된다. 간 내 GSH 농도는 5-10 mM [7]이지만, 혈장 내 농도는 2  $\mu$ M [8]이다. 세포 내 시스테인 농도는 반응 속도를 제한하는 GSH 합성효소, 즉  $\gamma$ -glutamyl-cysteine 합성 효소의 Km 값보다 훨씬 낮다. 그러므로, 세포 내 시스테인 농도가 증가하는 것은 이미 GSH 합성량이 늘어났다는 것과 같다고 볼 수 있다 [7].

이론적으로 GSH(환원형글루타치온)/GSSG(산화형글루타치온) redox couple의 환원력은 총 GSH 농도가 높아지면 증가한다 [9]. 이 사실은 노인들에서 절대 GSH 농도가 감소되는 것과 관련하여 GSH 관련 REDST가 산성 상태가 될 수 있고, 결국 산화 스트레스 저항력에 영향을 미칠 수 있다. 다른 의미로는 예방적인 접근은 산화환원 상태를 개선하고, 세포 내에서 GSH와 같은 산화환원 완충제의 농도를 개선하여야 한다.

간은 GSH의 합성 능력이 가장 효과적인 기관이며, 각 기관의 GSH 교환을 조정한다 [10]. 혈액 내 34% 정도가 소화기관 및 간을 통과한다. 소장에서부터 유래한 혈액은 인체 다른 기관으로 영양소를 전달하기 이전에 반드시 간을 거쳐야만 한다. 다른 세포들과 반대로 간은 시스테인 아미노산 두 개가 결합하고, 시스테인의 산화 형태로 일컫는 시스틴(cystine)을 흡수할 수 있다. 이런 사실은 시스테인 이용률을 증가시키기 위해 간이 영양중재를 위한 주요 기관이 되어야 한다는 것을 의미한다. 이는 또한 감염, 알코올 또는 다른 독성 물질로 인한 간 기능 손상 내지는 지방간 등은 산화 환원 상태의 균형 및 GSH와 시스테인의 활용률에 좋지 않은 영향을 미칠 수 있다는 것을 의미한다.

글루타치온은 시스테인의 저장으로서 뿐만 아니라 다음의 역할을 수행할 수 있다.

- 인체에서 가장 풍부한 항산화 역할 및 독성물질 제거
- 간의 해독 체계에 있어서 호전자성 물질(electrophile)의 ligand. GSH와 결합하면 생체 이물질들의 독성을 줄여주고 이를 배출시키지만, 결국 조직에서의 GSH 농도는 낮아지게 된다.
- 주요 thiol - disulfide 산화 환원 완충제의 역할. 이 역할에서 GSH는 신호체계의 변화 등 인슐린 반응과 같은 생물학적 과정 [11], 상처 회복 및 복원과 관련된 세포주기 조절 [12], 면역 작용의 조절 등 [12]와 관련되어 있다.

다양한 증거들을 통해 병리적으로 암, 인체 면역결핍 바이러스, 감염, 또는 당뇨병에서 GSH가 쉽게 고갈된다는 것을 보여주고 있다 [13, 14]. 관절염과 같은 염증 상태에서는 GSH관련 REDST가 산화 상태에 머물도록 유도하는 산화 스트레스를 유발한다. 노인들을 위해 처방되는 약물들, 예를 들어 진통제를 다량 복용하면, 약물이 생체로 흡수된 이후에 과량의 GSH가 배출되기 때문에 GSH 풀 자체에 영향을 미치는 외부적인 요인이 될 수 있다.

## 건강한 노인을 위한 Cysteine Peptide의 개발

인체에서 안전하게 시스테인 아미노산이 글루타치온으로 전환되게 하기 위해서 DMV International에서는 Cysteine Pepton™을 개발했다. 이는 우유 유래 단백질 가수분해물로서 식품



유래 단백질로서는 가장 시스테인 함량이 높다(단백질의 6.5%). Cysteine Peption™가 성공적인 노화를 위해 중요한 영양공급원이 될 것이라는 것을 아래와 같은 근거로 가정했다.

- 시스테인 함량이 높아 추가의 단백질 공급이 없이도 시스테인을 안정적으로 공급할 수 있다.
- Cysteine Peption™은 간에서 생리적 시스테인 저장 형태인 글루타치온으로 전환된다. 노인들에게 미칠 장점은 아주 명확하다. 즉, GSH 합성이 증가하면 체내 유용 시스테인의 양이 증가하고, 동시에 해독 작용과 같은 GSH 관련 기능이 개선된다.
- Cysteine Peption™은 안전하다. 총 시스테인의 90% 이상이 시스테인 이중 황결합 형태로 존재한다. 그러므로 Cysteine Peption™는 산화물질 전구체 내지는 독성을 나타내지는 않는다. 글루타치온의 합성은 피드백에 의해 조절되기 때문에 시스테인이 과량 존재하거나 GSH를 과량 합성한다는 것은 있을 수 없는 일이다.
- 쉽게 소화되는 단백질로서 노인성 단백질 손실을 보완해 줄 수 있는 장점이 있다 [15]. Cysteine Peption™은 단백질 가수분해물로서 쉽게 소화되는 단백질 급원으로서 손색이 없다.
- Cysteine Peption™은 알약 및 임상 조제식에서부터 기능성 식품 소재까지 소비자를 위한 다양한 제품에 적용할 수 있다. 그러므로 특히 노인 소비자들을 위한 다양한 제품 적용에 잘 수용할 수 있는 식품 첨가물이라 하겠다.

### 동물실험결과

동물실험의 목적은 Cysteine Peption™ 섭취와 간 내 글루타치온 농도간의 상관성을 입증하고, Cysteine Peption™이 간을 독성이나 산화 손상으로부터 보호할 수 있는지를 평가하고자 하였다.

실험 쥐에게 14일간 부분적으로 Cysteine Peption™ 또는 N-acetyl cysteine (NAC)을 첨가한 20%의 카제인 단백질이 함유되어 있는 식이를 공급했다. NAC가 포함된 식이는 아세트아미노펜을 해독하는 목적으로 사용되어 왔다. 식이 내 다양한 항 함유량에 따라 간 내 -SH 농도를 측정했으며, 결과는 그림 1에 나타내었다.

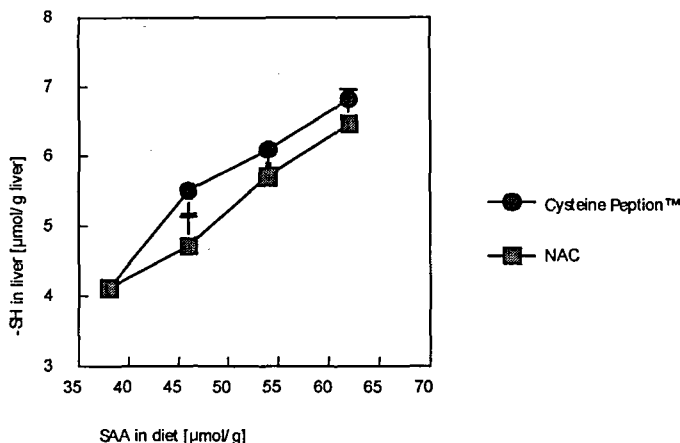


그림 1. 식이 내 함황 아미노산 함량에 따른 간 내 -SH 농도 [μmol/per gram liver tissue].

연구 결과 간 내 -SH의 농도는 직접적으로 식이 내 Cysteine Peption™ 또는 NAC의 함량에 비례했다.

두 번째 연구에서 실험 동물들은 20% 카제인 또는 14%의 카제인에 6% Cysteine Peption™를 혼합한 식이를 14일간 섭취한 후 결과를 관찰하였다. 아세트아미노펜 (paracetamol)을 과다 투여 (300mg/kg body weight; approx. 100mg/rat)하기 바로 직전, 12시간 공복 후 각 식이 섭취 그룹에서 6마리씩 취하여 간 내 GSH 농도를 측정했다. 각 식이 섭취 그룹에서 9마리씩 살처분하여 간 내 GSH 농도를 측정했다. 남은 9마리의 실험쥐에게 다시 해당 식이를 섭취하도록 하고 12시간 후 다시 살처분하여 GSH 농도를 측정했다. 간 조직 검사를 통해 소강세포 및 괴사세포가 있는지 여부를 확인하고, 백혈구의 유무에 의한 조직 내 면역 활성화 정도가 있는지를 관찰했다.

실험 결과 Cysteine Peption™의 함유량이 증가함에 따라 실험 쥐들의 간 내 글루타치온이 특정 농도까지 올라갔지만, GSH의 농도가 증가해도 아세트아미노펜을 투여하면 실험쥐들의 간 손상을 예방할 수 없었다. 하지만, 회복기에는 Cysteine Peption™을 섭취한 그룹에서 GSH 농도가 다른 그룹보다 높고, 초기 값이 유의하게 높았다. 이런 관찰 결과와 더불어 조직 검사에서 Cysteine Peption™ 섭취 군에서 조직의 회복도가 높았음을 알 수 있었다(그림 2).

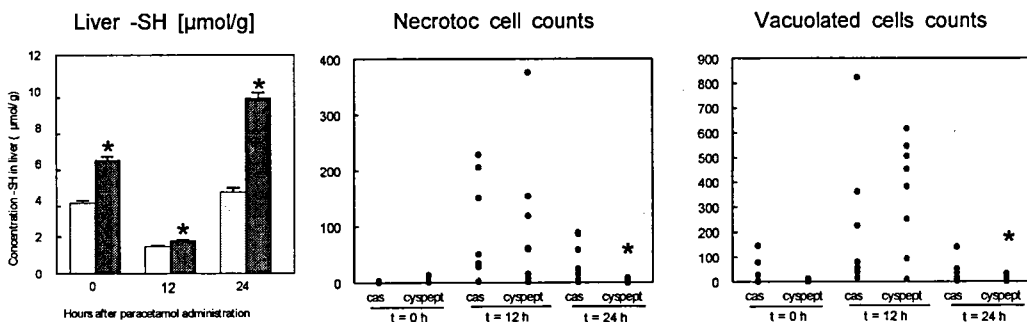


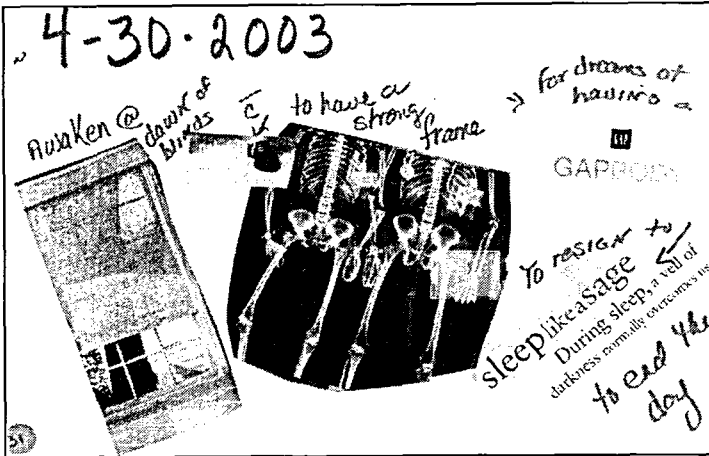
그림 2. 시스테인 펩티드를 보충한 카제인 식이를 섭취한 실험동물을 대상 아세트아미노펜으로 독성실험 결과 T=0, 12 and 24 h after challenge.

결과는 Cysteine Peption™가 장기적으로 간 보호뿐만 아니라 손상된 간을 회복시키는 역할을 할 수 있다는 가설을 뒷받침해 주고 있다. 특히 노인의 경우 신체가 독소 스트레스에 반응하는 능력이 떨어지기 때문에 Cysteine Peption™를 섭취하면 좋은 효과를 볼 수 있다. 약물복용 내지는 알코올 섭취, 염증 반응의 완화 또는 중금속 등은 기존의 시스테인 농도 변화 및 글루타치온, 산화 환원 불균형 등으로 인한 스트레스를 더욱 가중시킬 수 있다.

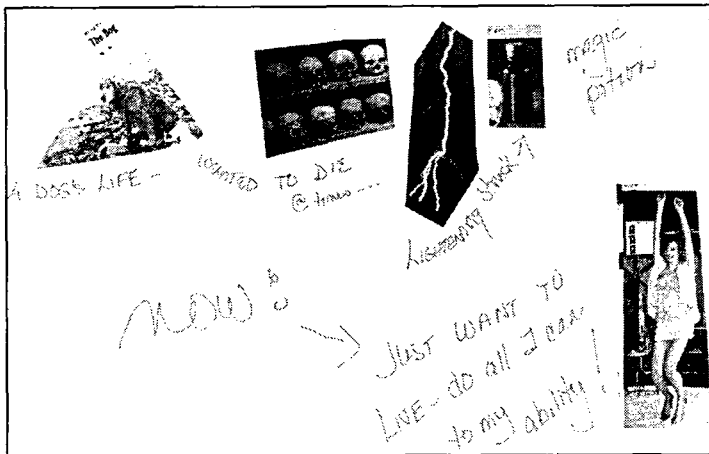
이 동물 연구의 결과, Cysteine Peption™은 건강한 간 기능을 유지시키고, 시스테인 GSH 항상성 회복을 도울 수 있는 것으로 나타났다.

소비자 연구

미국에서 50세 이상 노인 13명을 대상으로 Cysteine Peption™를 섭취한 후 효과를 평가하기 위해 작은 규모이지만 잘 계획된 소비자 연구를 실시했다. 연령이 가장 주요한 판단 기준인 질문을 통해 가장 적절한 대상자를 선택했다. 이 맹검 연구(blind study)에서 소비자들은 하루 3회 3.3 g의 Cysteine Peption™, 즉 시스테인 200 mg을 4주간 섭취했다. 그 효과는 자가 건강 진단 보고 결과를 바탕으로 평가했고, 대학에서 개발하여 감정을 그림으로 표현하는 방법으로 Cysteine Peption™을 섭취하기 전과 후를 비교했다. 예를 들어 섭취 전 후의 결과를 그림 3(a와 b)에 나타내었다.



Cysteine Peption™ 섭취 전



Cysteine Peption™ 섭취 후

그림 3. 소비자 연구: 4주간 Cysteine Peption™을 섭취하기 전과 후 55세 여성 대상자의 진술 결과.

이 맹검 연구에서 대상자들은 이 제품이 단지 유제품 회사에서 만든 것으로만 알고 있었다. 해당 식이 섭취 이전에 조사한 바에 의하면, 대상자들은 우유 원료로 만든 이 제품이 골격을 튼튼

하게 해 줄 것으로 기대를 하고 있다 (그림 3(a)). 이 대상자는 또한 아침에 일찍 일어나길 바라고, 멋진 옷을 입을 수 있기를 기대했으며, 밤에는 잠을 잘 이루기를 바랐다. 하지만, 제품을 섭취한 후 조사한 결과에 의하면 (그림 3(b)), 실제 대상자가 본인에 대해 느끼고, 건강이 어떻게 좋아졌는지 여부를 알 수 있다. 이 대상자는 예전의 삶이 마치 “개의 삶”과 같았고, 죽고 싶은 생각도 많이 들었었다. 하지만, 번개처럼 마술같은 Cysteine Peption™을 먹고 나니 지금은 살고 싶은 의지가 생기고, 스스로 할 수 있는 것들을 스스로 하게 되었다. 이런 결과는 대부분 대상자들에게 유사하게 나타났다. 총 13명의 대상자 중 9명이 더 활력을 느끼고, 동기부여를 받았으며, 몇몇은 수면패턴이 향상되었다고 보고했다. 이 소비자 연구 결과를 통해 인체 임상 실험을 구성할 수 있는 결정을 내릴 수 있었다.

## 인체 연구

건강한 사람을 대상으로 Cysteine Peption™의 효과를 연구하려면, 에탄올을 이용하는 것이 가장 좋다. 에탄올 대사는 독성과 산화 스트레스를 일으키고, 결과적으로 지질 과산화이 일어난다. 지질 과산화는 염증을 일으킬 수 있고, 염증은 죽상관상동맥 플라그 생성과, 플라그는 심혈관계 질환의 발생과 밀접한 관련이 있다.

## 알코올 대사

인체에서 에탄올을 대사시키는 데에는 3가지 방법이 있다 (그림 4).

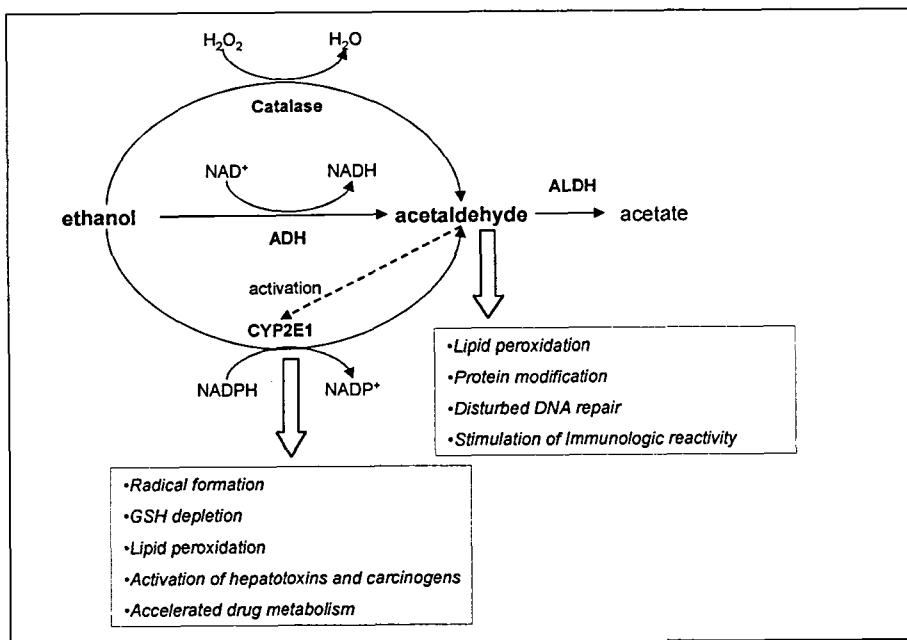


그림 4. 알코올의 주요 대사 과정.

- 알코올은 주로 간에서, 일부는 위에서도 alcohol dehydrogenase (ADH) 효소에 의해 산화가 된다. 이때 생성된 산화물인 아세트알데히드 (acetaldehyde)는 매우 독성이 강하다.
- 세포질 cytochrome P450 시스템 (MEOS)에서는 알코올 농도가 매우 높을 때 대사시키는 과정이다. 이 대사 과정에서 자유 라디칼과 활성산소가 많이 생성되어 thiol REDST가 산화 상태로 전환되고, GSH 풀도 고갈된다. 전형적으로 지질 과산화, 유전자 및 단백질 손상이 일어나게 된다. 알코올은 그 이후 CYP2E1로 전환되는데, 이는 아세트아미노펜 또는 간 손상을 일으키는 약물과 같은 독성을 나타낸다 [16, 17].
- 영향력은 크지 않지만, 카탈라제에 의한 산화 과정이 있다.

최근 인체 임상 실험에서 20명의 건강한 남성 자원자들은 40 g의 알코올과 3.3 g의 Cysteine Peption™ 또는 3.3 g의 위약을 3주간 섭취하였다. 위약은 Cysteine Peption™과 시스테인을 제외한 모든 아미노산이 동일하도록 구성했다. 이전에 실시된 연구에서 약 40 g의 알코올을 섭취했을 때 지질 과산화 결과물인 소변 내 F2-isoprostanes (F2IP)가 증가하는 것을 관찰했다. 지질 과산화물은 조직 손상을 일으키는 물질로서 염증을 일으킬 수 있다. C-reactive protein (CRP)는 시스템적 염증의 주요한 지표가 되고, 염증 지표로 많은 관심을 받고 있다.

실험의 일부 결과 Cysteine Peption™과 알코올을 동시에 섭취한 경우 위약을 섭취한 군에 비해 CRP의 농도가 낮음을 관찰할 수 있었다(그림 5). 특정 상황에서는 알코올 섭취량이 적으면 hsCRP의 농도가 낮아진다는 것을 이미 연구된 바 있다 [19]. 이 연구결과, 분명히 Cysteine Peption™은 이 효과를 증폭시킬 수 있었다. CRP는 영양 중재 실험 내지는 당부하 실험에서 매우 민감한 지표로 사용된다. 본 연구에서 대상자들은 식이를 엄격하게 제한하고 있었기 때문에 실험 식이 섭취에 의한 결과라고 볼 수 있겠다. 본 연구 구성에서 소변 내 F2-isoprostanes 농도는 두 그룹간의 차이가 없었다. 이는 본 연구 구성상 Cysteine peption™이 지질 과산화에 미치는

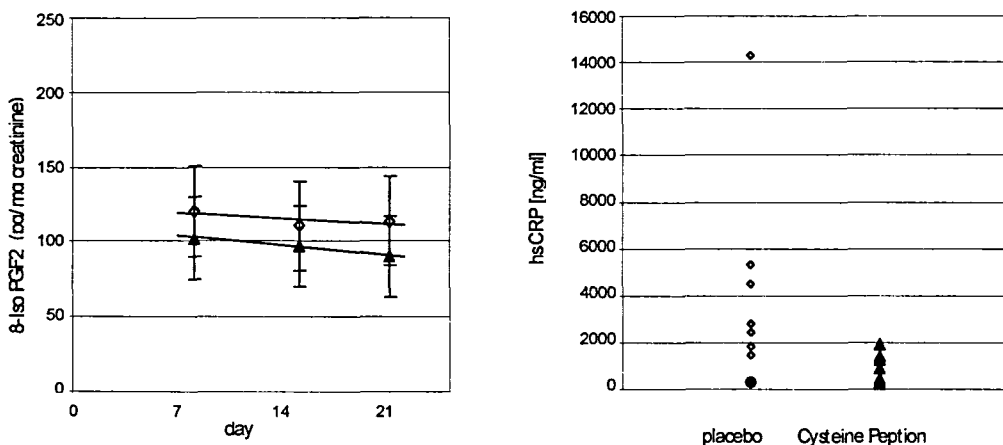


그림 5. 인체실험결과(대상자 20명, 평균 BMI 26.9, 평균 연령 43세) 3주간 알코올과 함께 위약 또는 Cystein Peption™을 섭취한 군의 F2-Isoprostane and hsCRP 농도.

효과를 나타내기에는 F2-isoprostanes지표가 민감하지 못함을 의미한다. 아직 분석해야 할 항목이 남아있기 때문에 더 이상 결과에 대한 고찰을 하기에는 한계가 있다. 더 많은 연구를 통해 Cysteine peption™이 지질 과산화 및 염증에 어떤 효과가 있는지 면밀히 연구해야 할 필요가 있겠다.

## 결 론

노인 대상자들에서 영양 중재에 의한 시스테인의 유용성에 미치는 영향력은 극히 미미하다. 더 많은 연구를 통해 노화의 상태 및 직접적인 간 보호 기능에 초점을 맞추어 Cysteine Peption™이 시스테인 또는 GSH 관련 생리기능에 미치는 영향을 연구해야 할 필요가 있다. 그럼에도 불구하고, 소비자 연구에서 매우 설득력 있는 결과가 나타나고, 대상자 대부분이 거의 대부분 효과를 본 것으로 나타났다. 동물 실험에서는 시스테인 섭취와 간 내 글루타치온 농도간의 상관성이 있음을 입증했다. 비록 영양소 과부하 실험에서 글루타치온 농도가 높다고 해서 산화 손상을 예방할 수 있다고 단정지을 수는 없지만, 조직의 회복 정도를 빠르게 할 수는 있다. 실험의 일부 결과에서 Cysteine Peption™이 염증 기전에 예방 효과가 있음을 어느 정도 알 수 있었다. 앞으로 더 면밀한 임상 실험을 통해 해독 기전과 노인 대상자들의 수면패턴 향상 및 활력에 미치는 밀접한 관련성을 밝혀야 할 것이다.

## 감사의 글

본 연구에서 소개한 동물 실험과 인체 임상 연구 수행에 힘써 주신 NIZO Food Research의 Corinne Sprong과 TNO, Zeist의 Len Roza님께 진심으로 감사 드립니다.

## 참고문헌

1. Y-H. Park, L.C.P.G.M. de Groot and W. A. van Staveren, WA, Dietary intake and anthropology of Korean elderly people: a literature review. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.*, 12 (3):234-242, 2003.
2. T. B. Kirkwood. Human senescence. *Bioessays* 18(12):1009-1016, 1996.
3. W. Droge. Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *Exp. Gerontol.* 37(12):1333-1345, 2002.
4. V. Hack, R. Breitkreutz, R. Kinscherf, H. Rohrer, P. Bartsch, F. Taut, A. Benner and W. Droge. The redox state as a correlate of senescence and wasting and as a target for therapeutic intervention. *Blood* 92(1):59-67, 1998.
5. H. A. Kleinveld, P. N. Demacker and A. F. Stalenhoef. Failure of N-acetylcysteine to reduce low-density lipoprotein oxidizability in healthy subjects. *Eur. J. Clin Pharmacol.* 43 (6):639-642, 1992.

- A. Meister; Strategies for increasing cellular glutathione. In: *Biothiols in Health and Disease*, L. Packer and E. Cadenas (eds.), Marcel Dekker New York, Basel, Honkong 1995, pp. 165-188.
6. S. Park and J. A. Imlay. High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the Fenton reaction. *J. Bacteriol.* 185 (6):1942-1950, 2003. A. Meister; Strategies for increasing cellular glutathione. In: *Biothiols in Health and Disease*, L. Packer and E. Cadenas (eds.), Marcel Dekker New York, Basel, Honkong 1995, pp. 165-188.
7. D. P. Jones, J. L. Carlson, P. S. Samiec, P. Sternberg, Jr., V. C. Mody, Jr., R. L. Reed, and L. A. Brown. Glutathione measurement in human plasma. Evaluation of sample collection, storage and derivatization conditions for analysis of dansyl derivatives by HPLC. *Clin. Chim. Acta* 275(2):175-184, 1998.
8. F. Q. Schafer, and G. R. Buettner. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* 30 (11):1191-1212, 2001.
9. L. D. DeLeve, and N. Kaplowitz. Importance and regulation of hepatic glutathione. *Semin. Liver Dis.* 10 (4):251-266, 1990.
10. W. Hildebrandt, A. Hamann, H. Krakowski-Roosen, R. Kinscherf, K. Dugi, R. Sauer, S. Lacher, N. Nobel, A. Bodens, V. Bellou, L. Edler, P. Nawroth, and W. Droge. Effect of thiol antioxidant on body fat and insulin reactivity. *J. Mol. Med.* 82(5):336-344, 2004.
- B. P. Mudge, C. Harris, R. R. Gilmont, B. S. Adamson, and R. S. Rees. Role of glutathione redox dysfunction in diabetic wounds. *Wound. Repair Regen.* 10(1):52-58, 2002.
- C. K. Sen. Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *Journal of Nutritional Biochemistry* 8:660-672, 1997.
- D. Darmaun, S. D. Smith, S. Sweeten, B. K. Sager, S. Welch, and N. Mauras. Evidence for accelerated rates of glutathione utilization and glutathione depletion in adolescents with poorly controlled type 1 diabetes. *Diabetes* 54(1):190-196, 2005.
11. M. Dangin, C. Guillet, C. Garcia-Rodenas, P. Gachon, C. Bouteloup Demange, K. Reiffers-Magnani, J. Fauquant, O. Balleve, and B. Beaufriere. The rate of protein digestion affects protein gain differently during aging in humans. *J. Physiol* 549 (Pt 2):635-644, 2003.
12. C. S. Lieber. Alcohol and the liver: metabolism of alcohol and its role in hepatic and extrahepatic diseases. *Mt. Sinai J. Med.* 67(1):84-94, 2000.
13. Klotz, U.; Ammon, E. Clinical and toxicological consequences of the inductive potential of ethanol. *Eur J Clin Pharmacol.* 1998 Mar; 54(1):7-12.
14. L. J. Roberts, K. P. Moore, W. E. Zackert, J. A. Oates, and J. D. Morrow. Identification of the major urinary metabolite of the F2-isoprostane 8-iso-prostaglandin F2alpha in humans. *J Biol. Chem.* 271 (34):20617-20620, 1996.
15. P. M. Clifton. Diet and C-reactive protein. *Curr. Atheroscler. Rep.* 5 (6):431-436, 2003.