

## Streptozotocin에 의한 랫드 적혈구 손상에 관한 연구

호지숙 · 문창규 · 정진호

서울대학교 약학대학

### TOXICITY OF STREPTOZOTOCIN TO RED BLOOD CELLS IN THE RAT

Ji-Sook Ho, Chang-Kiu Moon and Jin-Ho Chung

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea

(Received March 20, 1992)

(Accepted June 10, 1992)

**ABSTRACT:** Streptozotocin (STZ) is a naturally occurring nitrosoamide used extensively to produce diabetes in experimental animals. Since streptozotocin reportedly decreases deformability of red blood cells (RBC), we sought to investigate its potential toxicity at RBC. In addition to elevation blood glucose, 100 mg/kg iv streptozotocin caused significant RBC hemolysis in female Sprague-Dawley at 48 hrs post treatment. Streptozotocin induced hemolysis was found to be dose and time-dependent; complete hemolysis required a relatively high streptozotocin concentration (500 mM, 4 hrs incubation), which is much more than in vivo dose. This discrepancy between in vivo and in vitro results apparently was not due to the in vivo streptozotocin-induced hyperglycemia, since incubation with streptozotocin under in vitro hyperglycemic conditions (up to 50 mM glucose) failed to demonstrate potentiated hemolysis. RBCs from male SD rats demonstrate a hemolytic response to streptozotocin similar to those of female rats. These results suggest that: 1) RBC hemolysis is induced by streptozotocin treatment, 2) streptozotocin-induced hyperglycemia does not potentiate RBC hemolysis.

**Key words:** Streptozotocin, Red blood cells, Hemolysis, Hyperglycemia

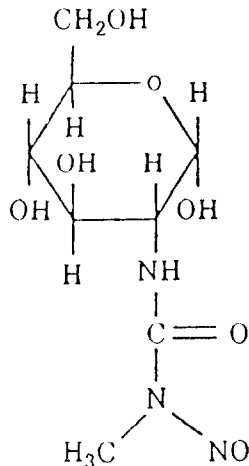
## 서 론

Streptozotocin은 *Streptomyces achromogenes*, variety 128의 fermentation broth에서 분리된 1-methyl-1-nitrosourea의 2-deoxy-D-glucose 유도체로서, 광범위 항균제이며 항암성, 돌연변이원성, 당뇨유발성을 가지는 물질이다(Weiss, 1982). Streptozotocin은 췌장의 베타 세포에 대한 특이적인 독성때문에(Bolaffi *et al.*, 1986) islet cell tumors, pancreatic ductal adenocarcinoma 등에 대한 항암제로 사용되고 있으며, 1963년 랫드와 개에서 당뇨병을 유발한다고 보고된 이래, 실험동물에서 당뇨병을 유도하기 위한 약물로도 널리 사용되고 있다(Junod *et al.*, 1967).

Streptozotocin의 구조는 한편에 포도당 분자가 있고 다른 편에는 methyl이 있는 nitrosourea 화합물로서(Fig. 1), deoxyglucose moiety로 인해 포도당 수용체를 통한 세포내 흡수가 쉽게 일어나며, methyl nitroso moiety가 췌장세포의 독성을 매개하는 것으로 알려져 있다(Thomas *et al.*, 1989, Agius *et al.*, 1985). 즉, streptozotocin은 세포내에서 alkylation 및 radical attack 등을 통한 DNA 손상을 일으켜 repair enzyme 인 poly(ADP-ribose) polymerase의 활성을 증가시키기 때문에 세포내의 NAD<sup>+</sup> 함량을 낮추며(Sandler *et al.*, Fram *et al.*, 1989, LeDoux *et al.*, 1988), 또한 superoxide dismutase 활성을 현저히 감소시킨다(Papaccio *et al.*, 1986).

Isotope-labeled streptozotocin을 사용한 랫드의 체내 분포 상태에 관한 보고에 따르면 간과 신장에서의 농도가 췌장에서보다 각각 8-9배, 3-4배 가량 높게 나타났다(Bhuyan *et al.*, 1974, Karunanayake *et al.*, 1974, 1975). 그럼에도 불구하고 췌장에 대하여 특이적 독성이 나타나는 것은, 췌장 베타 세포가 혈중의 포도당농도를 민감하게 인지하여 인슐린을 분비하는 세포이므로 streptozotocin의 흡수가 빠르고, 다른 세포에 비하여 radical attack에 대한 보호기전, 즉 catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione 등이 작기 때문으로 알려져 있다(Wohaieb *et al.*, 1987, Takasu *et al.*, 1991, Nukatsua *et al.*, 1988). 따라서 췌장 베타세포에 대한 독성기전은 DNA 손상과 그로인한 NAD<sup>+</sup> depletion 및 radical attack 등의 oxidative stress로 추정되고 있다(Papaccio *et al.*, 1986). 이처럼 streptozotocin에 의한 췌장 독성에 관한 연구는 많이 되어 왔으나 신체의 8%를 차지하고 각 조직으로의 물질수송 및 배설 등에 관여하는 혈액에 대하여는 잘 알려져 있지 않다.

혈액세포중 적혈구는 산소 전달이 주 역할인데 그 기능은 적혈구 무게의 30%을 차지하는 헤모글로빈



**Figure 1.** Structure of streptozotocin.

The structure is composed of a nitrosourea moiety with a methyl group attached at one end and a glucose molecule at the other.

(Hb)이 주로 담당한다. 적혈구는 항상 산소와 접해 있으므로 느린 자동산화가 일어날 뿐만 아니라, 화학 물질에 노출되면 대사를 받아 활성 본체가 증가되면서 단백질 변성 및 과산화지질의 생성으로 세포막의 손상을 가져온다(Chiu *et al.*, 1989, Pradhan *et al.*, 1990). 그 결과로써 적혈구 변형능의 감소, 용혈의 증가 등이 나타나며(Goldstein *et al.*, 1979), 또한 활성 본체는 헤모글로빈을 공격하여 적혈구의 산소 전달능력을 저하시킨다(Kelner *et al.*, 1986).

본 연구에서는 streptozotocin으로 실험동물에 당뇨 상태를 유도하는 실험을 수행하던 중에 streptozotocin투여 후 48시간에 적혈구 변형능의 감소 및 그에 관련된 생화학적 인자들의 농도변화 즉, ATP의 감소, calcium ion( $Ca^{2+}$ )의 증가를 발견하였다(Moon *et al.*, 1988). 이러한 적혈구 내에서 일어나는 일련의 생화학적 변화는 적혈구 독성을 야기시켜 적혈구 기능의 상실을 가져올 수 있다. 더욱이 streptozotocin 투여는 실험동물의 혈당을 증가시킴으로써 혈당 증가에 따른 2차적 적혈구 독성을 유발시킬 수 있다. 따라서 본 연구에서는 streptozotocin에 의한 혈당 변화와 적혈구 독성의 상관성을 실험하고, *in vitro*상에서 포도당을 첨가하여 고혈당 상태를 모방함으로써, 적혈구 이상이 streptozotocin에 의한 자체 독성인지 그 여부를 규명하고자 한다.

## 실험 재료 및 방법

### 실험동물

자성 Sprague-Dawley(SD) 랫드를 생후 3주에 공급받아 본 대학 사육실에서 사육하였다. 사육조건은 온도  $21 \pm 1^\circ C$ , 습도  $55 \pm 1\%$ 로 맞추어 주고, 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주었다. 사료(제일제당 사료) 및 식수는 충분히 공급하였다.

### Streptozotocin 용액의 조제 및 동물 투여

Streptozotocin을 투여할 때는 분해 방지를 위하여 일반적으로 등장액인 citrate-phosphate 완충액(pH; 4.4-5)에 용해시켜 사용하지만(Weiss, 1982), 본 연구에서는 산성 완충 용액 자체가 용혈을 일으킴을 발견하였기 때문에 냉장 보관된 생리 식염 용액에 streptozotocin을 용해시켰다.

체내에서의 적혈구 독성을 관찰하기 위하여 180-230 g의 자성 SD 랫드를 24시간 절식시킨 후, 사용직전에 차가운 생리식염액(pH 7.4)에 각각 20 mg/ml, 40 mg/ml로 용해시킨 streptozotocin용액을 2.5 ml/kg의 양으로 꼬리정맥에 1회 주사하였다. Streptozotocin용액은 매우 불안정하므로 streptozotocin용액을 얼음에 방치한 상태에서 20분 이내에 투여하였다. 이때 정상 대조군 랫드에는 생리 식염액만 동량 주사하였다. 이들을 채혈전까지 다시 사료공급하였다.

### 혈당 측정 및 용혈 측정

혈액은 streptozotocin투여 후 2, 8, 24, 48시간에 대조군과 투여군의 랫드를 ether로 흡입마취시킨 후 해파린 처리된 주사기와 18 G 주사바늘을 이용하여 복대 동맥으로부터 채취했다. 채혈로 인한 용혈을 방지하기 위하여 인위적인 힘을 가하지 않고 심장 박동만으로 채혈하였다. 이 혈액을 1,500 g에서 10분간 원심분리하여 상층의 혈장을 조심스럽게 취하였다.

혈당 측정은 PGO method에 의하여 시행하였다. 포도당은 공기 중에서 효소 glucose oxidase에 의해 glucuronic acid로 변하고  $H_2O_2$ 를 생성하는데, 이것은 peroxidase에 의하여 환원되면서 발색단을 산화시켜 붉은 색을 나타내므로 그 색조로 포도당의 양을 측정할 수 있다. 분리한 혈장과 PGO kit의 발색시약을 혼합한 후  $37^\circ C$  수조에서 18분간 작용시켜 505 nm에서 흡광도를 측정하였다.

체내 용혈이 일어나면 유리된 헤모글로빈이 혈장에 나타난다. Heme에 있는 peroxidatic activity는 과산화수소를 환원시키면서 benzidine을 산화시켜 적자색을 띠는데 이 색조를 측정하여 용혈의 지표로 삼는다. Benzidine 시약은 benzidine base 1 g을 glacial acetic acid 90 ml에 용해시킨 후 탈이온수로 100 ml를 만들었다. 차광병에 넣어  $4^\circ C$ 에 보관하였고 한달 이내에 사용하였다. 1% 과산화수소 용액은 매일 신선하게 제조하였고 희석제로는 10% acetic acid를 사용하였다. 시험관에 1% benzidine 용액 1 ml, 혈장(blank는 탈이온수) 20  $\mu$ l, 1% 과산화수소 1 ml를 가하여 잘 섞고 색깔 변화가 완전히 일어나도록 20분간 상온에서

는다. Benzidine 시약은 benzidine 염 1 g을 glacial acetic acid 90 ml에 용해시킨 후 탈이온수로 100 ml에 대해 흡광도를 측정하였다(Chanarin, 1989).

### 적혈구 분리 방법

랫드를 ether로 흡입마취시킨 후 복대 동맥으로부터 혈액을 채취하고, 1,500 g에서 10분간 원심분리하였다. 상층의 혈장을 조심스럽게 취해 ice bath에 보관하고, lymphocytes 등으로 구성된 buffy coats는 suction으로 완전히 제거한 후 남아있는 packed RBCs(red blood cells)는 phosphate-buffered saline(PBS;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  8.6 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  30.4 mM, NaCl 96 mM, pH 7.4)를 이용하여 동일방법으로 세척하였다. 얻어진 packed RBCs는 PBS를 이용하여 20% suspension으로 만들고 이것을 소량 취해 현미경상에서 적혈구 수를 산출하였다.

### In vitro 용혈 측정법

20% RBC suspension 0.5 ml, PBS 1.5 ml에 생리 식염액에 녹인 streptozotocin 용액 0.5 ml을 가하여 원하는 농도로 맞춘 후 37°C 수조에서 배양하여 일정시간에 1,500 g로 10분간 원심분리했다. 상등액 1 ml을 조심스럽게 취하여 540 nm에서 streptozotocin 대신 생리 식염액을 가한 용액을 blank로 흡광도를 측정하였다. 100% 용혈은 적혈구 현탁액의 4배량의 탈이온수를 가하여 일으켰다.

### 통계 처리

모든 결과는 평균 ± 표준편차로 표시되었으며 용혈 정도의 비교에는 관찰의 용이성 때문에 퍼센트(%)를 사용하였다. NCSS program을 이용하여 ANOVA test를 수행한 뒤 Duncan's Multiple Range test로 유의성을 검정하였으며 p값이 0.05 이하인 것으로 유의성이 있다고 보았다.

## 실험결과

### Streptozotocin에 의한 in vivo 효과

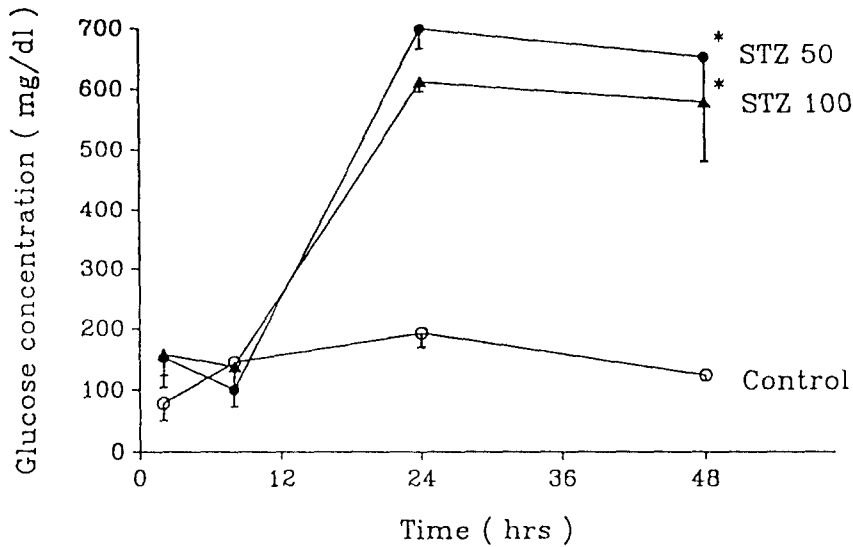
Streptozotocin은 실험동물에 당뇨병을 유도하는 대표적인 약물로서, 전에 보고된 적혈구 변형능 감소 효과가 당뇨유도로 인한 2차적 현상인지 streptozotocin의 자체 독성인지를 판별하기 위하여 혈당 증가와 용혈 발생의 두 실험을 병행하여 비교하였다.

Streptozotocin을 사정 랫드에 정맥주사한 후 혈당 변화를 측정한 결과, 정상쥐의 경우 전실험에 걸쳐 90-120 mg/dl인 것에 비해 약물 투여군에서는 24시간부터 700 mg/dl까지 증가하여 48시간까지 지속되었다. 또한 그 혈당 증가양상은 streptozotocin 50 mg/kg과 100 mg/kg의 두가지 용량에서 차이가 나지 않았다(Fig. 2). 한편, 체내에서 용혈이 발생할 때 혈장에 나타나는 헤모글로빈을 지표로 사용한 용혈 실험에서는 혈장 헤모글로빈의 양이 정상쥐의 경우 거의 변화가 없으나 streptozotocin 투여군에서는 용량과 시간에 따라 점차 증가하였으며 streptozotocin 100 mg/kg을 투여한 군에서는 투여 후 48시간에 유의성있는 증가를 보이고 있다(Fig. 3).

혈당증가는 용량에 관계없이 투여 후 24시간에 정점에 도달하였고, 용혈 발생은 streptozotocin의 용량과 시간에 따라 점차 증가하였다는 면에서 서로 다른 양상을 보이고 있으며, 이것은 streptozotocin이 당뇨유도와는 별개의 기전으로 용혈을 일으키는 것을 제시하고 있다.

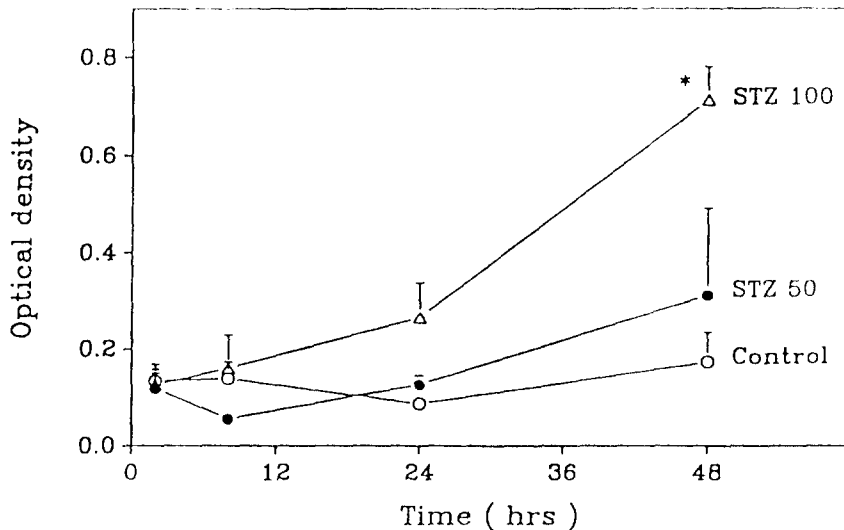
### Streptozotocin의 용혈효과에 영향을 미치는 인자들

Streptozotocin에 의한 혈당 증가와 적혈구 용혈 현상과의 무관성을 규명하기 위하여 in vitro 실험을 수행하였다. 먼저 streptozotocin 용량 변화에 따른 적혈구 용혈을 실험하였는데 용량 의존적으로 용혈이 증가함을 보여주고 있으며 500 mM에서는 100% 용혈이 일어남을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). 이에 따라 streptozotocin 300 mM을 택하여 시간에 따른 용혈 정도를 실험한 결과 역시 배양시간에 따라 용혈이 증가하여 4시간에 90%의 용혈이 일어났다(Fig. 5).



**Figure 2.** Effect of streptozotocin (STZ) on blood glucose level.

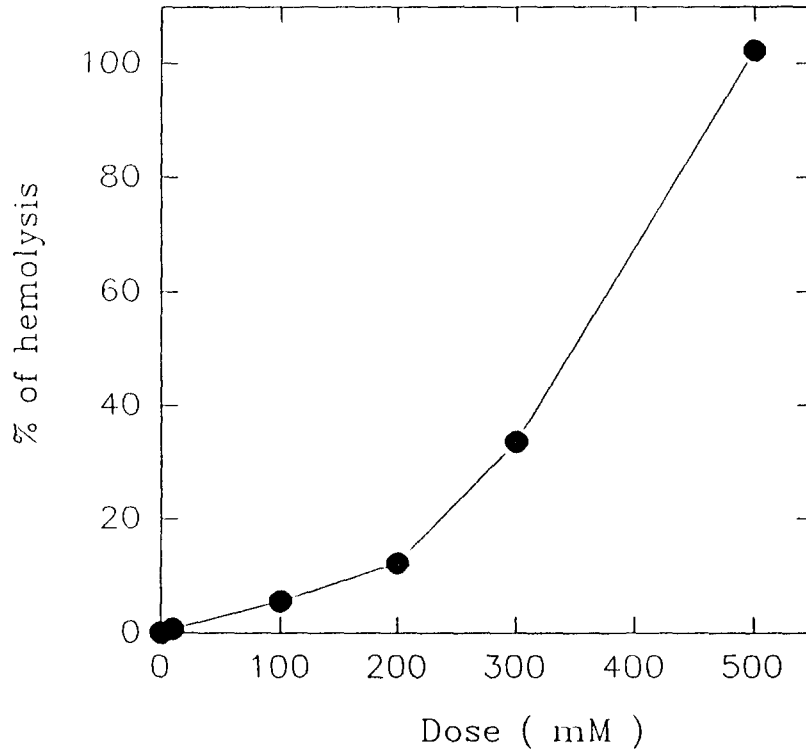
\* indicates significant differences from control (2-way ANOVA test followed by Duncan's Multiple range test,  $P < 0.05$ ).



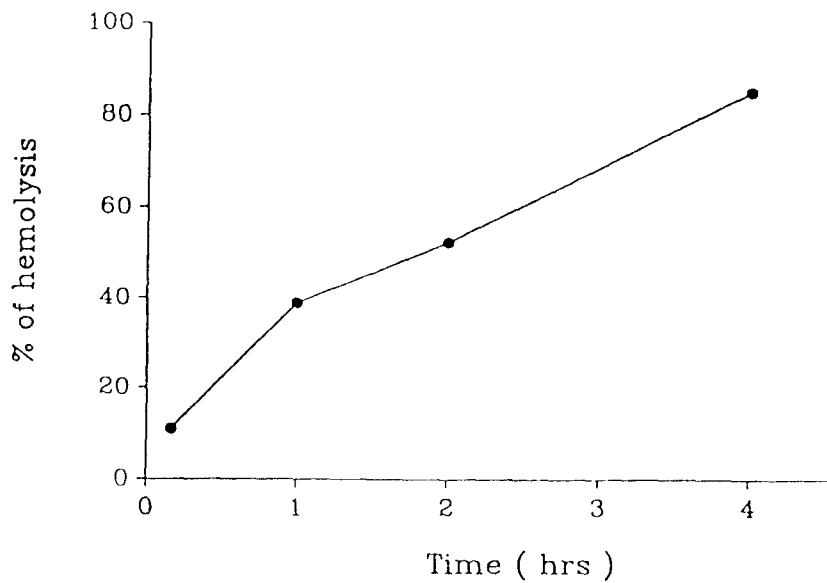
**Figure 3.** Effect of streptozotocin (STZ) on RBC hemolysis *in vivo*.

\* indicates significant differences from control (2-way ANOVA test followed by Duncan's Multiple range test,  $P < 0.05$ ).

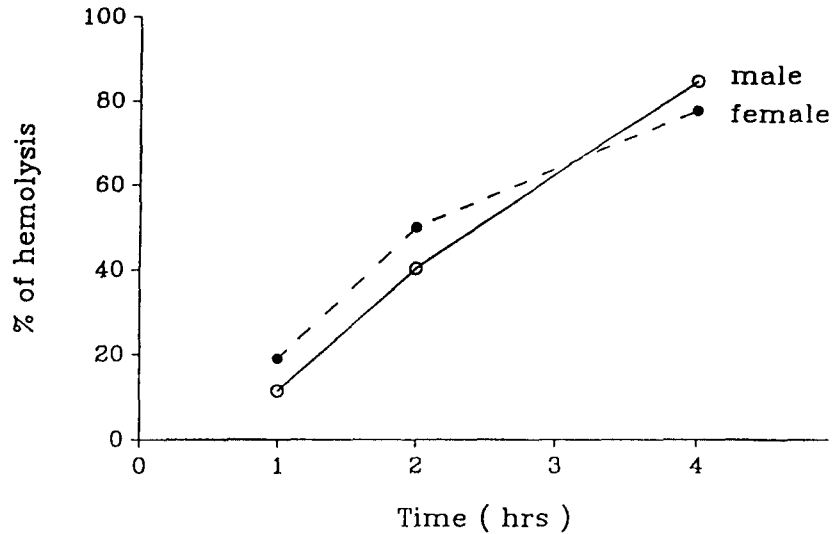
현재까지의 실험이 모두 자성 랫드 적혈구로 시행되었으므로 성별에 의한 차이가 있는지를 밝히 고자 *in vitro* system에 웅성과 자성의 적혈구에 대한 streptozotocin의 용혈 효과를 실험하였다(Fig. 6). 300 mM의 streptozotocin으로 2시간 배양했을 때 적혈구 용혈정도는 웅성과 자성군간에 큰 차이가 없음을 발견하였다. 따라서 앞으로의 실험 역시 자성 랫드의 적혈구로 수행하였다.



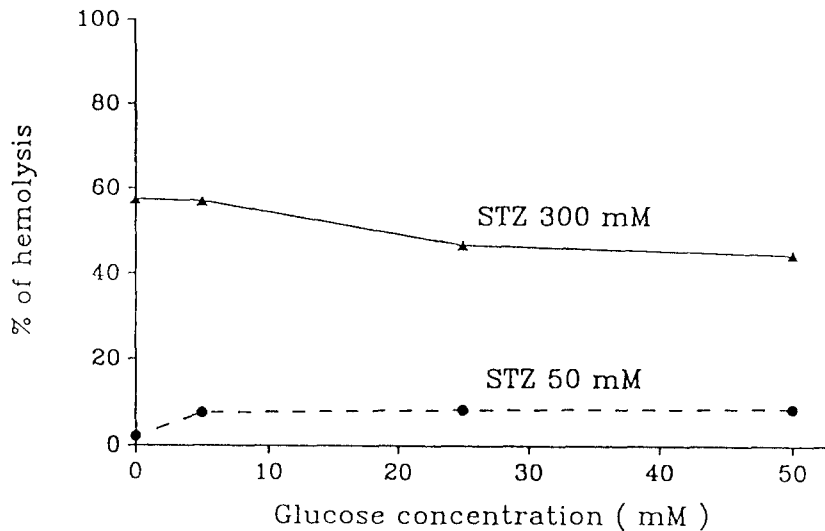
**Figure 4.** Dose-dependent hemolytic effect of streptozotocin(2 hrs) *in vitro*.



**Figure 5.** Time-dependent hemolytic effect of streptozotocin(300 mM) *in vitro*.



**Figure 6.** Hemolytic effect of streptozotocin on erythrocytes isolated from male and female rats.



**Figure 7.** Effect of hyperglycemia on streptozotocin-induced hemolysis.

앞서 언급했던 *in vitro*에서의 streptozotocin의 용혈 유발정도가 훨씬 약한 이유로 *in vivo*에서의 혈당증가로 인한 용혈 증가를 생각할 수 있다(Jain, 1989). 이 가능성을 시험하기 위하여 *in vitro* 실험에서 배양액에 포도당을 농도별로 첨가하여 streptozotocin의 용혈에 미치는 영향을 관찰하였다(Fig. 7). 일반적으로 정상혈당은 5 mM 정도이며 당뇨유도시 25 mM까지 증가하므로 배양 용액중의 포도당 농도를 50 mM(hyperglycemia)까지 증가시켰다. 용혈이 일어나지 않았던 streptozotocin 50 mM과 현저한 용혈이 일어났던 300 mM에서 모두 streptozotocin이 용혈 효과는 증가되지 않았음을 알 수 있다. 이상의 결과로부터 streptozotocin으로 유도된 고혈당상태는 용혈현상을 증가시키지 않으며, streptozotocin투여로

나타난 적혈구 독성은 당뇨유도로 인한 이차적 현상이 아니라 streptozotocin 화합물 자체에 의한 직접 독성이라고 할 수 있다.

## 고 찰

본 연구에는 streptozotocin이 적혈구의 변형능을 변화시킨다는 사실을 발견하고, streptozotocin에 의한 적혈구 독성과 혈당변화를 관련지어 실험함으로써, 적혈구 이상이 streptozotocin에 의한 자체독성인지 그 여부를 연구하였다.

Streptozotocin은 pH 7.4에서는 불안정하여 자발적으로 분해된다고 알려져 있다. 따라서 대부분의 경우 pH 4의 NaCl용액이나 citrate 완충용액에 녹여서 사용하고 있다. 그러나, streptozotocin의 *in vivo*에서의 용혈 유발 정도에 대해 실험하던 중 streptozotocin의 vehicle로 사용하던 pH=4의 완충용액 자체에 의한 적혈구 용혈이 일어남을 확인하고, vehicle을 saline(0.9% NaCl, pH 7)으로 교체하였다. *In vitro*의 실험 조건도 pH 7.4의 상태로 하였다. 본 연구의 *in vitro* 배양 조건은 *in vivo* 상태와 크게 다르지 않고 이러한 배양 조건에서 streptozotocin이 세포에 미치는 영향에 대하여 실험하는 것이 가능하다고 보고된 바 있다 (Park *et al.*, 1992).

Streptozotocin을 정맥주사한 결과, 혈당증가는 용량에 관계없이 투여 후 24시간에 정점에 도달하였고, 용혈발생은 streptozotocin의 용량과 시간에 따라 점차 증가하였다는 면에서 서로 다른 양상을 보이고 있으며, 이것은 streptozotocin이 당뇨유도와는 별개의 기전으로 용혈을 일으키는 것을 암시하고 있다. *In vitro*에서의 용혈실험에서도 streptozotocin의 용량과 배양시간에 의존적으로 용혈이 증가하였으나, 포도당을 첨가하여 인위적인 고혈당 상태를 유도하였을 때에는 용혈증가가 나타나지 않았으므로 streptozotocin으로 유도된 고혈당상태는 용혈현상을 증가시키지 않으며, streptozotocin 투여로 나타난 적혈구 독성은 당뇨유도로 인한 이차적 현상이 아니라 streptozotocin 화합물 자체에 의한 직접독성이라고 할 수 있다.

*In vitro*에서 시행한 용혈실험에서 streptozotocin은 매우 높은 용량에서 독성을 나타내는 것으로 나타났다. 물론 *in vivo*에서의 용혈치는 상대적 증가만을 나타냈고 *in vitro*에서는 % hemolysis로 나타냈기 때문에 직접 비교는 어려우나 *in vitro* 투여량이 100 mg/kg으로서 대략 5 mM에 해당한다는 것을 생각할 때 *in vitro*에서는 상당히 고용량에서 용혈이 발생한다는 것을 알 수 있다. 그러나 혈당증가는 용혈에 영향을 주지 않았으므로 생체내에 독성을 증가시키는 다른 기전이 있을지도 모른다는 추측을 갖게 한다.

Streptozotocin의 독성기전에 관한 새로운 가설로서, streptozotocin으로부터 carbamoylating compounds가 생성되어 단백질 등에 adducts를 생성하기 때문이라는 보고가 있어 많은 연구자들의 관심을 끌고 있다(Awasthi *et al.*, 1983, Chen *et al.*, 1990). 최근 Washington대학의 연구자들의 보고에 의하면 간세포에서 carbamylation된 화학 물질은 간세포에서 유리되어 다른 target organ에 흡수된 후 glutathione 등과 반응하여 세포 독성이 potentiation됨을 보고한 바 있다(Baillie, 1990). 따라서 streptozotocin은 간에서 carbamoylated compounds를 형성할 수 있을 뿐더러, 적혈구에는 glutathione을 많이 함유하기 때문에 간에서 대사된 대사체가 적혈구의 세포 독성을 증가시킬 수 있으며 이런 사실때문에 *in vivo* 및 *in vitro* 적혈구 용혈정도가 큰 차이를 나타낼 수 있다. 따라서 적혈구와 분리 간세포의 co-incubation system을 개발하여(Gee *et al.*, 1987) streptozotocin의 독성기전을 연구하는 것은 streptozotocin에 의한 적혈구 및 간세포의 손상기전이 규명될 뿐만 아니라 적혈구와 분리 간세포 co-incubation을 통한 실험 모델이 제시되면 *in vitro*상에서 inter-organ relationship에 관한 유익한 자료를 제공할 것이다.

이와 같이 streptozotocin은 1) *in vivo*로 정맥주사한 결과 48시간 후에 유의성 있는 용혈이 관찰되었으며, 2) 이러한 용혈 현상은 *in vitro*상에서 용량, 배양시간에 의존적이었으며 성별로 인한 차이는 나타나지 않았고, 3) 포도당의 첨가에 의한 용혈증가는 관찰되지 않았으므로 용혈현상은 streptozotocin 자체에 의한 직접 독성이라고 추측되었다. 이상의 결과는 streptozotocin이 랫드 적혈구에 대하여 용혈을 일으키지만, 그것은 streptozotocin에 의한 혈당 증가와는 무관함을 제시하고 있다.

## 감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 89년도 목적기초 연구비 지원에 의한 것으로서 한국과학재단에 감사드립니다.



## 참 고 문 헌

- Agius, C. and Gidari, A.S. (1985): Effect of streptozotocin on the glutathione-S-transferase of mouse liver cytosol, *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 811-819.
- Awasthi, Y.C., Misra, G., Rassin, D.K. and Srivastava, S.K. (1983): Detoxification of xenobiotics by glutathione S-transferases in erythrocytes: the transport of the conjugate of glutathione and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, *Br. J. Haematol.*, **55**, 419-425.
- Baillie, T.A. (1990): The role of metabolic activation in drug-induced toxicities. Studies with N-methylformamide, *Proc. Int. Sympo. on Toxicological Research in Drug Discovery and Development, Seoul*, pp. 7-22.
- Bhuyan, B.K., Kuentzel, S.L., Graey, L.G., Fraser, T.J., Wallach, D. and Neil, G.L. (1974): Tissue distribution of streptozotocin (NSC-85998), *Cancer Chemother. Rep.*, **58**, 157-165.
- Bolaffi, J.L., Nowlain, R.E., Cruz, L. and Grodsky, G.M. (1986): Progressive damage of cultured pancreatic islets after single early exposure to streptozotocin, *Diabetes*, **35**, 1027-1033.
- Chanarin, I. (1989): Laboratory Haematology-An Account of Laboratory Techniques (Churchill Livingstone, New York), p. 26-27.
- Chen, Q., Jones, T.W., Brown, P.C. and Stevens, J.L. (1990): The mechanism of cysteine conjugate cytotoxicity in renal epithelial cells, *J. Biol. Chem.*, **265**, 21603-21611.
- Chiu, D., Kuypers, F. and Lubin, B. (1989): Lipid peroxidation in human red cells, *Seminars in Hematology*, **26**, 257-276.
- Fram, R.J., Mack, S.L., George, M. and Marinus, M.G. (1989): DNA repair mechanisms affecting cytotoxicity by streptozotocin in *E. coli*, *Mutation Research*, **218**, 125-133.
- Gee, S.J., LeValley, S.E. and Tyson C.A. (1987): Application of a hepatocyte-erythrocyte coincubation system to studies of cyanide antidotal mechanisms, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **88**, 24-34.
- Goldstein, B.D., Rozen, M.G. and Kunis, R.L. (1979): Role of red cell membrane lipid peroxidation in hemolysis due to phenylhydrazine, *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 1355-1359.
- Jain, S.K. (1989): Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells, *J. Biol. Chem.*, **264**, 21340-21345.
- Junod, A. and Lambert, A.E. (1967): Studies on the diabetogenic action of streptozotocin, *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, **126**, 201-205.
- Karunanayake, E.H., Hearse, D.J. and Mellows, G. (1974): The synthesis of [<sup>14</sup>C] streptozotocin and its distribution and excretion in the rat, *Biochem. J.*, **142**, 673-683.
- Karunanayake, E.H., Hearse, D.J. and Mellows, G. (1975): The metabolic fate and elimination of streptozotocin, *Biochem. Soc. Trans.*, **3**, 410-414.
- Kelner, M.J. and Alexander, N.M. (1986): Inhibition of erythrocyte superoxide dismutase by diethyldithiocarbamate also results in oxyhemoglobin-catalysed glutathione depletion and methemoglobin production, *J. Biol. Chem.*, **261**, 1636-1641.

- LeDoux, S.P., Hall, C.R., Forbes, P.M. Patton, N.J. and Wilson, G.L. (1988): Mechanisms of nicotinamide and thymidine protection from alloxan and streptozotocin toxicity, *Diabetes*, **37**, 1015-1019.
- Moon, C.K., Chung, J.H., Lee, Y.M., Lee, S.H., Hwang, G.S., Park, K.S., Mock, M.S., Kim, S.G., Ahn, Y.S. and Ahn, J.H. (1988): Effects of brazilin on erythrocytes deformability and its related biochemical factors in streptozotocin-induced diabetic rats, *Arch. Pharm. Res.*, **11**, 149.
- Nukatsuka, M. Sakurai, H., Yoshimura, Y., Nishida, M. and Kawada, J. (1988): Enhancement by streptozotocin of superoxide radical generation by the xanthine oxidase system of pancreatic  $\beta$ -cells, *FEBS Letter*, **239**, 295-298.
- Papaccio, G., Pisanti, F.A. and Frascatore, S. (1986): Acetyl-homocysteine-thiolactone-induced increase of superoxide dismutase counteracts the effect of subdiabetogenic doses of streptozotocin, *Diabetes*, **35**, 470-474.
- Park, K.S., Ho, J.S., Moon, C.K. and Chung, J.H. (1992): Spontaneous degradation and cellular uptake of streptozotocin in two different buffer systems, *Kor. J. Toxicol.*, **7**, 183-189.
- Pradhan, D., Weiser, M., Sapanski, K.L., Frazier, D., Kemper, S., Williamoson, P. and Schlegel, R.A. (1990): Peroxidation-induced perturbations of erythrocyte lipid organization, *Biochim. Biophys. Acta*, **1023**, 398-404.
- Sandler, S., Welsh, M. and Andersson, A. (1983): Streptozotocin-induced impairment of islet B-cell metabolism and its prevention by a hydroxyl radical scavenger and inhibitors of pol(ADP-ribose) sythetase, *Acta pharmacol. toxicol.*, **53**, 392-400.
- Takasu, N., Komiya, I., Asawa, T., Nakasawa, Y. and Yamada, T. (1991): Streptozotocin- and alloxan-induced  $H_2O_2$  generation and DNA fragmentation in pancreatic islets, *Diabetes*, **40**, 1141-1145.
- Thomas, G. and Ramwell, P.W. (1989): Streptozotocin: nitric oxide carrying molecule and its effect on vasodilation, *Eur. J. of Pharmacol.*, **161**, 279-289.
- Weiss, R.W. (1982): Streptozotocin: Review of its pharmacology, efficacy, and toxicity, *Cancer Treatment Reports*, **66**, 427-438.
- Wohaieb, S.A. and Godin, D.V. (1987): Alteration in free radical tissue-defense mechanisms in streptozotocin-induced diabetes in rat, *Diabetes*, **36**, 1014-1018.