

## Adriamycin의 독성 발현에 미치는 백령(*Ampelopsis radix*)의 영향

김동석 · 이성호\* · 정연봉\*

경성대학교 식품공학과, \*경남전문대학 식품영양과, \*경성대학교 약학과

### Effect of *Ampelopsis radix* on the Toxicity of Adriamycin

Dong-Seuk Kim, Sung-Ho Lee\*, Yeoun-Bong Chung\*\*

Dept. of Food Science and Technology, Kyungsoong University, Pusan 608-736, Korea

\*Dept. of Food and Nutrition, Kyungnum Junior College, Pusan 616-701, Korea

\*\*Dept. of Pharmacy, Kyungsoong University, Pusan 608-736, Korea

#### Abstract

Adriamycin is a major cancer chemotherapeutic agent against a wide range of human neoplasms. However, its clinical application is limited since it has a variety of side effects, bone marrow suppression and cardiotoxicity, and this toxicity appears by free radical. This study investigated the effect of *Ampelopsis radix* on the toxicity of adriamycin. The methanol fraction reduced slightly adriamycin induced lipid peroxidation and superoxide production at the dose of 50mg /kg. i.p., respectively. During the adriamycin administration, protein bound-SH, nonprotein bound-SH, and glutathione-S-transferase did not change, but methanol fraction treated group were markedly increase. These results indicated that *Ampelopsis radix* has a major influence on the thiol group and related enzyme activity on the antioxidative effects.

Key words : adriamycin, *Ampelopsis radix*, , chemotherapeutic agent, antioxidative action, bone marrow suppression, cardiotoxicity, lipid peroxidation.

#### 서 론

Adriamycin은 *Streptomyces peuceitius caesius*로부터 분비한 anthracycline계의 antibiotic으로서 구조적으로 daunorubicin의 이성체로서 14번 위치의 carbon이 hydroxylation된 형태<sup>1)</sup>로 체내에 흡수된 뒤 혈액을 통하여 신속히 각 조직에 분포하며 처음 5일동안은 약 5%만이 뇨로 배설된다. Adriamycin의 대사는 주로 간에서 이루어지며, 간내에서 adriamycin과 몇 개의 유도체로 대사되며 약 절반은 담즙으로 분비되며 이중 30% 정도는 conjugate로 배설된다. 이러한 adriamycin의 생리적 활성은 인접한 염기쌍과의 상호작용에 의하여 DNA와의 구조적 결합과 관련이 있는 것으로 알려지고 있으며, 또한 입체화학적 구조에

따라 DNA replicaton(DNA-dependent DNA polymerase)와 DNA transcription(DNA-dependent RNA polymerase)과 관련된 enzyme을 억제하는 것으로 알려져 있다<sup>2, 3)</sup>.

Adriamycin의 알려진 독성으로서는 일반적으로 용량에 따른 myelosuppression, somatitis, nausea 및 vomiting 등이며 주 독성으로는 cardiomyopathy이다<sup>4)</sup>. 또한 adriamycin의 주대사장기가 간이며 약 70%이상이 간에 축적된다. 따라서 간질환이 있거나 간 기능에 손상이 있는 환자의 경우 adriamycin의 투여량의 결정에 신중을 기해야 한다.

현재까지 알려진 바로는 adriamycin의 독성 발현 기전은 조직내에서의 free radical의 생성에 따른 산화 반응의 결과 독성을 나타내는 것으로 알려지고 있다<sup>5)</sup>. Myers<sup>6)</sup>에 의하면 mice에서 adriamycin으로 유도되는 심장독성은 myocardium 내에서의 lipid

peroxide level의 증가와 관련이 있다고 보고하였으며, Sato<sup>7)</sup>은 adriamycin이 체내에서 microsomal NADPH-cytochrome P450 reductase에 의해 semiquinone free radical로 활성화 되어진다고 보고하였다. 또한 Mimnaugh 등<sup>8)</sup>은 adriamycin의 투여에 따른 hepatic microsomal에서의 lipid peroxidation의 증가는 microsomal mixed-function oxidation의 억제에 기인한다고 보고하였다.

Balin과 Olson<sup>9)</sup>에 의하면 생체 내에서 일어나는 이러한 free radical에 의한 반응이 노화의 원인이라고 하였으며, 또한 Harman 등<sup>10)</sup>에 의하면 free radical에 의한 연속적인 유해 반응의 결과로 노화 과정이 진행된다고 하였다. 따라서 생체는 이러한 활성산소에 의한 부반응을 조절할 수 있는 system, 즉 glutathione, superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase 등을 이용하여 활성산소를 제거함으로써 생체 homeostasis를 유지하고 있다.

본 연구에서는 현재 여러 가지 환경 오염물질 및 식품첨가물 등에 의한 생체의 부반응을 예방 및 치료할 수 있는 기초를 얻으며 아울러 항암제의 사용에 따른 부작용을 경감시킬 수 있는 방법을 모색하고자 성인성 질환에 널리 이용되어지고 있는 약용식물 중 백련(*Ampelopsis radix*)을 이용하여 체내 산소 유리기의 변화에 미치는 영향을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약

Cytochrome C, DTNB(5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid), glutathione, xanthine, xanthine oxidase 및 bovine serum albumin(BSA)은 Sigma社, DCNB(1-chloro-2,4-dinitro-benzene)은 Fluka社, N-1-naphthylethylenediamine, sulfanilamide 및 ninhydrin은 Wako社의 것을 사용하였으며, 그외 모든 시약은 시판되는 특급 또는 일급품을 구입하여 사용하였다.

### 2. 실험동물

본 실험에 사용한 동물은 웅성 Sprague-Dawley계 rat(180~200g)를 사용하였으며, 사료는 삼양 유지

사료사의 항생제 무첨가 pellet를 사용하였다. 사육시 물과 사료는 충분한 양을 공급하고, 동물실은 12시간의 light-dark cycle을 유지하였으며, 실험 동물의 circadian rhythm을 고려하여 사료의 투여와 실험은 오전 9시에서 11시 사이에 행하였다.

### 3. 시료의 추출

본 실험에 사용한 시료는 백련(*Ampelopsis radix*)으로 시판품을 구입하여 세정, 음건(陰乾) 후 시료로 사용하였다. 재료 약 600g을 수욕상에서 MeOH로 5시간씩 3회 추출하고 감압 농축하였다. 얻어지는 MeOH ext를 물로 현탁시킨 뒤 동량의 Abs-MeOH를 가하여 석출되는 침전을 제거시킨 뒤 다시 증발건고 시켜 시료(이하 AR-M으로 명명함)로 사용하였다.

### 4. 시료의 처치 및 효소원의 조제

시료는 7일간 연속으로 복강내로 투여하였으며 실험 개시일 1, 4, 7일전에 각각 adriamycin을 10mg/kg의 용량으로 복강 투여하였다. 실험 개시일에 실험 동물을 ether로 마취시킨 뒤 간을 취하고 10배 용량의 0.05M phosphate buffer(pH 7.4)를 가하여 병냉하에서 glass-teflon homogenizer로 마쇄 균질화한 후 실험에 사용하였으며, 일부는 12,000×g로 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 cytosol로 사용하였다.

### 5. 시료의 산소 유리기에 미치는 영향

#### 1) 간 지질 과산화에 미치는 영향

시료의 지질 과산화에 미치는 영향은 Masugi 등<sup>11)</sup>의 방법에 준하여 thiobarbituric acid(TBA)법에 따라 측정하였다. 즉 시험관에 간 homogenate 0.5ml씩을 duplicate로 취한 후 7% sodium dodecyl sulfate(SDS)용액 0.4ml를 가하여 37°C에서 30분간 incubation시켰다. 여기에 0.67% TBA-50% acetic acid 용액 2ml를 가하고 95°C 수욕상에서 50분간 가열한 후 즉시 빙냉시키고 butanol 5ml를 가하여 추출한 다음 3,000rpm에서 10분간 원심분리시켜 얻은 상등액을 535nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 2) Superoxide 생성에 미치는 영향

Superoxide 유리기의 생성은 McCord 등<sup>12)</sup>의 방법에 따라 superoxide dismutase를 억제할 수 있는 ferricytochrome C의 환원되는 속도를 측정하였다. 즉 50mM-phosphate buffer / 0.1mM-EDTA (pH 7.8) 1.8ml에 3mM-KCN 34 $\mu$ l를 가한 후 37°C에서 10분간 방치하였다. 여기에 postnuclear fraction 600 $\mu$ l와 0.1mM cytochrome C 0.2ml를 넣고 cuvette를 37°C로 유지시키면서 550nm에서의 흡광도의 변화를 2분간 측정하였다. 이때 cytochrome C의 양은 분자 흡광계수 19,500M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>로 계산하였다.

## 6. 시료의 Glutathione 함량에 미치는 영향

### 1) Total-SH 함량에 미치는 영향

시료의 Total-SH 함량 측정은 Sedlack 등<sup>13)</sup>의 방법에 따라 0.2M Tris buffer (pH 8.2) 1.0ml와 0.01M DTNB 및 methanol 4.0ml를 섞은 후 여기에 homogenate 0.1ml를 가하고 24°C에서 15분간 방치시킨 후 4,000rpm에서 30분간 원심분리시켜 얻은 상등액을 대조하여 412nm에서의 흡광도를 측정하였다.

### 2) Nonprotein bound-SH 함량에 미치는 영향

시료의 nonprotein bound-SH 함량의 측정은 Higash 등<sup>14)</sup>의 방법에 따라 homogenate에 trichloroacetic acid 용액을 최종농도 5%가 되도록 가한 후 원심분리하여 얻은 상등액 2.0ml에 0.4M-Tris (pH 8.9) 4.0ml와 0.01M-DTNB 0.1ml를 가한 후 412nm에서의 흡광도를 측정하였다.

### 3) Glutathione 함량에 미치는 영향

시료의 glutathione 함량의 측정은 Gaitonde법<sup>15)</sup>에 의해 cysteine의 양을 측정하여, nonprotein bound-SH의 양에서 cysteine-SH의 양을 빼어 산출하였다. Homogenate에 동량의 10% trichloroacetic acid를 가하여 원심분리한 후 얻은 상등액 0.5ml에 acetic acid 0.5ml와 2.5%-ninhydrin 0.5ml를 가한 후 끓는 물에서 10분간 반응시킨 후 빙냉하고 absolute ethanol 3.0ml를 가한 후 즉시 560nm에서의 흡광도를 측정하였다.

## 7. 시료의 효소활성에 미치는 영향

### 1) Glutathione S-transferase활성에 미치는 영향

시료의 glutathione S-transferase활성에 미치는 영향은 Habig 등<sup>16)</sup>의 방법에 따라 측정하였다. 즉 시험관에 0.1M phosphate buffer 2.8ml, cytosol 0.1ml 및 0.04M glutathione을 섞은 후 대조 시험관에 20%-TCA를 0.5ml 가하고 25°C에서 5분간 방치시켰다. 여기에 0.12M-DNCB를 25 $\mu$ l씩 가한 후 20%-TCA를 0.5ml씩 가한 후 원심분리시켜 얻은 상등액을 340nm에서의 흡광도를 측정하였다.

### 2) Catalase활성에 미치는 영향

시료의 catalase 활성에 미치는 영향은 Chance 등<sup>17)</sup>의 방법에 따라 50mM phosphate buffer (pH 7.0) 1.5ml에 효소원 100 $\mu$ l를 가한 후 26mM-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0ml를 가하고 240nm에서의 흡광도의 변화를 2분간 측정하였다.

## 8. 단백질 정량

Bovine Serum Albumin을 표준품으로 하여 Lowry method<sup>18)</sup>에 준하여 측정하였다.

## 9. 통계처리

모든 실험 data는 mean  $\pm$  standard deviation으로 나타내었으며, 유의성 검정은 student's t-test로 하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 간 homogenate에서의 지질 과산화에 미치는 영향

Table 1에서 보는 바와 같이 정상군의 경우 MDA의 양은 1.97nmole인데 비하여 Adriamycin을 투여한 경우 2.20nmole로서 유의할 만한 증가는 나타나지 않았다. 시료 투여군에 있어서도 2.11nmole로서 대조군과 뚜렷한 차이를 나타내지는 않았다. 이러한 결과는 mouse를 이용한 Odom 등<sup>19)</sup>의 결과와 유사한 양상을 나타내었으며 또한 Bartoszek 등<sup>20)</sup>의 adriamy-

**Table 1. Anti-lipid peroxidative effects of *Ampelopsis radix* on the liver homogenate of adriamycin treated rat**

| Group                         | N | MDA contents(nmole / g tissue)<br>(Mean ± S.D) | Inhibition(%) |
|-------------------------------|---|--|---------------|
| Normal control                | 5 | 19.70 ± 3.10                                   | —             |
| Adriamycin* <sup>1</sup>      | 5 | 22.04 ± 0.27 <sup>a</sup>                      | 0             |
| AR-M* <sup>2</sup> (50mg /kg) | 5 | 21.07 ± 1.47 <sup>b</sup>                      | 58.55         |

\*1 : Adriamycin was treated with i.p. at 1, 4, 7days (10mg /kg)

\*2 : MeOH Ex. was treated with i.p. for 7days

b vs a : p<0.05

**Table 2. Changes in superoxide generation in rats**

| Group                         | N | Superoxide<br>(nM /mg protein) | Significance<br>(P) |
|-------------------------------|---|--------------------------------|---------------------|
| Normal control                | 5 | 5.72 ± 0.41                    | —                   |
| Adriamycin* <sup>1</sup>      | 5 | 6.42 ± 1.19 <sup>a</sup>       | 0                   |
| AR-M* <sup>2</sup> (50mg /kg) | 5 | 5.64 ± 1.43 <sup>b</sup>       | P<0.05              |

\*1 : Adriamycin was treated with i.p. at 1, 4, 7days (10mg /kg)

\*2 : MeOH Ex. was treated with i.p. for 7days

b vs a : p<0.05

**Table 3. Protein-bound and nonprotein-bound sulfhydryl concentration in rat**

| Group                         | N | Protein bound-SH<br>( $\mu$ M /mg protein) | Nonprotein bound-SH<br>( $\mu$ M /mg protein) |
|-------------------------------|---|--|---|
| Normal control                | 5 | 4.73 ± 0.27                                | 5.38 ± 0.27                                   |
| Adriamycin* <sup>1</sup>      | 5 | 4.51 ± 0.83 <sup>a</sup>                   | 5.14 ± 0.64 <sup>a</sup>                      |
| AR-M* <sup>2</sup> (50mg /kg) | 5 | 2.88 ± 0.51 <sup>b</sup>                   | 7.40 ± 0.07 <sup>b</sup>                      |

\*1 : Adriamycin was treated with i.p. at 1, 4, 7days (10mg /kg)

\*2 : MeOH Ex. was treated with i.p. for 7days

b vs a : p<0.05

cin의 독성발현의 1차적 원인이 지질 과산화에 의한 것이 아니라는 보고와 비교하여 유의성 있는 결과라고 생각된다.

## 2. Superoxide 생성능에 미치는 영향

Superoxide 생성능의 경우 Table 2에서 보는 바와 같이 정상군에 비하여 adriamycin투여군의 경우 6.42nM /mg protein으로서 다소 증가하는 양상을 나타내었다. 그러나 추출한 시료를 일정농도를 투여한 경우 유의성 있는 감소를 관찰할 수 있었다. Farmer 등<sup>21)</sup>의 보고에 의하면 노화에 따라 superoxide radi-

cal이 증가하는 양상을 나타내는데 본 실험에서도 adriamycin의 투여로 superoxide radical의 형성이 다소 증가를 나타내었으나 시료를 투여함으로써 그 생성능이 거의 정상수준으로 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 투여되어진 시료가 체내에서 형성되어진 free radical에 대한 scavenger로서의 작용을 생각해 볼 수 있었다.

## 3. Nonprotein bound-SH 함량에 미치는 영향

Table 3에서 보는 바와 같이 protein bound-SH의 adriamycin의 투여에 의하여 정상군에 비하여 다소

**Table 4. Measurement of glutathione contents in liver homogenate**

| Group                         | N | Glutathione concentration<br>( $\mu\text{M}$ /mg protein) | Significance<br>(P) |
|-------------------------------|---|---|---------------------|
| Normal control                | 5 | 4.69 $\pm$ 0.15   | —                   |
| Adriamycin* <sup>1</sup>      | 5 | 4.58 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>                              | P<0.05              |
| AR-M* <sup>2</sup> (50mg /kg) | 5 | 6.47 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>                              | P<0.05              |

\*<sup>1</sup>: Adriamycin was treated with i.p. at 1, 4, 7days (10mg /kg)

\*<sup>2</sup>: MeOH Ex. was treated with i.p. for 7days

b vs a : P<0.05

**Table 5. Measurement of glutathione S-transferase activity in cytosol**

| Group                         | N | Glutathione S-transferase<br>( $\mu\text{M}$ /mg protein /min) | Significance<br>(P) |
|-------------------------------|---|--|---------------------|
| Normal control                | 5 | 7.68 $\pm$ 0.24  | —                   |
| Adriamycin* <sup>1</sup>      | 5 | 7.62 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>                                   | P<0.05              |
| AR-M* <sup>2</sup> (50mg /kg) | 5 | 8.83 $\pm$ 0.41 <sup>b</sup>                                   | P<0.05              |

\*<sup>1</sup>: Adriamycin was treated with i.p. at 1, 4, 7days (10mg /kg)

\*<sup>2</sup>: MeOH Ex. was treated with i.p. for 7days

b vs a : P<0.05

감소되는 경향을 나타내었으나 시료를 일정농도로 투여한 경우 더욱 감소되는 경향을 나타내었으나, non-protein bound-SH의 경우는 시료 투여군에서 현저한 증가를 나타내었다. 시료의 SH thiol기에 미치는 영향을 검토한 결과 adriamycin 투여군과 대조군에서 뚜렷한 변화를 관찰할 수는 없었다. 본 결과는 Odom<sup>19)</sup> 등에 의하면 adriamycin을 투여한 후 시간 변화에 따른 체내 Non-protein thiol의 변화를 관찰한 결과 투여 후 3시간 정도에서 그 함량이 가장 저하되었으며 투여 후 6시간 정도에서는 대조군과 거의 유사한 양상을 보인 것과 비교해 볼 때 투여기간과 실험기간의 오차에 의한 것으로 생각되어진다.

#### 4. Glutathione 함량에 미치는 영향

시료의 투여에 따른 glutathione 함량의 변화는 Table 4에서와 같이 정상군에 비하여 adriamycin 투여군의 경우 대조군과 유의할 만한 변화는 나타내지 않았다. 그러나 시료 투여군의 경우 대조군과 adriamycin 투여군에 비하여 현저한 증가의 양상을 나타냄을 알 수 있었다. 앞의 nonprotein bound-SH의 결과와 비교해 볼 때 시료가 체내 defence mechanism과는

별도로 또 다른 경로에 의한 체내 thiol화합물에 영향을 미칠 것으로 생각된다.

#### 5. Glutathione S-transferase 활성에 미치는 영향

시료의 투여에 따른 체내 glutathione S-transferase 활성의 변화에 Table 5에서 보는 바와 같이 adriamycin 투여군의 경우 7.62 $\mu\text{M}$  /mg protein /min 으로서 정상군에 비하여 다소 그 활성이 저하되어지는 양상을 보이기는 하나 유의할 만한 변화는 나타나지 않았다. 그러나 시료 투여군의 경우는 활성의 현저한 증가가 인정되었다. Thiol기의 함량 변화의 결과와 비교해 볼 때 시료 투여군에서의 thiol기의 증가가 glutathione S-transferase의 활성 증가와 관련이 있을 것으로 생각된다.

#### 6. Catalase 활성에 미치는 영향

시료의 catalase 활성에 미치는 영향을 검토한 결과 Table 6에서 보는 바와 같이 adriamycin 투여군의 경우 대조군에 비하여 다소 감소하였으며, 시료 투여군의 경우에서도 회복되지는 않았다. 따라서 투여한 시료가 체내의 catalase 활성에는 별다른 영향을 미치지

**Table 6. Measurement of catalase activity in liver homogenate**

| Group           | N | Catalase<br>(unit k /mg protein) | Significance<br>(P) |
|-----------------|---|----------------------------------|---------------------|
| Normal control  | 5 | 1.80±0.24                        | —                   |
| Adriamycin*1    | 5 | 1.19±0.22 <sup>a</sup>           | P<0.05              |
| AR-M*2(50mg/kg) | 5 | 1.21±0.18 <sup>b</sup>           | P<0.05              |

\*1 : Adriamycin was treated with i.p. at 1, 4, 7days (10mg /kg)

\*2 : MeOH Ex. was treated with i.p. for 7days

b vs a : P<0.05

못함을 알 수 있었다.

화학 물질이나 대사 부산물로 인하여 생성되어지는 free radical 또는 superoxide 등은 독성학적인 측면에서 볼 때 세포내 recycling 반응에 관여하여 radical을 계속적으로 생산시키거나, 세포내 인지질막의 과산화 지질을 유발하는 등 부수적인 역효과를 초래한다. 활성 산소는 면역질환 등의 발생에 중요한 요인이 되고 있으며 암의 발생에도 한 몫을 차지하고 있는 것으로 알려져 있을 뿐만 아니라 산소 소비량이 증가할수록 노화가 촉진된다는 보고들로부터 최근 활성산소에 관하여 많은 관심을 기울이고 있다<sup>22, 23)</sup>.

또한 암의 치료를 위하여 많은 연구가 진행되어져 왔으며 최근 암의 치료를 위하여 면역요법이 도입되어 좋은 결과를 얻고 있으나, 아직은 화학요법에 의한 치료가 주를 이루고 있다. 그러나 이러한 화학요법제의 사용에도 그 자체의 독성때문에 많은 제약이 따르고 있다.

이에 본 실험에서는 adriamycin을 이용하여 이의 독성발현을 검토하며 아울러 옛부터 성인성 질환에 이용되어온 백렴을 이용하여 adriamycin에 의한 독성의 경감을 검토한 결과 adriamycin의 간 독성의 일차적 반응이 지질 과산화에 의한 것이 아닌 다른 경로에 의한 것이라고 생각되며, 아울러 시료로 사용한 백렴의 항산화 활성은 체내 thiol기 화합물의 변화와 관련이 있을 것으로 생각된다. 따라서 앞으로 백렴의 보다 정확한 항산화 활성기전을 검토하기 위하여 산화형 및 환원형 glutathione의 변화, cytochrome P-450 활성의 변화와 아울러 백렴의 활성성분의 분리 및 동정 등의 지속적인 실험이 요망된다.

## 요 약

Adriamycin의 독성 및 이의 경감을 위한 백렴의 항산화 활성을 검토한 결과 in vivo에서 adriamycin에 의한 독성발현의 1차적 반응은 지질 과산화에 의한 것이 아닌 다른 경로에 의한 것으로 생각된다. 또한 시료로 사용한 백렴의 체내 지질 과산화 억제에 대한 작용은 뚜렷하지 않았으며, in vivo에서의 thiol기 현저한 증가를 보이는 것으로 보아 시료의 항산화 활성은 체내 glutathione 및 이와 관련한 효소의 활성화의 관련이 있을 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. Carter, S.K. : Adriamycin-A review. *J. Nat. Cancer Inst.*, 55(6), 1265(1975)
2. Calendi, E., Dimarco, A., Regiani, M. *et al.* : On physicochemical interactions between daunomycin and nuclei acid. *Biochem. Biophys. Acta*, 103, 25(1965)
3. Blum, R.H. and Carter, S.K. : A new anticancer drug with significant clinical activity. *Ann. Internal Med.* 80, 249(1974)
4. Billingham, M.E., Mason, J.W., Bristow, M. R. and Daniels, J.R. : Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer Treat. Rep.* 62(6), 865(1978)
5. Goodman, J. and Hochstein, P. Generation

- of free radicals and lipid peroxidation by red-ox cycling of adriamycin and daunomycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **77**, 797(1977)
6. Myers, C.E., McGuire, W.P., Liss, R.H., Ifrim, I., Grotzinger, K. and Young, R.C. : Adriamycin : The role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science*, **197**, 165(1977)
  7. Sato, S., Iwaizumi, M., Handa, K. and Tamura, Y. : Electron spin resonance study on the mode of generation of free radicals of daunomycin, adriamycin and carboquone in NAD(P) H-microsome system. *Gann*, **68**, 603 (1977)
  8. Mimnaugh, E.G., Trush, M.A. and Gram, T. E. Stimulation by adriamycin of rat heart and liver microsomal NADPH-dependent lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 2997(1981)
  9. Olsonm, C.B. : Accumlation of waste product theory. *Mech. Aging Dev.*, **41**, 17(1987)
  10. Harman, D. : A theory based on free radical and raqdiation chemitry. *J. Gerontol.*, **11**, 298 (1956)
  11. Masugi, F., and Nakamura, T. : Measurement of TBA value in liver homogenate solubilized with SDS and variation of the values affected by vitamin E and drugs. *Vitamin*. **51**, 21(1977)
  12. McCord, J.M. and Fridovich, I. : Superoxide dismutase. An enzymic function for erythro cuprein(hemo cuprein). *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049(1969)
  13. Sedlak, J. and Lindsay, R.H. : Estimation of total protein-bound and nonprotein-bound sulphydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.*, **25**, 192(1968)
  14. Higash, T. : Critical review on the determination of glutathione in biological preparations. *Preteins, Nucleic Acid and Enzyme*. **33**, 1370(1988)
  15. Gaitonide, M.K. : A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. *Biochem. J.*, **104**, 627(1967)
  16. Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B. : Glutathione S-transferase., *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130(1974)
  17. Chance, B. and Maehly, A.C. : *Assay of Catalase and Peroxidase*. Vol. 2, Academic Press. pp. 764-775(1955)
  18. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
  19. Odom, A.L., Hatwig, C.A., Stanley, J.S. and Benson, A.M. : Biochemical determinants of adriamycin toxicity in mouse liver, heart and intestine. *Biochem. Pharmacol.*, **43**(4), 831 (1992)
  20. Bartoszek, A. and Wolf, C.R. : Enhancement of doxorubicin toxicity following activation by NADPH cytochrome P450 reductase. *Biochem. Pharmacol.*, **43**(7), 1449 (1992)
  21. Farmer, K.J. and Sohal, R.S. : Relationship between superoxide anion radical generation and aging in the housefly, *Musca Domestica*. *Free Radic. Biol. Med.*, **23**, 7(1989)
  22. Raymond, J.S. : Antioxidants and cancer. 6. Initiating activity of malonaldehyde as a carcinogen., *J. National Cancer Institute*, **53**, 6 (1974)
  23. Glavind, J., Hartmenn, S. and Clemmesen, J. : Studies on the role of lipidperoxides in human pathology. 2. The presence of peroxidized lipids in the arthero-sclerotic aorta. *Acta, Pathol. Microbiol. Scand.*, **30**, 1(1952)