

산화적 스트레스상태에서 B16F10 Murine Melanoma 세포의 항산화효소 활성화에 대한 흑측추출물의 효과

김안근[#] · 차은정

숙명여자대학교 약학대학

(Received February 4, 2004; Revised February 20, 2004)

Effect of Pharbitidis Seed Extract on the Antioxidant Enzyme Activity in B16F10 Murine Melanoma Cells by Oxidative Stress

An Keun Kim[#] and Eun Jung Cha

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University

Abstract — The purpose of this study was to evaluate the effect of pharbitidis seed extract (PE) on antioxidant enzymes. The cytotoxicities of PE were measured by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The change of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), and catalase (CAT) activity assay were measured. The SOD activities by PE-treated groups were lower than control group's one. In the co-treated with hydrogen peroxide (H_2O_2) group, SOD activity was higher than H_2O_2 treated group's activity. In the case of GPx, GPx activities were increased in both PE-treated and co-treated with H_2O_2 group. In the case of CAT, H_2O_2 treated group's activities were very increased. The CAT activities by PE-treated groups were lower than control group's one, but the activity of co-treated group with H_2O_2 was higher than that of control group's one. These results suggest that PE has antioxidant activity.

Keywords □ antioxidant enzyme activity, pharbitidis seed, ROS

살아있는 생물체는 산소를 이용하는 정상적인 대사를 통하여 지속적으로 superoxide radical anion($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical(OH^{\cdot}) 등과 같은 반응성이 큰 reactive oxygen species(ROS)를 생성하는데,¹⁾ 이러한 ROS들은 UV, ozone, 공기오염, 여러 가지 약물 등과 같은 외부 자극에 의해서도 그 생성이 증가된다고 알려져 있다.²⁾ 인체에 존재하는 항산화 체계는 여러 가지 항산화 물질들이 관여하는 비효소적 방어 체계와 항산화 효소들이 관여하는 효소적 방어체제로 나눌 수 있다. 항산화 물질로는 ascorbic acid, α -tocopherol, glutathione, β -carotene, vitamin A 등이 있고,³⁾ 중요한 항산화 효소로는 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx), catalase(CAT), glutathione reductase를 들 수 있다. Free oxygen radicals이 생성되면 SOD, CAT, GPx와 같은 항산화 효소들은 membrane의 lipid peroxidative damage, sulfhydryl-

containing enzymes의 inactivation, integral protein의 cross-linking 등에 관련된 oxygen species를 불활성화 시키거나 제거함으로써 항산화 작용을 하게 된다.^{4,5)} 그러나 이러한 항산화작용이 제대로 되지 않으면 ROS가 체내에 축적되게 되고 생체내의 고분자 물질인 불포화 지방산, 단백질, DNA 등과 반응하여 다양한 기전을 통해 세포의 노화와 변형을 초래함으로써 여러 가지 질병과 밀접한 연관을 갖는 것으로 알려져 있다.⁶⁻⁸⁾

본 연구는 산화적 스트레스 상태에서의 항산화 효소활성에 대한 연구의 일환으로 침습성이 강하고 전이가 빠른 악성 흑색종 세포를 이용하였고 H_2O_2 스트레스 상태에서 흑측(Pharbitidis Semen, pharbitidis seed)추출물 투여로 인한 효소활성 변화를 측정하여 검토하고자 하였다. 또한 MTT Assay를 통하여 이 흑측 추출물이 세포의 증식에 미치는 영향을 관찰하였다.

실험방법

재료 및 시약

RPMI 1640 powder medium, fetal bovine serum(FBS),

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-710-9561, 9566 (팩스)
(E-mail) akkim@sdic.sookmyung.ac.kr

antibiotics(penicillin G sodium 10,000 units/ml, streptomycin sulfate 10,000 µg/ml), trypsin-EDTA(0.25% trypsin, 1 mM EDTA·4Na), sodium pyruvate, trypan blue는 Gibco BRL Life Technologies Inc. 제품을 사용하였고, sodium bicarbonate, *N*-2-hydroxyethyl piperazine-*N*'-2-ethane sulfonic acid(HEPES), ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt(EDTA), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue(MTT), dimethyl sulfoxide(DMSO), β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form(β-NADPH), glutathione reductase, glutathione reduced form, pyrogallol, sodium azide, tris[hydroxy-methyl]aminomethane(Tris), protein assay kit는 Sigma chemical Co. 제품을 사용하였다.

사용 기기

Electronic top loading balance(AC211S, Sartorius), digital pH meter(Mettler Delta 340), labo autoclave(Sanyo), ELISA reader(Dynatech MR5000), CO₂ incubator(New brunswick science), clean bench(한국 삼공), table top centrifuge(Hanil science industrial Co. Ltd.), microcentrifuge(micro17TR, Hanil science industrial Co. Ltd.), vacuum pump(DOA-V152-AA, Gast), inverted microscope(Olympus CK2), pipet-aid(Barnstead), vortex mixer(Broomall, PA, USA), magnetic stirrer(Corning), sonicator(2210, Branson[®]), deep freezer(OPR-DFU-128C, Operon), UV/visible spectrophotometer(Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech)를 사용하여 실험하였다.

세포 배양

실험에 사용한 세포는 mouse melanoma로부터 유래된 B16F10 cell로 한국 세포주 은행(Korean cell lines bank)으로부터 분양 받았다. 10% FBS와 항생제(penicillin G 100 sodium 10,000 units/ml, streptomycin sulfate 10,000 µg/ml), 1 mM sodium pyruvate를 포함하는 RPMI 1640 배지를 배양액으로 하여 37°C, humidified 5% CO₂ incubator에서 배양되었다. 배양액의 pH는 10 mM HEPES와 2 mg/ml sodium bicarbonate를 사용하여 7.2~7.4로 조정하였다. 25 cm² tissue culture flask나 75 cm² tissue culture flask에서 계대 배양하고 confluent되었을 때 trypsin-EDTA 용액을 처리하여 실험에 사용하였다.

흑색 추출물의 준비

한약재인 흑축은 서울 경동시장 내의 한약 건재상에서 건조상태로 구입하여 사용하였다. 흑축을 각각 100 g씩 둥근 플라스크에 넣고 80% 메탄올 3 l를 넣은 후 3시간씩 3회 가열, 추출하고 3 M 여과지를 이용하여 여과하였다. 이 여과액을 rotary vacuum evaporator에서 감압, 농축하였다. 이렇게 농축된 용액을 freeze-

dryer로 동결 건조하여 그 분말을 사용하였다.

시료의 처리

4×10⁵ cells/ml의 B16F10 melanoma cell suspension을 100π tissue culture dish에 가한 후, 배양기에서 24시간 동안 안정화시킨다. 각각의 시료를 cell suspension과 동량으로 가한 후 24시간 배양한다. dish에서 배지를 제거하고 PBS로 2회 세척하여 농도별 sample(1.0×10⁶ cells)을 얻고 상등액을 제거한 pellet을 -20°C에 저장한다. cell pellet에 cold PBS 1 ml를 가하고 얼음 위에서 한 sample 당 15초 간격으로 10초 동안 3회 sonication시킨 후, 12000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리하고 상등액만을 취하여 enzyme assay sample로 사용하였다. Sample의 protein양은 bovine serum albumin(BSA)을 standard로 사용하여 BCA protein assay에 의해 정량하였다.

Superoxide dismutase의 활성 측정

Superoxide dismutase(SOD) 활성 측정은 pyrogallol auto-oxidation의 저해를 관찰하는 Marklund의 방법을 사용하였다.^{9,10} 50 mM tris-cacodylic acid buffer(pH 8.2, 1 mM EDTA) 1 ml에 pyrogallol stock solution(0.2 mM/10 mM HCl) 약 500 µl를 가하여 1분당 0.015 정도의 흡광도 증가를 나타내도록 조절하여 standard absorbance로 사용하였다. 이 substrate 용액 1 ml에 각 sample 100 µl를 가하고 UV/visible spectrophotometer를 사용해 420 nm에서 tris-cacodylic acid buffer를 blank로 하고 1분마다 10분까지의 흡광도를 측정하고, lag phase에서 직선이 성립하는 5분에서 10분까지 1분당 흡광도 변화를 평균내어 효소 활성을 계산하였다.

Glutathione peroxidase의 활성 측정

Glutathione peroxidase(GPx)의 활성은 Flohe와 Gunzler의 방법에 의해 spectrophotometer를 사용하여 측정하였다.^{11,12} GPx의 반응동안 glutathione(GSSG)은 reduced glutathione(GSH)의 일정 농도에 대해서 제공되는 과잉의 glutathione reductase(GR)에 의해 계속 환원되며 이 때 reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH)의 산화를 관찰하였다. 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.0, 1 mM EDTA) 500 µl에 각 sample, GR, 10 mM GSH, 1 mM sodium azide를 각각 100 µl씩 넣은 후 37°C에서 10분간 예배양시킨다. 여기에 1.5 mM NADPH 100 µl를 가한 다음 3분 동안 H₂O₂가 없는 상태에서의 NADPH 소비를 관찰하였다. 1.5 mM H₂O₂를 넣고 감소한 NADPH의 흡광도가 직선이 나타나도록 340 nm에서 5분간 흡광도를 측정한다.

Catalase의 활성 측정

Catalase(CAT)의 활성 측정은 hydrogen peroxide의 분해에 따

라 감소하는 흡광도를 측정하는 Aebi의 방법을 이용하였다.¹³⁾ 50 mM phosphate buffer(pH 7.0) 100 ml당 30% H₂O₂를 넣어 10 mM substrate solution(A₂₄₀=0.5)을 만든다. 이 substrate solution 3 ml에 각 sample 100 µl를 가한 후, 43.6 M⁻¹cm⁻¹의 extinction coefficient¹²⁾를 사용하여 UV/visible spectrophotometer로 240 nm에서 phosphate buffer를 blank로 하고 1분마다 2분 동안 absorbance를 측정하였다.

세포 생존율 측정

B16F10 melanoma cells을 2.5×10⁴ cells/ml의 농도로 96-well plate의 well에 100 µl씩 가한 후, 배양기(37°C, humidified 5% CO₂)에서 24시간 동안 안정화시킨다. 각각의 시료 용액을 농도별로 각 well에 100 µl씩 넣어 실험군으로 하고, 각 시료를 녹인 용매 100 µl씩 가한 것을 대조군으로 하여 시료 용액을 넣은 후 24시간 배양한다. MTT 용액을 well 당 50 µl씩 넣어 4시간 동안 배양기에 방치한 후 원심 분리하여 상등액을 제거한다. 여기에 DMSO 원액을 well 당 50 µl씩을 가하여 1분간 흔들어주면서 formazan을 완전히 용해시켜 ELISA reader를 이용하여 흡광도(570 nm)를 측정한다.

통계처리

그래프와 표의 모든 수치는 각 실험횟수에 대한 평균과 표준 오차로 나타내었으며, 통계적 유의성에 대한 검증은 Student's t-test를 사용하여 계산하였다.

결과 및 고찰

흑측(Pharbitidis Semen, pharbitidis seed)추출물이 항산화 효소의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 추출물 단독 투여군과 산화적 스트레스를 유발하는 H₂O₂와의 병용 투여군으로 나누어 각각 SOD, GPx 그리고 CAT의 활성을 측정하였으며, 세포 독성은 MTT assay를 실시하여 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

Superoxide dismutase 활성에 미치는 영향

H₂O₂가 없는 상태에서 흑측추출물만 처리한 경우 SOD 활성이 모든 실험군에서 control보다 활성이 낮게 나타났는데, 3시간과 6시간 배양 시 control의 65%의 활성을 보이다가 시간이 지날수록 control 보다 활성이 낮아져 12시간에서는 control의 59%, 24시간에서는 60%의 활성을 나타냈다(Fig. 1). H₂O₂와의 병용 투여한 경우 control보다는 효소활성이 낮은 것으로 나타났으나 배양 15시간까지는 높은 활성을 나타냈다. H₂O₂를 단독투여한 경우는 배양 후 6시간 이후 점차 회복되는 것으로 나타났다(Fig. 2).

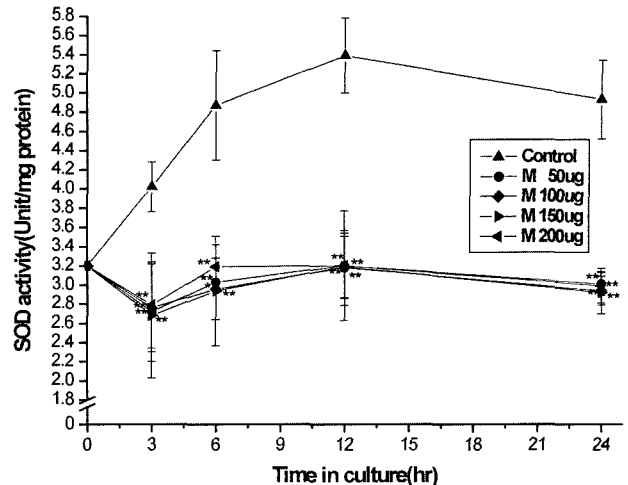


Fig. 1 – Effects of pharbitidis seed on SOD activity. The pharbitidis seed-treated cells and control cells were harvested at the indicated times and SOD activity of the extracts was measured. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05 compared with control. Control, untreated; M 50 µg, treated with 50 µg/ml pharbitidis seed; M 100 µg, treated with 100 µg/ml pharbitidis seed; M 150 µg, treated with 150 µg/ml pharbitidis seed; M 200 µg, treated with 200 µg/ml pharbitidis seed.

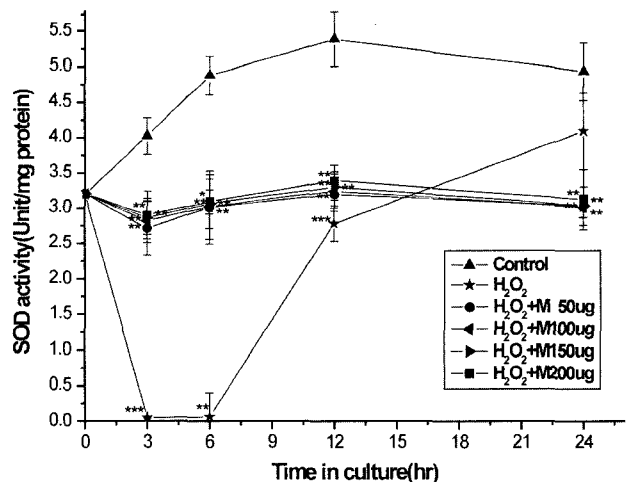


Fig. 2 – Effects of pharbitidis seed in combination with H₂O₂ on SOD activity. The pharbitidis seed-treated cells and control cells were harvested at indicated times and SOD activities of the extracts were measured. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05 compared with control. Control, untreated; H₂O₂, exposed to 2.5 mM H₂O₂; H₂O₂+M 50 µg, treated with 50 µg/ml pharbitidis seed in combination with 2.5 mM H₂O₂; H₂O₂+M 100 µg, treated with 100 µg/ml pharbitidis seed in combination with 2.5 mM H₂O₂; H₂O₂+M 150 µg, treated with 150 µg/ml pharbitidis seed in combination with 2.5 mM H₂O₂; H₂O₂+M 200 µg, treated with 200 µg/ml pharbitidis seed in combination with 2.5 mM H₂O₂.

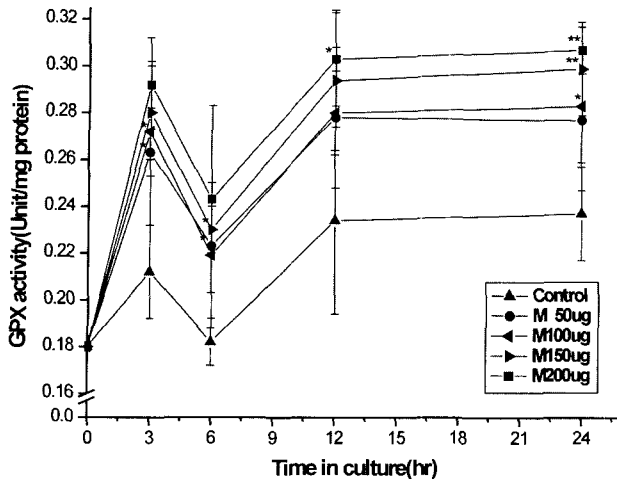


Fig. 3 - Effects of pharbitidis seed on GPx activity. The pharbitidis seed-treated cells and control cells were harvested at the indicated times and GPx activity of the extracts was measured. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ compared with control. Control, untreated; M 50 μg , treated with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pharbitidis seed; M 100 μg , treated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pharbitidis seed; M 150 μg , treated with 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pharbitidis seed; M 200 μg , treated with 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pharbitidis seed.

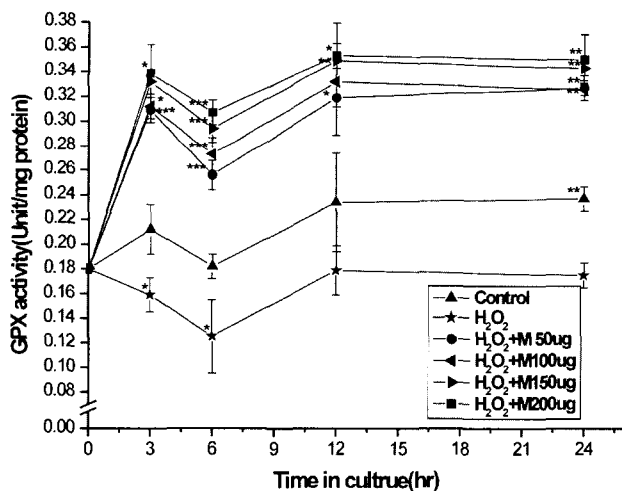


Fig. 4 - Effects of pharbitidis seed in combination with H_2O_2 on GPx activity. The pharbitidis seed-treated cells and control cells were harvested at indicated times and GPx activity of the extracts were measured. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ compared with control. Control, untreated; H_2O_2 , exposed to 2.5 mM H_2O_2 ; H_2O_2 +M 50 μg , treated with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pharbitidis seed in combination with 2.5 mM H_2O_2 ; H_2O_2 +M 100 μg , treated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pharbitidis seed in combination with 2.5 mM H_2O_2 ; H_2O_2 +M 150 μg , treated with 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pharbitidis seed in combination with 2.5 mM H_2O_2 ; H_2O_2 +M 200 μg , treated with 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pharbitidis seed in combination with 2.5 mM H_2O_2 .

Glutathione peroxidase 활성에 미치는 영향

GPx의 경우에는 효소의 활성이 가장 많이 증가하였는데 흑측 추출물 단독 투여 시에는 control 군보다 활성이 크게 증가하였고 처리한 모든 농도에서 배양시간에 따른 활성 변화가 큰 것을 볼 수 있었다. 활성변화양상은 control과 매우 유사하여 3시간까지 급격히 증가하던 효소 활성이 6시간 배양군에서는 급격히 감소하는 양상을 보였고, 다시 12시간까지 증가하다가 24시간에서는 12시간과 비슷한 활성을 나타내었으며, 모두 control보다 높은 수준이었다(Fig. 3). H_2O_2 와의 병용 투여 시에는 control이나 H_2O_2 만을 투여한 군보다도 활성이 증가하였음을 관찰할 수 있었고 변화 양상도 비슷함을 알 수 있었다(Fig. 4).

Catalase 활성에 미치는 영향

흑측추출물만을 처리한 경우 처리한 모든 농도에서 control보다 약간 낮은 수준에서 비슷한 활성을 보였고 3시간에서 최대치, 24시간에 최저치를 나타냈다. 효소활성변화 양상도 control과 유사하였다(Fig. 5).

H_2O_2 만을 투여하였을 때는 CAT의 활성을 크게 상승시켰다. 흑측추출물과 병용 투여한 경우는 효소활성이 낮아졌으나 control보다는 높게 나타났고 효소활성변화양상은 유사하였다(Fig. 6). H_2O_2 와 병용 투여한 경우에 있어서는 배양 후 3시간에서 최대치를 나타내었고, 모든 농도에서 control보다는 높고 H_2O_2 보다는 낮은 수준에서 비슷함을 알 수 있다.

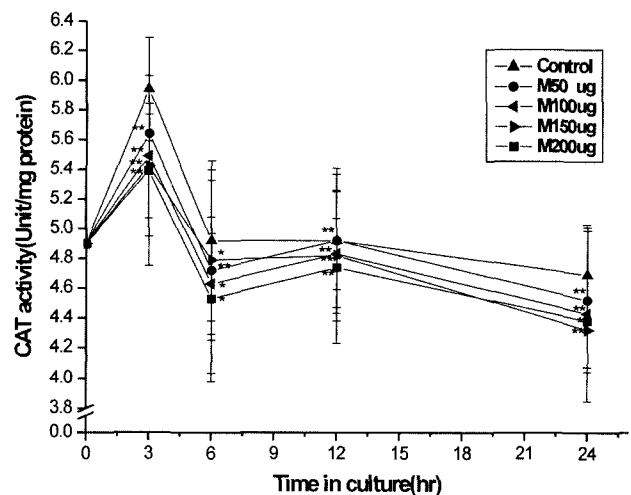


Fig. 5 - Effects of pharbitidis seed on CAT activity. The pharbitidis seed-treated cells and control cells were harvested at the indicated times and CAT activity of the extracts was measured. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ compared with control. Control, untreated; M 50 μg , treated with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pharbitidis seed; M 100 μg , treated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pharbitidis seed; M 150 μg , treated with 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pharbitidis seed; M 200 μg , treated with 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pharbitidis seed.

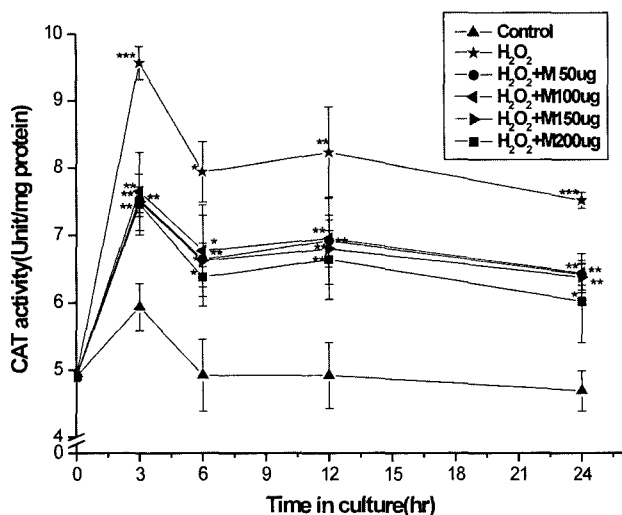


Fig. 6 – Effects of pharbitidis seed in combination with H₂O₂ on CAT activity. The pharbitidis seeds-treated cells and control cells were harvested at indicated times and CAT activity of the extracts were measured. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05 compared with control. Control, untreated; H₂O₂, exposed to 2.5 mM H₂O₂; H₂O₂+M 50 μ g, treated with 50 μ g/ml pharbitidis seed in combination with 2.5 mM H₂O₂; H₂O₂+M 100 μ g, treated with 100 μ g/ml pharbitidis seed in combination with 2.5 mM H₂O₂; H₂O₂+M 150 μ g, treated with 150 μ g/ml pharbitidis seed in combination with 2.5 mM H₂O₂; H₂O₂+M 200 μ g, treated with 200 μ g/ml pharbitidis seed in combination with 2.5 mM H₂O₂.

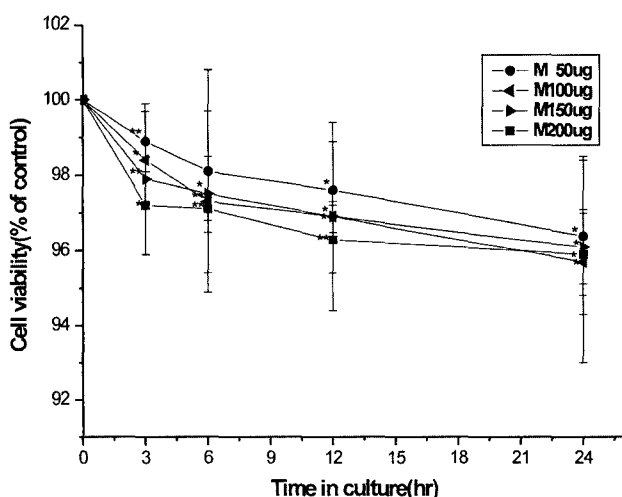


Fig. 7 – Effects of pharbitidis seed on proliferation of B16 melanoma cells. The cells were treated with various concentration of pharbitidis seed for indicated times. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05 compared with control. M 50 μ g, treated with 50 μ g/ml pharbitidis seed; M 100 μ g, treated with 100 μ g/ml pharbitidis seed; M 150 μ g, treated with 150 μ g/ml pharbitidis seed; M 200 μ g, treated with 200 μ g/ml pharbitidis seed.

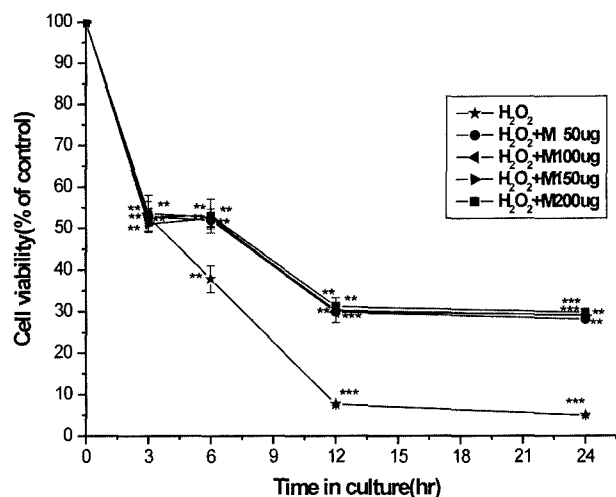


Fig. 8 – Effects of pharbitidis seed in combination with H₂O₂ on proliferation of B16 melanoma cells. The cells were treated with various concentration of pharbitidis seed for indicated times. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05 compared with control. H₂O₂, exposed to 2.5 mM H₂O₂; H₂O₂+M 50 μ g, treated with 50 μ g/ml pharbitidis seed in combination with 2.5 mM H₂O₂; H₂O₂+M 100 μ g, treated with 100 μ g/ml pharbitidis seed in combination with 2.5 mM H₂O₂; H₂O₂+M 150 μ g, treated with 150 μ g/ml pharbitidis seed in combination with 2.5 mM H₂O₂; H₂O₂+M 200 μ g, treated with 200 μ g/ml pharbitidis seed in combination with 2.5 mM H₂O₂.

B16 melanoma cell의 proliferation에 미치는 영향

MTT assay를 통하여 세포 생존율을 측정해 본 결과 0.2 mg/ml의 농도에서 24시간 배양 시 흑측의 세포 생존율은 각각 95.9%로 흑측 추출물이 세포에 미치는 영향은 거의 없음을 알 수 있다(Fig. 7). 와 병용 투여시, H₂O₂ 단독 투여군의 경우 2.5 mM 농도로 처리한 후 24시간 배양시 생존율이 거의 0에 가까운데 비하여 흑측추출물과 병용 투여시 세포 생존율이 단독 투여군에 비하여 6배 정도까지 증가하였다(Fig. 8). MTT assay를 실시한 결과 실험한 전 농도와 전 시간동안 세포 독성을 거의 나타내지 않았다.

위의 결과는 흑측 추출물만을 단독으로 투여한 경우 SOD의 활성은 control에 비해 감소하였고 GPx는 활성의 증가가 나타났으나, CAT는 control과 비교하여 별다른 차이가 없었다. 그러나 H₂O₂와 병용 투여한 경우에는 SOD의 활성만이 control보다 낮았을 뿐 다른 두 효소의 활성은 control보다 증가하였다. H₂O₂만을 투여하였을 때 나타나는 결과에서 보는 바와 같이 SOD는 H₂O₂가 높을 때 불활성화 되는 것으로 알려져 있다. 그러나 H₂O₂와 흑측추출물을 병용 투여하였을 때는 SOD 활성이 어느정도 회복되는 상태를 나타내었다.

이상의 결과들을 살펴볼 때, 흑측 추출물은 H₂O₂로 인한 산화

적 스트레스상태에 있는 악성 흑색종 세포에서 주로 GPx나 CAT와 같은 항산화 효소를 활성화시켜 과산화물을 제거시킴으로써 항산화기능을 나타내는 것으로 사료된다.

결 론

흑축이 항산화 효소의 활성화에 미치는 영향을 B16 melanoma cells에서 살펴본 결과, 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 흑축추출물만을 단독으로 투여한 군에서는 SOD가 control보다 낮은 활성을 보였고, H_2O_2 와 병용 투여한 실험 군에서는 H_2O_2 단독 투여 군보다는 높으나 control보다는 낮은 활성을 나타냈다.
2. GPx는 흑축추출물 단독 투여 군과 H_2O_2 병용 투여 군 모두에서 control에 비해 높은 활성 증가를 관찰할 수 있었다.
3. 흑축추출물 단독 투여군에서는 CAT가 control과 비슷하거나 조금 낮은 활성을 보였으나, 산화적 스트레스 상태인 H_2O_2 와의 병용 투여군에서는 H_2O_2 단독 투여군보다는 높고 control보다는 낮게 나타났다.
4. MTT assay를 통하여 이들 추출물이 B16 melanoma cells의 proliferation에 미치는 영향을 측정한 결과, 이들이 미치는 영향은 매우 작은 것으로 나타났다.

감사의 말씀

본 연구는 숙명여자대학교 2002년도 교내연구비 지원에 의해 수행되었음.

참고문헌

- 1) Terry D. Oberley, Janice L. Schultz, Ning Li and Larry W. Oberley : Antioxidant enzyme levels as a function of growth state in cell culture. *Free Radical Biol. Med.* **19**, 53 (1995).
- 2) Yasuko, Shindo and Takashi, Hashimoto : Time course of changes in antioxidant enzymes in human skin fibroblasts after UV irradiation. *J. Dermatol Sci.* **14**, 225 (1997).
- 3) Bernadette, E. K., Marianne, D. and Bernhard, P. : Protective effect against sunburn of combined systemic ascorbic acid (vitamin C) and α -tocopherol (vitamin E). *J. Am. Acad. Dermatol.* **38**, 45 (1998).
- 4) Zoltan, Gregus and Curtis D. Klaassen : Mechanisms of toxicity. In Casarett and Doull's toxicology. pp. 39-43 McGraw-Hill Com. (1996).
- 5) Kenneth S. Ranos, Enrique Chacon and Jr. Daniel Acosta : Toxic responses of the heart and vascular systems. In Casarett and Doull's toxicology. pp. 492-495. McGraw-Hill Com. (1996).
- 6) Lisa A. Brennan, Gerard M. Morris, Gillian R. Wasson, Bernadette M. Hannigan and Yvonne A. Barnett : The effect of vitamin C or vitamin E supplementation on basal and H_2O_2 -induced DNA damage in human lymphocytes. *British Journal of Nutrition.* **84**, 195 (2000).
- 7) Gavatt, V. and Voroniuc, O. : Oxidative stress and antioxidants in the diet in pathological processes at the level of the cardiovascular system. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.* **103**, 37 (1999).
- 8) Elke, Rohrdanz and Regine, Kahl : Alterations of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide. *Free Radical Biol. Med.* **24**, 27 (1998).
- 9) Stefan, Marklund and Gudrun, Marklund : Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**, 469. (1974).
- 10) Eugene F. Roth, Jr. and Harriet S. Gilbert : The pyrogallol assay for superoxide dismutase: absence in glutathione artifact. *Anal. Biochem.* **137**, 50 (1983).
- 11) Flohe, Leopold and Wolfgang A. Gunzler : Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology* **105**, 93 (1984).
- 12) Donald E. Paglia and William N. Valentine : Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. & Clin. Med.* **70**, 158 (1967).
- 13) Hugo, Abei : Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* **105**, 93 (1984).