

## 한우 무손상 적혈구의 superoxide 및 과산화수소 제거능력

조종후·박상열

전북대학교 수의과대학  
(1998년 1월 5일 접수)

### Scavenge of superoxide and hydrogen peroxide by bovine intact red blood cells

Jong-hoo Cho, Sang-youel Park

*College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University*

(Received Jan 5, 1998)

**Abstract** : The ability of bovine intact red blood cells to scavenge superoxide and hydrogen peroxide by superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase was investigated. Intact red cells(up to 0.4%) suspensions did not inhibit ferricytochrome c reduction by superoxide in the superoxide generating system. On the other hand, intact red cell(0.4%) suspensions almost completely inhibit ferrocycytochrome c oxidation by hydrogen peroxide. The ability of intact red cells to scavenge hydrogen peroxide was mainly attributed to either membrane bound catalase or glutathione peroxidase.

The scavenge of hydrogen peroxide by 0.1~0.2% intact red cells showed a trend of dependence on mainly glutathione peroxidase. However, at blood cell concentration higher than 0.3%, the process depended upon peroxidase-independent scavengers like catalase.

Enhancement of ferrocycytochrome c oxidation by red cells treated with aminotriazole proved that the protection against hydrogen peroxide was due to catalase, while the protection in the presence of glutathione indicated scavenging effect of glutathione peroxidase against hydrogen peroxide.

**Key words** : superoxide, superoxide dismutase, hydrogen peroxide, catalase, glutathione peroxidase.

## 서 론

인체의 무손상 적혈구는 세포내에서 생성되는 superoxide ( $O_2^-$ ), 과산화수소( $H_2O_2$ )와 이들 유도체 등 유해산소종을 superoxide dismutase, catalase 및 hexose monophosphate shunt에서 생성되는 NADPH의 도움으로 glutathione peroxidase의 협력작용에 의하여 즉시 제거할 수 있으며 이외에도 hemoglobin의 oxidase 또는 peroxidase로서의 촉매기능과 항산화제인  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -carotene 및 ascorbic acid 등이 유해산소종의 독성을 방어할 수 있는 것으로 보고되었다<sup>1-5</sup>.

적혈구외의 혈류중에는 유해산소종들이 존재하며, 이들 산소종은 세포막 투과성이 있으므로 적혈구에서 생성되어 유출될 수도 있고<sup>6</sup> 백혈구 호중구(neutrophil)에 의하여 생성되는 superoxide와 과산화수소가 myeloperoxidase에 의하여 hydroxyl radical 및 hypochlorous acid로 전환하여 살균작용에 이용되며<sup>7</sup> 이 과정에서 과량으로 생성된 superoxide와 과산화수소는 혈류중에서 독성을 발휘할 수 있을 것이다<sup>8-12</sup>. 그러나 혈장에는 유해산소종을 제거할 수 있는 superoxide dismutase, catalase 및 glutathione peroxidase 등의 활성이 매우 낮은 것으로 보고되었다<sup>13</sup>. 따라서 이들 유해산소종을 제거함으로써 혈액중의 세포 또는 모든 기능성 단백질을 비롯한 유용한 화합물을 보호할 수 있는 장치가 요구되며, 인체의 무손상 적혈구는 혈류중의 유해산소종에 대한 제거능력이 있음이 보고되었다<sup>2,14-19</sup>. Agar *et al*<sup>2</sup>은 랫트의 leukemic cell의 용해, Toth *et al*<sup>14</sup>은 폐수종의 원인이 되는  $O_2^-/H_2O_2$  발생실험, Van Asbeck *et al*<sup>17</sup>은 고산소혈증에 노출된 랫트의 치사효과 등에 관한 실험에서 인체의 무손상 적혈구가 이들에 대하여 방어기능을 발휘하는 것을 확인하였으며, 이러한 효과는 catalase와 glutathione 대사에 의하여 이루어진다고 하였다. Cohen과 Hochstein<sup>14</sup>은 인체 적혈구내에서의 과산화수소 제거는 일차적으로 glutathione peroxidase에 의하여 이루어진다고 하였으나 Gaetani *et al*<sup>4,5,18</sup>은 catalase에 의하여 주로 제거되고 약 17%만이 glutathione peroxidase에 의하여 제거된다고 하였다. 인체 무손상 적혈구에 의한 과산화수소의 제거는 적혈구 내에서와 달라 Gaetani *et al*<sup>5,18</sup>은 1차적으로 glutathione peroxidase에 의하여 우선하여 제거되며, 결과적으로는 catalase와 glutathione peroxidase가 각각 절반씩 나누어 제

거한다고 하였다.

Nasuoka *et al*<sup>19</sup>은 인체와 랫트 및 마우스의 무손상 적혈구에 의한 과산화수소 제거율은 랫트 > 인체 > 마우스로 동물종에 따라 차이가 있음을 밝혔다. 그러나 무손상 적혈구의 막결합 catalase 및 glutathione peroxidase에 의한 혈류중의 과산화수소 제거에 있어서 상호 협조적인 방어효능에 대한 상대적 관계 또는 인체의 적혈구에 의한 방어효과가 여타의 포유동물 적혈구에 의해서도 같은 효과를 나타내는지 의문이 되어 왔다. 이에 따라 본 연구에서는 한우의 무손상 적혈구에 의한 superoxide와 과산화수소 제거능력을 조사하고 과산화수소를 제거하는 catalase와 glutathione peroxidase간의 상대적 효율에 대하여 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

분석시약 및 실험기기 : Catalase, ferricytochrome c, hypoxanthine, xanthine oxidase, glutathione 및 3-amino-1,2,4-triazole은 Sigma(USA) 회사제 였고, ferrocyclochrome c는 ferricytochrome c 용액에 sodium dithionite를 가하여 환원시켜 사용하였다. 반응액의 흡광곡선은 UV-2100 double beam spectrophotometer(Shimadzu, Japan)를 사용하여 작성하였다.

무손상 적혈구의 분리 : 전북 전주 도축장에서 암수 구분없이 한우로부터 heparin이 들어있는 용기에 채혈하여 혼합한 후 즉시 실험실에 옮겨 적혈구를 분리하였다. 적혈구 분리는  $1000 \times g$ 에서 5분간 원심분리하여 혈장과 백혈구를 제거하고 pH 7.4의 0.01M 인산완충식염수(PBS)로 3회 세척한 후 1% 적혈구 부유액을 만들어 실험시 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

무손상 적혈구에 의한 superoxide 제거능력 측정 : 적혈구 농도에 따른 superoxide 제거능력을 측정하기 위하여 반응액 1ml중 적혈구 농도 0, 0.1, 0.2 및 0.4%에 해당하는 1% 적혈구 부유액 0-0.4ml를 비색관에 취하고 여기에 발생되는 과산화수소를 제거하기 위하여 catalase (650U/ml)를 가하고 superoxide에 의한 ferricytochrome c의 환원상태를 측정하기 위하여 ferricytochrome c(15 $\mu$ M)와 superoxide 생성을 위하여 hypoxanthine(150 $\mu$ M) 및 xanthine oxidase(0.01U/ml)를 가한 후 PBS를 1ml로 정용하여 혼합 4분 후에 37 $^{\circ}$ C에서 파장 480-650nm 사이의 흡광곡선을 작성하였다.

무손상 적혈구에 의한 과산화수소 제거능력 검증 : 과산화수소를 직접 제거하는 catalase와 glutathione peroxidase는 다같이 적혈구 외막에 존재할 수 있으므로 두 효소에 의한 과산화수소 제거능력을 조사하였다. 원심분리관에 반응액 3ml 중 적혈구 0, 0.1, 0.2 및 0.4%에 해당하는 1% 적혈구 부유액을 취하고 여기에 과산화수소에 의한 산화지표물질로 ferrocyanide c(15 $\mu$ M)와 glutathione peroxidase의 조효소인 환원 glutathione(2.5mM)을 가한 후 마지막으로 0.9mM에 해당하는 과산화수소를 가하여 혼합한 후 즉시 1000 $\times$ g에서 1분간 원심분리하였다. 상청액을 분리하여 비색관에 취하고 과산화수소에 의한 ferrocyanide c의 산화에 대하여 적혈구 농도에 따른 방어능력을 파장 480~650nm에서의 흡광곡선을 작성하여 조사하였다.

무손상 적혈구막 catalase와 glutathione peroxidase 각각에 의한 과산화수소제거능력을 확인하기 위하여 위의 실험에서 glutathione을 제거하여 glutathione peroxidase의 작용을 차단시킨 후 흡광곡선을 작성하여 그 차이로서 적혈구막 catalase와 glutathione peroxidase 각각에 의한 과산화수소에 기인하는 ferrocyanide c 산화의 억제능력을 산출하였다.

적혈구막 결합 catalase와 glutathione peroxidase에 의한 과산화수소 제거의 증명 : 적혈구막 결합 catalase에 의한 과산화수소의 제거를 증명하기 위하여 반응액중 catalase 활성차단제인 3-amino-1,2,4-triazole로 적혈구를 처리하여 실험하였다. 처리는 적혈구 부유액(25%), aminotriazole(0.05M) 및 과산화수소(4.5mM)를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 작용시킨 후 원심분리하여 catalase가 불활화된 aminotriazole 처리 적혈구를 얻었다. Glutathione이 결합된 상태에서 aminotriazole 처리 적혈구와 처리하지 않은 적혈구를 사용하여 얻은 흡광곡선의 차이는 catalase에 의한 것임을 증명한다. Glutathione peroxidase에 의한 과산화수소 제거의 증명은 glutathione의 첨가와 첨가하지 않은 반응액의 흡광곡선의 차이로서 증명된다.

## 결 과

무손상 적혈구에 의한 superoxide의 제거능력 : 반응액중 0.1% 내지 0.4%의 적혈구 농도에서 hypoxanthine과 xanthine oxidase의 반응에 의하여 생성된 superoxide가

ferricytochrome c의 ferrocyanide c로의 환원에 미치는 영향은 Fig 1과 같았다. 즉, 적혈구가 존재하지 않는 반응액 중에서 ferricytochrome c의 환원에 의하여 생성된 ferrocyanide c의 흡광곡선과 0.1~0.4%의 적혈구 존재하에서 ferricytochrome c의 환원에 의한 흡광곡선은 차이를 보이지 않았으며, 따라서 무손상 적혈구막 결합 superoxide dismutase의 존재를 증명할 수 없었다.

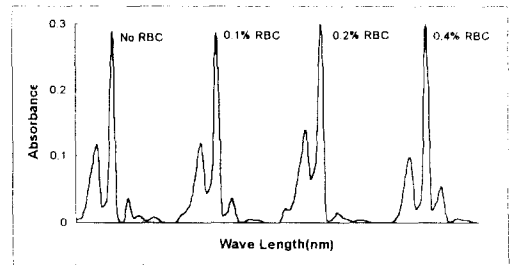


Fig 1. Effect of intact red blood cells on reduction of 15 $\mu$ M ferrocyanide c by superoxide ions generated by hypoxanthine oxidase in reaction mixture. Spectra between 480 and 650nm were recorded after reaction with superoxide.

무손상 적혈구에 의한 과산화수소 제거능력 : 반응액중 ferrocyanide c는 과산화수소의 첨가로 산화되어 ferricytochrome c를 형성하고 550nm에서의 흡광 peak를 소실시킨다. 이때 첨가된 무손상 적혈구는 막결합 효소인 catalase 및 glutathione peroxidase의 존재시 과산화수소를 제거하여 과산화수소에 의한 ferrocyanide c의 산화를 방지하며 적혈구 농도에 따라 흡광의 차이를 나타내게 된다. Fig 2-A는 glutathione 존재하에서 무손상 적혈구 농도에 따른 ferrocyanide c의 산화정도를 나타낸 것으로 적혈구 농도가 높을수록 산화를 더 억제하였으며 따라서 적혈구막 결합 과산화수소 제거효소의 존재를 의미한다. 과산화수소 제거효소는 catalase와 glutathione peroxidase임으로 이 두 효소중 어느 효소에 의한 것인지 확인하기 위하여 반응액중 glutathione을 제거한 상태에서 무손상 적혈구만 첨가하여 ferrocyanide c의 산화정도를 조사하였으며, 그 결과 Fig 2-B와 같았다. 즉, 적혈구 농도가 높을수록 ferrocyanide c의 산화는 더 억제되는 경향이었으나 glutathione이 공존할 때보다는 더 높은 산화를 보였으며 따라서 glutathione의 존재유무에 따른 차이는 적혈구막 결합 glutathione peroxidase에 의한 과산화수소 제거능력을 반영하는 것이다. 또한 glu-

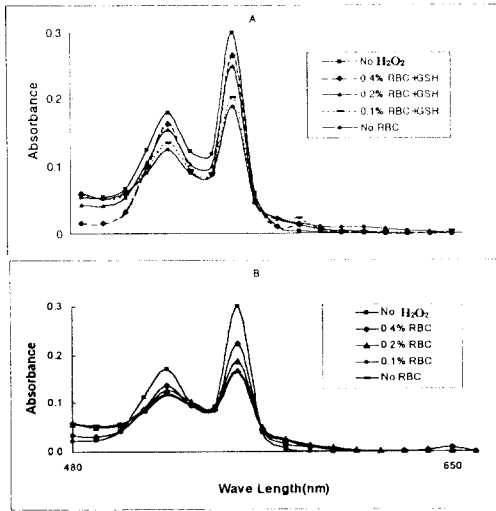


Fig 2. Effect of intact red blood cells in the presence (A) or absence (B) of glutathione (GSH) on oxidation of 15µM ferrocytochrome c by 0.9mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Spectra between 480 and 650nm were recorded immediately after reaction with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

tathione이 존재하지 않는 조건에서 적혈구에 의한 ferrocytochrome c 산화의 억제는 catalase를 포함하는 glutathione peroxidase 비의존성 억제인 것으로 확인하였다.

이상의 결과로부터 glutathione peroxidase 의존성과 비의존성을 합한 과산화수소 제거능에서 비의존성에 의한 제거능을 감하여 glutathione peroxidase 의존성과 비의존성 각각에 의한 제거능력을 비교할 수 있으며 ferrocytochrome c 산화능으로 확인된 각각의 과산화수소 제거능력은 Fig 3과 같다. 즉, 0-0.2%까지의 적혈구 농도에서

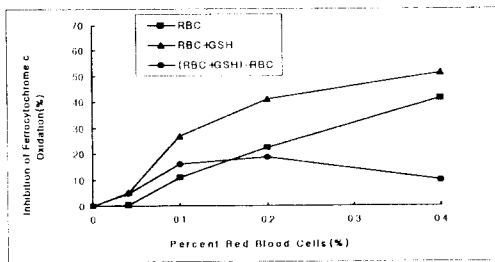


Fig 3. A comparison of inhibition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent ferrocytochrome c oxidation by intact red blood cells in the presence or absence of glutathione(GSH). Data were calculated from the mean absorbance differences of 3 samples between the 550nm peak and 535nm trough for a measure of the extent of oxidation.

glutathione peroxidase 의존성과 비의존성 공히 과산화수소 제거능력을 증대시켰으나 glutathione peroxidase 의존성이 컸고, 0.2-0.4% 농도에서는 비의존성을 증대시켰으며, glutathione peroxidase 의존성은 크게 감소하는 경향이 있었다.

적혈구 막결합 catalase 존재의 증명 : 막결합 catalase의 존재를 증명하고자 catalase를 불활화시키는 aminotriazole로 처리한 적혈구를 반응액에 가하여 ferrocytochrome c의 산화정도를 조사하여 Fig 4의 결과를 얻었다. Aminotriazole 처리 적혈구 농도에 따라 차이를 보이긴 하였으나 과산화수소에 의한 ferrocytochrome c의 산화가 크게 진행된 것으로 보아 반응액중의 glutathione peroxidase 비의존성 과산화수소 제거는 적혈구 막결합 catalase에 크게 의존하고 있음을 증명하였다.

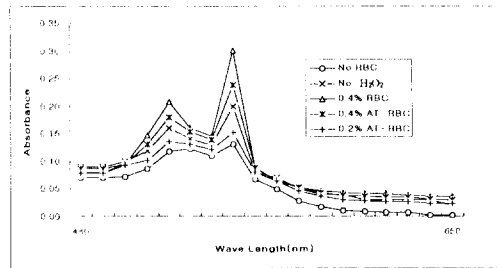


Fig 4. Effect of intact red blood cells treated with aminotriazole (AT), a catalase inhibitor, on oxidation of 15µM ferrocytochrome c by 0.9mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Spectra between 480 and 650nm were recorded immediately after reaction with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

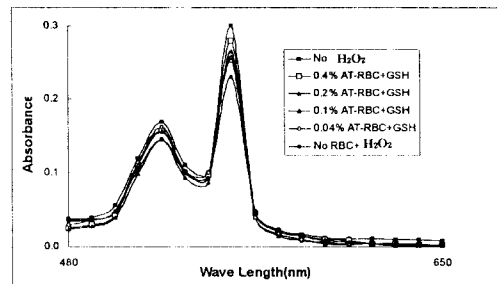


Fig 5. Effect of intact red blood cells treated with aminotriazole (AT), a catalase inhibitor, in the presence of glutathione(GSH) on oxidation of 15µM ferrocytochrome c by 0.9mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Spectra between 480 and 650nm were recorded immediately after reaction with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

적혈구 막결합 glutathione peroxidase의 증명 : 막결합 catalase를 불활화시키기 위하여 aminotriazole을 처리한 적혈구를 glutathione과 함께 반응액에 가하여 ferrocyanochrome c의 산화억제 유무를 조사하여 Fig 5의 결과를 얻었다. Aminotriazole을 처리한 적혈구의 농도를 증가시키면 따라 glutathione의 존재하에서 ferrocyanochrome c의 산화가 크게 억제되었으며, 이는 glutathione peroxidase에 의존하고 있음을 증명한다.

## 고 찰

산소분자에 1개의 전자를 얻어 생성되는 superoxide는 매우 강력한 반응을 나타내는 산소종으로 superoxide dismutase에 의하여 분자산소와 과산화수소로 제거된다. 그러나 superoxide 생성계에 한우 적혈구를 첨가하였을 때 superoxide에 의한 ferrocyanochrome c의 환원을 억제하지 못하였으며, 따라서 적혈구 막결합 superoxide dismutase가 존재하지 않는 것으로 추정된다(Fig 1). Winterbourn과 Stern<sup>16</sup>은 인체 적혈구 추출물이 superoxide에 의한 ferrocyanochrome c의 환원을 억제하여 적혈구내에 superoxide dismutase의 존재를 확인하였으나 무손상 적혈구는 ferrocyanochrome c의 환원을 억제하지 못함을 밝혀 적혈구 외막에 의한 superoxide의 제거능력이 없다고 하였으며, 한우 적혈구도 인체 적혈구 외막과 같이 superoxide 제거능력이 없는 것으로 생각된다.

Superoxide는 superoxide dismutase의 작용이 없더라도 전자를 얻어 신속히 과산화수소를 생성할 수 있으며, 과량생성된 과산화수소는 catalase와 glutathione peroxidase에 의하여 제거된다. 따라서 혈류중에 존재할 수 있는 과산화수소를 한우 적혈구가 제거할 수 있는지 검증하였다. 무손상 한우 적혈구는 glutathione 존재하에 첨가한 과산화수소에 의한 ferrocyanochrome c의 산화를 억제하였으며, glutathione을 제거한 상태에서는 ferrocyanochrome c의 산화를 증대시킴으로써 적혈구막 결합 glutathione peroxidase 의한 과산화수소 제거를 입증하였다(Fig 2). 그러나 glutathione이 존재하지 않는 상태에서 ferrocyanochrome c의 완전 산화가 이루어지지 않은 것으로 보아 과산화수소의 일부는 적혈구막의 catalase를 포함하는 glutathione peroxidase 비의존성 요인들의 협력작용에 의하여 제거되는 것으로 생각된다. Glutathione 존재하에 적혈구에 의한 산화억제에서 glutathione을 가하지 않은 적혈구만

으로 이루어진 산화억제를 뺀 나머지 산화억제는 glutathione peroxidase의 작용에 의한 것으로 판단된다. 이 결과는 0.04-0.4%의 적혈구 농도에 따라 차이를 보였으며, glutathione peroxidase 의존성과 catalase를 포함하는 glutathione 비의존성의 상대적 작용 백분율을 보면 저농도의 적혈구 농도에서는 glutathione peroxidase 의존성에 의한 산화 억제율이 비의존성에 의한 산화 억제율보다 월등히 높았으며, 적혈구 농도가 증가함에 따라 glutathione peroxidase 의존성은 낮아져서 0.4% 적혈구농도에서는 비의존성에 의한 ferrocyanochrome c 산화억제가 상대적으로 월등히 높았다(Fig 3). 이러한 결과로 보아 과산화수소의 제거가 적혈구의 glutathione peroxidase에 의하여 1차적으로 이루어지고 glutathione peroxidase 비의존성 특히 catalase에 의한 과산화수소의 제거로 이어지는 것이 아닌가 생각된다. 이상의 결과들은 인체의 무손상 적혈구가 과산화수소에 의한 랫트 폐의 손상과 소의 폐동맥 내피세포에 대한 손상을 방지한다는 Toth *et al*<sup>15</sup>의 보고와 Winterbourn과 Stern<sup>16</sup>의 인체 적혈구에 의한 과산화수소 제거에 관한 보고 및 Cohen과 Hochstein<sup>14</sup>의 인체 적혈구에서 과산화수소 제거의 1차적 처리는 glutathione peroxidase에 의하여 이루어진다는 보고와 Gaetani *et al*<sup>18</sup>의 인체 무손상 적혈구에 의한 과산화수소 제거는 glutathione peroxidase와 catalase가 절반씩 나누어 처리하며, 1차적으로는 glutathione peroxidase가 우선한다<sup>5</sup>는 보고에 비추어 한우의 무손상 적혈구도 과산화수소 제거능력을 확신할 수 있으며, 이는 glutathione peroxidase 의존성 및 catalase를 포함하는 glutathione peroxidase 비의존성 요인에 의한 과산화수소 제거능력이 입증되었다(Fig 4, 5), 그러나 본 실험에서 적혈구 농도가 증가함에 따라 glutathione peroxidase 비의존성 과산화수소 제거가 증가하였으며, 이는 Gaetani *et al*<sup>18</sup>의 보고와는 다른 것으로 더 추후할 과제로 생각된다. 또한 catalase의 억제물질인 aminotriazole로 처리한 적혈구가 glutathione을 첨가하지 않은 상태에서 과산화수소에 의한 ferrocyanochrome c 산화를 어느정도 억제하는 경향을 보였으며, 이는 적혈구막 catalase와 glutathione peroxidase 이외에 적혈구막에 다른 항산화물질의 존재를 암시하는 것으로 이와 관련한 항산화제의 협력작용에 관한 연구가 필요하다고 생각된다. 적혈구막의 catalase와 glutathione peroxidase가 과산화수소 제거의 주요 역할을 담당하는 두 효소중 catalase를 aminotriazole로 불활화시

킬 때의 영향을 관찰한 바 glutathione peroxidase에 의하여 보상되는 경향을 보였으며 이로 보아 기질농도( $H_2O_2$ )가 낮을 때 catalase가 불활화되면 glutathione peroxidase가 그 역할을 대행할 수 있는 것으로 생각되며 Gaetani *et al*<sup>18</sup>이 인체 무손상 적혈구에서 catalase와 glutathione peroxidase가 과산화수소 절반씩을 제거할지라도 catalase의 98%가 활성을 잃으면 glutathione peroxidase 의존성이 증가하였으며, 따라서 glutathione peroxidase는 속도조절 효소인 것 같다고 한 보고와 관련있는 것으로 보인다.

이상의 결과를 종합하여 보면 혈류중 유리되는 superoxide는 superoxide dismutase에 의하여 제거되지 못하고 과산화수소로 전환되어 적혈구 막결합 glutathione peroxidase와 catalase에 의하여 대부분 제거되며 일부는 항산화제에 의하여 방어되는 것으로 생각된다. 혈액과 세포내의 기능분자 또는 기능세포들은 유해산소종에 항시 노출되어 있어 손상받기 쉬우므로 생명체의 건강유지를 위하여 이를 방어하기 위한 노력은 매우 중요하다. 산소독을 제거하기 위한 생명체 자체의 기능을 극대화하기 위한 glutathione peroxidase 및 catalase의 활성을 유지할 수 있는 조건과 환경, 특히 항산화제와 같은 보존물질들의 역할과 적정농도 및 협력작용에 관한 계속적인 연구 노력이 필요하다고 생각된다.

## 결 론

한우 무손상 적혈구에 의한 superoxide 및 과산화수소 제거능력을 검정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 0.1~0.4% 한우 무손상 적혈구는 superoxide 제거능력이 없었다.
2. 0.1~0.4% 한우 무손상 적혈구는 과산화수소 제거능력을 가졌으며 0.4% 무손상 적혈구는 0.9mM 과산화수소를 90% 이상 제거하였다.
3. 한우 무손상 적혈구에 의한 과산화수소의 제거는 대부분 막결합 glutathione peroxidase와 glutathione peroxidase 비의존성이었고, glutathione peroxidase 비의존성 제거는 막결합 catalase에 크게 의존하였다.
4. 적혈구막 결합 catalase에 의한 과산화수소의 제거는 catalase 불활화제인 3-amino-1,2,4-triazole 첨가시험으로 확인되었고, glutathione peroxidase에 의한 과산화수소 제거는 glutathione을 제거한 상태에서의 반응과 glutathione 존재하에서 catalase 불활화시의 반응으로 확인되었다.

5. Catalase 불활화시 과산화수소의 제거는 glutathione peroxidase에 의하여 보상되는 경향을 보였다.

## 참 고 문 헌

1. Stocker R, Frei B. Endogenous antioxidant defences in human blood cells. In Sies H, ed Oxidative stress, Academic Press Ltd, London : 234-238, 1991.
2. Agar NS, Sadrzadeh SMH, Halaway PE, *et al*. Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense? *J Clin Invest*, 77:319-321, 1986.
3. Sutton HC, Roberts PC, Winterbourn PC. The rate of reaction of superoxide reaction of the superoxide radical ion with oxy- and met-hemoglobin. *Biochem J*, 155:503-510, 1976.
4. Gaetani GF, Galiano S, Canepa L, *et al*. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxication of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood*, 73:334-339, 1989.
5. Gaetani GF, Ferraris AM, Rolfo M, *et al*. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood*, 87:1595-1599, 1996.
6. Lynch RE, Fridovich I. Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical. *J Biol Chem*, 253:4697-4699, 1978.
7. Test ST, Weiss SJ. Quantitative and temporal characterization of the extracellular  $H_2O_2$  pool generated by human neutrophils. *J Biol Chem*, 259:399-405, 1984.
8. Weiss SJ, Lobuglio F. Phagocytes generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Invest*, 47:5-18, 1982.
9. Grisham MB, Jefferson MM, Thomas EL. Role of monochloramine in the oxidation of erythrocyte hemoglobin by stimulated neutrophils. *J Biol Chem*, 259:6766-6772, 1984.
10. Grisham MB, Jefferson MM, Melton DF, *et al*. Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils. *J Biol Chem*, 259:10404-10413, 1984.
11. Thomas EL, Grisham MB, Melton DF, *et al*. Evidence for a role of taurine in the *in vitro* oxidative tox-

- icity of neutrophils toward erythrocytes. *J Biol Chem*, 260:3321-3329, 1985.
12. McCord JM. Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. *Engl J Med*, 312:159-163, 1985.
  13. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine. some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys*, 246: 501-514, 1986.
  14. Cohen G, Hochstein P. The primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry*, 2:1420-1427, 1963.
  15. Toth KM, Clifford DP, Berger EM, *et al*. Intact human erythrocytes prevent hydrogen peroxide-mediated damage to isolated perfused rat lungs and cultured bovine pulmonary artery endothelial cells. *J Clin Invest*, 74:292-295, 1984.
  16. Winterbourn CC, Stern A. Human red cells scavenge extracellular hydrogen peroxide and inhibit formation of hypochlorous acid and hydroxyl radical. *J Clin Invest*, 80:1486-1491, 1987.
  17. Van Asbeck BS, Hoidal J, Vercellotti GM, *et al*. Protection against lethal hyperoxia by tracheal insufflation of erythrocytes: Role of red cell glutathione. *Science*, 227:756-759, 1985.
  18. Gaetani GF, Kirkman HN, Mangerini R, *et al*. Importance of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood*, 84:325-330, 1994.
  19. Nasuoka N, Wakimoto M, Ubuka T, *et al*. Spectrophotometric determination: catalase activity and rates of hydrogen peroxide removal by erythrocytes. *Clin Chim Acta*, 254:101-112, 1996.
-