

## Tricarboxylic acid 회로를 차단한 흰쥐의 조직에서 Superoxide Dismutase에 관한 연구

김 일

(단국대학교 화학과)

### A Study on Superoxide Dismutase from various Tissue of the Tricarboxylic acid cycle blocked Rat

Kim, Yil

Department of Chemistry Dankook University, Korea

This study was carried out to observe the formation of superoxide radicals and the changes in the activities of superoxide dismutase (EC. 1.15.1.1.) from the various organs of a rat which was blocked tricarboxylic acid cycle. In order to block the tricarboxylic acid cycle, the beta-fluoroethylacetate was injected into peritoneal cavity of rat and removed the various tissues from the rat at intervals of an hour. By tissue extracts being prepared by the method of Weigiger and Fridovich the activities of superoxide dismutase, aconitase, and contents of blood glucose, citrates, and superoxide radicals were determined. The experimental results are summarized as follows:

Accumulation of citrates is increased within three hours after treatment in the all tested tissues, especially, in the heart and spleen they are higher than one of other tissues as 12 and 20 times of control. The activities of aconitase are inhibited to 30-35% on an hour after beta-fluoroethylacetate treatment comparing with that of control rat. The content of blood glucose is increased to 1.6 fold of normal value after 5 hours of treatment. In all tested tissues, superoxide radicals are formed in the heart as 0.26 micromoles per gram tissue between one and two hours after treatment. The activities of total superoxide dismutase are increased between one and three hours after treatment in the all tested tissues and one of these enzymes in heart is highest. The activities of superoxide dismutase containing Mn are also increased with an increase of total superoxide dismutase activities.

Mitochondria는  $H_2O_2$ 를 생성하며 superoxide anion( $O_2^-$ )도 생성됨이 확인되었다(Boveris, et al., 1976). Haber, et al. (1934)는  $H_2O_2$ 가 superoxide anion과 반응하여 hydroxyl radical ( $OH\cdot$ )이 형성됨을 밝혔으며, 산소로 호흡하는 미생물체(Neurospora, Steptomyces mutans, E. coli) 및 고등동물은 superoxide anion을 제거하는 Superoxide dismutase (EC. 1.15.1.1: SOD)를 가진다.

Krebs cycle이 원활히 운영되지 않으면 mitochondria내의 전자수송관계가 안정성을 잃고

호흡연쇄반응의 조건이 어렵게 되며 전자전달계에 관계되는 화합물들의 자기산화로 인하여 superoxide radical의 생성이 증가될 것이라 생각되어 필자는 krebs cycle을 차단함으로써 생성될 것으로 기대되는 superoxide radical 및 SOD의 활성도 변화를 관찰하고자 본실험을 계획하게 되었다. Krebs cycle이 열리는 첫단계를 촉매하는 citrate synthase는 acetyl coA와 oxaloacetate를 축합하여 citrate를 합성하지만 monofluoroacetyl coA로부터 monofluoro citrate도 형성된다. 이 fluorocitrate자체는 독

성이 없지만 krebs cycle의 다음단계인 aconitase에 대해서는 강력한 억제제로 작용하기 때문에 더이상 반응이 진행되지 않고, 체내에 citrate가 축적되어 생물이 죽게되므로 "lethal synthesis"로 알려져 있다. 필자는 이러한 기전을 이용하여 krebs cycle을 차단시키기 위하여 비교적 2 차독성이 적은  $\beta$ -fluoroethylacetate를 흰쥐의 복강에 주입시키고 시간의 경과에 따라 차단되었을 때 나타나는 생리적인 변화를 관찰확인하고 superoxide anion과 이에 대한 방어기전으로서의 SOD의 역할을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 실험동물

Cytochrome C, Xanthine, Bobine serum albumin과 Xanthine oxidase등은 Sigma제품을 사용하였고,  $\beta$ -fluoroethylacetate, Sodium deoxychlorate등은 E. Merck 제품을, 그 이외의 일반적인 제품은 일본제 특급 또는 일급을 사용하였다. 실험에 사용된 흰쥐는 NCI 순계 Donryu rat로서 성별에 관계없이 240~260g된 것을 사용하였다.

### Krebs cycle의 차단과 시료의 조제

체중 240~260g 되는 흰쥐를 성별에 관계없이 선택하여 0.1ml의  $\beta$ -fluoroethylacetate를 50ml의 0.9% NaCl에 희석한 후 이 용액을 체중 100g당 0.25ml씩을 복강에 주사 하였고, 대조군은 같은양의 0.9% NaCl만을 주사하였다. 이렇게 처리한 실험동물을 30분 및 60분마다 생리적인 변화를 관찰하고 3마리씩 random sampling하고 다음과 같은 방법으로 시료를 조제하였다. 대조군과 실험군에서 선택된 흰쥐는 decapitation에 의해 희생시키고 혈액 및 각 장기를 채취하였으며 각 장기는 10배용량의 0.1M Sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 가해 teflon pestle homogenizer로 균일화 하였다. 이 균일액은 125W에서 5분간 Sonification(B-ranson Sonifier) 하고 냉동원심분리기(Beckman 5-21B)로 700×g에서 10분간 원심분리하여 그 상정액을 수집하였다. (Weisiger, et al.

1973).

### 차단(Blocking)의 확인

Rectal temperature의 측정; 정상 및  $\beta$ -fluoroethylacetate를 투여한 시간부터 생리적인 Symptom을 관찰하고 매시간 희생되기 직전에 rectal temperature를 측정하였다.

**Aconitase의 활성도 측정;** Fluorocitrate의 생성에 의해 그 활성도가 억제 될것으로 기대되는 aconitase (EC. 4. 2. 1. 3)의 활성도 측정은 Christian (1965)의 방법에 의해서 다음과 같이 측정하였다. 0.1M DL-isocitrate를 함유한 0.05M Sodium phosphate buffer (pH 7.0)용액 2.9ml와 0.1ml의 시료를 취해서 잘 섞은후 파장 240nm에서 흡광도의 증기를 측정하여 활성도를 구하고 mg단백질로 나눈 값을 비활성도로 정하였다.

Citrate의 정량; 조직중에 축적된 citrate의 함량을 정량하기위하여 membrane filter (ultra-sart ultrafilter collodion bags)를 사용하여 단백질등 고분자 물질을 제거한 다음, round bottom flask에 취하여 evaporation시킨후 butyl alcohol과 conc- $H_2SO_4$ 를 첨가하여 butyl esterfication시키고 gas chromatograph (varian 3700)에 의하여 정량하였다.

혈당의 정량; 정상 및 krebs cycle이 blocking된 흰쥐의 혈중 glucose량을 정량하기 위하여 10% EDTA로 혈액응고를 방지시킨 흰쥐의 혈액을 Folin-Wu 법으로 단백질을 제거한 용액을 만들고 Somogyi, et al. (1970)법에 의하여 정량하였다.

### Superoxide radical의 측정

본 실험조건에서 각 장기내에 생성된 superoxide radical은 McCord, et al. (1969) 및 Badwey, et al. (1979)의 방법에 따라 ferricytochrome C의 환원속도를 이용하여 측정하였다. 즉 0.1mM EDTA를 함유한 50mM 인산염 완충용액 (pH 7.8) 420 $\mu$ l에 cyanide의 농도가 50 $\mu$ M이 되도록 20 $\mu$ l의 cyanide용액을 가한 후 37°C에서 10분간 보온하였다. 여기에 10 $\mu$ l의 시료와 0.1mM cytochrome C를 차례로 가하고 잘 섞은후 550nm에서 흡광도의 변화를 관찰하여 생성된 superoxide radical을 정량하였다.

**SOD의 활성도 측정**

Total superoxide dismutase의 활성도 측정은 Xanthine과 Xanthine Oxidase의 존재하에서 생성되는 superoxide에 의해서 Ferricytochrome C의 활성을 억제시키는 원리를 이용하였다. (McCord, et al., 1969; Salin, et al., 1978) 즉 3.0ml 용량의 cuvette에 0.1mM EDTA를 함유한 50mM 인산염완충용액 (pH 7.8) 2.3 ml, 0.1mM ferricytochrome C 0.3ml, 0.5 mM Xanthine 0.3ml씩을 넣어 잘 섞고 여기에 Xanthine oxidase를 가하여 파장 550 nm 에서 매분당 0.02가되게 Xanthine oxidase의 농도를 조정하였다. 또 다른 cuvette에는 같은 파장에서 흡광도의 변화를 관찰하고 이 조건에서 ferricytochrome C의 환원속도를 50% 억제시키는 때의 효소량을 1 unit로 하고 mg 단백질로 나눈 값을 비활성도로 하였다. 또한 mitochondria에 존재하는 Mn-SOD의 활성도를 측정하기 위하여 반응액에 cyanide의 농도가 2 mM이 되도록 가하여 Cu, Zn-SOD를 억제시킨 후 같은 방법으로 측정하였으며 반응액에 존재하는 미립자 물질은 sodium deoxycholate를 0.033%되게 첨가하여 용해시켰다 (Salin, et al. 1978; Geller, et al. 1982).

**단백질의 정량**

각 장기로부터 추출한 시료에 함유된 Soluble protein은 Lowry, et al. (1951)의 방법을 이용하여 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 정량하였다.

**결과 및 고찰**

**실험동물의 physiological symptom과 rectal temperature**

$\beta$ -Fluoroethylacetate를 투여한 후 30분이 경과되면서 기동이 둔화되고 움추린 상태로 머물다가 약 1시간이 되었을때 경련을 일으키는 것들이 나타나고 이어서 경직 현상을 보이기도 하였다. Rectal temperature는 Table 1에서와 같이 정상 흰쥐에 있어서는 37°C이었으나, 30분이 경과되었을때는 4°C가 낮아진 33°C 이었고 5시간후에는 21.5°C로 크게 떨어졌다.

**Table I.** Sequential changes in the rectal temperature of  $\beta$ -fluoroethylacetate treated rat

Time (hour)	Temperature (°C)
0.0	37.0
0.5	33.0
1.0	30.0
2.0	28.5
3.0	27.0
4.0	25.5
5.0	21.5

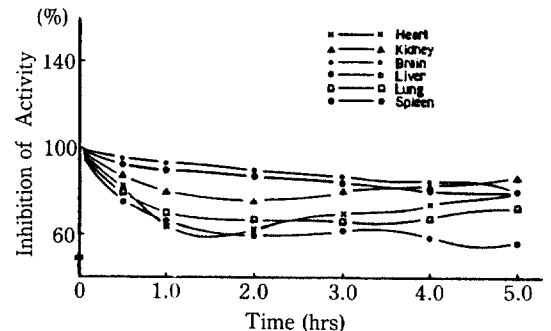
**Aconitase의 활성도의 변화**

실험방법에 따라 조제한 조효소 (crude enzyme)액에서 aconitase의 활성도 변화를 측정해 본 결과는 Fig. 1과 같다. 그림에서와 같이 brain, heart lung 그리고 spleen이 다른 조직에 비하여 더 많은 억제현상을 보여 한시간 후에도 정상 흰쥐의 조직들에 비해 30%에서 35%까지 억제되었으며 그후는 시간의 경과에 따라 큰변화를 보이지 않았다. 그러나 kidney와 liver는 한시간 후에 5~10% 억제되었고 5시간후에는 13~20%까지 억제되므로서 다른 장기에 비해 억제되는 현상이 적었다.

**Citrate의 측정**

Aconitase의 억제로 인해 citrate가 isocitrate로 전환되지 못하므로 생체내에 축적되는 양을 gas chromatography로 정량하여 Table II와 같은 결과를 얻었다.

정상 흰쥐의 brain과 heart에서 citrate의 함량은 43과 46  $\mu$ g/g tissue이었고, 다른 조직



**Fig. 1.** Sequential changes in the aconitase activities from the various tissues of  $\beta$ -fluoroethylacetate treated rat.

**Table II.** Accumulation of citrate in the various tissues of  $\beta$ -fluoroethylacetate treated rat

Tissues	Time (hour)							
	0.0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	
Brain	43	45	62	89	103	105	103	
Heart	46	256	422	550	588	580	562	
Kidney	< 20	61	95	127	140	135	120	
Liver	< 20	32	48	62	73	70	72	
Lung	< 20	42	80	125	127	150	163	
Spleen	< 20	171	352	400	416	393	376	

\*0.0; Normal

\*\* Unit;  $\mu\text{g/g}$  tissue

에서는  $20\mu\text{g/g}$  tissue 이하로 비교적 낮았다. 그러나  $\beta$ -fluoroethylacetate를 투여하고 시간의 경과에 따라 모든 장기에서 citrate의 함량이 증가하였으며 heart와 spleen에서 가장 많이 축적되어 2시간 후에는  $550$ 과  $400\mu\text{g/g}$  tissue로 각각 12배와 20배로 증가되었다. 그러나 모든 조직에서 2-3시간을 정점으로 하여 축적도가 크게 변화하지는 않았다.

#### 혈당의 축적

Somogyi, et al. (1970) 법에 의해 정상 및  $\beta$ -fluoroethylacetate를 투여한 흰쥐의 혈당을 정량한 결과 Table III과 같다. 정상 흰쥐에 있어서의 혈당 (glucose)은  $375\text{mg/dl}$ 이었으나 30분 후에는  $380\text{mg/dl}$ 로  $5\text{mg}$  증가되었고, 한시간 후에는  $412\text{mg}$ , 5시간 후에는  $612\text{mg/dl}$ 로 각각  $37\text{mg}$  및  $237\text{mg}$ 씩 크게 증가되었다.

**Table III.** Accumulation of blood glucose from the blood of  $\beta$ -fluoroethylacetate treated rat

Time (hour)	Content of glucose (mg/dl)
0.0	375
0.5	380
1.0	412
2.0	480
3.0	572
4.0	605
5.0	612

#### SOD 활성도의 변화

Superoxide radical의 생성과 이들을 제거하는 역할로서 SOD의 활성도가 어떠한지를 알아보기 위하여 이 효소의 총활성도 변화를 관찰하였다. 이 효소의 활성도 변화는 Fig. 2와 같다. He-

#### Superoxide radical의 생성

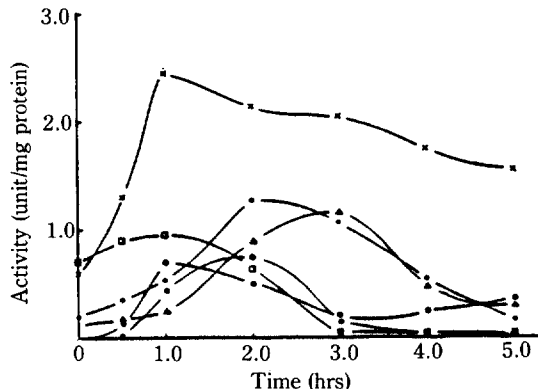
정상 및  $\beta$ -Fluoroethyl acetate를 투여한 흰쥐의 각 장기에서 시간의 경과에 따라 생성되는 superoxide radical을 McCord, et al. (1969)의 방법에 의해 정량한 결과는 Table IV와 같다. Heart는 다른 조직에 비해 Superoxide radical의 생성이 크게 증가하여 30분 후에는  $0.04\mu\text{mol/g}$ 이었으나 2시간 후에는  $0.26\mu\text{mol/g}$ 으로 크게 증가하였고 5시간 후에는 거의 검출되지 않았다. Liver의 경우는 1시간 후에  $0.16\mu\text{mol/g}$ 으로 가장 많이 생성되었고 그 후에는 점차 감소되었다. 다른 조직에서도 일반적으로 1-2시간 후에 가장 높았으며 그 후에는 비슷한 pattern으로 감소되었다.

**Table IV.** Formation of superoxide radicals in the various tissues of  $\beta$ -fluoroethylacetate treated rat

Tissues	Time (hour)							
	0.0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	
Brain	0.00	0.03	0.09	0.16	0.06	0.07	0.05	
Heart	0.01	0.04	0.18	0.26	0.08	0.04	0.01	
Kidney	0.01	0.04	0.06	0.02	0.02	0.02	0.03	
Liver	0.00	0.01	0.16	0.06	0.05	0.04	0.04	
Lung	0.00	0.02	0.13	0.05	0.03	0.03	0.02	
Spleen	0.00	0.00	0.05	0.08	0.04	0.01	0.01	

\* 0.0; Normal

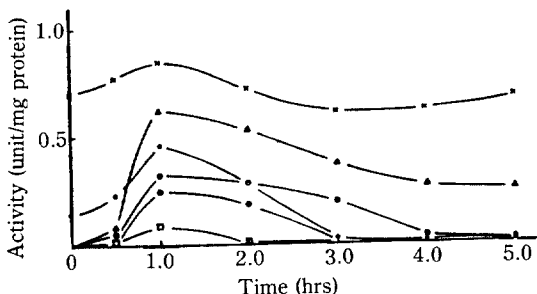
\*\* Unit;  $\mu\text{moles/g}$  tissues



**Fig. 2.** Total activities of superoxide dismutase from the various tissues of  $\beta$ -fluoroethylacetate treated rat  $\times$ — $\times$ , heart;  $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ , kidney;  $\bullet$ — $\bullet$ , brain;  $\circ$ — $\circ$ , liver;  $\blacksquare$ — $\blacksquare$ , lung;  $\circ$ — $\circ$ , spleen.

art에 있는 이 효소는 다른 조직에 비해 그 활성도가 크게 높아서  $\beta$ -fluoroethylacetate를 투여한 후 1시간 뒤에는 비활성도가 2.42로 정상에 비해 약 4배 증가되었고, 그 후에는 완만하게 감소되었다. 또 brain의 경우는 2시간후에 비활성도가 1.32로 가장 높았고 kidney는 3시간 후에 1.17로 liver와 lung는 1시간후에 0.75 및 0.98로 가장 높았다. 그러나 mitochondria에 존재하는 Mn-SOD는 모든 장기에서 1시간후에 가장 증가하였고 이 효소도 heart에서 비활성도가 0.85로 가장 높았으며 lung과 spleen에서는 매우 낮게 나타났다(Fig. 3 참조).

Sodium monofluoroacetate, monofluoroacetamide,  $\beta$ -fluoroethylacetate 등은 살서제로 널리 이용되고 있으며 이들의 작용기전은 동일



**Fig. 3.** Cyquide insensitive Mn-superoxide dismutase activities from the  $\beta$ -fluoroethylacetate treated rat tissues  $\times$ — $\times$ , heart;  $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ , kidney;  $\bullet$ — $\bullet$ , brain;  $\circ$ — $\circ$ , liver;  $\blacksquare$ — $\blacksquare$ , lung;  $\circ$ — $\circ$ , spleen.

하며 모두 krebs cycle의 첫 단계에서 fluorocitrate를 형성하므로써 이것이 aconitase의 강력한 inhibitor로 작용하기 때문에 이회로가 원활하게 운행될 수 없게 된다 (Buffa, et. al., 1950). 따라서 citrate가 isocitrate로 전환되지 못하고 호흡연쇄반응에 필요한 환원당량을 정상적으로 공급하지 못하기 때문에 대사에 필요한 energy를 공급받지 못하고 치사하게된다.

Buffa, et al. (1950)에 따르면 이때 체내에 ammonia ion이 증가되고 calcium을 비롯한 2가 양이온이 immobilization되기 때문에 생체가 경련을 수반하게 된다고 하였다. 또한 이러한 회로의 이상에 따라 glucose의 농도가 증가하고 체온은 급격히 떨어 진다고 하였다. 필자는 이러한 physiological symptom들과 대사 중간 산물 및 aconitase에 작용하는 fluorocitrate의 생성등을 확인하여 krebs cycle이 blocking 되었음을 확인하려 했다. 조직내의 citrate의 양은  $\beta$ -fluoroethylacetate를 투여한 후 1시간이 경과한 후에서 부터 3시간까지 가장 많이 축적되었고, 실험동물이 경련을 일으키는 현상도 대부분 약 1시간이 경과한 후에 나타났다. Aconitase가 억제되는 정도는 fluorocitrate의 축적된 양과 관계가 있겠으나 이것은 citrate의 축적과 직접관계되기 때문에 1시간에서 3시간 사이에 가장 심할것으로 예상된다. 그러나 1~2시간에 경과 했을때를 정점으로 하여 aconitase의 억제 현상은 크게 증가되지 않았다. 이러한 physiological symptom과 혈당의 증가 및 rectal temperature의 강하등으로 미루어보아 정도의 차이는 있겠으나  $\beta$ -fluoroethylacetate를 투여함으로 인해 krebs cycle이 blocking 되었음을 확인할 수 있었다. 이때 생체의 각 조직에서 superoxide radical이 생성되는지를 알아보기 위해 McCord, et. al (1969)의 방법에 따라 관찰해본 결과 모든 조직에서  $\beta$ -Fluoroethylacetate를 투여한지 1시간내지 2시간 후에 현저한 증가를 보였다. Stevens, et al. (1979)의 보고에 의하면 정상세포에 비해서 neonatal pulmonary macrophase의 mitochondria에서는 state 4에서 superoxide radical이 생성이 높다고 하였으며 이 세포에서  $H_2O_2$ 의 생성속도

가 증가하는 것을 근거로하여 설명하였다. 이 상태는 전자수송계에 관계하는 화합물이 자기산화 일어날 가능성이 증가하기 때문이라고 하였다(Chance, et al. 1956). 전자수송계에 있어서 일반적으로  $NAD^+$ 와 Ubiquinone 사이에는 2개의 전자가 transport 되고 cytochrome b와 c 사이에는 1개의 electron이 transport 되는 것으로 알려져 있다. 그러나 한 분자의  $O_2$ 는 4개의 electron과 결합하여 2분자의 물을 생성한다. 정상 세포에서 어떤 방법으로 4개의 electron이 도입되어 물을 형성하는지는 분명하지 않다. 만약 cytochrome이 한쌍씩의 전자를 transport 할 경우 역시 산소의 부분적인 환원을 배제할 수 없고 따라서 superoxide radical 이나 oxygen derivative를 생성하는 것이 불가피하다.

본 실험 조건하에서 생체조직에서의 superoxide radical의 증가는 어느 기전에 기인한 것인지 확인할 수는 없지만 아마도 전자의 경우로 사료된다. 그 이유는 state 4의 경우 환원속도의 증가로 일어나는 현상으로 환원당량의 결핍과 같은 환경으로 되기 때문에 산화 환원에 민감한 cytochrome b나 ubiquinone 등의 auto-oxidation에 기인한 것으로 생각된다. 생체내에서 superoxide radical을 제거하는 기전은 크게 2가지로 볼 수 있다. 그 하나는 자발적인 dismutation으로  $H_2O_2$ 와  $O_2$ 를 생성하는 것이며, 다른 하나로 SOD나 catalase 및 glutathione peroxidase와 같은 효소축매에 의한 것이다(Autor, et al 1978; 1979). 그러나 superoxide radical을 생성하는 환경에서는 SOD에 의

한 dismutation이 지배적이며 이 radical의 증가가 SOD의 유발을 촉진하는 것으로 보고 되었다(Hassan, et al. 1977; Gregory, et al.; 1973; puget, et al., 1974). Dryer et al. (1979) 등은 2, 4-dinitrophenol로 처리한 쥐의 간조직에서  $H_2O_2$ 의 증가에 따라 특히 Mn-SOD가 크게 증가하는 것은 oxygen derivatives로부터 mitochondria를 보호하기 위함이라고 하였다. 필자의 경우 superoxide radical의 증가나 SOD의 활성도 변화가 일치하지는 않았지만 정상조직에 비해 비활성도가 크게 증가됨이 관찰되었다. Mn-SOD는 모든 조직에서  $\beta$ -Fluoroethylacetate를 투여한지 1시간 후에 약 2배 증가되었고 kidney는 비활성도가 0.62로 가장 많이 증가되었다. SOD의 총활성도는 brain과 kidney에서는 2시간 및 3시간 후에 가장 높은 활성을 보였고, heart에서는 다른 어느 장기에서 보다 높은 활성을 보였다. 그러나 이들 효소의 활성도는 superoxide radical이 감소함과 동시에 거의 그 활성이 감소되었다. 이와같은 효소활성도 변화는 전자수송계의 rhythm을 깬 상태에서 superoxide radical의 증가에 따라 세포내에 존재하는 효소가 활성화된 것인지 아니면 cytosol에서 각각 유발될 것인지는 더욱 더 연구되어야 할 과제이다. 그러나 superoxide radical과 SOD의 변화되는 pattern을 미루어 볼 때 oxygen derivatives에 대한 SOD의 역할은 지금까지 보고된 바와같이 세포나 mitochondria membrane을 이들로 부터 보호하는 것으로 설명될 수 있다.

## 적 요

$\beta$ -fluoroethylacetate를 흰쥐의 복강에 투여하여 krebs cycle이 blocking된 것을 확인하고 이로 인해 각 조직에서 생성되는 superoxide radical과 SOD의 활성도 변화를 관찰하였다.  $\beta$ -fluoroethylacetate를 투여한지 1~3시간 사이에 모든 장기에서 citrate의 축적농도가 가장 높았으며, 특히 heart와 spleen에서 12배 및 20배로 가장 높았고, aconitase의 활성도는 한시간 후에 30~35%까지 억제되었고 시간의 경과에 따라 큰 변화는 없었다. 그리고 혈중 glucose의 함량은 계속증가되어 5시간 후에 612mg/dl로 정상에 비해 1.6배 증가되었다.  $\beta$ -fluoroethylacetate를 투여하고 1~2시간 후에 모든 장기에서 superoxide radical이 생성되었고 heart에서는 0.26  $\mu$ mole/g로 가장 높았고, SOD의 총활성도는 1~3시간후에 활성이 가장 높았으며, heart에 있는 이 효소가 한 시간후에 약 4배로 가장 많이 증가되었다. Mn-SOD는 한시간 후에 모든 조직에서 증가되었고 Kidney가 가장 높은 활성도의 변화를 보였다. 이상의 결과로 흰쥐에서 Krebs cycle이 차단되면 거의 모든 장기에서 superoxide radical이 생성되며 Cu, Zn 및 Mn-SOD의 활성도가 모두 증가되고 특히 heart에서 가장 큰 변화를 보임을 알 수 있었다.

## REFERENCES

1. Autor, A.P., and J.B. Stevens, 1978. Enhancement of mitochondrial cyanide-resistant superoxide dismutase in the liver of rats treated with 2,4-dinitrophenol. *Photochem. Photobiol.* **28**, 775-778
2. Autor, A.P., A.W. Fox, and J.B. Stevens, 1979. in *Oxygen; Biochemical and Clinical Aspects* (Coughey, W.S., ed) Academic press, New York
3. Badwey, J.A., and M.L. Karnovsky, 1979. Production of superoxide and hydrogen peroxide by an NADH-oxidase in guinea pig polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* **254**, 11530-11537
4. Beauchamp, C.O., and I. Fridovich, 1973. *Biochem. Biophys. Acta* **317**, 50-64
5. Boveris, A., and E. Cadenas, 1975. *FEBS Lett.* **54**, 311-315
6. Boveris, A., E. Cadenas, and A. Stoppavi, 1976. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* **156**, 435-444
7. Boveris, A., and B. Chance, 1973. The cellular production of hydrogen peroxide: General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* **134**, 707-716
8. Boveris, A., N. Oshino, and B. Chance, 1972. *Biochem. J.* **128**, 617-630
9. Buffa, P., and R.A. Peters, 1950. The in vivo formation of citrate induced by fluoroacetate and its significances. *J. Physiol* **110**, 488-500
10. Bus, J.S., S.D. Aust, and J.E. Gibson, 1974. Superoxide-and singlet oxygen-catalyzed lipid peroxidation as a possible mechanism paraquat (methyl biogen) toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **58**, 749-755
11. Chance, B., and Oshino, N. 1971. Kinetic and mechanism of catalase in peroxisome of the mitochondrial fraction. *Biochem. J.* **122**, 225-233
12. Chance, B., and Williams, G., 1956. *Adv. Enzymol.* **17**, 65-134
13. Christian B. Anfinsen, 1965. Aconitase from pig heart muscle. *Method in Enzymol* **1**, 695-698
14. Crapo, J., and J.M. McCord, 1976. Oxygen induced change in pulmonary superoxide dismutase assayed by antibody titrations. *Am. J. Physiol* **231**, 1196-1103
15. Doinisi, O., Galeotti, T., Terranova, T., and Azzi, A., 1975. Superoxide radicals and hydrogen peroxide formation in mitochondria from normal and neoplastic tissues. *Biochem. Biophys. Acta* **403**, 292-300
16. Dryer, S.E., Dryer, R.L., and Autor, A.P., 1980. Enhancement of mitochondrial cyanide-resistant superoxide dismutase in the livers of rats treated with 2,4-dinitrophenol. *J. Biol. Chem.* **255**, 1054-1057
17. Farrington, J.A., Zbert, M., Land, E.J., and Fletcher, K., 1973. Bipyridylum quaternary salts and related compounds. V. pulse radiolysis studies of the reaction of paraquat radical with oxygen. Implications for mode of action of bipyridyl herbicides. *Biochem. Biophys. Acta* **314**, 372-381
18. Fridovich, I., 1975. Superoxide dismutase. *Annu. Rev. Biochem.* **44**, 147-159
19. Fridovich, I., 1974. Superoxide dismutase. *Adv. Enzymol.* **41**, 35-97
20. Geller, B.L., and Winge, D.R., 1982, Rat liver Cu,Zn-superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **257**, 8945-8952
21. Green, A.R., and Curzon, G., 1968. Superoxide dismutase: Organelle specificity. *Nature* **220**, 1095-1097
22. Gregory, E.M., and Fridovich, I., 1973. Introduction of a new copper-containing superoxide dismutase bacteriocuprein. *J. Bacteriol* **114**, 543-548
23. Haber, F., Weiss, J., 1974. *Proc. R. SOC, London Ser. A* **147**, 332-51
24. Hassan, H.M., and Fridovich, I., 1977a, Enzymatic defense against the toxicity of oxygen and of streptonigrin in *E. coli*. *J. Bacteriol* **129**, 1574-1583
25. Hassan, H.M., and Fridovich, I., 1977b. Regulation of the synthesis of superoxide dismutase in *E. coli*. *J. Bacteriol* **130**, 805-811
26. Hinkle, P.C., Botow, R.A., Racker, E., and

- Chance, B., 1967, Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **242**, 5169-5173
27. Kimball, P., Reddy, K., Pierce, T., Schwartz, I., Mustafa, M., and Cross, C., 1976. Oxygen toxicity: Augmentatin of antioxydant defense mechanisms in rat lung.
28. Lowry, C.M., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., 1951, Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 256-277
29. McLord, J.M., and Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: Enzymic function for erythrocyte (hematocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**, 6049-6055
30. Michelson, A.M., 1973. Studies in bioluminescence. X. chemical models of enzymic oxidation. *Biochemie* **55**, 465-479
31. Puget, K., and Michelson, A.N., 1974. Isolation of a new copper-containing Superoxide dismutase bacteriocuprein. *Biochem. Biophys. S. ROS. Commun.* **58**, 830-838
32. Salin, M.L., E.D. Day, Jr. and J.D. Crapo, 1978. Isolation and characterization of manganese-containing Superoxide dismutase from rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **187**, 223-228
33. Somogyi, M., and Nelson, N., 1970. induction of superoxide dismutase by molecular oxygen. Measurement of glucose, *Chemistry for medical technologists* 140-141, White, Irickson, 3rd ed Mosbg.
34. Stevens, J.B., and Autor, A.P., 1977. Induction of superoxide dismutase by oxygen in neonatal rat lung. *J. Biol. Chem.* **252**, 3509-3514
35. Stevens, J.B., and Autor, A.P., 1979. Pulmonary macrophage mitochondrial superoxide dismutase(SOD): Control of enzyme level by superoxide anion generation during electron transport. *Fed. Proc.* **38**, 577
36. Weisiger, R.A., and Fridovich, I., 1973. Superoxide dismutase: Organelle specificity. *J. Biol. Chem.* **248**, 3582-3592

(Received, March 1, 1985)