

Diskussion

Unsere Daten zeigen, dass Ascorbinsäure Krebszellen selektiv abtötet und normale Zellen nicht, wenn man entsprechende Konzentrationen einsetzt, die nur mit intravenöser Gabe zu erreichen sind, und wenn man Umstände berücksichtigt für einen potentiellen klinischen Einsatz. Der Effekt geht zurück allein auf die extrazelluläre Konzentration und nicht auf die intrazelluläre, konsistent zur intravenösen Dosis. Der durch Ascorbat so vermittelte Zelltod wird verursacht durch die Protein-abhängige extrazelluläre Generierung von H_2O_2 , indem vom Ascorbat als dem Elektronen-Donor ein Radikal gebildet wird.

Wie auch bei Glukose sollte sich die pharmakologische Ascorbat-Konzentration nach der Infusion rasch in der extrazellulären Flüssigkeit aufbauen (42). Wir konnten zeigen, dass pharmakologische Nährlösung-Konzentrationen von Ascorbat, als Ersatzlösungen für die extrazelluläre wässrige Umgebung, die Radikal-Bildung des Ascorbat hervorbrachte und H_2O_2 . Im Gegensatz dazu erzeugen die gleichen pharmakologischen Konzentrationen im gesamten Blutstrom nur wenige messbare Ascorbat-Radikale und kein H_2O_2 . Dieses kann dem effizienten und redundanten H_2O_2 -Katabolismus [Katabolismus = Abbaustoffwechsel] im gesamten Blut zugerechnet werden (z.B. Katalase und Glutathionperoxidase), im Vergleich zur Situation in Nährlösungen oder der extrazellulären Flüssigkeit (38 – 41).

Insgesamt lässt sich aus den Daten die konsistente Interpretation ableiten, dass intravenös verabreichte Ascorbinsäure in pharmakologischen Konzentrationen als ein Pro-Pharmakon für den Transport von H_2O_2 funktionieren kann, hinein ins extrazelluläre Milieu, ohne Akkumulation von H_2O_2 im Blutstrom.

Obwohl die Akkumulation von H_2O_2 im Blut möglich ist, ist dieses doch nur unter bestimmten Bedingungen der Fall, die auf die Debatte über die generelle Sicherheit von i.v. Ascorbat zeigen. Intravenös gegebenes Ascorbat ist wahrscheinlich sicher bei den meisten Patienten, mit praktisch keinerlei Toxizität, verglichen mit den üblichen Anti-Krebs-Chemotherapeutika.

Das Auftreten von einer vorausgesagten Komplikation, nämlich Oxalat-Nierensteinen, ist umstritten (13). Bei Patienten mit einem Mangel der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase ist i.v. Ascorbat kontro-indiziert, weil intravaskuläre Hämolyse [Auflösung der roten Blutkörperchen infolge Zerstörung ihrer Zellmembran] verursacht wird (13). Der Mechanismus dieser früher nicht erklärbaren Beobachtung kann nun, basierend auf den hier vorliegenden Resultaten, direkt erklärt werden. Normalerweise wird H_2O_2 in den roten Blutzellen durch die Katalase und die Glutathion-

Peroxidase entfernt, zusammen mit dem intern vorhandenen Glutathion, das die Reduzierungs-Potentiale zur Verfügung stellt. Die Elektronen-Quelle für Glutathion ist NADPH aus dem pentose shunt mithilfe der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase [pentose shunt = Pentosephosphatweg, eine Energiegewinnung, die in allen Organismen vorkommt, indem Glukose zur Erzeugung von NADPH oxidiert wird]. Wenn die Aktivität dieses Enzyms herabgemindert ist, ist das vorauszusagende Resultat eine beeinträchtigte Entfernung des H₂O₂, was intravaskuläre Hämolyse zur Folge hat, das beobachtete klinische Ergebnis.

Über Ascorbat als einem möglichen Anti-Krebs-Mittel gab es in der Vergangenheit eine kontroverse und emotional belastete Debatte (1, 3 - 6). Klinische Beobachtungs-Studien berichteten von möglichen Vorteilen bei ausgewählten Patienten, aber Doppelblind-Plazebo-kontrollierte Studien berichteten von keinerlei Vorteilen und eine mögliche Ascorbat-Therapie wurde durch konventionelle Praktiker ad acta gelegt. Erst in letzter Zeit ist verstanden worden, dass die Nicht-Übereinstimmung der klinischen Studien erklärt werden kann durch vorher nicht beachtete fundamentale pharmakokinetische Eigenschaften des Ascorbat (7). In vitro erzielte Effekte des Ascorbat hinsichtlich des Überlebens und Absterbens von Zell-Linien sind berichtet worden, aber es gibt vielfache experimentelle Bedenken. Beispielsweise wurde eine experimentelle Bedingung verglichen, dass nämlich überhaupt kein Ascorbat mehr vorhanden ist, aber diese Bedingung hat eine unklare physiologische Relevanz, weil Ascorbat innerhalb und ausserhalb der Zellen immer vorhanden ist, es sei denn, es liegt schwere Skorbut vor. Unklar blieb, ob die beobachteten Effekte dem extrazellulären oder dem intrazellulären Ascorbat geschuldet waren oder beiden (12, 43 - 46).

Manche Experimente benutzten sehr stark variierende Inkubationszeiten und Ascorbat-Konzentrationen, die keinen entsprechenden klinischen Kontext hatte, sodass die Interpretation schwierig wurde. Die im Labor-Medium gelungene Erzeugung von H₂O₂ durch Ascorbat wurde verschiedentlich als Artefakt interpretiert (47, 48), auch obwohl Chelatbildner [organische Stoffe, die mithilfe von Metallen Chelate bilden – Chelate werden auch zur Entgiftung von Schwermetallen eingesetzt] keinen Effekt hatten (49), es wurde von interner Schadens-Verursachung berichtet, aufgrund von vermindertem intrazellulären Ascorbat, aber unter Benutzung eines H₂O₂-Tests, bei dem Ascorbat störend eingreifen konnte (43, 44).

Die Experimente, die wir hier präsentieren, bieten einen klaren klinischen Kontext für die Ascorbat-Aktion. Die Bedingungen wurden so gewählt, dass Spitzen-Konzentrationen von intravenösem Ascorbat erreicht wurden, die klinisch meist nur wenige Stunden andauern, abhängig von der Infusions-Rate (7). Die intrazelluläre Ascorbat-Konzentration wird straff kontrolliert in

Relation zur extrazellulären Konzentration (8, 9, 29). Man kann davon ausgehen, dass intravenöse Ascorbat-Infusion die extrazelluläre, aber nicht die intrazelluläre Konzentration ändert (8, 9). Um mit i.v. Ascorbat einen klinischen Nutzen beim Abtöten von Krebs-Zellen zu erzielen, sollten pharmakologische und nicht physiologische Konzentrationen effektiv sein, unabhängig von den intrazellulären Ascorbat-Konzentrationen.

Dies ist es, was wir hier beobachtet haben. Die Experimente, die wir hier vorstellen, liefern eine zusammenhängende Erklärung für die Wirkung von Ascorbat bei der Erzeugung von H₂O₂ ausserhalb der Zellen, ohne dass im Blut H₂O₂ akkumuliert wird, was zu der Schlussfolgerung führt, dass Ascorbat bei pharmakologischen Konzentrationen im Blut ein Pro-Pharmakon für den Transport von H₂O₂ zum Gewebe darstellt.

Wir beobachteten, dass die Erzeugung von H₂O₂ unabhängig war von metallischen Chelatbildnern und abhängig von mindestens 0,5% extrazellulärem Protein. Die verantwortlichen Proteine lagen zwischen 10 und 30 kDa [??]. Es ist vernünftig, davon auszugehen, dass das extrazelluläre Milieu diese Proteine enthält, in Anbetracht dessen, dass extrazelluläres Milieu Protein so viel wie 20% des Serum-Proteins darstellt, bei Bevorzugung von niedrig-molekulargewichtigen Proteinen (50). Obwohl die genauen Identitäten dieser verantwortlichen Proteine nicht bekannt sind, können wir postulieren, dass sie redox-aktive metallische Zentren haben. Während Chelatbildner diese Metalle am Rand beeinflussen können, können sie teilnehmen an der Oxidation von Ascorbat bei pharmakologischen Konzentrationen, mit der nachfolgenden Erzeugung von Superoxid und H₂O₂ (34). Ebenfalls ist möglich, dass in vivo Zell-Membranen und ihre zugehörigen Proteine Metalle beherbergen können, die der extrazellulären Flüssigkeit zugeführt werden können und ähnlich reagieren.

In jedem Fall initiiert das Ascorbat als Elektronen-Donor in solchen Reaktionen ironischerweise einen pro-oxidativen Stoffwechsel und die Erzeugung von H₂O₂ (34, 51).

Es ist nicht bekannt, warum Ascorbat via H₂O₂ Krebs-Zellen aber keine normalen Zellen abtöten kann. Es gab auch keine Korrelation zwischen Ascorbat-induziertem Zelltod und Glutathion, der Katalase- oder Glutathion-Peroxidase-Aktivität.

Die Daten zeigen, dass Ascorbat die Erzeugung extrazellulärem H₂O₂ initiiert, aber die H₂O₂-Ziele können sowohl intra- wie extrazellulär liegen, weil H₂O₂ membrandurchgängig ist (38, 52). Beispielsweise kann H₂O₂ Membranlipide zum Ziel haben, was zur Erzeugung von Hydroperoxiden oder reaktiven Zwischenprodukten führt, die in normalen Zellen abgeschreckt oder repariert werden aber nicht in sensitiven Krebs-Zellen. In sensitiven, nicht aber in resistenten Krebs-Zellen kann H₂O₂ intrazelluläre DNA zum Ziel

haben, oder DNA-Reparatur-Proteine oder Mitochondrien aufgrund der verminderten Aktivität der Superoxid-Dismutase (53). Hier mögen zukünftige Studien über ein sehr breites Spektrum von Krebs-Zellen mehr Aufschluss geben oder Studien über Microarray-Analysen von resistenten und sensitiven Zellen, ausgehend von demselben genetischen Stamm.

H₂O₂ hat als Produkt von pharmakologischen Ascorbat-Konzentrationen weitere über die Krebs-Behandlung hinausgehende nützliche Anwendungsmöglichkeiten, besonders bei Infektionen. H₂O₂ ist gegen Mikroben ein potenter Abwehr-Mechanismus bei Säugetieren.

Neutrophile Granulozyten [bestimmte weisse Blutkörperchen des Immunsystems] erzeugen H₂O₂ durch Superoxid, der Reihe nach durch NADPH Oxidase-katalysierter Reduktion von molekularem Sauerstoff. Hier mögen besondere therapeutische Anwendungen für Patienten mit chronischer Granulomatose, die eine Verminderung der Superoxid-Produktion haben, liegen (55). Alte, wenn auch nicht gegen-kontrollierte Tier-Studien legen nahe, dass intravenöses Ascorbat bei bestimmten viralen Infekten effektiv ist (56, 57). Dieses passt zu in vitro Experimenten, in denen H₂O₂ für Hepatis C toxisch ist (58).

Die Benutzung von Ascorbat als eines Liefer-Systems von H₂O₂ gegen sensitive Pathogene, virale oder bakterielle, hat substantielle klinische Implikationen, die nach rascher Aufklärung verlangen.

Um klinisch in der potentiellen Behandlung von Infektions-Krankheiten und Krebs weiter zu kommen, ist eine saubere Dokumentation der Sicherheit des i.v. Ascorbat Einsatzes erforderlich. Mehr als 100 Patienten sind beschrieben worden, vermutlich ohne Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase Defizit, die 10 g oder mehr intravenösen Ascorbats bekamen, ohne andere, gegenläufige Effekte als die der Tumor-Lyse [Lyse = Auflösung von Zellen nach Zerstörung der Zell-Membran] (3, 4, 15, 59). Jedoch fehlen diesen Beschreibungen die Sicherheits-Dokumentation.

Komplementäre und alternative Medizin-Praktiker benutzen weltweit derzeit Ascorbat-Dosen i.v. bis zu 70 g über mehrere Stunden (14, 15, 59). Weil i.v. Ascorbat leicht zugänglich ist für alle, die danach suchen, ist nun eine Phase-I-Sicherheits-Studie mit Patienten mit fortgeschrittenem Krebs gerechtfertigt und auf dem Wege.

+++++

im Original:

Discussion

Our data show that ascorbic acid selectively killed cancer but not normal cells, using concentrations that could only be achieved by i.v. administration and conditions that reflect potential clinical use. The effect was due only to extracellular and not intracellular ascorbate, consistent with clinical i.v. dosing. Ascorbate-mediated cell death was due to protein-dependent extracellular H₂O₂ generation, via ascorbate radical formation from ascorbate as the electron donor. Like glucose, when ascorbate is infused i.v., the resulting pharmacologic concentrations should distribute rapidly in the extracellular water space (42). We showed that such pharmacologic ascorbate concentrations in media, as a surrogate for extracellular fluid, generated ascorbate radical and H₂O₂. In contrast, the same pharmacologic ascorbate concentrations in whole blood generated little detectable ascorbate radical and no detectable H₂O₂. These findings can be accounted for by efficient and redundant H₂O₂ catabolic pathways in whole blood (e.g., catalase and glutathione peroxidase) relative to those in media or extracellular fluid (38–41). The totality of the data are consistent with the interpretation that ascorbic acid administered i.v. in pharmacologic concentrations may serve as a pro-drug for H₂O₂ delivery to the extracellular milieu, but without H₂O₂ accumulation in blood. Although it is possible that H₂O₂ might accumulate in blood, this would occur only under specific conditions that reflect on the general safety of i.v. ascorbate. Ascorbate administered i.v. is likely to be safe in most patients, with virtually no toxicity compared to most currently available cancer chemotherapeutic agents. The occurrence of one predicted complication, oxalate kidney stones, is controversial (13). In patients with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, i.v. ascorbate is contraindicated because it causes intravascular hemolysis (13). The mechanism of this previously unexplained observation is now straightforward, based on the results here. H₂O₂ generated in blood is normally removed by catalase and glutathione peroxidase within red blood cells, with internal glutathione providing reducing equivalents. The electron source for glutathione is NADPH from the pentose shunt, via glucose-6-phosphate dehydrogenase. If activity of this enzyme is diminished, the predicted outcome is impaired H₂O₂ removal causing intravascular hemolysis, the observed clinical finding. Ascorbate as a potential cancer therapeutic agent has a controversial and emotionally charged past (1, 3–6). Clinical observational studies reported possible benefit in selected patients, but doubleblind placebo-controlled studies reported no benefit, and ascorbate was discarded as a potential therapy by conventional practitioners. Only recently has it been understood that the discordant clinical findings can be explained by previously unrecognized fundamental pharmacokinetics properties of ascorbate (7). *In vitro* effects of ascorbate on death and survival of cell lines have been reported, but there are multiple experimental concerns. For example, reports compared an experimental condition to that with no ascorbate at all (43, 44), but such a condition has had unclear physiologic relevance, because ascorbate outside and inside cells is always present unless there is severe scurvy. It was unclear whether observed effects were due to extracellular or intracellular ascorbate, or both (12, 43–46). Some experiments have used widely varying incubation times and ascorbate concentrations that have had no

corresponding clinical context, making interpretation difficult. H₂O₂ generation by ascorbate oxidation in culture media was variously interpreted as artifact (47, 48), even though chelators had no effect (49), or reported to mediate damage internally due to diminished intracellular ascorbate, but using an H₂O₂ assay in which ascorbate could interfere (43, 44).

The experiments presented here provide a clear clinical context for ascorbate action. Conditions were selected to reflect peak ranges of i.v. ascorbate concentrations, which clinically might last a few hours at most, depending on the infusion rate (7). Intracellular transport of ascorbate is tightly controlled in relation to extracellular concentration (8, 9, 29). Intravenous ascorbate infusion is expected to drastically change extracellular but not intracellular concentrations (8, 9). For i.v. ascorbate to be clinically useful in killing cancer cells, pharmacologic but not physiologic extracellular concentrations should be effective, independent of intracellular ascorbate concentrations. This was what was observed here. The experiments here provide a cohesive explanation for ascorbate action in generating H₂O₂ outside cells, without H₂O₂ accumulation in blood, leading to the conclusion that ascorbate at pharmacologic concentrations in blood is a pro-drug for H₂O₂ delivery to tissues.

We observed that H₂O₂ generation was independent of metal chelators and dependent on at least 0.5% extracellular protein. The responsible proteins were between 10 and 30 kDa (data not shown). It is reasonable that extracellular milieu contains these proteins, given that extracellular milieu protein is as much as 20% of serum protein, and favors lower-molecular-weight proteins (50). Although identities of the proteins responsible are unknown, we postulate that they may have redox-active metal centers. While chelators may marginally affect these metals, they could participate in the oxidation of ascorbate when it is at pharmacologic concentrations, with subsequent formation of superoxide and H₂O₂ (34). It is also possible that *in vivo*, cell membranes and their associated proteins could harbor metals accessible to extracellular fluid and could react similarly. In either case, ascorbate, an electron-donor in such reactions, ironically initiates pro-oxidant chemistry and H₂O₂ formation (34, 51).

It is unknown why ascorbate, via H₂O₂, killed some cancer cells but not normal cells. There was no correlation with ascorbate-induced cell death and glutathione, catalase activity, or glutathione peroxidase activity. The data here showed that ascorbate initiated H₂O₂ formation extracellularly, but H₂O₂ targets could be either intracellular or extracellular, because H₂O₂ is membrane permeant (38, 52). For example, extracellular H₂O₂ might target membrane lipids, forming hydroperoxides or reactive intermediates that are quenched or repaired in normal cells but not in sensitive cancer cells. In sensitive but not resistant cancer cells, intracellular H₂O₂ could target DNA, DNA repair proteins, or mitochondria because of diminished superoxide dismutase activity (53). New insights may follow from future studies of a very broad range of tumor cells or from microarray analysis of resistant and sensitive cells derived from the same genetic lineage.

H₂O₂, as the product of pharmacologic ascorbate concentrations, has potential therapeutic uses in addition to cancer treatment, especially in infections. H₂O₂ is a potent mammalian antimicrobial defense mechanism (54). Neutrophils generate H₂O₂ from superoxide, in turn formed by NADPH oxidase-catalyzed reduction of molecular oxygen. There may be particular therapeutic application in patients with chronic granulomatous disease who have diminished

superoxide production (55). Old observational animal experiments, although uncontrolled, suggest that i.v. ascorbate is effective in some viral infections (56, 57). This finding is also consistent with *in vitro* experiments, in which H₂O₂ is toxic to hepatitis C (58). Use of ascorbate as an H₂O₂-delivery system against sensitive pathogens, viral or bacterial, has substantial clinical implications that deserve rapid exploration.

To proceed clinically in potential treatment of infectious diseases and cancer, clear safety documentation of i.v. ascorbate administration is necessary. More than 100 patients have been described, presumably without glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, who received 10 g or more of i.v. ascorbate with no reported adverse effects other than tumor lysis (3, 4, 15, 59). However, these descriptions lack formal safety documentation. Complementary and alternative medicine practitioners worldwide currently use ascorbate i.v. in doses as high as 70 g over several hours (14, 15, 59). Because i.v. ascorbate is easily available to people who seek it, a phase I safety trial in patients with advanced cancer is justified and underway.

1. Padayatty, S. J. & Levine, M. (2000) *J. Am. Coll. Nutr.* **19**, 423–425.
2. Cameron, E. & Campbell, A. (1974) *Chem. Biol. Interact.* **9**, 285–315.
3. Cameron, E. & Pauling, L. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 3685–3689.
4. Cameron, E. & Pauling, L. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 4538–4542.
5. Creagan, E. T., Moertel, C. G., O'Fallon, J. R., Schutt, A. J., O'Connell, M. J., Rubin, J. & Frytak, S. (1979) *N. Engl. J. Med.* **301**, 687–690.
6. Moertel, C. G., Fleming, T. R., Creagan, E. T., Rubin, J., O'Connell, M. J. & Ames, M. M. (1985) *N. Engl. J. Med.* **312**, 137–141.
7. Padayatty, S. J., Sun, H., Wang, Y., Riordan, H. D., Hewitt, S. M., Katz, A., Wesley, R. A. & Levine, M. (2004) *Ann. Intern. Med.* **140**, 533–537.
8. Levine, M., Conry-Cantilena, C., Wang, Y., Welch, R. W., Washko, P. W., Dhariwal, K. R., Park, J. B., Lazarev, A., Graumlich, J., King, J., *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3704–3709.
9. Levine, M., Wang, Y., Padayatty, S. J. & Morrow, J. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 9842–9846.
10. Bram, S., Froussard, P., Guichard, M., Jasmin, C., Augery, Y., Sinoussi-Barre, F. & Wray, W. (1980) *Nature* **284**, 629–631.
11. Leung, P. Y., Miyashita, K., Young, M. & Tsao, C. S. (1993) *Anticancer Res.* **13**, 475–480.
12. Sakagami, H., Satoh, K., Hakeda, Y. & Kumegawa, M. (2000) *Cell. Mol. Biol.* **46**, 129–143.
13. Levine, M., Rumsey, S. C., Daruwala, R. C., Park, J. B. & Wang, Y. (1999) *J. Am. Med. Assoc.* **281**, 1415–1423.
14. Riordan, N. H., Riordan, H. D. & Casciari, J. J. (2000) *J. Orthomol. Med.* **15**, 201–203.
15. Riordan, H. D., Hunninghake, R. B., Riordan, N. H., Jackson, J. J., Meng, X., Taylor, P., Casciari, J. J., Gonzalez, M. J., Miranda-Massari, J. R., Mora, E. M., *et al.* (2003) *P. R. Health Sci. J.* **22**, 287–290.
16. Lee, Y. & Shacter, E. (1997) *J. Clin. Invest.* **89**, 4480–4492.
17. Bergsten, P., Amitai, G., Kehrl, J., Dhariwal, K. R., Klein, H. G. & Levine, M. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 2584–2587.
18. Washko, P. W., Wang, Y. & Levine, M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 15531–15535.
19. Lee, Y. J. & Shacter, E. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 19792–19798.
20. Heeg, K., Reimann, J., Kabelitz, D., Hardt, C. & Wagner, H. (1985) *J. Immunol. Methods* **77**, 237–246.
21. Leone, A., Flatow, U., VanHoutte, K. & Steeg, P. S. (1993) *Oncogene* **8**, 2325–2333.
22. Zhou, M., Diwu, Z., Panchuk-Voloshina, N. & Haugland, R. P. (1997) *Anal. Biochem.* **253**, 162–168.
23. Buettner, G. R. (1990) *Free Radical Res. Commun.* **10**, 5–9.
24. Buettner, G. R. & Kiminyo, K. P. (1992) *J. Biochem. Biophys. Methods* **24**, 147–151.
25. Long, L. H., Evans, P. J. & Halliwell, B. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **262**, 605–609.
26. Washko, P. W., Hartzell, W. O. & Levine, M. (1989) *Anal. Biochem.* **181**, 276–282.

27. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. (1985) *Anal. Biochem.* **150**, 76–85.
28. Englert, R. P. & Shacter, E. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 20518–20526.
29. Corpe, C. P., Lee, J. H., Kwon, O., Eck, P., Narayanan, J., Kirk, K. L. & Levine, M. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 5211–5220.
30. Day, B. J., Fridovich, I. & Crapo, J. D. (1997) *Arch. Biochem. Biophys.* **347**, 256–262.
31. Burns, J. A., Butler, J. C., Moran, J. & Whitesides, G. M. (1991) *J. Org. Chem.* **56**, 2648–2650.
32. Buettner, G. R. (1986) *Free Radical Res. Commun.* **1**, 349–353.
33. L'Eplattenier, F., Murase, I. & Martell, A. E. (1967) *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 837–843.
34. Halliwell, B. (1990) *Free Radical Res. Commun.* **9**, 1–32.
35. Samuni, A. M., Afeworki, M., Stein, W., Yordanov, A. T., DeGraff, W., Krishna, M. C., Mitchell, J. B. & Brechbiel, M. W. (2001) *Free Radical Biol. Med.* **30**, 170–177.
36. Fridovich, I. (1995) *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 97–112.
37. Wang, X., Liu, J., Yokoi, I., Kohno, M. & Mori, A. (1992) *Free Radical Biol. Med.* **12**, 121–126.
38. Chance, B., Sies, H. & Boveris, A. (1979) *Physiol. Rev.* **59**, 527–605.
39. Brown, J. M., Grosso, M. A., Terada, L. S., Beehler, C. J., Toth, K. M., Whitman, G. J., Harken, A. H. & Repine, J. E. (1989) *Am. J. Physiol.* **256**, H584–H588.
40. Guemouri, L., Artur, Y., Herbeth, B., Jeandel, C., Cuny, G. & Siest, G. (1991) *Clin. Chem.* **37**, 1932–1937.
41. Motoyama, S., Saito, S., Inaba, H., Kitamura, M., Minamiya, Y., Suzuki, H., Saito, R., Kamata, S., Nakae, H. & Ogawa, J. (2000) *Liver* **20**, 200–208.
42. Frossard, M., Blank, D., Joukhadar, C., Bayegan, K., Schmid, R., Luger, A. & Muller, M. (2005) *Diabet. Med.* **22**, 56–60.
43. Han, S. S., Kim, K., Hahm, E. R., Lee, S. J., Surh, Y. J., Park, H. K., Kim, W. S., Jung, C. W., Lee, M. H., Park, K., *et al.* (2004) *J. Cell. Biochem.* **93**, 257–270.
44. Park, S., Han, S. S., Park, C. H., Hahm, E. R., Lee, S. J., Park, H. K., Lee, S. H., Kim, W. S., Jung, C. W., Park, K., *et al.* (2004) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 2180–2195.
45. Koh, W. S., Lee, S. J., Lee, H., Park, C., Park, M. H., Kim, W. S., Yoon, S. S., Park, K., Hong, S. I., Chung, M. H., *et al.* (1998) *Anticancer Res.* **18**, 2487–2493.
46. Calderon, P. B., Cadrobbi, J., Marques, C., Hong-Ngoc, N., Jamison, J. M., Gilloteaux, J., Summers, J. L. & Taper, H. S. (2002) *Curr. Med. Chem.* **9**, 2271–2285.
47. Arakawa, N., Nemoto, S., Suzuki, E. & Otsuka, M. (1994) *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* **40**, 219–227.
48. Sestili, P., Brandi, G., Brambilla, L., Cattabeni, F. & Cantoni, O. (1996) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **277**, 1719–1725.
49. Clement, M. V., Ramalingam, J., Long, L. H. & Halliwell, B. (2001) *Antioxid. Redox. Signal.* **3**, 157–163.
50. Weinberger, A. & Simkin, P. A. (1989) *Semin. Arthritis Rheum.* **19**, 66–76.
51. Buettner, G. R. & Jurkiewicz, B. A. (1996) *Radiat. Res.* **145**, 532–541.
52. Antunes, F. & Cadenas, E. (2000) *FEBS Lett.* **475**, 121–126.
53. Oberley, L. W. (2001) *Antioxid. Redox. Signal.* **3**, 461–472.
54. Babior, B. M. (2000) *Am. J. Med.* **109**, 33–44.
55. Heyworth, P. G., Cross, A. R. & Curnutte, J. T. (2003) *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 578–584.
56. Edwards, W. C. (1968) *Vet. Med. Small. Anim. Clin.* **63**, 696–698.
57. Leveque, J. I. (1969) *Vet. Med. Small. Anim. Clin.* **64**, 997–999.
58. Choi, J., Lee, K. J., Zheng, Y., Yamaga, A. K., Lai, M. M. & Ou, J. H. (2004) *Hepatology* **39**, 81–89.
59. Riordan, N. H., Riordan, H. D., Meng, X., Li, Y. & Jackson, J. A. (1995) *Med. Hypotheses* **44**, 207–213.