

Molekulare Mechanismen der Alloxan-Toxizität sowie die radikalfangende und antidiabetogene Bedeutung von Melatonin

Einleitung

Ein erheblicher Teil unseres derzeitigen Wissens bezüglich Ätiologie und Behandlung des Diabetes mellitus beim Menschen wurde aus Erkenntnissen abgeleitet, die von entsprechenden Tiermodellen gewonnen wurden. Eine wichtige Rolle spielt dabei der bei Labornagern wie Maus und Ratte durch das chemische Diabetogen Alloxan (ALX) induzierte Insulinmangeldiabetes.

ALX ist ein Pyrimidinderivat, das bereits 1838 als Produkt der Oxidation von Harnsäure in Gegenwart von Salpetersäure dargestellt wurde (Wöhler und Liebig, 1838). Erhebliches medizinisches Interesse erlangte ALX allerdings erst seit Anfang der 40er Jahre, als Dunn und Mitarbeiter (Dunn und McLetchie, 1943; Dunn et al., 1943) nachwiesen, dass ALX schwere Zellnekrosen in den B-Zellen der LANGERHANSschen Inseln des Pankreas von Kaninchen bzw. Ratten hervorrufen kann. In den Folgejahren konnte in umfangreichen experimentellen Studien zweifelsfrei belegt werden, dass sich durch Gabe von ALX bei den meisten Tierspezies ein metabolischer Zustand induzieren lässt, der durch Hypoinsulinämie, Hyperglykämie, Ketonämie, Glucosurie, Polyphagie, Polydipsie, Polyurie und Gewichtsverlust charakterisiert ist. Bedingt wird er durch eine weitgehend selektive Zerstörung der insulinproduzierenden B-Zellen des Inselorgans und zeigt eine deutliche Ähnlichkeit zum Typ1-Diabetes des Menschen. Weiterführende Literatur zu diesem Themenkomplex ist in einer Vielzahl von Übersichtsarbeiten enthalten, auf die an dieser Stelle verwiesen sei (Webb, 1966; Rerup, 1970; Frerichs und Creutz-

feldt, 1971; Cahill et al., 1974; Malaisse, 1982; Lenzen und Panten, 1988; Oberley, 1988; Scarpelli, 1989; Bobyrev et al., 1992; Wolff, 1993; Cheta, 1998; Peschke et al., 2000a).

In einem ersten Teil der nachfolgenden Betrachtungen soll der Versuch unternommen werden, aufzuklären, inwieweit sich die Abfolge von radikalerzeugenden Einzelereignissen, an deren Ende B-Zellnekrose und chronischer Insulinmangel stehen, aus den bekannten physikochemischen Eigenschaften von ALX sowie aus den Besonderheiten des B-Zellstoffwechsels der LANGERHANSschen Inseln herleiten.

In einem zweiten Teil soll analysiert werden, welchen Einfluss das Indolamin Melatonin auf die Entwicklung des ALX-Diabetes nimmt, wobei eine mögliche antidiabetogene Bedeutung des Melatonins im Fokus der Untersuchungen stehen wird. Dass dem Melatonin in pharmakologisch hohen Dosen eine radikalfangende Bedeutung zuerkannt werden kann, war Ergebnis zahlreicher Untersuchungen der letzten Jahre, insbesondere der Arbeitsgruppe um Russel Reiter aus San Antonio, Texas (siehe auch separaten Beitrag in diesem Band). In der vorliegenden Untersuchung wird – bisherige Teilbefunde zusammenfassend – analysiert, ob die Schädigung der Insulin produzierenden pankreatischen B-Zelle durch ALX, einem seit Jahrzehnten experimentell eingesetzten Diabetogen, auf der Generierung von Radikalen beruht und ob sich die radikalfangende Eigenschaft des Melatonins mit seiner antidiabetogenen Wirksamkeit in Verbindung setzen lässt.

* Institut für Pathophysiologie der Martin-Luther-Universität Halle–Wittenberg, Halle, Bundesrepublik Deutschland

** Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle–Wittenberg, Halle, Bundesrepublik Deutschland

(Winterbourn und Munday, 1990). Bei der Oxidation von SH-Gruppen von Proteinen können sich intra- und intermolekulare Disulfidbrücken herausbilden.

Reagieren ALX und GSH miteinander, kommt es in geringem Umfang auch zur Bildung einer Substanz unbekannter Zusammensetzung, die als „compound 305“ bezeichnet wurde. Ältere Untersuchungen legten nahe, dass ihr Absorptionsmaximum bei 305 nm liegt (Patterson et al., 1949a; Lenzen und Munday, 1991). Spätere Untersuchungen sprechen nur noch von einem Absorptionsmaximum um 305 nm (Munday et al., 1993), wohingegen neuere Befunde darauf hindeuten, dass diese Verbindung eher bei 314 nm ihr Absorptionsmaximum aufweist (Brömme et al., 1999a, b, 2002a, b). Verschiedene Derivate von Alloxan reagieren mit GSH zu Verbindungen, die ebenfalls nahe 305 nm absorbieren (Munday et al., 1993). Andere Reduktionsmittel, wie Ascorbinsäure und

Cystein, führen hingegen nicht zur Bildung von „compound 305“ (Patterson et al., 1949b; vgl. auch Abb. 2). Daher gilt das Auftreten von „compound 305“ als spezifisch für die Reaktion zwischen ALX bzw. einigen ALX-Derivaten und GSH (Patterson et al., 1949a, b; Munday et al., 1993). Bei pH-Werten unterhalb von 4,0 kommt es in Gegenwart von GSH und ALX nicht zur Bildung von „compound 305“. Ebenso wenig wird diese Verbindung bei der Wechselwirkung zwischen Alloxansäure bzw. DS mit GSH erzeugt (Resnik und Wolff, 1956). Unabhängig vom eingesetzten Reduktionsmittel (GSH, Cystein, Ascorbinsäure) entsteht aus ALX jedoch immer DS (Archibald, 1945; Patterson et al., 1949a; Resnik und Wolff, 1956). Sowohl DS (Patterson et al., 1949a) als auch das $ALX\bullet$ (Houee-Levin et al., 1979; Nukatsuka et al., 1989a; Sakurai und Ogiso, 1994; Karoui et al., 1996; Murata et al., 1998; Brömme et al., 2002a, b) sind in Gegenwart von Sauerstoff

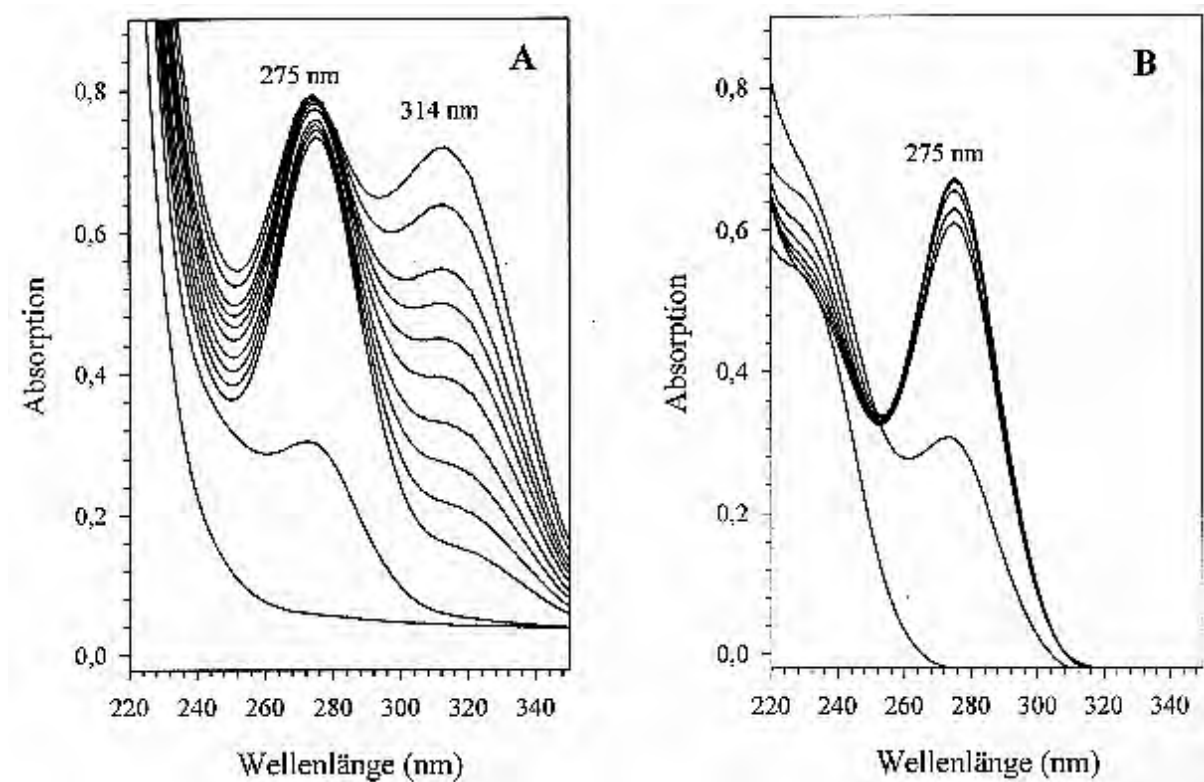
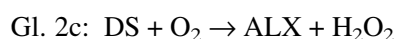
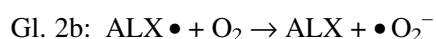
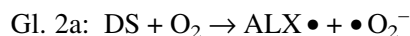


Abb. 2: UV-Spektrogramme der Wechselwirkung zwischen Glutathion bzw. Cystein und Alloxan. Die Spektren wurden im Abstand von 2 min bei 25 °C in PBS (pH 7,4) in Gegenwart von jeweils 1 mmol/l Glutathion (Ansatz A) bzw. Cystein (Ansatz B) sowie 50 μ mol/l DTPA (Diethylentriamin-pentaessigsäure) nach Zugabe von 100 μ mol/l Alloxan (pH 3,0) mit Hilfe eines Spektralphotometers (DU-640, Beckman Inc., USA) ermittelt. Dialursäure weist ein Absorptionsmaximum von 275 nm auf, „compound 305“ bei 314 nm. Durch Interaktion von Cystein und Alloxan wird „compound 305“ nicht gebildet.

instabil. Es konnte gezeigt werden, dass DS über das $\text{ALX}\bullet$ zum ALX autoxydiert. Bei dieser Reaktion wird molekularer Sauerstoff (O_2) verbraucht, was sich durch eine direkte polarographische Messung des Sauerstoffverbrauchs (Lenzen und Munday, 1991; Brömme et al., 2001b) bzw. durch die reduktive Bildung von Superoxidradikalanionen ($\bullet\text{O}_2^-$) bzw. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) belegen ließ (Fischer und Hamburger, 1980a, b; Munday, 1988; Winterbourn und Munday, 1989; Winterbourn und Munday, 1990; Brömme et al. 1999a, b, 2000a, b, 2001a, b).



„Compound 305“ entsteht wahrscheinlich durch eine Dimerisierung der radikalischen Intermediate $\text{ALX}\bullet$ und $\text{GS}\bullet$. Diese Verbindung kann somit als ein Konjugationsprodukt aufgefasst werden, das, im Gegensatz zu seinen radikalischen Ausgangsverbindungen ($\text{GS}\bullet$ und $\text{ALX}\bullet$), selbst wieder nichtradikalische (diamagnetische) Eigenschaften aufweist. Das $\text{ALX}\bullet$ lässt sich unter anoxischen Bedingungen, wie in Abbildung 3 gezeigt, mittels ESR-Spektroskopie nachweisen (Houee-Levin et al., 1979; Nukatsuka et al., 1989a; Sakurai und Ogiso, 1994; Karoui et al., 1996; Murata et al., 1998; Brömme et al., 2002a, b).

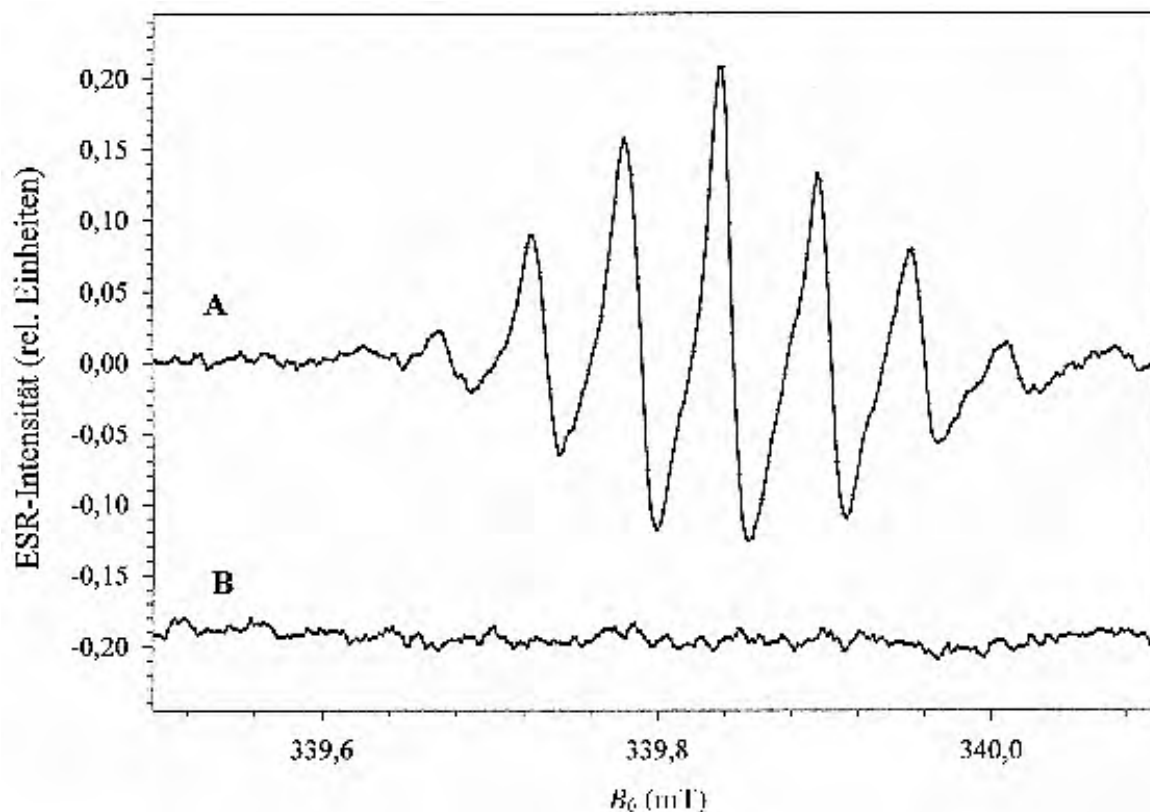
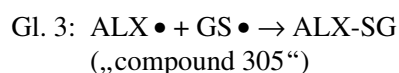
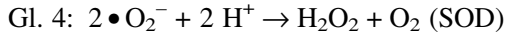
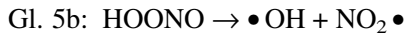
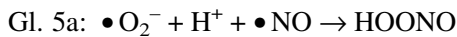


Abb. 3: ESR-Spektrogramm des Alloxanradikals vor bzw. nach seiner Reoxygenierung. Zusammensetzung des Reaktionsansatzes: 930 μl PBS (10 mmol/l, pH 7,4), 20 μl GSH (100 mmol/l), 50 μl Alloxan (100 mmol/l). 300 μl der Mischung wurden in eine mit N_2 durchspülte Flachquarz-Zelle überführt. Das entstehende und unter anaeroben Bedingungen stabile Alloxanradikal wurde bei 25 °C mittels eines ESR-Spektrometers (ERS 220, Berlin-Adlershof, DDR) bei 9,53 GHz vermessen (Spektrum A). Das Einbringen von Luft in den Messansatz löschte das $\bullet\text{ALX}$ (Spektrum B). Folgende Messbedingungen wurden eingestellt: Mikrowellenleistung: 10 mW, Modulationsamplitude: 0,01 mT, Feldscanbereich: 2 mT, Scanzeit: 120 Sekunden, Zeitkonstante: 0,5 Sekunden, Verstärkerstufe: 256 (modifiziert nach: Brömme et al., 2002a).

Die bei der Autoxidation von DS gebildeten $\bullet\text{O}_2^-$ können entweder spontan bzw. um ein Vielfaches schneller, durch Superoxiddismutasen (SOD) katalysiert, zu H_2O_2 und O_2 dismutieren (McCord und Fridovich, 1969; Fridovich, 1975, 1995).



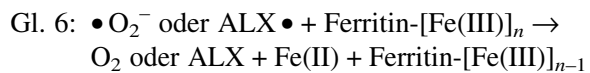
Darüber hinaus kann $\bullet\text{O}_2^-$ auch nichtenzymatisch mit Stickstoffmonoxid ($\bullet\text{NO}$) zu Peroxynitrit reagieren (Beckman et al., 1994; Crow und Beckman, 1995). Es gibt Befunde, die darauf hindeuten, dass die B-Zelle auf Peroxynitritbildung mit nekrotischem Zelltod reagiert (Delaney et al., 1996). Möglicherweise wird die Toxizität von Peroxynitrit auch durch seine Fähigkeit, Hydroxylradikale ($\bullet\text{OH}$) zu bilden, vermittelt (Beckman et al., 1990; Hogg et al., 1992; Edwards und Plumb, 1994).



Aus den Gleichungen 1 sowie 2a bis 2c ist ersichtlich, dass ALX und DS in Gegenwart eines geeig-

neten Reduktionsmittels sowie bei Anwesenheit von Sauerstoff ein Redoxpaar bilden, das zum *redox-cycling* befähigt ist. Dabei wird unter ständigem Verbrauch von Reduktionsäquivalenten Sauerstoff zu $\bullet\text{O}_2^-$ und H_2O_2 reduziert (Munday, 1988; Winterbourn und Munday, 1989, 1990; Lenzen und Munday, 1991; Brömme et al. 1999a, b, 2001a, b). Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 4 bzw. 5 dargestellt.

Superoxidradikale ($\bullet\text{O}_2^-$) als auch das beim *redox-cycling* intermediär entstehende $\text{ALX} \bullet$ sind in der Lage, aus Eisenspeichermolekülen (z. B. Ferritin) Eisen freizusetzen (Biernacki et al., 1984; Bolann und Ulvik, 1987; Miura und Sakurai, 1988; Reif et al., 1989; Reif, 1992).



Das freigesetzte Fe(II) ist bei physiologischem pH-Wert kaum löslich (Smith et al., 1990; Lesnefsky, 1994). Erst durch Einbindung in zelluläre Chelatoren, wie z. B. Adeninnukleotide, Citrat oder Succin-

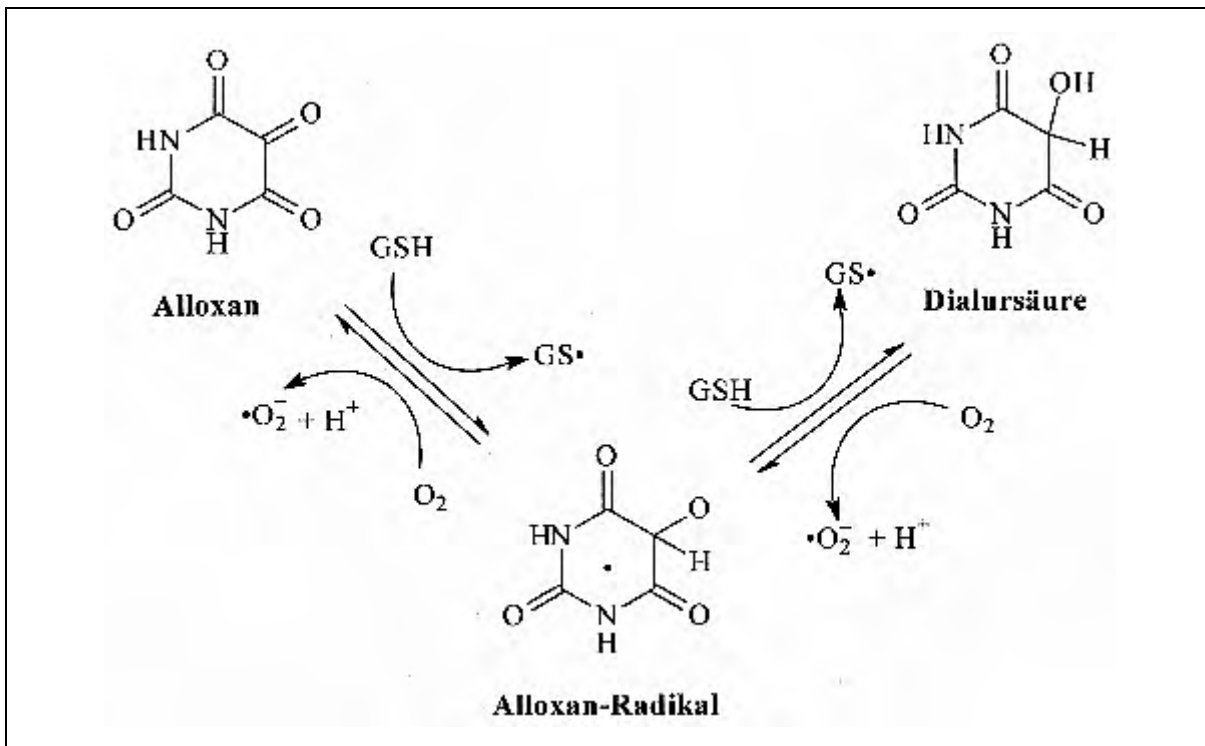


Abb. 4: *Redox-cycling* von Alloxan und Dialursäure in Gegenwart von Glutathion und Sauerstoff. Alloxan wird unter intermediärer Bildung des ALX-Radikals zu Dialursäure reduziert. Dabei werden zelluläre Reduktionsmittel (z. B. GSH) verbraucht. Die Dialursäure autoxydiert über das Alloxanradikal zurück zum Alloxan. Dabei wird molekularer Sauerstoff zum Superoxidanion-Radikal ($\bullet\text{O}_2^-$) bzw. zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reduziert. Der Vorgang kann wiederholt werden, solange geeignete Reduktionsmittel zur Verfügung stehen.

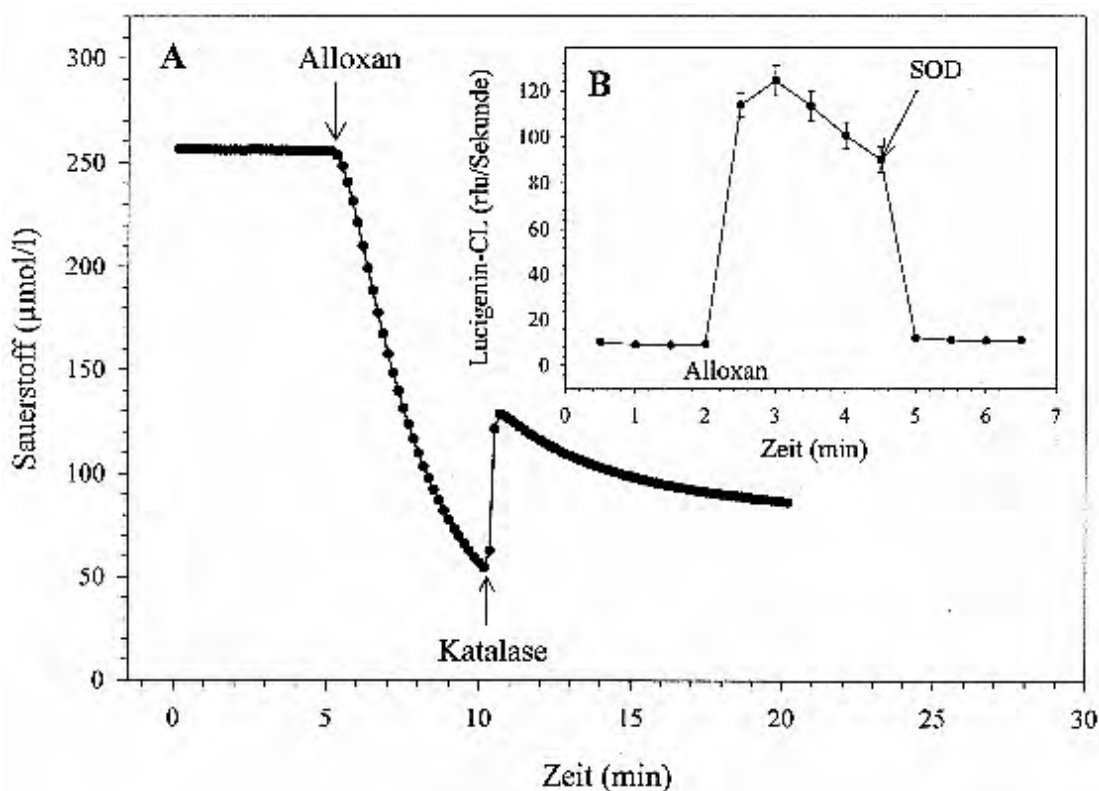
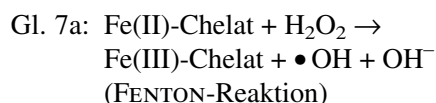


Abb. 5: Verbrauch von Sauerstoff in Gegenwart von Glutathion und Alloxan. Der Sauerstoffverbrauch wurde mit Hilfe eines Hochleistungsrespirometers (Oroborus, A. Paar Innsbruck, Österreich) polarographisch ermittelt. Zusammensetzung des Messansatzes (A): 1600 μl Tris-HCl (20 mmol/l, pH 7,4), 8 μl GSH (100 mmol/l, pH 7,2), 8 μl Alloxan (100 mmol/l, pH 3,0). Da die Zugabe von Katalase (600 Einheiten) wieder Sauerstoff aus dem Ansatz freisetzt, kann daraus abgeleitet werden, dass ein erheblicher Anteil des durch die ALX/GSH-Reaktion verbrauchten Sauerstoffs zu Wasserstoffperoxid reduziert sein musste. Die Einfügung (B) zeigt die $\bullet\text{O}_2^-$ -induzierte sowie Lucigenin-vermittelte Chemilumineszenz (CL) der ALX/GSH-Reaktion. Die Generierung der Lucigenin-CL wurde mittels eines Lumat LB 9501 (EG & Berthold, Wildbad, BRD) erfasst. Da die Zugabe von SOD die CL blockiert, kann gefolgert werden, dass diese hauptsächlich durch Superoxidradikale initiiert wurde. Die Zusammensetzung des Messansatzes war mit dem oben beschriebenen Ansatz vergleichbar (modifiziert nach: Brömme et al., 2000a).

nat können die so entstehenden Eisenkomplexe in Gegenwart von H_2O_2 die extrem zytotoxischen $\bullet\text{OH}$ generieren (Halliwell und Gutteridge, 1984; Burkitt und Gilbert, 1990; Gutteridge et al., 1990; Yamazaki und Piette, 1990).

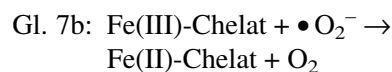
Ein entsprechendes $\bullet\text{DEPMPO-OH}$ -Addukt zeigt Abbildung 6. Die mittels Bleomycin nachweisbare freie Eisenkonzentration in menschlichen Geweben ist mit Werten um 3 $\mu\text{mol/l}$ jedoch sehr niedrig (Gutteridge, 1987).



Hydroxylradikale können auf Grund ihrer hohen Reaktivität mit den meisten Molekülen, die sich

in ihrer unmittelbaren Nähe befinden, interagieren (Czapski, 1984; Halliwell und Gutteridge, 1984). Die mögliche Diffusionsstrecke, die ein $\bullet\text{OH}$ zurücklegen kann, beträgt dabei ca. 1 nm, die Halbwertszeit weniger als 1 ns (Pryor, 1986; Elstner, 1990; Yu, 1994; Ohlenschläger, 1995). Daher spricht man auch von einer diffusionslimitierten Reaktivität des $\bullet\text{OH}$.

Das oxidierte Fe(III)-Chelat kann durch diverse Reduktionsmittel (z. B. durch $\bullet\text{O}_2^-$) wieder zum reaktiven Fe(II)-Chelat reduziert werden (Fong et al., 1976; Halliwell und Gutteridge, 1984, 1990; Lesnfsky, 1994).



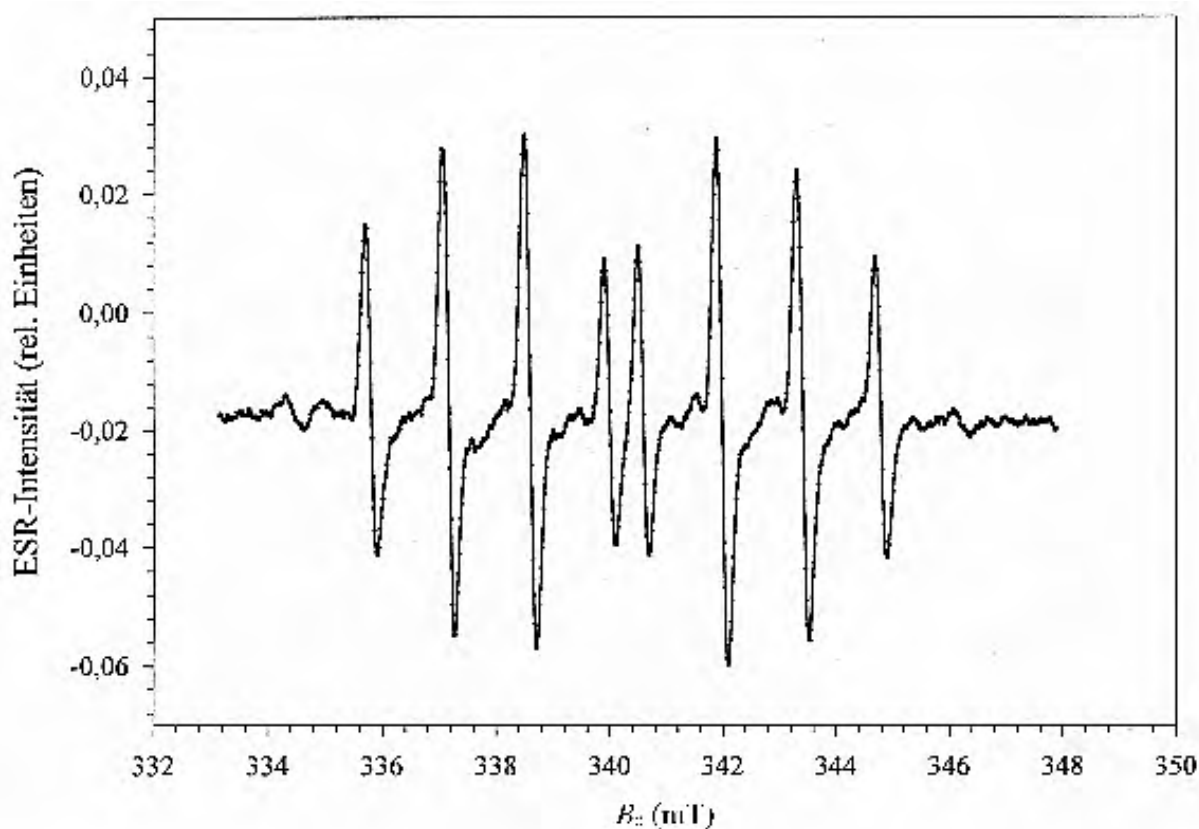
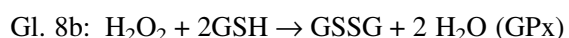
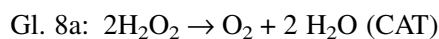


Abb. 6: ESR-Spektrum eines •DEPMPO-OH-Adduktes: Zusammensetzung des Kontrollmessansatzes: 910 µl PBS (10 mmol/l, pH 7,4), 20 µl DEPMPO (212 mmol/l), 50 µl H₂O₂ (10 mmol/l) sowie 20 µl NTA-Fe²⁺ (Eisenkomplex mit Nitrilotriessigsäure, je 10 mmol/l). 350 µl der Mischung wurden in eine Flachquarz-Zelle überführt und mittels eines ESR-Spektrometers (ERS 220, Berlin-Adlershof, DDR) bei 9,53 GHz vermessen. Folgende Messeinstellungen wurden verwandt: Mikrowellenleistung: 10 mW, Modulationsamplitude: 0,35 mT, Feldscanbereich: 20 mT, Scanzeit: 120 Sekunden, Zeitkonstante: 0,5 Sekunden, Verstärkerstufe: 256.

Die Gleichungen 7a und 7b beschreiben die Eisen-katalysierte Reduktion von H₂O₂ zum •OH. Sie wird als HABER-WEISS-Reaktion bezeichnet. Weitere Übergangsmetallionen wie Kupfer, Cadmium, Chrom und andere können in ihren unteren Oxidationsstufen Eisen als Katalysator grundsätzlich ersetzen und sind somit gleichfalls in der Lage, aus H₂O₂ •OH zu generieren (Goldstein et al., 1993).

Neben der Generierung von •OH durch die Eisen-katalysierte HABER-WEISS-Reaktion wird von einigen Autoren zusätzlich auch die Bildung von oxidierenden Eisenverbindungen, wie Ferryl-Ionen, FeO²⁺, bzw. Fe(IV)=O postuliert (Rush und Koppenol, 1986; Yamazaki und Piette, 1990; Halliwell und Gutteridge, 1992). Dabei wird insbesondere dem Ferryl-Ion ein dem •OH analog reaktives Verhalten nachgesagt.

Das für die •OH-Generierung erforderliche H₂O₂ wird durch intrazellulär vorkommende Enzyme wie Katalase (CAT) bzw. Glutathionperoxidase (GPx) weitgehend neutralisiert.



Das erhebliche Schädigungspotenzial des •OH erlaubt diesem Radikal sich an viele Moleküle, die sich in seiner Entstehungsnähe befinden, zu adduktieren bzw. sie durch Wasserstoffabstraktion zu modifizieren. Die dabei entstehenden sekundären Radikale bzw. deren Zerfallsprodukte sind z. T. selbst wieder reaktiv (Czapski, 1984; Gutteridge et al., 1990; Halliwell und Gutteridge, 1999).



→ Molekül-Modifikationen

→ Zelltod durch Apoptose oder Nekrose

Die durch $\bullet\text{OH}$ induzierten Schädigungen von makromolekularen Strukturen können über deren Funktionseinschränkung bzw. -verlust und damit einhergehender Desynchronisation des Stoffwechsels zum Untergang der betroffenen Zellen führen.

Vor einmal entstandenen $\bullet\text{OH}$ gibt es keinen enzymatischen Schutzmechanismus. Die Verteidigungsstrategie der Zelle gegenüber $\bullet\text{OH}$ besteht zum einen in der Vermeidung ihrer Entstehung (z. B. durch Sequestrierung von Eisen in Strukturen, aus denen heraus keine FENTON-Reaktion möglich ist, bzw. durch Aufrechterhaltung einer möglichst geringen *steady-state*-Konzentration von H_2O_2) sowie zum anderen in der Bereitstellung von geeigneten *scavenger*-Molekülen oder in der Reparatur bereits geschädigter Molekülstrukturen (Elstner, 1990; Ohlenschläger, 1995; Halliwell und Gutteridge, 1999).

Da die Eisen-katalysierte Bildung von $\bullet\text{OH}$ aus H_2O_2 mindestens eine freie Koordinationsstelle am Eisenion benötigt, bestimmte Chelatoren, wie Deferoxamin (DF) oder 1,10-ortho-Phenanthrolin, jedoch alle sechs Koordinationsstellen von Eisen komplexieren können, verhindern derartige Chelatoren auch bei Anwesenheit von H_2O_2 die Bildung von $\bullet\text{OH}$ (Heikkilä und Cabbat, 1982; Graf et al., 1984; Eizirik et al., 1986; Halliwell, 1991; Zager und Conrad, 1996).

Eine Reihe von natürlich vorkommenden bzw. synthetisch hergestellten organischen Verbindungen sind ebenfalls in der Lage, effizient mit $\bullet\text{OH}$ zu interagieren. Dadurch kann eine von der lokalen Konzentration dieser Moleküle abhängige Neutralisierung der aggressiven $\bullet\text{OH}$ erfolgen. Derartige Verbindungen werden $\bullet\text{OH}$ -Fänger oder $\bullet\text{OH}$ -*scavenger* genannt. Sie antagonisieren z. T. deutlich die ALX-Wirkung, was als Hinweis auf eine Beteiligung von $\bullet\text{OH}$ an der ALX-Toxizität gewertet werden kann.

Beispiele für derartige Fängermoleküle, die einen gewissen Schutz vor der diabetogenen Wirkung von ALX geben können, sind u. a. Ethanol (Heikkilä et al., 1974; Heikkilä et al., 1976; Saku-

rai et al., 1992b; Katsumata et al., 1994), Mannitol (Grankvist et al., 1979; Dillard et al., 1982), Dimethylthioharnstoff (DMTU) (Fischer und Hamburger, 1980a; Masukawa und Nakanishi, 1994; keine protektive Eigenschaft von DMTU fanden hingegen Jörns et al., 1999), Dimethylharnstoff (Heikkilä und Cabbat, 1978; Wilson et al., 1984; Sumoski et al., 1989), butyliertes Hydroxyanisol (Cowden et al., 1985), Dimethylsulfoxid (DMSO) (Heikkilä, 1977; Grankvist et al., 1979; Kurahashi et al., 1993; Jörns et al., 1999), Melatonin (Pierrefiche et al., 1993; Chen et al., 1994; Reiter et al., 1998; Brömme et al., 1999a, b, 2000a, b; Ebelt et al. 2000a, b; Sailaja Devi et al., 2000), Salizylsäure (Fang, 1968), Benzoesäure (Grankvist et al., 1979) und Probucol (Matsushita et al., 1989; Korchin et al., 1992; Bobyrev, 1997). Die Aufzählung ist unvollständig und ließe sich weiter fortsetzen.

Eine besondere Gruppe von $\bullet\text{OH}$ -*Scavengern* sind sog. *spin-traps*. Dies sind ebenfalls organische Moleküle, an die das kurzlebige $\bullet\text{OH}$ leicht adduktierbar ist. Das entstehende Addukt ist ein paramagnetisches Molekül, das sich, da es selbst wesentlich stabiler und damit langlebiger als das $\text{OH}\bullet$ ist, mittels ESR-Spektroskopie identifizieren und quantifizieren lässt (Gutteridge et al., 1990; Towell und Kalyanaraman, 1991; Frejaville et al., 1995; Roubaud et al., 1997; Brömme et al. 2000a, b; Ebelt et al. 2000a, b).

Häufig wird aber der Nachweis der Bildung von $\bullet\text{OH}$ indirekt anhand seiner entstehenden Folgeprodukte (*footprints*) geführt. Ein solches Marker-Molekül ist z. B. Malondialdehyd (MDA). MDA wird als reaktives Endprodukt der Lipidperoxidation (LPO) angesehen. Andere Marker-Moleküle sind die unter dem Einfluss von $\bullet\text{OH}$ -Attacken entstehenden hydroxylierten DNS-Basen, wie z. B. 8-Hydroxy-Guanosin oder hydroxylierte Aminosäuren und Aromate (Richmond et al., 1981; Halliwell und Gutteridge, 1984; Halliwell et al., 1988, 1991; Smith et al., 1990; Kurahashi et al., 1993; Lubec et al., 1998; Akcetin et al., 1999).

Voraussetzungen der selektiven Alloxantoxizität in der B-Zelle

Wenn sich die Zytotoxizität von ALX aus seiner Fähigkeit herleitet, in Gegenwart von Reduktionsmitteln und bei Anwesenheit von molekularem Sauerstoff reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu

bilden, dann sollte erwartet werden, dass in den B-Zellen der LANGERHANSschen Inseln Eigenschaften bzw. Besonderheiten vorhanden sein müssen, welche die bei Verwendung diabetogener

ALX-Dosen nachgewiesene Selektivität seiner Wirkung auf diese B-Zellen erklären können.

Wie bereits dargelegt, wandelt sich ALX bei physiologischem pH-Wert (ca. 7,4) innerhalb von Minuten irreversibel in die nicht diabetogene Alloxansäure um. Da bei dieser Umlagerung kein Sauerstoff verbraucht wird, entstehen dabei auch keine ROS. So gesehen kann die Bildung von Alloxansäure als Entgiftungsreaktion angesehen werden. Damit sollte die diabetogene Wirksamkeit von ALX im Blutkreislauf auf wenige Minuten beschränkt sein, was mit frühen experimentellen Beobachtungen im Einklang steht (Leech und Bailey, 1945). Gleichmaßen schützt deshalb auch eine Unterbindung der Blutzufuhr zum Pankreas für wenige Minuten während der intravenösen Injektion einer ansonsten diabetogenen Dosis von ALX komplett vor der Etablierung eines ALX-Diabetes (Gomori und Goldner, 1945). Abweichend dazu wurde von Bilic und Felber (1969) berichtet, dass ALX auch noch 25 min nach seiner Applikation im Blut, wenn auch nur in Spuren, nachweisbar war.

Sind geeignete Reduktionsmittel für das ALX vorhanden, kommt es innerhalb von Sekunden zur Bildung von Dialursäure (DS). So lassen sich etwa 90 bis 95 % des ALX innerhalb von 4 min nach Interaktion mit GSH in Form von DS wiederfinden (Washburn und Wells, 1997). Eine direkte Umlagerung von DS zu Alloxansäure scheint hingegen nicht möglich zu sein. Die Bildung von DS aus ALX benötigt *per se* keinen Sauerstoff (Brömme et al., 2002a, b). Ist jedoch Sauerstoff vorhanden, dann kommt es zu einem durch Reduktionsmittel und Sauerstoff angetriebenen Redoxzyklus zwischen ALX und DS und damit zu einer kontinuierlichen Generierung von ROS (primär $\bullet\text{O}_2^-$ und H_2O_2). Die Bildung der ROS kann andauern, solange Reduktionsäquivalente verfügbar sind (Winterbourn et al., 1989; Winterbourn und Munday, 1990; Lenzen und Munday, 1991; Brömme et al. 1999a, b). *In vitro* konnten bis zu 25 solcher Redoxzyklen nachgewiesen werden (Brömme et al., 2001a, b). Dies bedeutet, dass pro Molekül ALX bis zu 50 Moleküle GSH oxidiert werden. Dabei werden gleichzeitig bis zu 25 Moleküle O_2 zu H_2O_2 reduziert. Da *in vitro* die Anzahl der möglichen Redoxzyklen zwischen DS und ALX neben der begrenzten Verfügbarkeit des Reduktionsmittels auch noch durch die kontinuierliche Abnahme der O_2 -Konzentration im Ansatz

limitiert ist, darf davon ausgegangen werden, dass *in vivo*, wo derartige Limitationen weniger deutlich ausgeprägt sind, weit mehr solcher Zyklen durchlaufen werden können.

Bei Anwesenheit eines geeigneten Eisenspeichers (z. B. Ferritin) kann es gemäß Gl. 6 zu einer Freisetzung von Eisen kommen, welches dann sekundär die Möglichkeit einer Eisen-katalysierten Bildung von $\bullet\text{OH}$ aus H_2O_2 eröffnen würde (Reif et al., 1989; Reif, 1992).

Nimmt man nun an, dass in einer transient erhöhten Produktion von ROS ein wesentliches Merkmal der ALX-Toxizität liegt, dann müssten sich die für eine verstärkte ROS-Bildung charakteristischen zellulären Folgeerscheinungen, wie z. B. Erhöhung der Lipidperoxidation (LPO), die damit einhergehende Destabilisierung der Plasmamembran einschließlich nachfolgender Veränderungen im Membranpotenzial, Veränderungen in der Aktivität von Enzymen sowie Modifikationen an der DNS (erkennbar u. a. durch verstärktes Auftreten von Basenalterationen oder Strangbrüchen) nachweisen lassen. Zum anderen sollte sich ein Teil der ROS-bedingten Schäden durch Gabe von Radikalfängermolekülen oder bestimmten Eisenkomplexatoren verhindern lassen. Dies ist im Einzelnen durch entsprechende Literaturdaten detailliert belegbar, wie nachfolgend gezeigt werden soll.

Nach Gabe von ALX wurde beobachtet, dass sich B-Zellen verstärkt durch Vitalfarbstoffe wie Trypanblau bzw. Evansblau anfärben ließen (Grankvist et al., 1977; Jennische und Hansson, 1986). Zudem kommt es in ALX-geschädigten B-Zellen zu einem raschen Efflux von Insulin, einhergehend mit einer deutlichen Degranulierung der B-Zellen (Ebelt et al., 2000a, b; Peschke et al., 2000a). Fernerhin wurde eine Abnahme des Zellmembranpotenzials festgestellt (Carroll et al., 1994; Shen et al., 1994; Herson und Ashford, 1997). Ebenso wurde beobachtet, dass sowohl ALX als auch H_2O_2 das mitochondriale Membranpotenzial herabsetzen können (Drews et al., 2000). In ALX-behandelten Hepatozyten wurde der Austritt von Enzymen, wie Laktatdehydrogenase und Glutamat-Pyruvat-Transaminase, beobachtet (Harman und Fischer, 1982). Deutbar sind diese Befunde als Folge einer erhöhten Zellpermeabilität, deren Ursache wiederum in einer gesteigerten LPO gesehen werden kann. Letztere ist u. a. auch durch die Bildung von MDA belegbar (Nakakimura und Mizuno, 1980; Ivanov et al.,

1984; Godin et al., 1988; Zhang et al., 1991; Kumar und Menon, 1992a, b; Shanthi und Ramakrishnan, 1994; Alexandrova et al., 1998; Brömme et al., 2000a, b; Ebelt et al., 2000a, b; El-Missiry und El Gindy, 2000).

Als auslösende Agenzien für die beobachteten Effekte kommen weniger $\bullet\text{O}_2^-$ oder H_2O_2 in Frage, da für diese ROS nur eine limitierte Reaktivität nachgewiesen wurde. Eine LPO-initiierende Rolle wird daher dem aggressiveren $\bullet\text{OH}$ zugeschrieben. So können $\bullet\text{OH}$ leicht von konjugierten Doppelbindungen mehrfach ungesättigter Fettsäuren, die Bestandteil von Zellmembranen sind, Wasserstoffatome abspalten (Halliwell und Gutteridge, 1984; Jamieson et al., 1986).

Des Weiteren ließ sich nach Gabe von ALX auch ein Abfall der GSH-Konzentration in den B-Zellen feststellen (Leech und Bailey, 1945; Brückmann und Wertheimer, 1947; Harman und Fischer, 1982; Malaisse et al. 1982; Kumar und Menon 1992a, b; Saxena et al., 1993; Shanthi und Ramakrishnan, 1994). Der Abfall des GSH-Gehaltes hat dabei hauptsächlich zwei Ursachen. Zum einen dient GSH als Reduktionsmittel bei der Umwandlung von ALX zu DS (vgl. Gl. 1). Hier wirkt GSH demnach als Prooxidant, da es letztlich an der Generierung von ROS gemäß der Gl. 2a–c bzw. 7a–b beteiligt ist. Zum anderen wirkt GSH stets aber gleichzeitig auch als Antioxidant, weil es entsprechend der Gl. 10 in der Lage ist, die entstehenden $\bullet\text{OH}$ konzentrationsabhängig zu neutralisieren. Möglicherweise liegt hierin auch ein Deutungsansatz für die von Lazarow (1946) beschriebene Schutzfunktion von hohen GSH- bzw. Cystein-Konzentrationen im Blut. Die Ergebnisse der zitierten Arbeit lassen aber auch die Deutung zu, dass es wegen der Etablierung eines extrazellulären *redox-cycles* und der damit bereits intravasal einsetzenden Generierung von ROS nicht zur Ausbildung eines ALX-Diabetes kommt, was im Umkehrschluss als ein Argument für die bevorzugt intrazelluläre Wirkung von ALX aufgefasst werden kann.



Eine Reihe von Experimenten konnte zudem nachweisen, dass nach ALX-Gabe vermehrt Basenmodifikationen sowie Strangbrüche von DNS auftraten (Yamamoto et al., 1981a, b; Uchigata et al., 1982; Ishii et al., 1988; Takasu et al., 1991a, b; Sakurai et al., 1992a, 1994; Heller et al., 1994; Sa-

kurai und Ogiso, 1995; Murata et al., 1998; Rho et al., 2000). Begleitet wurden die DNS-Strangbrüche von einer Aktivierung der Poly-(ADP-Ribose-)Polymerase (PARP), einem Enzym, das Kernproteine in der Nähe von geschädigter DNS durch ADP-Ribosylierung für eine nachfolgende Reparatur markiert. Durch die ADP-Ribosylierung der Histone kommt es nach Yamamoto et al. (1981) zu einer Verknappung von NAD^+ in der B-Zelle, die ihren Zelltod beschleunigen soll (Yamamoto et al., 1981a, b; Uchigata et al., 1983; Heller et al., 1994, 1997).

Viele dieser ALX-induzierten Veränderungen in und an der B-Zelle lassen sich mehr oder weniger vollständig durch eine vorherige Gabe von Radikalfängern bzw. Eisenkomplexatoren wie z. B. Deferoxamin (DF) oder Diethylentriaminpentaessigsäure (DETAPAC) verhindern (Fang, 1968; Heikkila et al., 1974; Heikkila, 1977; Grankvist et al., 1979; Fischer und Hamburger, 1980a, 1981; Dillard et al., 1982; Heikkila und Cabbat, 1982; Grankvist und Marklund, 1983; Wilson et al., 1984; Cowden et al., 1985; Eizirik et al., 1986; LeDoux et al., 1988; Matsushita et al., 1989; Korchin et al., 1992; Kurahashi et al., 1993; Pierrefiche et al., 1993; Katsumata et al., 1994; Bobyrev, 1997; Jörns et al., 1999; Brömme et al., 2000a, b; Ebelt et al., 2000a, b; Ho et al., 2000). Es gibt aber auch Angaben in der Literatur, die derartig protektive Wirkungen nur mit Einschränkungen (Grankvist und Marklund, 1983; Jörns et al., 1999) bzw. hinsichtlich von DETAPAC nicht finden (Yamazaki und Piette, 1990). Andererseits wirft die oftmals nachgewiesene Schutzfunktion von intravasal verabreichten Enzymen, wie SOD oder CAT (Grankvist et al., 1979; Fischer und Hamburger, 1980b; Gandy et al., 1982; Uchigata et al., 1982; Thaete et al., 1985; Abdel-Rahman et al., 1992; Jörns et al., 1999), die Frage auf, ob der primäre Angriffspunkt von ALX extra- oder intrazellulär lokalisiert ist. Die Tatsache, dass diese Enzyme eine protektive Wirkung zeigen, obwohl sie die intakte Zellmembran der B-Zellen nicht passieren können, lässt eine primäre ALX-induzierte Radikalgenerierung im Extrazellularraum bzw. direkt an der Zellmembran möglich erscheinen. Dafür sprechen auch Untersuchungen, bei denen ein System aus Xanthin bzw. Hypoxanthin und Xanthinoxidase als ROS-Generator verwendet wurde (Burkart et al., 1992; Heller et al., 1994; Ebelt et al., 2000a, b; Peschke et al., 2000a). Hier erscheint

ein Hinweis auf die verwendete Quelle der Xanthinoxidase von Bedeutung. So vermag z. B. eine mikrobielle Xanthinoxidase grundsätzlich keine $\bullet\text{O}_2^-$ zu bilden (Wippich et al., 2001a, b). Andererseits ist jedoch extrazellulär die Konzentration von geeigneten Reduktionsmitteln, ohne die die Generierung von ROS *via* ALX nicht stattfinden kann, um ein Vielfaches niedriger als im Zellinneren. Im Blutplasma findet man GSH-Konzentrationen im mikromolaren Bereich (Navarro et al., 1997; Halliwell und Gutteridge, 1999). Intrazellulär liegen die gefundenen GSH-Konzentrationen zwischen 1 und 10 mmol/l (Kosower und Kosower, 1978; Halliwell, 1991; Yu, 1994; Navarro et al., 1997). Zudem vermögen die $\bullet\text{O}_2^-$ auf Grund ihrer Polarität die intakte Zellmembran kaum zu durchdringen. Die protonierte und damit nichtpolare Form von $\bullet\text{O}_2^-$ ($\bullet\text{O}_2\text{H}$), die die Membran passieren könnte, existiert nur bei pH-Werten unterhalb von 4,0 (Cadenas, 1989; Ohlenschläger, 1995). Ferner wurde eindeutig gezeigt, dass $\bullet\text{O}_2^-$, im Gegensatz zu $\bullet\text{OH}$, nicht die Fähigkeit zur Initiierung der LPO besitzt (Halliwell und Gutteridge, 1984; Jamieson et al., 1986). Lediglich das nichtpolare H_2O_2 ist zu einer uneingeschränkten Membranpassage befähigt, so dass bei einer angenommenen ALX-bedingten extrazellulären H_2O_2 -Bildung eine intrazelluläre Wirkung dann vorstellbar erscheint, wenn gleichzeitig Eisen aus entsprechenden zytosolischen Speichern mobilisierbar wäre. Da $\bullet\text{O}_2^-$ diese Fähigkeit besitzt (Biemond et al., 1984) und sie für ALX $\bullet$ vorstellbar ist (Miura und Sakurai, 1988; Reif, 1992), beide radikalischen Spezies bei extrazellulärer Generierung die Zellmembran aber nicht zu durchdringen vermögen, ergeben sich hier erhebliche Deutungsschwierigkeiten hinsichtlich der Erklärung der nachgewiesenen intrazellulären Veränderungen, die letztlich zu den beobachteten Nekrosen der B-Zellen nach ALX-Gabe führen.

Favorisiert man hingegen eine bevorzugt intrazelluläre Bildung von ROS durch ALX, dann müsste ALX zunächst rasch über die Zellmembran aufgenommen werden können, um damit der ansonsten stattfindenden schnellen Umlagerung zu Alloxansäure zu entgehen. Dies setzt voraus, dass ALX rasch durch die B-Zellen aufgenommen wird. Die selektive Aufnahme von ALX durch die B-Zellen ist vielfach experimentell belegt worden (Hammarström und Ullberg, 1966; Hammarström et al., 1967; Weaver et al., 1978a; Gorus et al., 1982; Ma-

laisse et al., 1982). Die rasche Aufnahme von ALX durch die B-Zelle erfolgt dabei hauptsächlich durch die Mitnutzung des für die B-Zelle der Ratte charakteristischen Glucosetransporters GLUT2 (Weaver et al., 1978a, b; Gorus et al., 1982; Unger, 1991; De Vos et al., 1995). Die GLUT2-Transporter tragen auf Grund ihrer kinetischen Eigenschaften zur sehr schnellen Äquilibration der Glucose zwischen dem extrazellulären Raum und dem Zellinneren bei (Hellman et al., 1971). Interessanterweise verfügen die ebenfalls in der LANGERHANSschen Insel vorkommenden A- bzw. D-Zellen nicht über die gleichen „*high capacity*“-GLUT2-Transporter der B-Zelle (Thorens et al., 1988; Orci et al., 1989). Dieser Umstand ist möglicherweise ein Grund für deren Unempfindlichkeit gegenüber ALX. Die ALX-Aufnahme in die B-Zelle unter Mitnutzung des GLUT2-Transporters würde auch erklären, weshalb steigende Konzentrationen von D-Glucose im Blut die Wirksamkeit von ALX herabsetzten (Grankvist et al., 1977; Idahl et al., 1977; Gorray et al., 1983; Jansson und Sandler, 1988; Shen et al., 1994; Park et al., 1995). Daher erscheint es auch verständlich, dass die Gabe von 3-O-Methylglucose, einem Hemmstoff der Glucoseaufnahme, vor ALX-Diabetes zu schützen vermag (Jansson und Sandler, 1988; De Vos et al., 1995). Auch die durch Feuers und Mitarbeiter (1991) beobachtete tageszeitabhängig unterschiedliche Sensitivität von Mäusen gegenüber ALX könnte mit den sich im Tagesverlauf verändernden Glucosekonzentrationen im Blut im Zusammenhang stehen. Dies steht in Übereinstimmung mit Beobachtungen, dass die Empfindlichkeit gegenüber ALX auch mit der Dauer des Fastens korreliert ist (Hernandez et al., 1978). Des Weiteren bietet das etwa 100fach geringere Vorkommen von GLUT2-Transportern in pankreatischen B-Zellen des Menschen eine Erklärungsmöglichkeit für die beobachtete deutlich geringere diabetogene Wirksamkeit von ALX beim Menschen (De Vos et al., 1995).

Einmal in die B-Zelle aufgenommen, trifft ALX auf Reduktionsmittel wie GSH oder Ascorbat, die intrazellulär in beachtlich hoher Konzentration vorkommen. Für GSH liegen die ermittelten Konzentrationen zwischen 0,5 und 1,0 mmol/l (Yu, 1994; Navarro et al., 1997). In anderen Geweben kann diese für das GSH bis zu 10 mmol/l betragen (Kosower und Kosower, 1978; Al-Turk und Stohs, 1981). Damit sind wesentliche Voraussetzungen

für eine durch *redox-cycling* von ALX und DS vermittelte intrazelluläre Generierung von $\bullet\text{O}_2^-$, H_2O_2 und letztlich auch von $\bullet\text{OH}$ gegeben, die das nachgewiesene Schädigungsspektrum leichter deutbar erscheinen lassen. Hinzu kommt, dass die B-Zellen – im Gegensatz zu Hepatozyten, die ALX wegen des Vorhandenseins des gleichen Glucosetransporters (GLUT2) ebenfalls vergleichsweise rasch aufnehmen können – nur über eine sehr eingeschränkte enzymatische Entgiftungskapazität für ROS verfügen (Malaisse et al., 1982; Lenzen et al., 1996). Darüber hinaus gib es in der Literatur Hinweise, die besagen, dass ALX zusätzlich die Aktivität antioxidativer Enzyme zu hemmen vermag (Crouch et al., 1981; Simonian et al., 1987; Kumar und Menon, 1992a, b; Saxena et al., 1992; Shanthi und Ramakrishnan, 1994; Kosenko et al., 1999). Da junge Ratten im Gegensatz zu älteren Tieren über eine höhere Kapazität antioxidativer Enzyme verfügen, verwundert es nicht, dass ältere Tiere im Vergleich mit jungen Ratten bei Gabe vergleichbarer ALX-Dosen mit einer höheren MDA-Bildung reagieren (Gatsko et al., 1985).

Das intrazelluläre *redox-cycling* generiert nicht nur ROS, sondern verbraucht dabei auch erhebliche Mengen antioxidativ wirksamer Schutzmoleküle wie GSH und/oder Ascorbat. Somit kann die B-Zelle kurzzeitig regelrecht von ROS „überschwemmt“ werden, wodurch sich ein vorübergehendes Ungleichgewicht von Bildung und Entgiftung von ROS zugunsten der Bildung einstellt. Dieser Zustand wird als oxidativer Stress bezeichnet (Sies, 1986). Neben den bereits erwähnten Veränderungen an der B-Zelle, wie der Steigerung

der LPO, der Erhöhung der Membranpermeabilität und dem Auftreten von DNS-Modifikationen, kommt es auch zu Funktionseinschränkungen von Proteinen und Enzymen. So wurde z. B. berichtet, dass die vorwiegend zytosolisch vorkommende Glucokinase durch ALX effektiv gehemmt werden kann. Die Hemmung kommt wahrscheinlich durch die ALX-bedingte Oxidation essenzieller SH-Gruppen in der Glucokinase zustande (Lenzen et al., 1987; Lenzen und Panten, 1988). Ebenso kommt es zu einem Aktivitätsverlust der Aconitase. Letzterer soll durch eine $\bullet\text{O}_2^-$ -induzierte Mobilisierung von Eisen aus dem aktiven Zentrum dieses Enzyms bedingt sein (Boquist und Ericsson, 1984; Boquist und Bostrom, 1985; Lenzen und Mirzaie-Petri, 1992; Gardner et al., 1995). Durch die Hemmung dieser Enzyme, die an der Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten für die mitochondriale Atmungskette beteiligt sind, soll es generell zu einer Verknappung von ATP in den B-Zellen kommen. Da es durch die gesetzten Schäden an der DNS auch zu einer Aktivierung der PARP kommt, die NAD^+ als Substrat für die Polymerasereaktion verwendet, kommt es zudem zu einer raschen Verarmung von intrazellulär verfügbarem NAD^+ (Yamamoto et al., 1981a), was zusätzlich die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung und damit der ATP-Versorgung der B-Zelle beeinträchtigen würde.

Obwohl bislang nicht endgültig belegbar, bietet der geschilderte intrazelluläre Wirkungsmechanismus von ALX für die nachweisbaren Veränderungen an der B-Zelle die überzeugenderen Deutungsmöglichkeiten.

Rolle von Melatonin als Scavenger von Hydroxylradikalen

Melatonin (N-Acetyl-5-methoxytryptamin) ist evolutionsbiologisch betrachtet ein konservatives Molekül, das bereits bei Algen und höheren Pflanzen sowie bei nahezu allen Evertebraten und allen Vertebraten nachweisbar ist. Bei Säugetieren wird es vornehmlich im Pinealorgan, aber auch in der Retina und bei Rodentia zusätzlich in der HARDERSchen Drüse gebildet. Die Synthese von Melatonin unterliegt einem deutlich ausgeprägten circadianen Rhythmus mit hohen Bildungsraten und Blutkonzentrationen zur Nachtzeit.

Die Epiphyse, wegen ihrer Ähnlichkeit mit einem Pinienzapfen als Zirbeldrüse oder Pineal-

organ, wegen ihrer antigonadotropen Partialfunktion als „Keuschheitsdrüse“ bezeichnet, ist in der aufsteigenden Wirbeltierreihe bis zur Entwicklungshöhe der Reptilien ein Lichtsinnesorgan (medianes „drittes Auge“). Bei Vögeln tritt ein Funktionswandel hinzu, die Epiphyse wird hier zum Generator circadianer Rhythmen. Bei Säugetieren wird die *pacemaker*-Funktion in einen hypothalamischen Kern, den Nucleus suprachiasmaticus, verlagert, das Pinealorgan ist ausschließlich endokrine Drüse mit erhaltener enger Anknüpfung an das optische System. Photisch gesteuerter nervaler „input“ (insbesondere über Katecholamine) wird

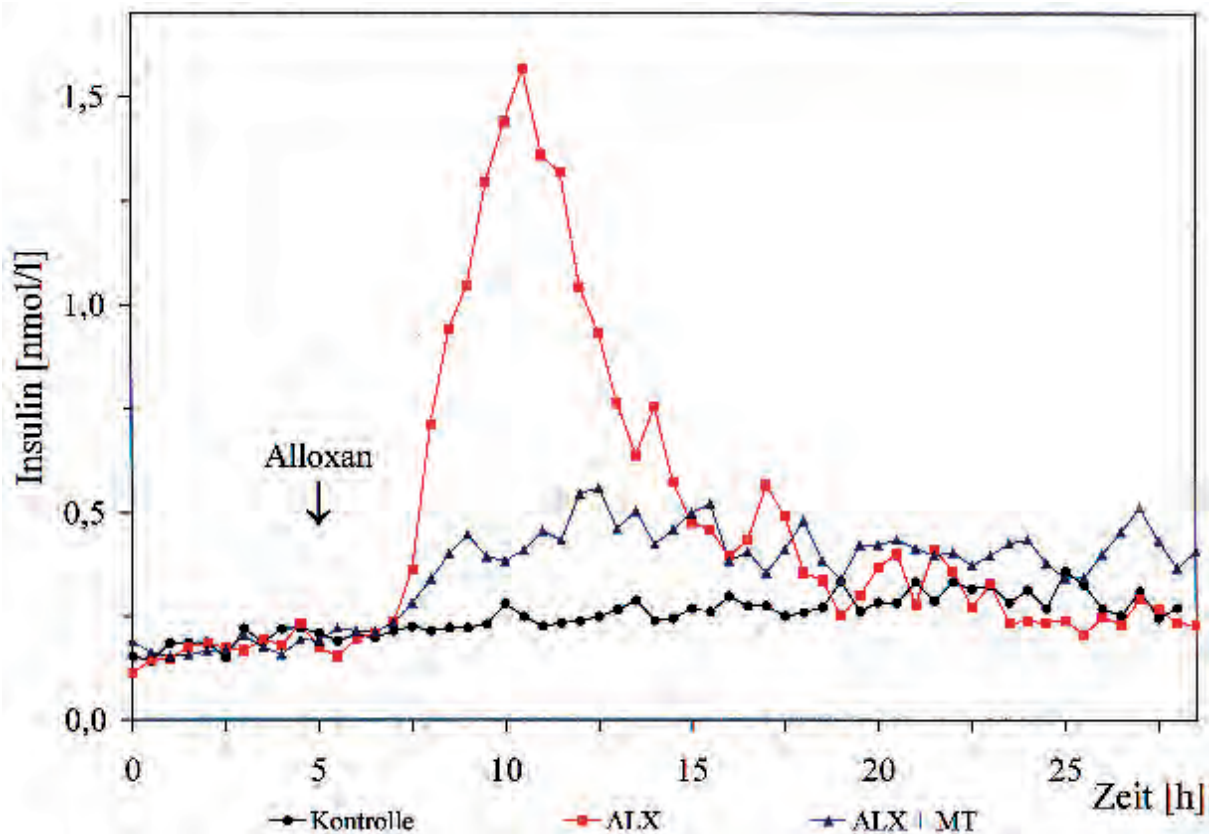


Abb. 7: Synopsis der Insulinfreisetzung isolierter Ratten-Inseln im Perifusionsexperiment ohne Behandlung, bei alleiniger Alloxan- sowie kombinierter Melatonin+Alloxan-Behandlung. – Die Alloxan-Applikation (2 mmol/l) erfolgte über einen Zeitraum von 9 min, Melatonin (1 mmol/l) wurde über die gesamte Dauer des Perifusionsexperimentes verabreicht. Jede Kurve zeigt ein repräsentatives Beispiel von jeweils mindestens 3 Experimenten. Pro Perifusion wurden 300 isolierte pankreatische Inseln neonater Wistar-Ratten in das Perifusionssystem eingebracht und mit Kulturmedium 199 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), dem 2,22 g/l Hydrogencarbonat, 1,75 g/l BSA (Rinderserumalbumin), 80 mg/l Gentamycin und 3 mmol/l Glucose zugesetzt worden waren, kontinuierlich perifundiert und aller 30 min Proben (10 ml) mittels Fraktionssammler gewonnen. Der Schockfrierung schloss sich die radioimmunologische Insulinbestimmung an. Nähere Angaben siehe Peschke et al., 1997, 2000b; Csernus et al., 1998; Peschke und Peschke, 1998. Nach Alloxan-Applikation erfolgt eine auf Zelluntergängen beruhende verstärkte Insulinfreisetzung, die nach 2 h beginnt, nach 5 h ihr Maximum erreicht und nach 10 h überwunden ist. Dauerapplikation von Melatonin verhindert den Alloxaneffekt weitgehend (modifiziert nach: Ebelt et al., 2000b).

in einen hormonellen „output“ (Melatonin) umgesetzt. Die Epiphyse fungiert als photoneuroendokriner „transducer“ und informiert mit nächtlich erhöhter Melatoninausschüttung über das Verhältnis von Licht- und Dunkelzeit im Tagesverlauf (Uhrenfunktion) sowie dessen Veränderungen im Jahresverlauf (Kalenderfunktion). Damit gehört die Epiphyse mit ihrem circadianrhythmischen, in unterschiedlicher Höhe sezernierten Melatonin zum morphologischen Substrat, das wir unter dem Begriff der „inneren Uhr“ subsumieren. Auf weitere Einzelheiten soll hier nicht eingegangen werden (Übersichten siehe Vollrath, 1981; Stehle

und Korf, 1996; Reuss, 1996; Vanecek, 1998; van Esseveldt et al., 2000).

Bedeutungsvoll für die von uns in dieser Arbeit verfolgten Thematik ist vielmehr eine vor mehr als 30 Jahren erschienene Arbeit von Milcu und Mitarbeitern (Milcu et al., 1971), in der erstmals die protektive Bedeutung pinealer Peptide gegenüber der Manifestation eines experimentellen Alloxan-Diabetes festgestellt wurde, ohne dass verständlicherweise die Phänomene aus dem Blickwinkel von Radikalgenerierung und -neutralisierung gesehen werden konnten. Die bei experimentell Streptozotocin-diabetischen Ratten durch zusätzliche

Exstirpation oder sympathische Denervation der Epiphyse hervorgerufenen verstärkten Glucose- und Glucagonspiegelerhöhungen gliedern sich sinnvoll in das Grundkonzept einer pinealen Diabetes-Protektion ein (Munoz Barragán et al., 1983, 1984, 1986; Mellado et al., 1989). Gleichzeitig

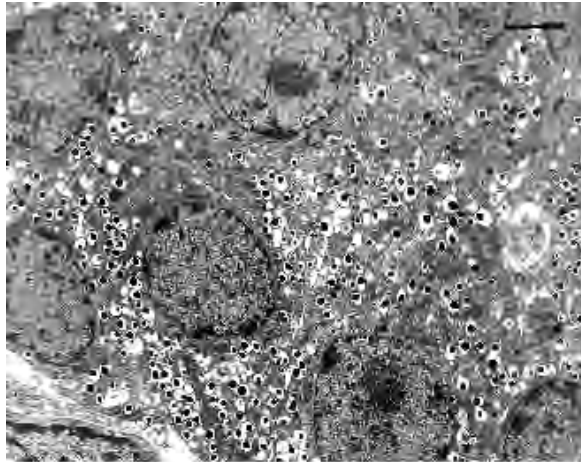


Abb. 8 a

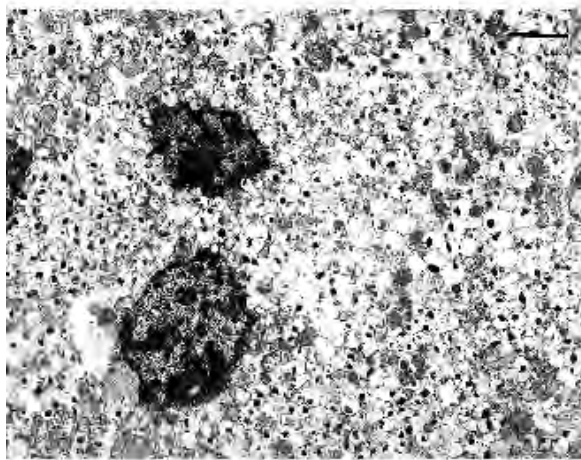


Abb. 8 b

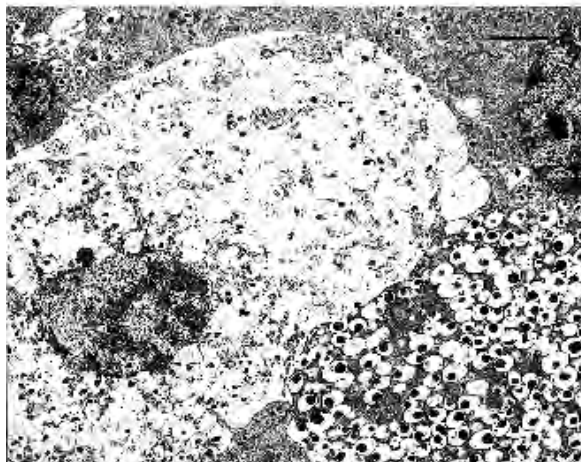


Abb. 8 c

lenken sie den Blick auf gerade in jüngster Zeit in den Vordergrund getretene Überzeugungen, dass dem Pinealhormon Melatonin eine *free-radical-scavenger*-Bedeutung zukommt, und zwar besonders hinsichtlich von Radikalen der Sauerstoff-Familie (ROS) (Poeggeler et al., 1993; Reiter, 1993, 1995, 1996, 1997, 2002 im selben Band; Reiter et al., 1994; Matuszak et al., 1997). In diesem Zusammenhang sind zwei Beobachtungen interessant. Zum einen wurde festgestellt, dass junge Tiere, mit vergleichbaren Alloxandosen behandelt, geringere Schädigungsmuster aufwiesen als ältere Tiere (Gatsko et al., 1985). Dieser zunächst nicht erklärbare Befund gewinnt in Kenntnis der wohl bekannten Tatsache an Bedeutung, dass der Melatonin-Spiegel in der Jugendzeit relativ hoch ist und sich mit zunehmendem Alter auf einen kaum noch detektierbaren Titer reduziert. Im Kontext dieses Sachverhaltes steht die Beobachtung, dass eine Applikation von Alloxan am Tag von stärkeren Schädigungen gefolgt ist als zur Nachtzeit, während der bekannterweise die Melatoninspiegel deutlich erhöht sind (Feuers et al., 1991).

Ausgangspunkt der hier vorzustellenden Befunde war die Beobachtung, dass Melatonin auf das Ausmaß physiologischer und morphologischer Veränderungen der pankreatischen B-Zelle nach ALX-Applikation im *in vitro*-Superfusionsexperiment einen nachhaltigen Einfluss in dem Sinne ausübte, dass die ALX-Effekte abgeschwächt oder gänzlich unterdrückt wurden. Wurden andere Dia-

Abb. 8: Gegenüberstellung elektronenmikroskopischer Aufnahmen von pankreatischen Inseln neonater Wistar-Ratten ohne Behandlung (a) sowie nach Alloxan- (b) oder kombinierter Melatonin+Alloxan-Behandlung (c). Nach erfolgter 30-stündiger Perfusion, wie in der Abbildungsunterschrift 7 beschrieben, wurden die Inseln aus der Perifusionskammer zurückgewonnen und der elektronenmikroskopischen Aufarbeitung zugeführt. Fixierung nach Karnowsky, Nachfixierung mit Osmiumtetroxid, Einbettung: Durcupan (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland), Nachkontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat. Nach Alloxan-Applikation wurden ausschließlich schwer geschädigte, nekrotische Zellen gefunden, während das Schädigungsausmaß nach zusätzlicher Melatonin-Applikation geringer war. Neben schwer geschädigten, nekrotischen Zellen finden sich zahlreiche morphologisch unauffällige Zellen ohne Schädigungen, wie sie für die Kontrollgruppe (a) typisch sind. Maßstab: 2,5 µm.

betogene wie Streptozotocin oder Testsubstanzen wie SNAP (S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin, NO-Donator) und Hypoxanthin/Xanthinoxidase (ROS-Generierung) verabreicht, trat ebenso wie nach ALX-Applikation eine temporäre Steigerung der Insulinliberation auf, deren Zeitverlauf ein jeweils Substanz-spezifisches Muster aufwies. 24 h nach Applikation von ALX bzw. Streptozotocin waren die KCl- und Glucose-stimulierbare Insulinsekretion deutlich eingeschränkt, während nach Gabe von SNAP und Hypoxanthin/Xanthinoxidase die Sekretionsleistung der B-Zellen nach KCl- und Glucose-Stimulation keine Beeinträchtigung erkennen ließ. Morphologisch waren allein nach ALX und Streptozotocin B-Zellnekrosen zu beobachten. B-Zellapoptosen hingegen waren lediglich nach SNAP-Applikation (NO-Freisetzung) verstärkt identifizierbar. Vergleichbare Effekte, wie von der präventiven Melatoningabe zur Vermei-

dung der ALX-Effekte bereits genannt, konnten hier nicht beobachtet werden. Die nach Streptozotocin, SNAP oder Hypoxanthin/Xanthinoxidase beobachteten zellschädigenden Einflüsse vermochte Melatonin nicht zu mindern oder aufzuheben (Ebelt et al., 1998, 1999, 2000a, b, 2001; Brömme et al., 1999a, b, 2000a, b, 2001a, b; Peschke et al., 2000a).

Dieser Sachverhalt wird am Beispiel von ALX durch die Abbildung 7 veranschaulicht, aus der unschwer zu entnehmen ist, dass Melatonin den Alloxan-Effekt, gemessen an der Insulinfreisetzung, nahezu löscht, wohingegen die Streptozotocin-Effekte durch Melatonin nicht antagonisiert werden konnten. Zur Erklärung der drei bis fünf Stunden nach Gabe der oben genannten Substanzen beobachteten starken Insulinfreisetzung kann aufgeführt werden, dass der Efflux von Insulin nach Wechselwirkung der B-Zelle mit den generierten Radikalen

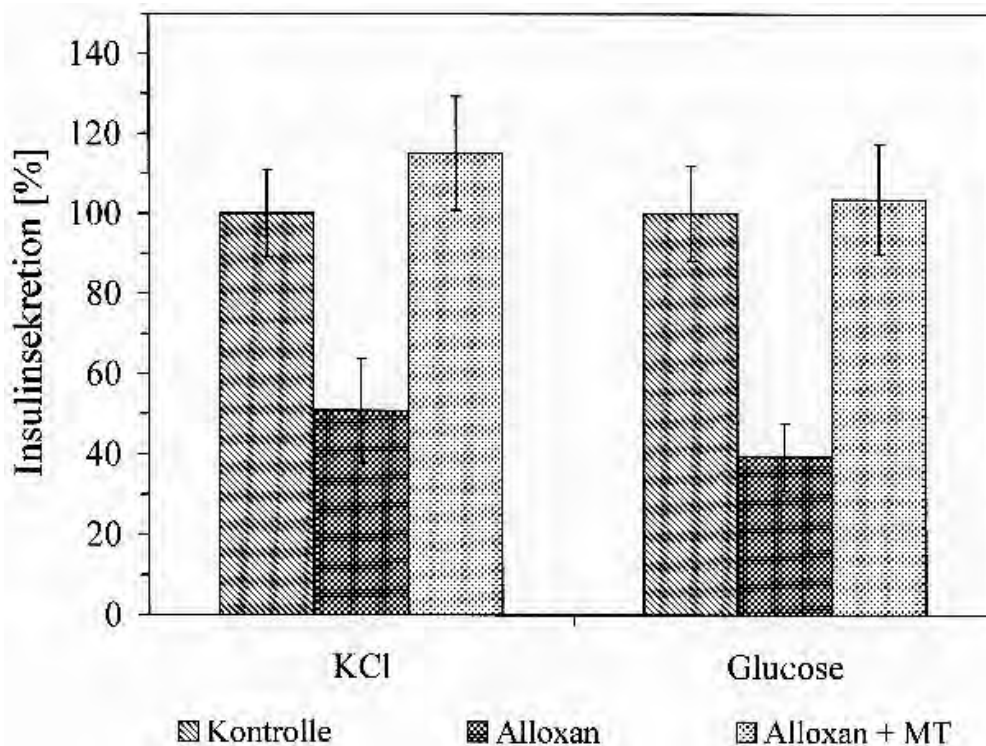


Abb. 9: Insulin-Sekretionskapazität nach alleiniger Alloxan- sowie kombinierter Melatonin+Alloxan-Applikation. Den einzelnen Perifusionsexperimenten lagen verschiedene Kontrollmaßnahmen zugrunde, die u. a. der Erfassung der stimulierbaren Insulinsekretionskapazität dienten und durch Anfangs- und Endstimulationen mit gleichen Glucose- und KCl-Konzentrationen herbeigeführt wurden (in der Abbildung 7 wurde auf die Darstellung dieser Maßnahmen der besseren Übersichtlichkeit wegen verzichtet). Im Ergebnis dieser Applikationen konnte gesichert werden, dass sowohl die KCl- als auch die Glucose-stimulierte Insulinsekretion durch Alloxan-Gabe um ca. 50 % gesenkt wurde, während die zusätzliche Melatonin-Applikation diese Effekte vollständig verhinderte, was Ausdruck einer erhaltenen intakten Sekretionsmaschinerie ist (modifiziert nach: Ebelt et al., 2000b).

nicht etwa auf einer Sekretionssteigerung, sondern auf Membranschädigungen (leakage) und konsekutiven B-Zelluntergängen (Nekrosen, Apoptosen) beruht. Dass die durch ALX ausgelösten Effekte auf Zellschädigung beruhen und dass die Effekte durch Melatonin entscheidend verhindert werden können, ist der Synopsis repräsentativer elektronenmikroskopischer Mikrophotogramme zu entnehmen (Abb. 8), in denen vergleichend ungeschädigte Zellen einer unbehandelten Kontrolle mit nekrotischen Zellen nach Alloxan-Begiftung und teilweiser Prävention des Alloxaneffektes durch Melatonin gegenübergestellt wurden. Dass die erhöhte Insulinfreisetzung tatsächlich auf Zelluntergängen beruht, verdeutlicht weiterhin die Abbil-

dung 9, in der die stimulierbare Kapazität verfügbaren Insulins am Anfang und Ende eines Versuches gemessen wurde. Aus dieser Abbildung ist ersichtlich, dass sowohl die Glucose- als auch die KCl-stimulierbare Insulin-Kapazität (die Ausdruck der Unversehrtheit der B-Zelle ist) nach alleiniger ALX-Begiftung auf ca. 50 % herabgesetzt sind, während nach zusätzlicher präventiver Melatonin-Gabe keine Kapazitätsdefizite auftraten, was als Zeichen einer weitgehend ungeschädigten Sekretionsmaschinerie zu werten ist. Gedeutet wurde dieser protektive Effekt von Melatonin vor dem Hintergrund des oben beschriebenen Wirkungsmechanismus von ALX. So konnte belegt werden, dass Melatonin in der Lage ist, die beim *redox-cyc-*

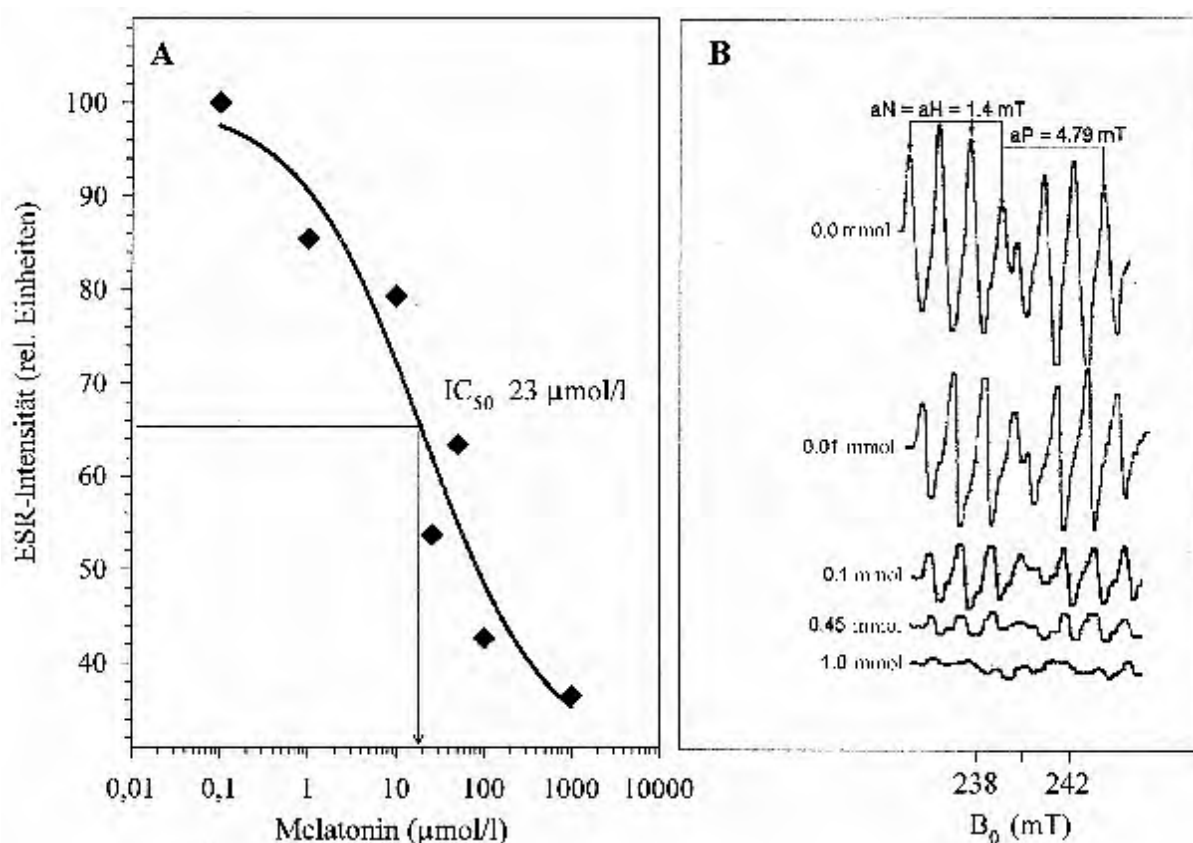


Abb. 10: Einfluss von Melatonin auf die relative ESR-Intensität des durch Wechselwirkung zwischen GSH und ALX in Gegenwart von NTA-Fe^{2+} generierten $\bullet\text{DEPMPO-OH}$ -Addukts. Zusammensetzung des Messansatzes: 990 μl Tris-HCl (20 mmol/l, pH 7,4), 5 μl GSH (100 mmol/l, pH 7,0) sowie 5 μl Alloxan (100 mmol/l, pH 3,0). Der Puffer enthielt entweder kein oder 0,01; 0,1; 0,45 bzw. 1,0 mmol/l Melatonin. Nach 10 min wurden zu 310 μl der Mischung 20 μl DEPMPO (212 mmol/l) sowie 20 μl NTA-Fe^{2+} (10 mmol/l) hinzugefügt. 350 μl der Mischung wurden in eine Flachquarzelle überführt und mittels eines ESR-Spektrometers (ERS 220, Berlin-Adlershof, DDR) bei 9,53 GHz vermessen. Folgende Messeinstellungen wurden verwandt: Mikrowellenleistung: 10 mW; Modulationsamplitude: 0,35 mT; Feldscanbereich: 20 mT; Scanzeit: 120 Sekunden; Zeitkonstante: 0,5 Sekunden; Verstärkerstufe: 256 (modifiziert nach Brömme et al., 2000a; Ebelt et al., 2000b).

ling von ALX und Dialursäure in Gegenwart von Fe(II)-Chelaten gebildeten $\bullet\text{OH}$ mit einer IC_{50} von 23 $\mu\text{mol/l}$ zu neutralisieren (Abb. 10A). Der Nachweis der ALX-induzierten $\bullet\text{OH}$ -Bildung sowie die konzentrationsabhängige Verringerung des $\bullet\text{DEPMPO-OH}$ -Signals durch Melatonin erfolgte mittels ESR-Spektroskopie (Abb. 10B) unter Verwendung der *spin-trap*-DEPMPO (5-Diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline-oxid) (Brömme et al., 2000a, b; Ebelt et al., 2000a, b). Aus den bisherigen Befunden wird zwingend deutlich, dass Melatonin hauptsächlich $\bullet\text{OH}$ zu neutralisieren in der Lage ist und dass die cytotoxische Bedeutung der übrigen noch eingesetzten Radikalgeneratoren ein anderes oder breiteres Spektrum aufweisen müssen (z. B. Streptozotocin u. a. auch NO-Radikale, SNAP ebenfalls NO-Radikale und XO/HX $\bullet\text{O}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ (vergleichende Untersuchungen siehe Peschke et al., 2000a). In einem weiteren Versuch konnte nachgewiesen werden, dass Melatonin die $\bullet\text{OH}$ -induzierte Lipidperoxidation von Liposomen

konzentrationsabhängig zu verringern vermag (Abb. 11). Diese Ergebnisse bestätigen grundsätzlich frühere Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (Pieri et al., 1995; Antunes et al., 1999; Pless et al., 1999; Tan et al., 2000).

Alle bisherigen Befunde machen wahrscheinlich, dass Melatonin in der Lage ist, $\bullet\text{OH}$ abzufangen. Damit stehen die hier vorgestellten Befunde in Einklang mit Ergebnissen anderer Autoren wie Poeggeler et al. (1993), Reiter (1993, 1995, 1996, 1997), Tan et al. (1993), Matuszak et al. (1997), die ihre Ergebnisse z. T. an anderen Modellen erhoben haben. Als Produkt der sequenziellen Adduktierung von zwei $\bullet\text{OH}$ an Melatonin wird zyklisches 3-Hydroxymelatonin diskutiert (Tan et al., 1998, 2000). Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass die im Blut detektierbaren Melatonin-Konzentrationen um einige Größenordnungen niedriger sind als die zur effektiven Neutralisierung von $\bullet\text{OH}$ notwendigen Konzentrationen. Dennoch ist dem Melatonin eine grundsätzliche

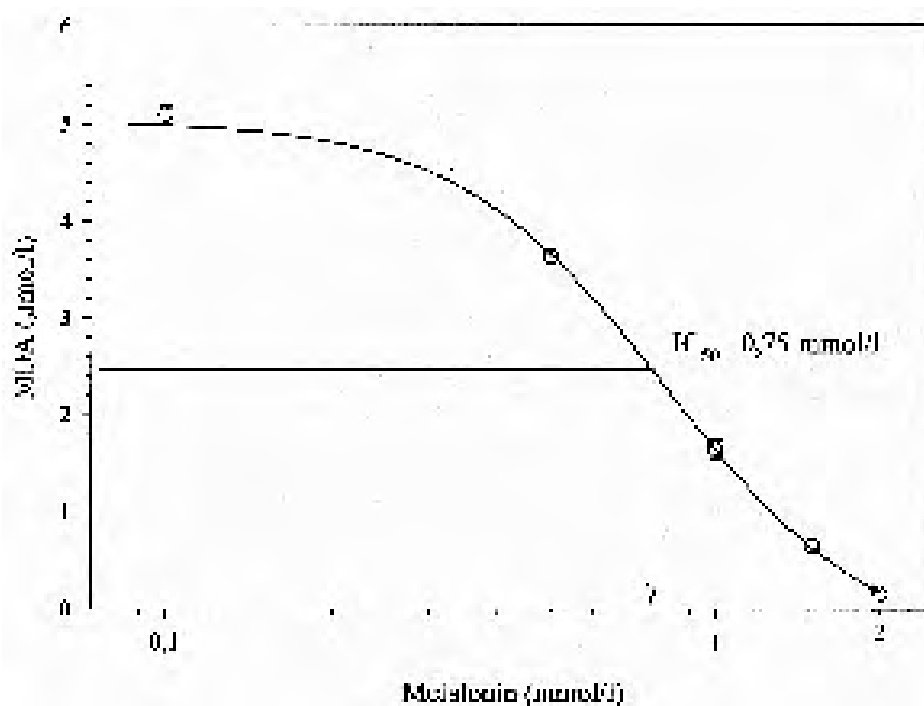


Abb. 11: Hemmung der $\bullet\text{OH}$ -induzierten Lipidperoxidation von Liposomen durch Melatonin. – Zusammensetzung des Messansatzes: 990 μl Tris-HCl (20 mmol/l, pH 7,4), 5 μl GSH (100 mmol/l, pH 7,0) sowie 5 μl Alloxan (100 mmol/l, pH 3,0). Nach 10 min wurden zu 142 μl des Ansatzes 50 μl Liposomen hinzugefügt. Der Puffer enthielt entweder kein oder 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 bzw. 2,0 mmol/l Melatonin. Die LPO wurde nach Zugabe von 8 μl NTA- Fe^{2+} eingeleitet. Dieser Ansatz wurde für 120 min bei 37 °C inkubiert und anschließend die freigesetzte Menge von Malondialdehyd (MDA) mittels eines MDA-Testbestecks (Calbiochem, La Jolla, USA) bei 586 nm bestimmt.

Der Leerwert enthielt kein GSH (modifiziert nach: Brömme et al., 2000a).

Schutzfunktion gegenüber ROS nicht abzuspüren. Hierzu sei insbesondere auf den Beitrag von Reiter in diesem Heft verwiesen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass auf Grund unterschiedlicher Techniken und Methoden erstmalig zwingend nachgewiesen werden konnte,

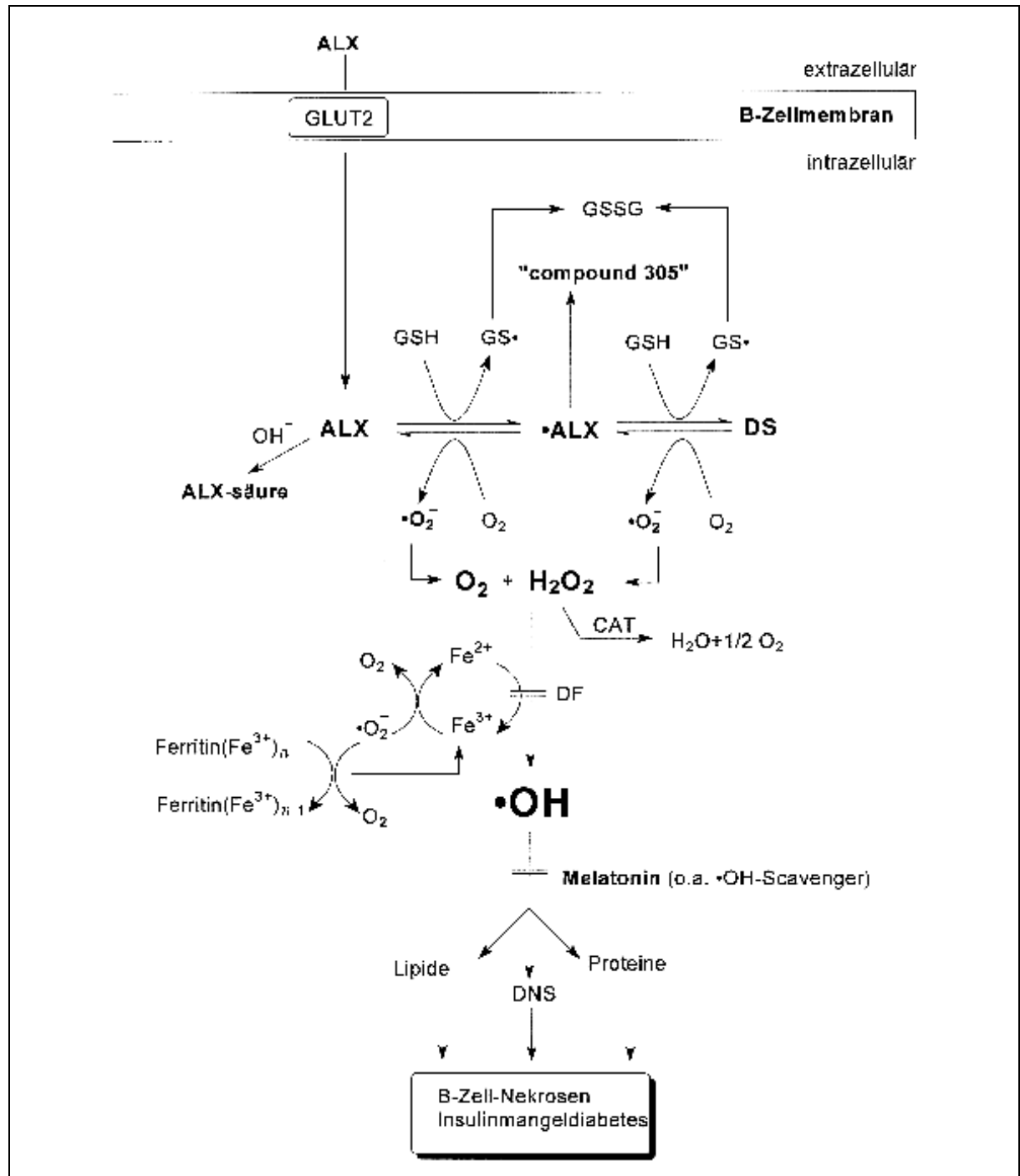


Abb. 12: Synopsis der Alloxan-induzierten Generierungswege von ROS sowie der antidiabetogenen Wirkung von Melatonin in der B-Zelle. – Abkürzungen: ALX – Alloxan, $\bullet$ ALX – Alloxanradikal, CAT – Katalase, DF – Deferoxamin, DNS – Desoxyribonukleinsäure, DS – Dialursäure, GSH – Glutathion (reduziert), GS $\bullet$ – Glutathylradikal, GSSG – Glutathion (oxidiert), GLUT2 – Glucosetransporter 2, H_2O_2 – Wasserstoffperoxid, $\bullet\text{OH}$ – Hydroxylradikal, OH^- – Hydroxidion, $\bullet\text{O}_2^-$ – Superoxidanion-Radikal.

dass Melatonin mit hoher Spezifität letztlich die durch Alloxan-Gabe ausgelöste intrazelluläre Generierung von Hydroxylradikalen zu neutralisieren in der Lage ist (vgl. Abb. 12). Die Nachweise wurden

mittels superfusionstechnischer *in vitro*-Untersuchungen, elektronenmikroskopisch-morphologischer, Elektronen-Spin-Resonanz-analytischer und Lipidperoxidations-Experimente geführt.

Literatur

- Abdel-Rahman, M. S., F. I. Elrakhawy, F. A. Iskander (1992) Protection of B cells against the effect of alloxan. *Toxicol. Lett.* 63: 155–164.
- Akcetin, Z., A. Busch, G. Kessler, H. Heynemann, J. Holtz, H. J. Brömme (1999) Evidence for only a moderate lipid peroxidation during ischemia-reperfusion of rat kidney due to its high antioxidative capacity. *Urol. Res.* 27: 280–284.
- Alexandrova, A., M. Kirkova, E. Russanov (1998) In vitro effects of alloxan-vanadium combination on lipid peroxidation and on antioxidant enzyme activity. *Gen. Pharmacol.* 31: 489–493.
- Al-Turk, W. A., S. J. Stohs (1981) Hepatic glutathione content and aryl hydrocarbon hydroxylase activity of acetaminophen-treated mice as a function of age. *Drug Chem. Toxicol.* 4: 37–48.
- Andersson, M., K. Grankvist (1995) Ascorbate-induced free radical toxicity to isolated islet cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27: 493–498.
- Antunes, F., L. R. Barclay, K. U. Ingold, M. King, J. Q. Norris, J. C. Scaiano, F. Xi (1999) On the antioxidant activity of melatonin. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 117–128.
- Archibald, R. M. (1945) Methods for the determination of alloxan, together with observations of certain properties of alloxan. *J. Biol. Chem.* 158: 347–373.
- Beckman, J. S., T. W. Beckman, J. Chen, P. A. Marshall, B. A. Freeman (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1620–1624.
- Beckman, J. S., J. Chen, H. Ischiropoulos, J. P. Crow (1994) Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol.* 233: 229–240.
- Biamond, P., H. G. van Eijk, A. J. Swaak, J. F. Koster (1984) Iron mobilization from ferritin by superoxide derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. Possible mechanism in inflammation diseases. *J. Clin. Invest.* 73: 1576–1579.
- Bilic, N., J. P. Felber (1969) An improved fluorometric method for measurement of alloxan in biological fluids. *Anal. Biochem.* 29: 91–99.
- Bobyrev, V. N., V. F. Pocherniaeva, I. L. Dumenko, L. N. Bobyrev (1992) [Free radical processes in the pathogenesis of alloxan diabetes]. *Probl. Endokrinol. (Mosk)* 38: 55–57.
- Bobyreva, L. E. (1997) [The effect of phenol antioxidants on the development of alloxan diabetes in rats]. *Eksp. Klin. Farmakol.* 60: 51–53.
- Bolann, B. J., R. J. Ulvik (1987) Release of iron from ferritin by xanthine oxidase. Role of the superoxide radical. *Biochem. J.* 243: 55–59.
- Boquist, L., T. Bostrom (1985) Alloxan effects on mitochondria in vitro, studied with regard to inhibition of mitochondrial aconitase. *Diabete Metab.* 11: 232–237.
- Boquist, L., I. Ericsson (1984) Inhibition by alloxan of mitochondrial aconitase and other enzymes associated with the citric acid cycle. *FEBS Lett.* 178: 245–248.
- Brömme, H. J., H. Ebel, W. Mörke, D. Peschke, E. Peschke (1999a) Interpretationsansätze radikalinduzierter Schädigungen durch Alloxan an der pankreatischen B-Zelle in vitro – Einfluß von Melatonin. *Verh. Anat. Ges.* 181 (Suppl.): 246.
- Brömme, H. J., H. Ebel, D. Peschke, E. Peschke (1999b) Alloxan acts as a prooxidant only under reducing conditions: influence of melatonin. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 487–493.
- Brömme, H. J., W. Mörke, D. Peschke, H. Ebel, E. Peschke (2000a) Scavenging effect of melatonin on hydroxyl radicals generated by alloxan. *J. Pineal Res.* 29: 201–208.
- Brömme, H. J., W. Mörke, R. Weinandy, D. Peschke, E. Peschke (2002a) Formation of compound 305 requires the simultaneous generation of both alloxan- and GSH-radicals. *Horm. Metab. Res.* 34: 1–5.
- Brömme, H. J., W. Mörke, R. Weinandy, D. Peschke, E. Peschke (2002b) Bildung von „compound 305“ verlangt die gleichzeitige Anwesenheit von Alloxan- und Glutathionradikalen. *Verh. Anat. Ges.* 184 (Suppl.):
- Brömme, H. J., D. Peschke, H. Ebel, E. Peschke (2000b) Bedeutung von Alloxan für die Hydroxylradikal-induzierte Diabetogenese – Einfluß von Melatonin. *Verh. Anat. Ges.* 182 (Suppl.): 155.
- Brömme, H. J., R. Weinandy, D. Peschke, E. Peschke (2001a) Einfluß von Glutathion auf die Anzahl der Redoxzyklen zwischen Alloxan und Dialursäure sowie auf die Generierung von reaktiven Sauerstoffintermediaten. *Verh. Anat. Ges.* 183 (Suppl.): 218–219.

- Brömme, H. J., R. Weinandy, D. Peschke, E. Peschke (2001b) Simultaneous quantitative determination of alloxan, GSH and GSSG by HPLC. Estimation of the frequency of redox cycling between alloxan and dialuric acid. *Horm. Metab. Res.* 33: 106–109.
- Brückmann, G., E. Wertheimer (1945) Diabetogenic action of alloxan derivatives. *Nature* 155: 267–268.
- Brückmann, G., E. Wertheimer (1947) Alloxan studies. The action of alloxan homologues and related compounds. *J. Biol. Chem.* 168: 241–256.
- Burkart, V., T. Koike, H. H. Brenner, H. Kolb (1992) Oxygen radicals generated by the enzyme xanthine oxidase lyse rat pancreatic islet cells in vitro. *Diabetologia* 35: 1028–1034.
- Burkitt, M., B. Gilbert (1990) Model studies of iron-catalysed Haber-Weiss cycle and the ascorbate-driven Fenton reaction. *Free Radic. Res. Commun.* 10: 265–280.
- Cadenas, E. (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 79–110.
- Cahill, G. F., Jr., A. A. Rossini, T. T. Aoki (1974) Metabolic effects of insulin in normal and diabetic man (short review). *Endocrinol. Exp.* 8: 89–96.
- Carroll, P. B., A. S. Moura, E. Rojas, I. Atwater (1994) The diabetogenic agent alloxan increases K⁺ permeability by a mechanism involving activation of ATP-sensitive K(+) channels in mouse pancreatic beta-cells. *Mol. Cell. Biochem.* 140: 127–136.
- Chen, L. D., P. Kumar, R. J. Reiter, D. X. Tan, L. C. Manchester, J. P. Chambers, B. Poeggeler, S. Saarela (1994) Melatonin prevents the suppression of cardiac Ca(2+)-stimulated ATPase activity induced by alloxan. *Am. J. Physiol.* 267: E57–E62.
- Cheta, D. (1998) Animal models of type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 11: 11–19.
- Cowden, W. B., P. H. Lewis-Hughes, I. A. Clark (1985) Protection against alloxan-induced diabetes in mice by the free radical scavenger butylated hydroxyanisole. *Biochem. Pharmacol.* 34: 3601–3603.
- Crouch, R. K., S. E. Gandy, G. Kimsey, R. A. Galbraith, G. M. Galbraith, M. G. Buse (1981) The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes* 30: 235–241.
- Crow, J. P., J. S. Beckman (1995) Reactions between nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: footprints of peroxynitrite in vivo. *Adv. Pharmacol.* 34: 17–43.
- Csernus, V. J., T. Hammer, D. Peschke, E. Peschke (1998) Dynamic insulin secretion from perfused rat pancreatic islets. *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 733–743.
- Czapski, G. (1984) Reaction of .OH. *Methods Enzymol.* 105: 209–215.
- Delaney, C. A., B. Tyrberg, L. Bouwens, H. Vaghef, B. Hellman, D. L. Eizirik (1996) Sensitivity of human pancreatic islets to peroxynitrite-induced cell dysfunction and death. *FEBS Lett.* 394: 300–306.
- De Vos, A., H. Heimberg, E. Quartier, P. Huypens, L. Bouwens, D. Pipeleers, F. Schuit (1995) Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *J. Clin. Invest.* 96: 2489–2495.
- Dillard, C. J., K. J. Kunert, A. L. Tappel (1982) Effects of vitamin E, ascorbic acid and mannitol on alloxan-induced lipid peroxidation in rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 216: 204–212.
- Domke, I., W. Weis (1983) Reduction of alloxan by microsomal electron transport proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114: 578–583.
- Drews, G., C. Kramer, M. Dufer, P. Krippeit-Drews (2000) Contrasting effects of alloxan on islets and single mouse pancreatic beta-cells. *Biochem. J.* 352: 389–397.
- Dunn, J. S., N. G. B. McLetchie (1943) Experimental alloxan diabetes in the rat. *Lancet* II: 384–387.
- Dunn, J. S., H. K. Sheehan, N. G. B. McLetchie (1943) Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. *Lancet* I: 484–487.
- Ebelt, H., D. Peschke, R. Blume, H. J. Brömme, N. Wippich, E. Peschke (1999) Vergleichende Untersuchungen zum Schädigungsmuster von Alloxan und Xanthinoxidase/Hypoxanthin an der pankreatischen B-Zelle in vitro – Einfluß von Melatonin. *Verh. Anat. Ges.* 181 (Suppl.): 92.
- Ebelt, H., D. Peschke, R. Blume, P. Meinel, E. Peschke (1998) Radikal-induzierte Veränderungen an pankreatischen B-Zellen der Wistar-Ratte in vitro – Einfluß von Melatonin. *Verh. Anat. Ges.* 180 (Suppl.): 99.
- Ebelt, H., D. Peschke, H. J. Brömme, S. Albert, E. Peschke (2001) Influence of melatonin on free radical induced changes in rat pancreatic β -cells and INS1-cells. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 109 (Suppl. 1): 43.
- Ebelt, H., D. Peschke, H. J. Brömme, R. Blume, E. Peschke (2000a) Einfluß von Melatonin auf Radikal-induzierte Veränderungen pankreatischer B-Zellen neonater Wistar-Ratten in vitro. *Verh. Anat. Ges.* 182 (Suppl.): 160–161.
- Ebelt, H., D. Peschke, H. J. Brömme, W. Mörke, R. Blume, E. Peschke (2000b) Influence of melatonin on free radical-induced changes in rat pancreatic beta-cells in vitro. *J. Pineal Res.* 28: 65–72.
- Edwards, J. O., R. C. Plumb (1994) The chemistry of peroxynitrites. *Progr. Inorganic Chem.* 41: 600–635.
- Eizirik, D. L., M. A. de Lucio, A. C. Boscherio, M. E. Hoffmann (1986) 1,10 phenanthroline, a metal chelator, protects against alloxan- but not streptozotocin-induced diabetes. *J. Free Radic. Biol. Med.* 2: 189–192.
- El-Missiry, M. A., A. M. El Gindy (2000) Amelioration of alloxan induced diabetes mellitus and oxidative stress in rats by oil of *Eruca sativa* seeds. *Ann. Nutr. Metab.* 44: 97–100.

- Elstner, E. F. (1990): Der Sauerstoff. BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich.
- Fang, V. S. (1968) Salicylate hypoglycemic action in alloxan-diabetic rats and structural relationships. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 176: 193–208.
- Feuers, R. J., R. A. Mittelstaedt, J. D. Hunter, J. Saldívar, T. H. Tsai, L. E. Scheving (1991) Circadian variation in alloxan sensitivity of mice as indicated by mortality and blood glucose alteration. *Chronobiol. Int.* 8: 67–74.
- Fischer, L. J., S. A. Hamburger (1980a) Dimethylurea: a radical scavenger that protects isolated pancreatic islets from the effects of alloxan and dihydroxyfumarate exposure. *Life Sci.* 26: 1405–1409.
- Fischer, L. J., S. A. Hamburger (1980b) Inhibition of alloxan action in isolated pancreatic islets by superoxide dismutase, catalase, and a metal chelator. *Diabetes* 29: 213–216.
- Fischer, L. J., S. A. Hamburger (1981) Impaired insulin release after exposure of pancreatic islets to auto-oxidizing dihydroxyfumarate. *Endocrinology* 108: 2331–2335.
- Fong, K. L., P. B. McCay, J. L. Poyer (1976) Evidence for superoxide-dependent reduction of Fe³⁺ and its role in enzyme-generated hydroxyl radical formation. *Chem. Biol. Interact.* 15: 77–89.
- Frejaville, C., H. Karoui, B. Tuccio, F. Le Moigne, M. Culcasi, S. Pietri, R. Lauricella, P. Tordo (1995) 5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide: a new efficient phosphorylated nitron for the in vitro and in vivo spin trapping of oxygen-centered radicals. *J. Med. Chem.* 38: 258–265.
- Frerichs, H., W. Creutzfeldt (1971) Der experimentelle chemische Diabetes. *Insulin* 1. E. Dörzbach ed. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York, pp. 159–202.
- Fridovich, I. (1975) Superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 44: 147–159.
- Fridovich, I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 97–112.
- Gandy, S. E., M. G. Buse, R. K. Crouch (1982) Protective role of superoxide dismutase against diabetogenic drugs. *J. Clin. Invest.* 70: 650–658.
- Gardner, P. R., I. Raineri, L. B. Epstein, C. W. White (1995) Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 270: 13399–13405.
- Gatsko, G. G., L. M. Mazhul, O. V. Shablinskaia (1985) [Age-related characteristics of lipid peroxidation in the blood in alloxan diabetes]. *Probl. Endokrinol. (Mosk)* 31: 68–70.
- Godin, D. V., S. A. Wohaieb, M. E. Garnett, A. D. Goumeniouk (1988) Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes. *Mol. Cell. Biochem.* 84: 223–231.
- Goldstein, S., D. Meyerstein, G. Czapski (1993) The Fenton reagents. *Free Radic. Biol. Med.* 15: 435–445.
- Gomori, G., M. G. Goldner (1945) Acute nature of alloxan damage. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)* 58: 232–233.
- Gorray, K. C., D. G. Baskin, W. Y. Fujimoto (1983) Cytotoxic effects of alloxan treatment in vitro on monolayer cultures of neonatal rat pancreas. *Am. J. Physiol.* 245: E417–E423.
- Gorus, F. K., W. J. Malaisse, D. G. Pipeleers (1982) Selective uptake of alloxan by pancreatic B-cells. *Biochem. J.* 208: 513–515.
- Graf, E., J. R. Mahoney, R. G. Bryant, J. W. Eaton (1984) Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. Stringent requirement for free iron coordination site. *J. Biol. Chem.* 259: 3620–3624.
- Grankvist, K., A. Lernmark, I. B. Taljedal (1977) Alloxan cytotoxicity in vitro. Microscope photometric analyses of Trypan Blue uptake by pancreatic islet cells in suspension. *Biochem. J.* 162: 19–24.
- Grankvist, K., S. L. Marklund (1983) Opposite effects of two metal-chelators on alloxan-induced diabetes in mice. *Life Sci.* 33: 2535–2540.
- Grankvist, K., S. Marklund, J. Sehlin, I. B. Taljedal (1979) Superoxide dismutase, catalase and scavengers of hydroxyl radical protect against the toxic action of alloxan on pancreatic islet cells in vitro. *Biochem. J.* 182: 17–25.
- Gutteridge, J. M. (1987) Bleomycin-detectable iron in knee-joint synovial fluid from arthritic patients and its relationship to the extracellular antioxidant activities of caeruloplasmin, transferrin and lactoferrin. *Biochem. J.* 245: 415–421.
- Gutteridge, J., I. Nagy, L. Maidt (1990) ADP-iron as a Fenton reactant: radical reactions detected by spin trapping, hydrogen abstraction, and aromatic hydroxylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 277: 422–428.
- Halliwell, B. (1991) Drug antioxidant effects. A basis for drug selection? *Drugs* 42: 569–605.
- Halliwell, B., M. Grootveld, J. M. Gutteridge (1988) Methods for the measurement of hydroxyl radicals in biomedical systems: deoxyribose degradation and aromatic hydroxylation. *Methods Biochem. Anal.* 33: 59–90.
- Halliwell, B., J. M. Gutteridge (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219: 1–14.
- Halliwell, B., J. M. Gutteridge (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186: 1–85.
- Halliwell, B., J. M. C. Gutteridge (1992) Biological relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS-Lett.* 307: 108–112.
- Halliwell, B., J. M. Gutteridge (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. University Press, New York/Oxford, pp. 48–104.

- Halliwell, B., H. Kaur, M. Ingelman-Sundberg (1991) Hydroxylation of salicylate as an assay for hydroxyl radicals: a cautionary note. *Free Radic. Biol. Med.* 10: 439–441.
- Hammarström, L., B. Hellman, S. Ullberg (1967) On the accumulation of alloxan in the pancreatic beta-cells. *Diabetologia* 3: 340–344.
- Hammarström, L., S. Ullberg (1966) Specific uptake of labelled alloxan in the pancreatic islet. *Nature* 212: 708–709.
- Harman, A. W., L. J. Fischer (1982) Alloxan toxicity in isolated rat hepatocytes and protection by sugars. *Biochem. Pharmacol.* 31: 3731–3736.
- Heikkilä, R. E. (1977) The prevention of alloxan-induced diabetes in mice by dimethyl sulfoxide. *Eur. J. Pharmacol.* 44: 191–193.
- Heikkilä, R. E., H. Barden, G. Cohen (1974) Prevention of alloxan-induced diabetes by ethanol administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 190: 501–506.
- Heikkilä, R. E., E. S. Cabbat (1978) Protection against alloxan-induced diabetes in mice by the hydroxyl radical scavenger dimethylurea. *Eur. J. Pharmacol.* 52: 57–60.
- Heikkilä, R. E., F. S. Cabbat (1982) The prevention of alloxan-induced diabetes in mice by the iron-chelator detapac: suggestion of a role for iron in the cytotoxic process. *Experientia* 38: 378–379.
- Heikkilä, R. E., G. Cohen (1975) Cytotoxic aspects of the interaction of ascorbic acid with alloxan and 6-hydroxydopamine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 258: 221–230.
- Heikkilä, R. E., B. Winston, G. Cohen (1976) Alloxan-induced diabetes – evidence for hydroxyl radical as a cytotoxic intermediate. *Biochem. Pharmacol.* 25: 1085–1092.
- Heller, B., A. Burkle, J. Radons, E. Fengler, A. Jalowy, M. Muller, V. Burkart, H. Kolb (1994) Analysis of oxygen radical toxicity in pancreatic islets at the single cell level. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 375: 597–602.
- Heller, B., A. Burkle, J. Radons, E. Fengler, M. Muller, V. Burkart, H. Kolb (1997) DNA-damage and NAD(+)–depletion are initial events in oxygen radical induced islet cell death. *Adv. Exp. Med. Biol.* 426: 329–334.
- Hellman, B., J. Sehlin, I. B. Taljedal (1971) Evidence for mediated transport of glucose in mammalian pancreatic-cells. *Biochim. Biophys. Acta* 241: 147–154.
- Hernandez, R. E., J. F. Kuhl, E. Halberg, F. Halberg, R. N. Shiotsuka, E. Haus (1978) Circadian susceptibility rhythm of the rat to alloxan. *Chronobiologia* 5: 369–378.
- Herson, P. S., M. L. Ashford (1997) Activation of a novel non-selective cation channel by alloxan and H₂O₂ in the rat insulin-secreting cell line CRI-G1. *J. Physiol.* 501: 59–66.
- Ho, E., G. Chen, T. M. Bray (2000) Alpha-phenyl-tert-butyl nitron (PBN) inhibits NFκB activation offering protection against chemically induced diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 604–614.
- Hogg, N., V. M. Darley-Usmar, M. T. Wilson, S. Moncada (1992) Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem. J.* 281: 419–424.
- Holmgren, A., C. Lyckeborg (1980) Enzymatic reduction of alloxan by thioredoxin and NADPH-thioredoxin reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 5149–5152.
- Houee-Levin, C., M. Gardes-Albert, C. Ferradini, J. Pucheault (1979) Pulse radiolytic investigations of the redox system alloxan-dialuric acid: evidence for a radical intermediate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91: 1196–1200.
- Idahl, L. A., A. Lernmark, J. Sehlin, I. B. Taljedal (1977) Alloxan cytotoxicity in vitro. Inhibition of rubidium ion pumping in pancreatic beta-cells. *Biochem. J.* 162: 9–18.
- Ishii, T., H. Iwahashi, R. Sugata, R. Kido (1988) Detection of nucleic acid-derived radicals formed by alloxan. *J. Biochem. (Tokyo)* 104: 610–615.
- Ivanov, V. V., I. V. Vaseneva, N. A. Udintsev (1984) [Lipid peroxidation in the liver of rats with alloxan diabetes]. *Probl. Endokrinol. (Mosk)* 30: 70–73.
- Jamieson, D., B. Chance, E. Cadenas, A. Boveris (1986) The relation of free radical production to hyperoxia. *Annu. Rev. Physiol.* 48: 703–719.
- Jansson, L., S. Sandler (1988) The protective effect of glucose, but not 3-O-methyl glucose, against alloxan-induced diabetes depends upon the route of hexose administration. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 293: 257–264.
- Jennische, E., H. A. Hansson (1986) Relation between alloxan-induced plasma membrane dysfunction and inhibition of insulin secretion in pancreatic B-cells in vivo. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. [A]* 94: 153–158.
- Jörns, A., M. Tiedge, S. Lenzen, R. Munday (1999) Effect of superoxide dismutase, catalase, chelating agents, and free radical scavengers on the toxicity of alloxan to isolated pancreatic islets in vitro. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1300–1304.
- Karoui, H., N. Hogg, C. Frejaville, P. Tordo, B. Kalyanaraman (1996) Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxynitrite. ESR-spin trapping and oxygen uptake studies. *J. Biol. Chem.* 271: 6000–6009.
- Katsumata, K., K. Katsumata, Jr., Y. Katsumata, T. Ozawa (1994) Acute and chronic effect of ethanol on the occurrence of alloxan diabetes in rats. *Horm. Metab. Res.* 26: 166–168.
- Korchin, V. I., V. Z. Lankin, R. D. Iarkova, G. G. Konovalova, L. D. Smirnov, V. V. Kukharchuk (1992) [An-

- tioxidant probucol prevents development of alloxan diabetes and decrease of antioxidant enzyme activity in rat tissues]. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 114: 279–282.
- Kosenko, E. A., A. I. Kaminskii, I. G. Kaminskii (1999) [Activity of antioxidant enzymes in liver and brain is decreased in the early stage of diabetes, and this decrease depends on the function of NMDA-receptors]. *Vopr. Med. Khim.* 45: 304–308.
- Kosower, N. S., E. M. Kosower (1978) The glutathione status of cells. *Intern. Rev. Cytol.* 54: 109–160.
- Kumar, J. S., V. P. Menon (1992a) Changes in levels of lipid peroxides and activity of superoxide dismutase and catalase in diabetes associated with myocardial infarction. *Indian J. Exp. Biol.* 30: 122–127.
- Kumar, J. S., V. P. Menon (1992b) Peroxidative changes in experimental diabetes mellitus. *Indian J. Med. Res.* 96: 176–181.
- Kurahashi, M., H. Masui, S. Yoshimoto, I. Wakabayashi, K. Sakamoto (1993) Effect of diethyldithiocarbamate on diabetogenic action of alloxan in rats. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 19: 39–47.
- Lazarow, A. (1946) Protective effect of glutathione and cysteine against alloxan. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)* 61: 441–447.
- LeDoux, S. P., C. R. Hall, P. M. Forbes, N. J. Patton, G. L. Wilson (1988) Mechanisms of nicotinamide and thymidine protection from alloxan and streptozocin toxicity. *Diabetes* 37: 1015–1019.
- Leech, R. S., C. C. Bailey (1945) Blood alloxan and blood glutathione in rabbits injected with alloxan. *J. Biol. Chem.* 157: 525–542.
- Lenzen, S., J. Drinkgern, M. Tiedge (1996) Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic. Biol. Med.* 20: 463–466.
- Lenzen, S., M. Mirzaie-Petri (1992) Inhibition of aconitase by alloxan and the differential modes of protection of glucose, 3-O-methylglucose, and mannheptulose. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 346: 532–536.
- Lenzen, S., R. Munday (1991) Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. *Biochem. Pharmacol.* 42: 1385–1391.
- Lenzen, S., U. Panten (1988) Alloxan: history and mechanism of action. *Diabetologia* 31: 337–342.
- Lenzen, S., M. Tiedge, U. Panten (1987) Glucokinase in pancreatic B-cells and its inhibition by alloxan. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 115: 21–29.
- Lesnefsky, E. J. (1994) Tissue iron overload and mechanisms of iron-catalyzed oxidative injury. In: *Free Radicals in Diagnostic Medicine*, D. Armstrong ed. Plenum Press, New-York, pp. 129–146.
- Lubec, B., M. Hermon, H. Hoeger, G. Lubec (1998) Aromatic hydroxylation in animal models of diabetes mellitus. *FASEB J.* 12: 1581–1587.
- Malaisse, W. J. (1982) Alloxan toxicity to the pancreatic B-cell. A new hypothesis. *Biochem. Pharmacol.* 31: 3527–3534.
- Malaisse, W. J., F. Malaisse-Lagae, A. Sener, D. G. Pipeleers (1982) Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic B cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 927–930.
- Masukawa, T., K. Nakanishi (1994) Involvement of blood glucose in the dimethylthiourea-induced protection against alloxan-induced diabetes. *Jpn. J. Pharmacol.* 66: 159–161.
- Matsushita, M., G. Yoshino, M. Iwai, K. Matsuba, M. Morita, I. Iwatani, M. Yoshida, T. Kazumi, and S. Baba (1989) Protective effect of probucol on alloxan diabetes in rats. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 7: 313–316.
- Matuszak, Z., K. Reszka, C. F. Chignell (1997) Reaction of melatonin and related indoles with hydroxyl radicals: EPR and spin trapping investigations. *Free Radic. Biol. Med.* 23: 367–372.
- McCord, J. M., I. Fridovich (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244: 6049–6055.
- Mellado, C., V. Rodriguez, J. G. de Diego, E. Alvarez, E. Blázquez (1989) Effect of pinealectomy and of diabetes on liver insulin and glucagon receptor concentrations in the rat. *J. Pineal Res.* 6: 295–306.
- Milcu, S. M., L. Nanu-Ionescu, I. Milcu (1971) The effect of pinealectomy on plasma insulin in rats. In: *The pineal gland*, G. E. W. Wolstenholme and J. Knight eds. Livingstone Churchill, Edinburgh/London, pp. 345–357.
- Miura, T., K. Sakurai (1988) Iron release from ferritin by alloxan radical. *Life Sci* 43: 2145–2149.
- Miwa, I., J. Okuda (1982) Non-enzymatic reduction of alloxan by reduced nicotinamide nucleotide. *Biochem. Pharmacol.* 31: 921–925.
- Munday, R. (1988) Dialuric acid autoxidation. Effects of transition metals on the reaction rate and on the generation of active oxygen species. *Biochem. Pharmacol.* 37: 409–413.
- Munday, R., K. Ludwig, S. Lenzen (1993) The relationship between the physicochemical properties and the biological effects of alloxan and several N-alkyl substituted alloxan derivatives. *J. Endocrinol.* 139: 153–163.
- Munoz Barragán, L., J. A. López Gil, D. Toranzo, J. L. Blázquez, M. D. Pizarro, F. E. Pastor, M. I. Mosquera (1986) The pineal gland: a neuroendocrine crossroad. *Proceedings of the workshop on the pineal gland*. R. J. Reiter and E. Blázquez. Salamanca, pp. 57–61.
- Munoz Barragán, L., D. Toranzo, E. Blázquez, M. Ghigliione, F. E. Pastor (1983) Role of the pineal gland on insulin and glucagon release of control and diabetic rats. *Diabetes* 32 Suppl. 1: 141A.

- Munoz Barragán, L., D. Toranzo, E. Blázquez, F. E. Pastor, M. I. Mosqueira, J. A. López, J. L. Blázquez (1984) A radio-immunoanalytical and immunocytochemical study on A and B insular cells in response to pinealectomy or pineal denervation. *Diabetologia* 27: 313A.
- Murata, M., M. Imada, S. Inoue, S. Kawanishi (1998) Metal-mediated DNA damage induced by diabetogenic alloxan in the presence of NADH. *Free Radic. Biol. Med.* 25: 586–595.
- Nakakimura, H., K. Mizuno (1980) Studies on lipid peroxidation in biological systems. II. Hyperlipoperoxidemia in mice induced by alloxan. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 28: 2207–2211.
- Navarro, J., E. Obrador, J. A. Pellicer, M. Aseni, J. Vina, J. M. Estrela (1997) Blood glutathione as an index of radiation-induced oxidative stress in mice and humans. *Free Radic. Biol. Med.* 22: 1203–1209.
- Nukatsuka, M., H. Sakurai, J. Kawada (1989a) Generation of alloxan free radicals in chemical and biological systems: implication in the diabetogenic action of alloxan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165: 278–283.
- Nukatsuka, M., H. Sakurai, J. Kawada (1989b) Microsomal reduction of alloxan produces alloxan anion radicals. *Naturwissenschaften* 76: 574–575.
- Oberley, L. W. (1988) Free radicals and diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* 5: 113–124.
- Ohlenschläger, G. (1995) *Freie Radikale, Oxidativer Stress und Antioxidantien*. Reglin Verlag, Köln.
- Orci, L., B. Thorens, M. Ravazzola, H. F. Lodish (1989) Localization of the pancreatic beta cell glucose transporter to specific plasma membrane domains. *Science* 245: 295–297.
- Park, B. H., H. W. Rho, J. W. Park, C. G. Cho, J. S. Kim, H. T. Chung, H. R. Kim (1995) Protective mechanism of glucose against alloxan-induced pancreatic beta-cell damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210: 1–6.
- Patterson, J. W., A. Lazarow, S. Levey (1949a) Alloxan and dialuric acid: their stabilities and ultraviolet absorption spectra. *J. Biol. Chem.* 177: 187–196.
- Patterson, J. W., A. Lazarow, S. Levey (1949b) Reactions of alloxan and dialuric acid with the sulfhydryl group. *J. Biol. Chem.* 177: 197–204.
- Peschke, E., H. Ebel, H. J. Brömme, D. Peschke (2000a) 'Classical' and 'new' diabetogens – comparison of their effects on isolated rat pancreatic islets in vitro. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 158–164.
- Peschke, E., J. D. Fauteck, U. Musshoff, F. Schmidt, A. Beckmann, D. Peschke (2000b) Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. *J. Pineal Res.* 28: 156–164.
- Peschke, E., D. Peschke (1998) Evidence for a circadian rhythm of insulin release from perfused rat pancreatic islets. *Diabetologia* 41: 1085–1092.
- Peschke, E., D. Peschke, T. Hammer, V. Csernus (1997) Influence of melatonin and serotonin on glucose-stimulated insulin release from perfused rat pancreatic islets in vitro. *J. Pineal Res.* 23: 156–163.
- Pieri, C., M. Moroni, F. Marcheselli, R. Recchioni (1995) Melatonin is an efficient antioxidant. *Arch. Gerontol. Geriatrics* 20: 159–165.
- Pierrefiche, G., G. Topall, G. Courboin, I. Henriot, H. Laborit (1993) Antioxidant activity of melatonin in mice. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 80: 211–223.
- Pless, G., T. J. Frederiksen, J. J. Garcia, R. J. Reiter (1999) Pharmacological aspects of N-acetyl-5-methoxytryptamine (melatonin) and 6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline (pinoline) as antioxidants: reduction of oxidative damage in brain region homogenates. *J. Pineal Res.* 26: 236–246.
- Poeggeler, B., R. J. Reiter, D. X. Tan, L. D. Chen, L. C. Manchester (1993) Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis. *J. Pineal Res.* 14: 151–168.
- Pryor, W. A. (1986) Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu. Rev. Physiol.* 48: 657–667.
- Reif, D. W. (1992) Ferritin as a source of iron for oxidative damage. *Free Radic. Biol. Med.* 12: 417–427.
- Reif, D. W., V. M. Samokyszyn, D. M. Miller, S. D. Aust (1989) Alloxan- and glutathione-dependent ferritin iron release and lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 269: 407–414.
- Reiter, R. J. (1993) Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 26: 1141–1155.
- Reiter, R. J. (1995) Oxygen radical detoxification processes during aging: the functional importance of melatonin. *Aging (Milano)* 7: 340–351.
- Reiter, R. J. (1996) Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals. *Eur. J. Endocrinol.* 134: 412–420.
- Reiter, R. J. (1997) Antioxidant actions of melatonin. *Adv. Pharmacol.* 38: 103–117.
- Reiter, R. J., J. M. Guerrero, J. J. Garcia, D. Acuna-Castroviejo (1998) Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging. Relation to melatonin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 854: 410–424.
- Reiter, R. J., D. X. Tan, B. Poeggeler, A. Menendezpe-laez, L. D. Chen, S. Saarela (1994) Melatonin as a free radical scavenger: implications for aging and age-related diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 719: 1–12.
- Rerup, C. C. (1970) Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol. Rev.* 22: 485–518.
- Resnik, R. A., A. R. Wolff (1956) The reaction of alloxan with glutathione and protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 64: 33–50.

- Reuss, S. (1996) Components and connections of the circadian timing system in mammals. *Cell Tiss. Res.* 285: 353–378.
- Rho, H. W., J. N. Lee, H. R. Kim, B. H. Park, J. W. Park (2000) Protective mechanism of glucose against alloxan-induced beta-cell damage: pivotal role of ATP. *Exp. Mol. Med.* 32: 12–17.
- Richmond, R., B. Halliwell, J. Chauhan, A. Darbre (1981) Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals: detection of hydroxyl radicals by the hydroxylation of aromatic compounds. *Anal. Biochem.* 118: 328–335.
- Roubaud, V., S. Sankarapandi, P. Kuppusamy, P. Tordo, J. L. Zweier (1997) Quantitative measurement of superoxide generation using the spin trap 5-(diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide. *Anal. Biochem.* 247: 404–411.
- Rush, J. D., W. H. Koppenol (1986) Oxidizing intermediates in the reaction of ferrous EDTA with hydrogen peroxide. Reaction with organic molecules and ferrocytochrome c. *J. Biol. Chem.* 261: 6730–6733.
- Sailaja Devi, M. M., Y. Suresh, U. N. Das (2000) Preservation of the antioxidant status in chemically-induced diabetes mellitus by melatonin. *J. Pineal Res.* 29: 108–115.
- Sakurai, K., K. Haga, T. Ogiso (1992a) Effect of glutathione on lambda deoxyribonucleic acid strand breaks in the reaction system of glutathione-alkoxan in the presence of Fe(3+)-ethylenediaminetetraacetic acid. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 40: 2147–2150.
- Sakurai, K., K. Haga, T. Ogiso (1992b) Enzymatic generation of alloxan radicals in rat liver microsomes: possible participation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-cytochrome P-450 reductase. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 40: 432–435.
- Sakurai, K., K. Haga, T. Ogiso (1994) A role of iron in lambda DNA strand breaks in the reaction system of alloxan with reduced glutathione: iron (III) binding to DNA. *Biol. Pharm. Bull.* 17: 227–231.
- Sakurai, K., T. Miura (1989) Generation of free radicals by alloxan in the presence of bovine serum albumin: a role of protein sulfhydryl groups in alloxan cytotoxicity. *Biochem. Int.* 19: 405–412.
- Sakurai, K., T. Ogiso (1994) Generation of alloxan radical in rat islet cells: participation of NADPH: cytochrome P-450 reductase. *Biol. Pharm. Bull.* 17: 1451–1455.
- Sakurai, K., T. Ogiso (1995) Effect of ferritin on lambda DNA strand breaks in the reaction system of alloxan plus NADPH-cytochrome P450 reductase: ferritin's role in diabetogenic action of alloxan. *Biol. Pharm. Bull.* 18: 262–266.
- Saxena, A. K., P. Srivastava, N. Z. Baquer (1992) Effects of vanadate on glycolytic enzymes and malic enzyme in insulin-dependent and -independent tissues of diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 216: 123–126.
- Saxena, A. K., P. Srivastava, R. K. Kale, N. Z. Baquer (1993) Impaired antioxidant status in diabetic rat liver. Effect of vanadate. *Biochem Pharmacol.* 45: 539–542.
- Scarpelli, D. G. (1989) Toxicology of the pancreas. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 101: 543–554.
- Shanthi, V. P., P. Ramakrishnan (1994) Mechanism of the antioxidant effect of Bordetella pertussis extract. *Indian J. Biochem. Biophys.* 31: 398–402.
- Shen, X. M., Q. F. Su, Z. W. Qian, J. R. Zhang (1994) Effects of alloxan on electric activity of mouse pancreatic B cells in vitro. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 15: 439–442.
- Sies, H. (1986) Biochemie des oxidativen Stress. *Angew. Chem.* 98: 1061–1075.
- Simonian, M. A., D. M. Gevorkian, V. G. Mkhitarian (1987) [Quantitative changes in Cu, Zn-superoxide dismutase and catalase isolated from the liver of alloxan diabetic rats]. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 103: 306–308.
- Smith, J. B., J. C. Cusumano, C. F. Babbs (1990) Quantitative effects of iron chelators on hydroxyl radical production by the superoxide-driven fenton reaction. *Free Radic. Res. Commun.* 8: 101–106.
- Stehle, J. L., H. W. Korf (1996) Neuroendokrine Signaltransduktion: das Pinealorgan als Modell für cAMP-modulierte Genexpression. *Neuroforum* 4: 13–22.
- Sumoski, W., H. Baquerizo, A. Rabinovitch (1989) Oxygen free radical scavengers protect rat islet cells from damage by cytokines. *Diabetologia* 32: 792–796.
- Takasu, N., T. Asawa, I. Komiya, Y. Nagasawa, T. Yamada (1991a) Alloxan-induced DNA strand breaks in pancreatic islets. Evidence for H₂O₂ as an intermediate. *J. Biol. Chem.* 266: 2112–2114.
- Takasu, N., I. Komiya, T. Asawa, Y. Nagasawa, T. Yamada (1991b) Streptozocin- and alloxan-induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. H₂O₂ as mediator for DNA fragmentation. *Diabetes* 40: 1141–1145.
- Tan, D. X., L. D. Chen, B. Poeggeler, L. C. Manchester, R. J. Reiter (1993) Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J.* 1: 57–60.
- Tan, D. X., L. C. Manchester, R. J. Reiter, J. Cabrera, S. Burkhardt, T. Phillip, E. Gitto, M. Karbownik, Q. D. Li (2000) Melatonin suppresses autoxidation and hydrogen peroxide-induced lipid peroxidation in monkey brain homogenate. *Neuroendocrinol. Lett.* 21: 361–365.
- Tan, D. X., L. C. Manchester, R. J. Reiter, B. F. Plummer, L. J. Hardies, S. T. Weintraub, Vijayalaxmi, A. M. Shepherd (1998) A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253: 614–620.
- Tan, D. X., L. C. Manchester, R. J. Reiter, W. B. Qi, M. Karbownik, J. R. Calvo (2000) Significance of

- melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biol. Signals Recept.* 9: 137–159.
- Thaete, L. G., R. K. Crouch, M. G. Buse, S. S. Spicer (1985) The protective role of copper-zinc superoxide dismutase against alloxan-induced diabetes: morphological aspects. *Diabetologia* 28: 677–682.
- Thorens, B., H. K. Sarkar, H. R. Kaback, H. F. Lodish (1988) Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. *Cell* 55: 281–290.
- Towell, J., B. Kalyanaraman (1991) Detection of radical adducts of 5,5-dimethyl-1-pyrroline n-oxide by the combined use of high-performance liquid chromatography with electrochemical detection and electron spin resonance. *Anal. Biochem.* 196: 111–119.
- Uchigata, Y., H. Yamamoto, A. Kawamura, H. Okamoto (1982) Protection by superoxide dismutase, catalase, and poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan- and streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. *J. Biol. Chem.* 257: 6084–6088.
- Uchigata, Y., H. Yamamoto, H. Nagai, H. Okamoto (1983) Effect of poly(ADP-ribose) synthetase inhibitor administration to rats before and after injection of alloxan and streptozotocin on islet proinsulin synthesis. *Diabetes* 32: 316–318.
- Unger, R. H. (1991) Diabetic hyperglycemia: link to impaired glucose transport in pancreatic beta cells. *Science* 251: 1200–1205.
- Vanecek, J. (1998) Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol. Rev.* 78: 687–721.
- van Esseveldt, K. E., M. N. Lehman, G. J. Boer (2000) The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. *Brain Res. Rev.* 33: 34–77.
- Vollrath, L. (1981) The pineal organ. In: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, A. Ok-sche and L. Vollrath eds. Springer Verlag, Berlin, S. 1–665.
- Washburn, M. P., W. W. Wells (1997) Glutathione dependent reduction of alloxan to dialuric acid catalyzed by thioltransferase (glutaredoxin): a possible role for thioltransferase in alloxan toxicity. *Free Radic. Biol. Med.* 23: 563–570.
- Weaver, D. C., M. L. McDaniel, P. E. Lacy (1978a) Alloxan uptake by isolated rat islets of Langerhans. *Endocrinology* 102: 1847–1855.
- Weaver, D. C., M. L. McDaniel, P. E. Lacy (1978b) Mechanism of barbituric-acid protection against inhibition by alloxan of glucose-induced insulin release. *Diabetes* 27: 71–77.
- Webb, J. L. (1966) *Enzyme and metabolic inhibitors*. Academic Press, New York, pp. 367–419.
- Wilson, G. L., N. J. Patton, J. M. McCord, D. W. Mullins, B. T. Mossman (1984) Mechanisms of streptozotocin- and alloxan-induced damage in rat B cells. *Diabetologia* 27: 587–591.
- Winterbourn, C. C., W. B. Cowden, H. C. Sutton (1989) Auto-oxidation of dialuric acid, divicine and isouramil. Superoxide dependent and independent mechanisms. *Biochem. Pharmacol.* 38: 611–618.
- Winterbourn, C. C., R. Munday (1989) Glutathione-mediated redox cycling of alloxan. Mechanisms of superoxide dismutase inhibition and of metal-catalyzed OH formation. *Biochem. Pharmacol.* 38: 271–277.
- Winterbourn, C. C., R. Munday (1990) Concerted action of reduced glutathion and superoxide dismutase in preventing redox cycling of dihydroxypyrimidines, and their role in antioxidative defense. *Free Radic. Res. Commun.* 8: 287–293.
- Wippich, N., D. Peschke, E. Peschke, H. J. Brömme (2001a) Xanthinoxidasen verschiedener Herkunft unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, reaktive Sauerstoffintermediate (ROI) zu generieren. *Verh. Anat. Ges.* 183 (Suppl.): 307.
- Wippich, N., D. Peschke, E. Peschke, J. Holtz, H. Brömme (2001b) Comparison between xanthine oxidases from buttermilk and microorganisms regarding their ability to generate reactive oxygen species. *Int. J. Mol. Med.* 7: 211–216.
- Wöhler, F., J. Liebig (1838) Untersuchungen über die Natur der Harnsäure. *Ann. Pharm.* 26: 241–340.
- Wolff, S. P. (1993) Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *Br. Med. Bull.* 49: 642–652.
- Yamamoto, H., Y. Uchigata, H. Okamoto (1981a) DNA strand breaks in pancreatic islets by in vivo administration of alloxan or streptozotocin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 103: 1014–1020.
- Yamamoto, H., Y. Uchigata, H. Okamoto (1981b) Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature* 294: 284–286.
- Yamazaki, I., L. Piette (1990) ESR spin-trapping studies on the reaction of Fe^{2+} ions with H_2O_2 -reactive species in oxygen toxicity in biology. *J. Biol. Chem.* 265: 13589–13594.
- Yu, B. P. (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74: 139–162.
- Zager, R. A., D. S. Conrad (1996) Deferoxamine confers striking protection against cold storage injury to isolated mouse proximal tubules. *Kidney Int.* 50: 2109–2111.
- Zhang, H., U. T. Brunk (1993) Alloxan cytotoxicity is highly potentiated by plasma membrane- and lysosomal-associated iron – a study on a model system of cultured J-774 cells. *Diabetologia* 36: 707–715.
- Zhang, H., J. M. Zdzilek, U. T. Brunk (1991) Effects of alloxan and reducing agents on macrophages in culture. *Apmis* 99: 1038–1048.