

Received: 2005.06.27  
Accepted: 2005.08.17  
Published: 2005.09.30

## Wpływ stresu oksydacyjnego indukowanego etanolem na ośrodkowy układ nerwowy (OUN)

The action of oxidative stress induced by ethanol on the central nervous system (CNS)

Agnieszka Augustyniak, Kamil Michalak, Elżbieta Skrzydlewska

Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Akademii Medycznej w Białymstoku

### Streszczenie

Mózg jest narządem, który w procesach metabolicznych zużywa prawie 20% całkowitej ilości tlenu pobieranego przez organizm. Sprzyja to generowaniu wolnych rodników, szczególnie w obecności niektórych ksenobiotyków, takich jak alkohol etylowy. W celu przeciwdziałania uszkodzeniom komórek powodowanym przez wolne rodniki organizm wykształcił mechanizmy ochronne występujące pod nazwą system antyoksydacyjny. Zawartość antyoksydantów w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), zarówno pochodzenia egzo-, jak i endogennego, jest bardzo mała w porównaniu do innych tkanek, co w połączeniu z dużym stężeniem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych sprawia, że jest wyjątkowo podatny na uszkodzenia wolnorodnikowe.

Enzymy antyoksydacyjne: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT), peroksydaza glutationowa (GSH-Px), reduktaza glutationowa (GSSG-R) są obecne we wszystkich obszarach OUN odpowiedzialnych za podstawowe funkcje fizjologiczne, tj. w korze, mózdzku, podwzgórzu, prążkowi i rdzeniu kręgowym, przy czym największą aktywność wykazują w neuronach lub/i komórkach glijowych. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych ulega istotnym zmianom mózgu zwierząt poddanych zarówno ostremu, jak i przewlekłemu zatruciu etanolem, przy czym obniżenie aktywności może wskazywać na oksydacyjne modyfikacje cząsteczek białek enzymatycznych spowodowane przez wolne rodniki, powstające zarówno w czasie metabolizmu etanolu, jak i acetaldehydu lub obniżenie szybkości syntezy tych enzymów. Wzrost aktywności można traktować jako odpowiedź adaptacyjną komórki na nadmierne wytwarzanie wolnych rodników. Wyjątek stanowi katalaza, w przypadku której obniżenie aktywności jest związane z nasileniem syntezy białka. W zatruciu etanolem dochodzi również do obniżenia stężenia GSH, szczególnie w mózdzku, prążkowi i korze mózgowej, co może być spowodowane wzrostem stężenia acetaldehydu usuwanego z komórki z udziałem tego antyoksydanta. Zdolności antyoksydacyjne w OUN zależą także od poziomu antyoksydantów pochodzenia egzogenego, które są dostarczane do organizmu wraz z pożywieniem. Najważniejszym antyoksydantem egzogenym w OUN jest witamina E, której zawartość, podobnie jak witaminy C obniża się w zatruciu etanolem. Podwyższenie stężenia obserwuje się natomiast w przypadku witaminy A, co może być przyczyną poważnych uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego, szczególnie u młodych szczurów, którym podawano etanol w okresie prenatalnym.

### Słowa kluczowe:

etanol • ośrodkowy układ nerwowy (OUN) • enzymy antyoksydacyjne • antyoksydanty nieenzymatyczne

### Summary

The brain is an organ which metabolically consumes about 20% of the total oxygen received by the organism. This causes the generation of free radicals, especially in the presence of some xe-



nobiotics, such as ethanol. In order to prevent free radical-induced cellular damage, the organism developed a defense mechanism, the antioxidative system. The content of both exogenous and endogenous antioxidants in the central nervous system (CNS) is very small in comparison with that of other tissues, which in relation to the high level of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) makes the CNS exceptionally susceptible to free-radical damage.

The antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), and glutathione reductase (GSSG-R) are present in the CNS i.e. in the cortex, cerebellum, hypothalamus, striatum, and spinal cord, where they are responsible for the brain's basic functions, both physical and cognitive. Moreover, the highest activity of these enzymes is observed in neurons and/or glial cells. The activity of antioxidant enzymes is significantly changed in the CNS of animals chronically intoxicated with ethanol. The decrease in these activity may indicate at oxidative modification of the enzymatic proteins caused by free radicals which are generated during ethanol and acetaldehyde metabolism. It may also be caused by the decrease in the synthesis rate of these enzymes. However, the increase in the activity of antioxidant enzymes may often be explained as an adaptive reaction to an excess production of free radicals. The catalase is an exception in this respect because the decrease in its activity is related to the enhancement of protein synthesis. Ethanol intoxication also caused a decrease in GSH concentration, especially in the cerebellum, striatum, and cortex. This may be explained by the increase in the concentration of acetaldehyde, which is removed from cells with the use of this antioxidant. The antioxidative abilities of the CNS also depend on exogenous antioxidants which are provided to the organism during food intake. The most important exogenous antioxidant in the CNS is vitamin E. The content of vitamin E as well as that of vitamin C in the CNS is decreased, whereas the content of vitamin A is increased after ethanol administration. The high vitamin A level may cause damage of the central nervous system, especially in young rats exposed to ethanol in the prenatal period.

**Key words:** ethanol • central nervous system • antioxidant enzymes • non-enzymatic antioxidants

**Full-text PDF:** [http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_59/8216.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_59/8216.pdf)

**Word count:** 3767

**Tables:** –

**Figures:** –

**References:** 87

**Adres autorki:** prof. dr hab. Elżbieta Skrzydlewska, Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej AM, ul. Mickiewicza 2a, 15-230 Białystok; e-mail: skrzydle@amb.edu.pl

Mózg jest narządem, który w procesach metabolicznych zużywa prawie 20% całkowitej ilości tlenu pobieranego przez organizm, co w połączeniu z dużym stężeniem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych oraz małą zawartością związków o działaniu antyoksydacyjnym sprzyja generacji wolnych rodników zarówno w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych [37]. Jednym z czynników wpływających na stan redoks komórek w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) jest powszechnie spożywany ksenobiotyk – alkohol etylowy. Mimo że jego metabolizm zachodzi głównie w wątrobie, przenika on łatwo przez barierę krew-mózg i staje się przyczyną poważnych uszkodzeń OUN [64].

Poszczególne obszary ośrodkowego układu nerwowego są w różnym stopniu narażone na uszkodzenie przez alkohol etylowy. Zależy to zarówno od dawki, jak i długości okresu spożywania tego ksenobiotyku, a także wieku osobników. Do istotnych zmian dochodzi w przypadku narażenia OUN na działanie alkoholu w okresie prenatalnym. Szczególnie narażona na uszkodzenia powodowane przez etanol jest wtedy kora mózgu, która kontroluje procesy przekazywania informacji, funkcje motoryczne, a także

odpowiada za mowę, pamięć, emocje, zachowanie oraz inne funkcje [64]. Wykazano, że przewlekłe podawanie etanolu w okresie życia płodowego, powoduje poważne nieprawidłowości w budowie zewnętrznej warstwy kory u narodzonych zwierząt [58]. Do istotnych zmian powodowanych zarówno ostrym, jak i przewlekłym zatruciem etanolem dochodzi również w hipokampie [54], który odpowiada m.in. za zdolność uczenia i pamięć. Stwierdzono, że u szczurów, którym w okresie prenatalnym podawano etanol liczba neuronów w hipokampie była obniżona o 20% [8,64]. Ponadto zaobserwowano, że w wyniku podawania alkoholu w okresie życia płodowego dochodzi do obniżenia liczby połączeń synaptycznych oraz liczby komórek Purkiniego w mózdzku, który odpowiada za utrzymanie równowagi i koordynację, co w rezultacie powoduje zaburzenia równowagi u narodzonych dzieci [58].

#### **METABOLIZM ETANOLU W OŚRODKOWYM UKŁADZIE NERWOWYM (OUN)**

Wprowadzony do organizmu alkohol etylowy jest utleniany do acetaldehydu, a następnie octanu, który ulega utle-

nieniu do dwutlenku węgla i wody. Około 90% spożytego alkoholu etylowego ulega metabolizmowi w wątrobie, a pozostała jego część jest metabolizowana w nerkach, mięśniach, płucach, śledzionie i OUN [62,78]. Głównym enzymem utleniającym alkohol etylowy do aldehydu octowego jest cytosolowa dehydrogenaza alkoholowa (ADH), której koenzymem jest NAD [52]. W OUN ta droga metabolizmu etanolu ma mniejsze znaczenie niż w innych tkankach ze względu na małą aktywność dehydrogenazy alkoholowej typu 1 (ADH1), która odpowiada za utlenianie etanolu głównie w wątrobie [53]. Oprócz ADH1 wyizolowano jeszcze pięć innych izoenzymów dehydrogenazy alkoholowej, spośród których w OUN występują ADH2, ADH3 oraz ADH4. Dehydrogenaza alkoholowa typu 2 (ADH2), przy małych i średnich stężeniach etanolu nie wykorzystuje go jako substratu [31,53], natomiast ADH4 ze względu na zbyt wysoką wartość stałej Michaelisa nie bierze udziału w metabolizmie etanolu u gryzoni, ale może go utleniać w OUN człowieka [53]. Pomimo małego powinowactwa do etanolu w jego metabolizmie może mieć udział (oprócz ADH1) dehydrogenaza alkoholowa typu 3 (ADH3). Jednak utlenianie etanolu przez ADH3 ma znaczenie tylko w tych obszarach OUN, w których obserwuje się wzrost aktywności tego izoenzymu, czyli w mózdzku i hipokampie [31]. Ponadto w uszkodzonym przez alkohol OUN dochodzi do nasilonej mutacji genów kodujących izoenzymy ADH, co dodatkowo zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia reakcji z udziałem tego enzymu [84].

Alkohol etylowy utleniany jest również przez mikrosomalny system utleniający (MEOS) zależny od cytochromu P-450 z udziałem NADP [52]. Mimo że z OUN wyizolowano sześć różnych izoenzymów cytochromu P-450, w tym P-450 2E1, którego zawartość wzrasta w zatruciu etanolem [85], to jednak ze względu na stosunkowo niewielką zawartość cytochromu P-450 ta droga metaboliczna odgrywa większą rolę w innych narządach, m.in. w wątrobie. Poziom P-450 w mikrosomach OUN odpowiada jedynie 1–3% jego zawartości w wątrobie [42,57,67,83].

W OUN, w przeciwieństwie do innych tkanek, duże znaczenie ma utlenianie alkoholu etylowego przez katalazę, enzym zawarty w dużych ilościach w peroksyzomach mózgu [5,6,20]. Podczas reakcji utleniania etanolu katalizowanej przez katalazę dochodzi do utworzenia kompleksu katalaza-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, który następnie może reagować z etanolem. Reakcja ta prowadzi do powstania acetaldehydu i uwolnienia enzymu. Jednak uważa się, że utlenianie etanolu z udziałem katalazy jest w większym stopniu uwarunkowane dostępnością nadtlenu wodoru niż poziomem lub/i aktywnością tego enzymu [5,6].

Udział poszczególnych enzymów w metabolizmie etanolu w dużym stopniu zależy od obszaru OUN. Dehydrogenaza alkoholowa jest najbardziej aktywna w komórkach Purkiniego i w niektórych neuronach kory mózgowej [45], natomiast do aktywacji P-450 2E1 dochodzi przede wszystkim w komórkach glejowych [38]. Utlenianie etanolu przez katalazę zachodzi głównie w neuronach aminoergicznych i w komórkach glejowych [87].

Powstający z etanolu aldehyd octowy jest utleniany do octanu z udziałem dehydrogenazy aldehydowej (ALDH), która jest obecna w OUN w tych samych obszarach co ADH, tj.

głównie w mózdzku i hipokampie [53]. Największe powinowactwo do aldehydu octowego ma dehydrogenaza mitochondrialna, gdzie z udziałem NAD jako koenzymu zachodzi jego utlenianie [52]. Aldehyd octowy może być również utleniany w reakcjach katalizowanych przez oksydazę aldehydową lub oksydazę ksantynową, jednak ze względu na małe powinowactwo do substratu ich udział w tym procesie jest bardzo ograniczony [21]. Utlenianie acetaldehydu przebiega szczególnie wolno w neuronach aminoergicznych, co prowadzi do jego akumulacji i może spowodować aktywację systemu aminoergicznego uważaną za jedną z przyczyn poalkoholowego uszkodzenia OUN [87].

Doświadczalnie wykazano, że utlenianiu etanolu w OUN towarzyszy zwiększone wytwarzanie wolnych rodników, przy czym jako pierwszy generowany jest anionorodnik ponadtlenkowy [64]. Ze względu na zużycie tlenu w reakcjach metabolicznych OUN jest poddany działaniu dużych ilości anionorodnika ponadtlenkowego [77]. Zwiększone wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego w OUN, podobnie jak w innych tkankach jest spowodowane nasileniem konwersji dehydrogenazy ksantynowej w oksydazę ksantynową [44]. Przyczyną tego jest wzrost stężenia NADH powstającego w czasie utleniania zarówno etanolu jak i jego metabolitu – acetaldehydu [76]. Z anionorodnika ponadtlenkowego z udziałem dysmutazy ponadtlenkowej powstaje nadtlenek wodoru, który może pełnić rolę aktywatora grupy neuroprzebieżników odpowiedzialnych za kontrolowanie czynności ruchowych u gryzoni, np. dopaminy [1].

W obecności jonów żelaza (II), których zawartość w OUN jest bardzo duża, nadtlenek wodoru ulega przemianie do bardzo reaktywnego rodnika hydroksylowego [32]. Rodnik ten łatwo reaguje ze wszystkimi składnikami komórek, szczególnie z lipidami, powodując ich peroksydację. Ze względu na bardzo dużą zawartość fosfolipidów OUN jest w największym stopniu podatny na skutki działania rodnika hydroksylowego [35,65]. Ponadto, w reakcji rodnika hydroksylowego z acetaldehydem powstają rodniki acetylowe, których zawartość wzrasta zarówno w mikrosomach wątroby jak i OUN [66]. Rodnik hydroksylowy może również wchodzić w reakcję z alkoholem etylowym z utworzeniem rodnika 1-hydroksyetylowego, który ze względu na stosunkowo długi okres półtrwania w dużym stopniu przyczynia się do uszkodzenia komórek. Zawartość rodnika hydroksyetylowego w OUN wzrasta w wyniku indukcji izoenzymu CYP2E1, pomimo małej jego aktywności w ośrodkowym układzie nerwowym [79]. Rodnik 1-hydroksyetylowy może być również generowany przez inne systemy metabolizujące etanol, m.in. związane z 6-hydroksydopaminą [59] lub oksydazą ksantynową [3].

Powstawanie wolnych rodników w czasie metabolizmu etanolu w OUN może być również związane z indukcją syntazy tlenu azotu (iNOS). Na skutek indukcji iNOS w obecności cytokin dochodzi do generacji dużych ilości tlenu azotu (NO) [79]. NO w reakcji z anionorodnikiem ponadtlenkowym tworzy cytotoksyczny nadtlenoazotyn (ONOO<sup>-</sup>), który łatwo wchodzi w reakcje ze związkami ważnymi biologicznie. Powstający w nadmiernej ilości ONOO<sup>-</sup> powoduje modyfikacje białek, w tym również białek enzymatycznych, takich jak syntaza glutaminianowa [48] lub syntapsyna [25]. Powyższe reakcje towarzyszące meta-



bolizmowi etanolu w OUN i związana z nimi generacja wolnych rodników mogą powodować zmiany w układzie antyoksydacyjnym.

### WPLYW ETANOLU NA SYSTEM ANTYOKSYDACYJNY OUN

Powstawanie reaktywnych form tlenu towarzyszy wielu procesom fizjologicznym, dlatego w organizmie wykształcił się system antyoksydacyjny chroniący przed ich szkodliwym działaniem. Ze względu na mechanizm działania związki o działaniu antyoksydacyjnym dzieli się na enzymatyczne i nieenzymatyczne, przy czym wśród antyoksydantów nieenzymatycznych można wyróżnić związki pochodzenia zarówno endogenne, jak i egzogenne. W OUN, w którym szczególnie nasilona jest generacja wolnych rodników, prawidłowo funkcjonujący system antyoksydacyjny ma podstawowe znaczenie.

Do podstawowych składników enzymatycznych układu antyoksydacyjnego należą m.in. współdziałające ze sobą dysmutaza nadtlenkowa (SOD; E.C. 1.15.1.1) i katalaza (CAT; E.C.1.11.1.6) oraz enzymy uczestniczące w metabolizmie glutationu – peroksydaza glutationowa (GSH-Px; EC 1.11.1.9) i reduktaza glutationowa (GSSG-R; E.C.1.6.4.2).

Dysmutaza nadtlenkowa jest enzymem katalizującym reakcję dysmutacji anionorodnika nadtlenkowego do nadtlenu wodoru, który jest następnie rozkładany przez katalazę – enzym umiejscowiony przede wszystkim w peroksysomach. W zależności od miejsca występowania w OUN ssaków można wyróżnić trzy izoenzymy dysmutazy nadtlenkowej: zależną od jonów manganu – mitochondrialną (Mn-SOD; SOD-2) [9], zależną od jonów miedzi i cynku Cu, Zn-SOD (SOD-1) obecną w cytoplazmie, mikrosomach i synaptosomach [68,86] oraz pozakomórkową (EC-SOD) [60].

Aktywność Cu,Zn-SOD w poszczególnych obszarach OUN jest duża w porównaniu do MnSOD, przy czym obie odmiany molekularne SOD największą aktywność wykazują w prążkowie, w komórkach glejowych, a nieco mniejszą w neuronach [22]. Mniejsze znaczenie w tkance mózgu ma pozakomórkowa dysmutaza nadtlenkowa (EC-SOD). Uważa się natomiast, że enzym ten poprzez dysmutację anionorodnika nadtlenkowego zapobiega uszkodzeniu komórek przez nadtlendioazoty powstający w reakcji  $O_2^-$  z tlenkiem azotu, którego ilość wzrasta w zatruciu etanolem [60].

W wyniku działania alkoholu etylowego aktywność dysmutazy nadtlenkowej w mózgu zwierząt może się obniżyć, wzrastać lub nie ulegać istotnym zmianom [77,86]. Ze względu na znaczną szybkość procesów metabolicznych kora mózgowa jest głównym miejscem wytwarzania wolnych rodników. W związku z tym obserwowany w tym obszarze wzrost aktywności dysmutazy nadtlenkowej jest traktowany jako odpowiedź adaptacyjna na stres oksydacyjny indukowany ostrym zatruciem etanolem [14]. Natomiast w wyniku przewlekłego zatrucia etanolem w korze mózgowej dochodzi do obniżenia aktywności cytosolowej dysmutazy nadtlenkowej, a w mózdzku również mitochondrialnej dysmutazy nadtlenkowej [16]. Do obniżenia aktywności SOD dochodzi również w rdzeniu krę-

gowym, co przypisuje się oksydacyjnej inaktywacji enzymu i akumulacji nadtlenu, wywołanej zarówno ostrym, jak i przewlekłym zatruciem etanolem [50,51]. Poddanie *in vitro* komórek glejowych (C6, MT16, MT26) oraz neuronów (M1, MTD1, MT17) działaniu etanolu w doświadczeniu odpowiadającym ostremu zatruciu powoduje obniżenie aktywności SOD zarówno w neuronach, jak i komórkach glejowych, natomiast w doświadczeniu odpowiadającym przewlekłemu zatruciu etanolem aktywność SOD ulegała obniżeniu wyłącznie w komórkach glejowych (C6, NN) [49]. Wykazano ponadto, że po 2 dniach od zastosowania ostatniej dawki etanolu aktywność SOD w komórkach glejowych szczura osiągała wartości kontrolne, co może świadczyć o efekcie adaptacyjnym [49]. Podobne zachowanie dysmutazy nadtlenkowej zaobserwowano w OUN szczura w eksperymencie przeprowadzonym w warunkach *in vivo* [50]. W ostrym zatruciu etanolem stwierdzono obniżenie aktywności Cu, Zn-SOD we frakcji cytosolowej oraz mikrosomalnej, a także Mn-SOD w mitochondriach mózgu szczura [68].

Przypuszcza się, że obniżenie aktywności dysmutazy nadtlenkowej może być spowodowane zmniejszeniem szybkości syntezy tego enzymu, oksydacyjnymi modyfikacjami w cząsteczce białka enzymatycznego, inaktywacją centrum aktywnego enzymu lub wszystkimi wymienionymi czynnikami jednocześnie. Wykazano, że aktywność dysmutazy nadtlenkowej jest zahamowana na skutek reakcji cząsteczek białka enzymatycznego z wolnymi rodnikami powstającymi zarówno w czasie metabolizmu etanolu, jak i acetaldehydu [11]. Dotyczy to głównie rodnika hydroksylowego, a także rodnika 1-hydroksyetylowego, których wytwarzanie jest związane z indukcją cytochromu P-450 [72]. Reakcja dysmutazy nadtlenkowej z rodnikiem 1-hydroksyetylowym prawdopodobnie polega na alkilowaniu reszt aminokwasowych łańcucha bocznego białka enzymu lub jest związana z przeniesieniem elektronu na jon miedzi grupy prostetycznej enzymu, co w obu przypadkach może prowadzić do inaktywacji SOD [72]. Jednak szybkość wychwytywania rodnika 1-hydroksyetylowego przez dysmutazę nadtlenkową jest mniejsza w porównaniu z rodnikiem hydroksylowym. Wykazano, że z dużą szybkością zachodzi także reakcja pomiędzy SOD, a rodnikami hydroksynadtlenoalkilowymi, szczególnie z 1-hydroksyetylo-1-nadtlenorodnikiem, którego powstawanie również wiąże się z metabolizmem etanolu [11].

Z dysmutazą nadtlenkową ściśle współdziała katalaza, która katalizuje reakcję dysproporcjonowania nadtlenu wodoru, a także utlenianie substancji, takich jak metanol, etanol, mrówczan, azotyny i chinony. W tkankach ssaków katalaza jest umiejscowiona głównie w wątrobie, erytrocytach, nerkach i OUN. W wątrobie i nerce katalaza wykazuje najwyższą aktywność w peroksysomach, gdzie stanowi do 16% wszystkich białek [19], natomiast w OUN jest umiejscowiona również w mikroperoksysomach [87]. W ośrodkowym układzie nerwowym enzym ten występuje w największych i porównywalnych ilościach w mózdzku i rdzeniu kręgowym [28,87]. Wykazano, że w zatruciu alkoholem etylowym może dochodzić do różnych zmian w aktywności katalazy w zależności od badanego obszaru mózgu. Do obniżenia aktywności tego enzymu dochodzi w mózdzku [16] i podwzgórzu [77], natomiast wzrost aktywności obserwowano w rdzeniu kręgowym i prąż-

kowiu szczurów przewlekle zatrutych etanolem [77]. Przyczyną obniżenia aktywności katalazy w podwzgórzcu mogą być modyfikacje cząsteczek enzymu przez kumulujący się w komórkach  $H_2O_2$  oraz inne powstałe w czasie metabolizmu etanolu RFT [77]. Kierunek zmian aktywności katalazy w zatruciu etanolem zależy również od badanej frakcji komórkowej. Wykazano, że w ostrym zatruciu etanolem dochodzi do wzrostu aktywności tego enzymu w cytosolu, mikrosomach i synaptosomach, a także do obniżenia w mitochondriach OUN szczura [68].

Wzrost aktywności katalazy w następstwie działania etanolu obserwowany w OUN jest związany z małą aktywnością dehydrogenazy alkoholowej [7]. Powodem podwyższenia aktywności katalazy w ośrodkowym układzie nerwowym nie mogą być procesy adaptacyjne wywołane zwiększoną generacją nadtlenu wodoru, gdyż w OUN zwierząt poddanych działaniu etanolu duże stężenia  $H_2O_2$  powstają jedynie lokalnie, m.in. na skutek działania oksydazy monoaminowej w zakończeniach nerwowych lub w peroksysomach, co jednak nie ma wpływu na podwyższenie stężenia nadtlenu wodoru ani też aktywności CAT [7]. Przypuszcza się, że wzrost aktywności katalazy jest spowodowany nasileniem syntezy tego białka. Wykazano, że podwyższenie aktywności katalazy OUN szczura może być wynikiem wzrostu ilości lub zwiększenia szybkości różnicowania się oligodendrocytów zawierających duże ilości mikroperoksysomów [56]. Wzrost aktywności katalazy jest szczególnie niebezpieczny ze względu na możliwość powstawania lokalnie dużych stężeń acetaldehydu. Metabolit ten może reagować z białkami lub innymi związkami wielkocząsteczkowymi wpływając na ich aktywność biologiczną, a także może się przyczyniać do nasilenia peroksydacji lipidów. Wykazano również, że acetaldehyd może spowalniać metabolizm amin biogennych w mózgu, takich jak dopamina, norepinefryna, serotonina, a także obniżać aktywność  $O^6$ -metyloguaninotransferazy, która bierze udział w mechanizmach naprawczych alkilowanych nukleoprotein, a ponadto może zakłócać transkrypcyjną regulację genów [7,24,80].

Istotną rolę w działaniu antyoksydacyjnym odgrywa w OUN układ enzymów związanych z glutationem, takich jak peroksydaza i reduktaza glutationowa. Peroksydaza glutationowa (GSH-Px) występuje w wielu tkankach, przede wszystkim w wątrobie, erytrocytach i osoczu krwi, ale jej aktywność odnotowano także w komórkach OUN, m.in. w neuronach i komórkach glejowych [12,73]. GSH-Px jest umiejscowiona głównie w cytoplazmie i macierzy mitochondrialnej. Jej rola sprowadza się do redukcji nadtlenu z udziałem glutationu, czemu towarzyszy powstawanie disulfidu glutationu. W OUN spotyka się peroksydazę glutationową, zawierającą w centrum aktywnym atom selenu i również postać izoenzymu niezależną od tego pierwiastka [4], przy czym aktywność enzymatyczna tej ostatniej jest około cztery razy mniejsza w stosunku do GSH-Px selenozależnej [46]. Antyoksydacyjne właściwości tego enzymu polegają głównie na redukcji nadtlenu lipidów, które ze względu na dużą zawartość fosfolipidów w ośrodkowym układzie nerwowym, powstają w warunkach stresu oksydacyjnego w szczególności dużych ilościach [4]. Natomiast GSH-Px niezależna od selenu działa w obecności dużych stężeń nadtlenu wodoru i dlatego także ta postać enzymu może odgrywać istotną rolę w zapobieganiu stresu-

wi oksydacyjnego w OUN [46]. Aktywność peroksydazy glutationowej w OUN jest tylko nieznacznie mniejsza w porównaniu do innych tkanek, m.in. u myszy jest tylko o 5% mniejsza w stosunku do jej aktywności w wątrobie i w nerce [27]. W OUN człowieka oraz szczura największą aktywność peroksydazy glutationowej obserwuje się w istocie szarej i istocie białej kory mózgowej, przy czym w istocie szarej aktywność GSH-Px jest większa [4,13]. Ponadto w OUN szczura najwyższą aktywność wykazują komórki glejowe [27], które ze względu na stosunkowo dużą zawartość grup sulfhydrylowych pełnią bardzo ważną rolę w metabolizmie ksenobiotyków [73]. W wyniku działania etanolu w OUN może dochodzić zarówno do obniżenia jak i wzrostu aktywności peroksydazy glutationowej [28,39,55]. Wykazano, że ostre zatrucie etanolem powoduje wzrost aktywności GSH-Px w korze mózgu szczura [77]. Natomiast przewlekle działanie etanolu powoduje wzrost aktywności GSH-Px w prążkowie i podwzgórzcu, które w organizmie odpowiadają za kontrolowanie funkcji motorycznych, temperatury ciała oraz zachowania [77]. Przypuszcza się, że wzrost aktywności tego enzymu może wskazywać na procesy adaptacyjne w komórce spowodowane nadmiernym wytwarzaniem nadtlenu w zatruciu etanolem [77]. Z kolei powodem obniżenia aktywności GSH-Px obserwowanego głównie w tkance nerwowej na skutek przewlekłego zatrucia etanolem mogą być reakcje cząsteczek tego enzymu z końcowymi produktami peroksydacji lipidów, takimi jak MDA, 4-hydroksynonenal, co może prowadzić nawet do inaktywacji enzymu [12].

Reduktaza glutationowa (GSSG-R; E.C.1.6.4.2) jest enzymem występującym w cytosolu i w mitochondriach większości komórek. Katalizuje ona reakcję regeneracji zredukowanego glutationu kosztem utleniania NADPH. Aktywność reduktazy glutationowej w OUN jest mniejsza w porównaniu do innych tkanek, np. u myszy o 32% w stosunku do aktywności w nerce i o 65% w stosunku do aktywności w wątrobie [40]. Największą aktywność tego enzymu stwierdza się w neuronach i komórkach glejowych [47]. W ostrym zatruciu etanolem obserwuje się istotne obniżenie aktywności reduktazy glutationowej w korze mózgu [77]. Natomiast wzrost aktywności GSSG-R na skutek przewlekłego zatrucia etanolem zachodzi w prążkowie i rdzeniu kręgowym, co może być wynikiem dążenia komórek do utrzymania prawidłowego poziomu GSH lub stanowi odpowiedź adaptacyjną na towarzyszący zatruciu etanolem, obniżony poziom NADPH [77].

Najważniejszym nieenzymatycznym antyoksydantem cytosolowym współdziałającym z peroksydazą glutationową jest glutation zredukowany (GSH). Jako kosubstrat GSH-Px, bierze on udział w reakcjach redukcji nadtlenu wodoru i nadtlenu lipidów [27], a powstający w tych reakcjach disulfid glutationu jest następnie redukowany przez NADPH w reakcji katalizowanej przez reduktazę glutationową. Spośród komórek OUN największą zawartością GSH charakteryzują się neurony [69]. Zarówno ostre, jak i przewlekle zatrucie alkoholem etylowym powoduje obniżenie stężenia glutationu zredukowanego w OUN szczura [70]. Do największych zmian w stężeniu GSH dochodzi w mózdzku, prążkowie i korze mózgowej. Mózdzek jest strukturą charakteryzującą się szczególnie małym stężeniem antyoksydantów nieenzymatycznych, a zwłaszcza  $\alpha$ -tokoferolu. Spożywanie etanolu zmniejsza dodatkowo zawar-



tość tokoferolu w mózdku, a to obniża zdolności antyoksydacyjne w tym obszarze i sprzyja zużyciu się GSH w reakcjach wolnorodnikowych indukowanych przez etanol. Ponadto, obniżenie zawartości GSH w mózdku może być związane ze wzrostem zawartości metabolitu etanolu – acetaldehydu, który – podobnie jak inne toksyczne związki – jest usuwany z komórki z udziałem S-transferazy glutationowej i GSH [27]. Wzrost zawartości acetaldehydu jest również przyczyną obniżenia zawartości GSH w prądkowiu, które ze względu na duże stężenia dopaminy jest uważane za miejsce szczególnie podatne na uszkodzenia wolnorodnikowe [26]. Do obniżenia GSH dochodzi również w korze mózgu, która jest wyjątkowo wrażliwa na zmiany wywołane przez etanol [10].

Ponieważ jedną z podstawowych funkcji glutationu w organizmie jest utrzymywanie grup sulfhydrylowych białek w stanie zredukowanym, to obniżenie wewnątrzkomórkowego stężenia glutationu obserwowane w OUN na skutek zatrucia etanolem może prowadzić do nadmiernego ich utleniania [30]. Wykazano, że u szczura, szczególnie w prądkowiu i hipokampie dochodzi do obniżenia poziomu grup sulfhydrylowych białek [16]. W ostatnich latach wykazano, że istnieje związek pomiędzy obniżeniem zawartości grup –SH w zatruciu etanolem a indukcją białek szoku termicznego (HSPs) [43], których obecność może wskazywać na istnienie stresu oksydacyjnego. Pojawienie się HSPs może również uruchamiać wiele mechanizmów chroniących komórki zarówno przed wolnymi rodnikami, jak też przed innymi cytotoksycznymi czynnikami aktywowanymi przez wolne rodniki, m.in. TNF- $\alpha$  [43]. Obecność HSPs, w tym białka o masie 70 kDa (HSP70), może ponadto nasilać reakcje wolnorodnikowe, co przyczynia się do obniżenia zawartości grup sulfhydrylowych i w rezultacie obniża zdolności antyoksydacyjne. Zawartość HSP70 w prądkowiu i hipokampie mózgu szczura wzrasta podczas zatrucia etanolem proporcjonalnie do obniżenia zawartości grup sulfhydrylowych [16].

Obniżeniu stężenia GSH często towarzyszy wzrost stężenia utlenionej postaci glutationu – disulfidu glutationu (GSSG) oraz obniżenie stosunku GSH/GSSG. Wykazano, że zatrucie etanolem powoduje w mózgu szczura podwyższenie stężenia disulfidu glutationu, szczególnie w korze, mózdku, prądkowiu oraz hipokampie, czemu towarzyszy proporcjonalne obniżenie potencjału GSH/GSSG [17]. Uważa się, że przyczyną obniżenia stosunku GSH/GSSG w warunkach stresu oksydacyjnego mogą być zmiany w aktywności enzymów uczestniczących w metabolizmie glutationu, takich jak peroksydaza i reduktaza glutationowa [17,27].

Zdolności antyoksydacyjne OUN zależą także od poziomu antyoksydantów pochodzenia głównie egzogennego, których podstawowe ilości są dostarczane do organizmu wraz z pożywieniem. Ze względu na dużą zawartość struktur błonowych w OUN najważniejszym antyoksydantem egzogennym jest witamina E ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tokoferole), która ma właściwości lipofilowe i dzięki temu może chronić fosfolipidy błonowe przed ich peroksydacją. Uwzględniając zawartość poszczególnych tokoferoli w mózgu najważniejsze znaczenie ma  $\alpha$ -tokoferol [36]. Badania OUN wykazały, że także obecność małych ilości  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tokoferoli oraz śladowe ilości tokotrienoli mają znaczenie w usuwaniu wolnych rodników [63]. Stres oksydacyjny indukowany

etanolom powoduje obniżenie zawartości witaminy E w mózdku szczura, w którym witamina ta występuje w najmniejszych ilościach [81,82]. Uważa się, że jest to spowodowane wychwytywaniem przez witaminę E rodników powstających w czasie utleniania alkoholu etylowego, takich jak anionorodnik ponadtlenkowy oraz rodnik hydroksyloxy [15].  $\alpha$ -tokoferol reagując z nadtlendioazotem powstającym również w czasie metabolizmu etanolu daje chinon  $\alpha$ -tokoferolu, którego zredukowana postać – hydrochinon  $\alpha$ -tokoferolu może również pełnić rolę antyoksydanta. [41]. Wykazano, że działając w taki sposób witamina E zapobiega peroksydacji fosfolipidów w synapsosomach OUN [75].

Działanie antyoksydacyjne witaminy E w obszarze lipofilowym uzupełnia  $\beta$ -karoten, który jest skutecznym antyoksydantem zwłaszcza w przypadku małych stężeń tlenu i którego działanie polega na stabilizacji lipidowych rodników nadtlendiokowych w jego sprzężonej alkilowej strukturze. Właściwości antyoksydacyjne w OUN wykazuje także metabolit  $\beta$ -karotenu – witamina A (retinol). Retinol i jego pochodne przenikają przez barierę krew–mózg w niewielkim procencie (5%), co odbywa się jedynie w obecności albuminy i innych białek osocza charakteryzujących się dużym powinowactwem do witaminy A [33]. W związku z tym stężenie witaminy A w OUN jest bardzo małe i dlatego jej znaczenie w tym obszarze jest bardzo ograniczone. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że zmniejszenie stopnia peroksydacji lipidów w mitochondriach komórek OUN występuje dopiero wówczas, gdy stężenie retinolu oraz jego pochodnych, takich jak octan retinolu, kwas retinowy, palmitynian retinolu oraz retinal osiąga wartości powyżej 0,1 mmol/l [23]. Wykazano, że stres oksydacyjny indukowany etanolem powoduje wzrost stężenia witaminy A w mózgu, jednak duże stężenia retinolu okazały się szkodliwe dla OUN [29]. Szczególnie niebezpieczny jest stres oksydacyjny wywołany chronicznym podawaniem etanolu szczurom ciężarnym, gdyż skutkuje to wzrostem zawartości pochodnych retinolu oraz białek związanych z kwasem retinowym w OUN embrionów [34]. Uważa się, że na skutek stresu oksydacyjnego wywołanego etanolem w okresie prenatalnym dochodzi do uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego u młodych szczurów, spowodowanego podwyższeniem zawartości retinolu. Stanowi to jedną z przyczyn syndromu FAS [34].

W ochronie antyoksydacyjnej ważną rolę spełniają współdziałające z antyoksydantami lipofilowymi, antyoksydanty hydrofilowe, a zwłaszcza witamina C, która m.in. redukuje rodnik tokoferyloxy powstający w reakcji witaminy E z rodnikami lipidowymi [18]. Stężenie witaminy C jest większe w tkankach, niż w płynach ustrojowych, przy czym wykazano, że w OUN, jej zawartość jest 10 razy większa niż w osoczu krwi [71,74]. W ośrodkowym układzie nerwowym witamina C osiąga największe stężenia w istocie szarej oraz istocie białej kory mózgu [36], a także w neuronach [69]. Wykazano ponadto, że stężenie witaminy C w mózgu może dodatkowo ulegać podwyższeniu na skutek wzrostu stężenia kwasu dehydroaskorbinowego we krwi [33]. Przez barierę krew–mózg witamina C przenika w postaci utlenionej z udziałem transportera glukozy – receptora GLUT1, przy czym w OUN jest obecna w postaci kwasu askorbinowego [2]. Oprócz działania antyoksydacyjnego, polegającego na wychwytywaniu wol-

nych rodników [61] witamina C pełni w OUN rolę kofaktora  $\beta$ -hydroksylazy dopaminy, enzymu biorącego udział w syntezie katecholoamin [71,74]. Dlatego też obniżenie

zawartości witaminy C w mózdzku w wyniku stresu oksydacyjnego indukowanego ostrym zatruciem etanolem jest bardzo niebezpieczne [81].

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Adachi Y.U., Watanabe K., Higuchi H., Satoh T., Vizi E.S.: Oxygen inhalation enhances striatal dopamine metabolism and monoamine oxidase enzyme inhibition prevents it: a microdialysis study. *Eur. J. Pharmacol.*, 2001; 422: 61–68
- [2] Agus D.B., Gambhir S.S., Pardridge W.M., Spielholz C., Baselga J., Vera J.C., Golde D.W.: Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters. *J. Clin. Invest.*, 1997; 100: 2842–2848
- [3] Ahmad F.F., Cowan D.L., Sun A.Y.: Spin trapping studies of influence of alcohol on lipid peroxidation. W: *Biochemical Mechanism of Alcoholism*. Red.: G.Y. Sun. Humana Press, Clifton 1989, 215–226
- [4] Ansari K.A., Bigelow D., Kaplan E.: Glutathione peroxidase activity in surgical and autopsied human brains. *Neurochem. Res.*, 1985; 10: 703–711
- [5] Aragon C.M., Rogan F., Amit Z.: Ethanol metabolism in rat brain homogenates by a catalase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system. *Biochem. Pharmacol.*, 1992; 44: 93–98
- [6] Aragon C.M., Spivak K., Amit Z.: Effects of 3-amino-1,2,4-triazole on ethanol-induced open-field activity: evidence for brain catalase mediation of ethanol's effects. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 1989; 13: 104–108
- [7] Aspberg A., Soderback M., Totmar O.: Increase in catalase activity in developing rat brain cell reaggregation cultures in the presence of ethanol. *Biochem. Pharmacol.*, 1993; 46: 1873–1876
- [8] Barnes D.E., Walker D.W.: Prenatal ethanol exposure permanently reduces the number of pyramidal neurons in rat hippocampus. *Brain Res.*, 1981; 227: 333–340
- [9] Bidmon H.J., Kato K., Schleicher A., Witte O.W., Zilles K.: Transient increase of manganese-superoxide dismutase in remote brain areas after focal phototherapeutic cortical lesion. *Stroke*, 1998; 29: 203–210
- [10] Bondy S.C., Guo S.X.: Regional selectivity in ethanol-induced pro-oxidant events within the brain. *Biochem. Pharmacol.*, 1995; 49: 69–72
- [11] Bors W., Czapski G., Saran M.: An expanded function for superoxide dismutase. *Free Radic. Res. Commun.*, 1991; 12–13: 411–417
- [12] Bosch-Morell F., Martinez-Soriano F., Colell A., Fernandez-Checa J.C., Romero F.J.: Chronic ethanol feeding induces cellular antioxidants decrease and oxidative stress in rat peripheral nerves. Effect of S-adenosyl-L-methionine and N-acetyl-L-cysteine. *Free Radic. Biol. Med.*, 1998; 25: 365–368
- [13] Brannan T.S., Maker H.S., Weiss C., Cohen G.: Regional distribution of glutathione peroxidase in the adult rat brain. *J. Neurochem.*, 1980; 35: 1013–1014
- [14] Burmistrov S.O., Mashek O.P., Kotin A.M.: The action of acute alcoholic intoxication on the antioxidant system and creatine kinase activity in the brain of rat embryos. *Eksp. Klin. Farmakol.*, 1992; 55: 54–56
- [15] Burton G.W., Cheng S.C., Webb A., Ingold K.U.: Vitamin E in young and old human red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1986; 860: 84–90
- [16] Calabrese V., Renis M., Calderone A., Russo A., Reale S., Barcellona M.L., Rizza V.: Stress proteins and SH-groups in oxidant-induced cellular injury after chronic ethanol administration in rat. *Free Radic. Biol. Med.*, 1998; 24: 1159–1167
- [17] Calabrese V., Testa G., Ravagna A., Bates T.E., Stella A.M.: HSP70 induction in the brain following ethanol administration in the rat: regulation by glutathione redox state. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000; 269: 397–400
- [18] Chan P.H., Kinouchi H., Epstein C.J., Carlson E., Chen S.F., Imaizumi S., Yang G.Y.: Role of superoxide dismutase in ischemic brain injury: reduction of edema and infarction in transgenic mice following focal cerebral ischemia. *Prog. Brain Res.*, 1993; 96: 97–104
- [19] Chance B., Oshino N.: Kinetics and mechanisms of catalase in peroxisomes of the mitochondrial fraction. *Biochem. J.*, 1971; 122: 225–233
- [20] Correa M., Sanchis-Segura C., Pastor R., Aragon C.M.: Ethanol intake and motor sensitization: the role of brain catalase activity in mice with different genotypes. *Physiol. Behav.*, 2004; 82: 231–240
- [21] Crabb D.W., Bosron W.F., Li T.K.: Ethanol metabolism. *Pharmacol. Ther.*, 1987; 34: 59–73
- [22] Danh H.C., Benedetti M.S., Dostert P.: Differential changes in superoxide dismutase activity in brain and liver of old rats and mice. *J. Neurochem.*, 1983; 40: 1003–1007
- [23] Das N.P.: Effects of vitamin A and its analogs on nonenzymatic lipid peroxidation in rat brain mitochondria. *J. Neurochem.*, 1989; 52: 585–588
- [24] Deitrich R., Erwin V.: Biogenic amine-aldehyde condensation products: tetrahydroisoquinolines and tryptolones (B-carbolines). *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1980; 20: 55–80
- [25] Di Stasi A.M., Mallozzi C., Macchia G., Petrucci T.C., Minetti M.: Peroxynitrite induces tyrosine nitration and modulates tyrosine phosphorylation of synaptic proteins. *J. Neurochem.*, 1999; 73: 727–735
- [26] Donaldson J., LaBella F.S., Gesser D.: Enhanced autooxidation of dopamine as a possible basis of manganese neurotoxicity. *Neurotoxicology*, 1981; 2: 53–64
- [27] Dringen R.: Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog. Neurobiol.*, 2000; 62: 649–671
- [28] Eysseric H., Gonthier B., Soubeyran A., Richard M.J., Daveloose D., Barret L.: Effects of chronic ethanol exposure on acetaldehyde and free radical production by astrocytes in culture. *Alcohol*, 2000; 21: 117–125
- [29] Frank O., Luisada-Opper A., Sorrell M.F., Zetterman R., Baker H.: Effects of a single intoxicating dose of ethanol on the vitamin profile of organelles in rat liver and brain. *J. Nutr.*, 1976; 106: 606–614
- [30] Freeman M.L., Huntley S.A., Meredith M.J., Senisterra G.A., Lepock J.: Destabilization and denaturation of cellular protein by glutathione depletion. *Cell Stress Chaperones*, 1997; 2: 191–198
- [31] Galter D., Carmine A., Buervenich S., Dueter G., Olson L.: Distribution of class I, III and IV alcohol dehydrogenase mRNAs in the adult rat, mouse and human brain. *Eur. J. Biochem.*, 2003; 270: 1316–1326
- [32] Gerlach M., Ben-Shachar D., Riederer P., Youdim M.B.: Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? *J. Neurochem.*, 1994; 63: 793–807
- [33] Gilgun-Sherki Y., Melamed E., Offen D.: Oxidative stress induced neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, 2001; 40: 959–975
- [34] Grummer M.A., Langhough R.E., Zachman R.D.: Maternal ethanol ingestion effects on fetal rat brain vitamin A as a model for fetal alcohol syndrome. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 1993; 17: 592–597
- [35] Halliwell B.: Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.*, 1992; 59: 1609–1623
- [36] Halliwell B.: Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*, 2001; 18: 685–716
- [37] Halliwell B., Gutteridge J.M.: Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.*, 1990; 186: 1–85
- [38] Hansson T., Tindberg N., Ingelman-Sundberg M., Kohler C.: Regional distribution of ethanol-inducible cytochrome P450 IIE1 in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 1990; 34: 451–463
- [39] Heaton M.B., Paiva M., Mayer J., Miller R.: Ethanol-mediated generation of reactive oxygen species in developing rat cerebellum. *Neurosci. Lett.*, 2002; 334: 83–86
- [40] Ho Y.S., Magnanat J.L., Bronson R.T., Cao J., Gargano M., Sugawara M., Funk C.D.: Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 16644–16651
- [41] Hogg N., Joseph J., Kalyanaram B.: The oxidation of alpha-tocopherol and trolox by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1994; 314: 153–158
- [42] Holtzman D., Desautel M.: Microsomal cytochromes in the immature and adult rat brain. *J. Neurochem.*, 1980; 34: 1535–1537
- [43] Jaatela M.: Overexpression of major heat shock protein hsp70 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of phospholipase A2. *J. Immunol.*, 1993; 151: 4286–4294
- [44] Kato S., Kawase T., Alderman J., Inatomi N., Lieber C.S.: Role of xanthine oxidase in ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Gastroenterology*, 1990; 98: 203–210



- [45] Kerr J.T., Maxwell D.S., Crabb D.W.: Immunocytochemistry of alcohol dehydrogenase in the rat central nervous system. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 1989; 13: 730–736
- [46] Khan J.Y., Black S.M.: Developmental changes in murine brain antioxidant enzymes. *Pediatr. Res.*, 2003; 54: 77–82
- [47] Knollema S., Hom H.W., Schirmer H., Korf J., Ter Horst G.J.: Immunolocalization of glutathione reductase in the murine brain. *J. Comp. Neurol.*, 1996; 373: 157–172
- [48] Koppal T., Drake J., Yatin S., Jordan B., Varadarajan S., Bettenhausen L., Butterfield D.A.: Peroxynitrite-induced alterations in synaptosomal membrane protein: insight into oxidative stress in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, 1999; 72: 310–317
- [49] Ledig M., M'Paria J.R., Louis J.C., Fried R., Mandel P.: Effect of ethanol on superoxide dismutase activity in cultured neural cells. *Neurochem. Res.*, 1980; 5: 1155–1162
- [50] Ledig M., M'Paria J.R., Mandel P.: Superoxide dismutase activity in rat brain during acute and chronic alcohol intoxication. *Neurochem. Res.*, 1981; 6: 385–390
- [51] Ledig M., Tholey G., Megias-Megias L., Kopp P., Wedler R.: Combined effects of ethanol and manganese on cultured neurons and glia. *Neurochem. Res.*, 1991; 16: 591–596
- [52] Lieber C.S.: Hepatic and metabolic effects of ethanol: pathogenesis and prevention. *Ann. Med.*, 1994; 26: 325–330
- [53] Martínez S.E., Vaglenova J., Sabria J., Martínez M.C., Farres J., Pares X.: Distribution of alcohol dehydrogenase mRNA in the rat central nervous system. Consequence for brain ethanol and retinoid metabolism. *Eur. J. Biochem.*, 2001; 268: 5045–5056
- [54] Matthews D.B., Morrow A.L.: Effects of acute and chronic ethanol exposure on spatial cognitive processing and hippocampal function in the rat. *Hippocampus*, 2000; 10: 122–130
- [55] McDonough K.H.: Antioxidant nutrients and alcohol. *Toxicology*, 2003; 189: 89–97
- [56] McKenna O., Arnold G., Holtzman E.: Microperoxisome distribution in the central nervous system of the rat. *Brain Res.*, 1976; 117: 181–194
- [57] Nabeshima T., Fontenot J., Ho I.K.: Effects of chronic administration of pentobarbital or morphine on the brain microsomal cytochrome P-450 system. *Biochem. Pharmacol.*, 1981; 30: 1142–1145
- [58] Norton S., Kotkoskie L.A.: Basic animal research. *Recent Dev. Alcohol.*, 1991; 9: 95–115
- [59] Oldfield F.F., Cowan D.L., Sun A.Y.: The involvement of ethanol in the free radical reaction of 6-hydroxydopamine. *Neurochem. Res.*, 1991; 16: 83–87
- [60] Oury T.D., Piantadosi C.A., Crapo J.D.: Cold-induced brain edema in mice. Involvement of extracellular superoxide dismutase and nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, 1993; 268: 15394–15398
- [61] Padh H.: Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem. Cell Biol.*, 1990; 68: 1166–1173
- [62] Panchenko L.F., Pirozhkov S.V., Popova S.V., Antonenkov V.D.: Effect of chronic ethanol treatment on peroxisomal acyl-CoA oxidase activity and lipid peroxidation in rat liver and heart. *Experientia*, 1987; 43: 580–581
- [63] Podda M., Weber C., Traber M.G., Packer L.: Simultaneous determination of tissue tocopherols, tocotrienols, ubiquinol, and ubiquinones. *J. Lipid Res.*, 1996; 37: 893–901
- [64] Ponnappa B.C., Rubin E.: Modeling alcohol's effects on organs in animal models. *Alcohol Res. Health*, 2000; 24: 93–104
- [65] Porter N.A.: Chemistry of lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.*, 1984; 105: 273–282
- [66] Puntarulo S., Cederbaum A.I.: Chemiluminescence from acetaldehyde oxidation by xanthine oxidase involves generation of and interactions with hydroxyl radicals. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 1989; 13: 84–90
- [67] Qato M.K., Maines M.D.: Regulation of heme and drug metabolism activities in the brain by manganese. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1985; 128: 18–24
- [68] Reddy S.K., Husain K., Schlorff E.C., Scott R.B., Somani S.M.: Dose response of ethanol ingestion on antioxidant defense system in rat brain subcellular fractions. *Neurotoxicology*, 1999; 20: 977–987
- [69] Rice M.E., Russo-Menna I.: Differential compartmentalization of brain ascorbate and glutathione between neurons and glia. *Neuroscience*, 1998; 82: 1213–1223
- [70] Romero F.J.: Antioxidants in peripheral nerve. *Free Radic. Biol. Med.*, 1996; 20: 925–932
- [71] Rose R.C., Bode A.M.: Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. *FASEB J.*, 1993; 7: 1135–1142
- [72] Santiard D., Ribiere C., Nordmann R., Houee-Levin C.: Inactivation of Cu, Zn-superoxide dismutase by free radicals derived from ethanol metabolism: a  $\gamma$  radiolysis study. *Free Radic. Biol. Med.*, 1995; 19: 121–127
- [73] Savolainen H.: Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in rat brain. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 1978; 21: 173–176
- [74] Schreiber M., Trojan S.: Ascorbic acid in the brain. *Physiol. Res.*, 1991; 40: 413–418
- [75] Shi H., Noguchi N., Xu Y., Niki E.: Formation of phospholipid hydroperoxides and its inhibition by  $\alpha$ -tocopherol in rat brain synaptosomes induced by peroxynitrite. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999; 257: 651–656
- [76] Sochman J.: Regional ischemic and reperfusion injury. 2. Acute ethanol poisoning. *Biochem. J.*, 1994; 36: 269–279
- [77] Somani S.M., Husain K., Diaz-Phillips L., Lanzotti D.J., Kareti K.R., Trammell G.L.: Interaction of exercise and ethanol on antioxidant enzymes in brain regions of the rat. *Alcohol*, 1996; 13: 603–610
- [78] Speisky H., MacDonald A., Giles G., Orrego H., Israel Y.: Increased loss and decreased synthesis of hepatic glutathione after acute ethanol administration. *Biochem. J.*, 1985; 225: 565–572
- [79] Sun A.Y., Sun G.Y.: Ethanol and oxidative mechanisms in the brain. *J. Biomed. Sci.*, 2001; 8: 37–43
- [80] Totmar O.: Biogenetic aldehydes: metabolism, binding to brain membranes and electrophysiological effects. W: *Aldehyde Adducts in Alcoholism*. Red.: M.A. Collins. Alan R. Liss, New York 1985, 51–80
- [81] Uysal M., Kutalp G., Ozdemirler G., Aykac G.: Ethanol-induced changes in lipid peroxidation and glutathione content in rat brain. *Drug Alcohol Depend.*, 1989; 23: 227–230
- [82] Vatassery G.T.: Vitamin E. Neurochemistry and implications for Parkinson's disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992; 669: 97–109
- [83] Walther B., Ghersi-Egea J.F., Minn A., Siest G.: Subcellular distribution of cytochrome P-450 in the brain. *Brain Res.*, 1986; 375: 338–344
- [84] Ward R.J., Zhang Y., Crichton R.R., Piret B., Piette J., de Witte P.: Identification of the nuclear transcription factor NF $\kappa$ B in rat after *in vivo* ethanol administration. *FEBS Lett.*, 1996; 389: 119–122
- [85] Warner M., Gustafsson J.A.: Effect of ethanol on cytochrome P450 in the rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994; 91: 1019–1023
- [86] Xia J., Simonyi A., Sun G.Y.: Chronic ethanol and iron administration on iron content, neuronal nitric oxide synthase, and superoxide dismutase in rat cerebellum. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 1999; 23: 702–707
- [87] Zimatkin S.M., Lindros K.O.: Distribution of catalase in rat brain: aminegic neurons as possible targets for ethanol effects. *Alcohol Alcohol.*, 1996; 31: 167–174