

Korzystny wpływ selenu i magnezu na obniżenie stresu oksydacyjnego w mózгах szczurów zatrutowanych alkoholem

Beneficial effect of selenium and magnesium on reduction of oxidative stress in brain of rats intoxicated with alcohol

Iwona Markiewicz-Górka^(a-f), Marcin Zawadzki^(c, d, f), Lidia Januszczyńska^(c, d),
Iwona Pirogowicz^(f), Krystyna Pawlas^(b, f)

Katedra i Zakład Higieny, Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
Kierownik Katedry – prof. dr hab. Krystyna Pawlas

- ^(a) koncepcja,
- ^(b) opracowanie wniosku grantowego (tematu statutowego)
- ^(c) zebranie materiału do badań
- ^(d) badania laboratoryjne
- ^(e) statystyka
- ^(f) opracowanie tekstu i piśmiennictwa

Streszczenie

Celem pracy była ocena wpływu suplementacji selenem i/lub magnezem na aktywność enzymów antyoksydacyjnych i złagodzenie, indukowanego przez alkohol, stresu oksydacyjnego w mózгах szczurów. 40 szczurów, samców, szczepu Wistar podzielono na 5 grup: 1 kontrolną i 4 grupy pijące alkohol. Szczury zatrutowane alkoholem otrzymywały do picia 15% roztwór etanolu przez 4 dni w tygodniu, a przez kolejne 3 dni podawano im czystą wodę lub wodę z dodatkiem magnezu (100 mg Mg/l H₂O), selenu (0,4 mg Se/l H₂O) lub jednocześnie magnezu i selenu. Eksperyment prowadzono przez 3 miesiące. Zatrutowanie szczurów etanolem, powodowało obniżenie aktywności katalazy (o 20%) i znaczący (blisko dwukrotny) wzrost stężenia malonyldialdehydu (MDA) w mózгах w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Podawanie szczurom magnezu i/lub selenu zwiększało aktywność katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej oraz obniżało stężenie MDA w mózгах. U szczurów pijących alkohol obserwowano także wzrost aktywności peroksydazy glutationowej (GPx). Aktywności peroksydazy glutationowej i katalazy w mózгах

były najwyższe u zwierząt, którym jednocześnie podawano Mg i Se.

Wnioski: Zwiększenie podaży Se i/lub Mg w okresach abstynenckich powoduje wzrost aktywności enzymów neutralizujących wolne rodniki i obniżenie stresu oksydacyjnego w mózгах szczurów.

Słowa kluczowe: alkohol, mózg, selen, magnez, malonyldialdehyd

Summary

The aim of the study was to estimate the influence of supplementation with selenium and/or with magnesium the activities of antioxidative enzymes and alleviation of oxidative stress induced by ethanol in the rats brains. Forty male rats of Wistar strain were organized into five groups: 1 control and 4 groups which were given to drink alcohol. Rats were intoxicated with 15% solution of ethanol 4 days a week, and tap water and also water supplemented with selenium (0.4 mg Se/l), magnesium (100 mg Mg/l) or simultaneously

Nadesłano: 25.01.2012

Zatwierdzono do druku: 22.02.2012

with magnesium and selenium for the next 3 days. The experiment has been carried out for over 3 months. The intoxication of rats with ethanol decreased catalase activity (about 20%) and significantly (about twice) rose the concentration of malonyldialdehyde (MDA) in brains in comparison with the control animals. Magnesium and/or selenium administration increased catalase and superoxide dismutase activities and lowered concentration of MDA in brains. In rats drinking alcohol increase of activity of glutathione peroxidase (GPx)

was noted. The highest glutathione peroxidase and catalase activities were found in brains of rats supplemented with magnesium and selenium simultaneously.

Conclusions: Increased supply of Se and/or Mg during the periods of abstinence increases the activities of enzymes neutralizing free radicals and lessens oxidative alcohol induced stress in brains of rats.

Key words: alcohol, brain, selenium, magnesium, malonyldialdehyde.

Wstęp

Indukcja stresu oksydacyjnego jest istotnym mechanizmem patogenetycznym odpowiedzialnym za – powodowane przez alkohol – uszkodzenia i zaburzenia funkcjonowania różnych narządów [1]. Mózg jako organ o intensywnym metabolizmie tlenowym i dużej zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych jest szczególnie podatny na szkodliwe działanie oksydantów, generowanych podczas metabolizowania etanolu. Procesom tym sprzyja również duże stężenie żelaza w mózgu. Alkohol zwiększa zawartość niezwiązanych z białkami jonów tego metalu, katalizujących wytwarzanie wolnych rodników w reakcji Fentona [2]. Alkohol etylowy łatwo przechodzi przez barierę krew-mózg, gdzie jest utleniany do aldehydu octowego przez katalazę oraz w mniejszym stopniu przez dehydrogenazę alkoholową, a także metabolizowany na drodze beztlenowej z wytworzeniem estrów etylowych kwasów tłuszczowych (FAEE) [1, 2]. Zarówno aldehyd octowy jak i FAEE mogą bezpośrednio uszkadzać mitochondria, zaburzać ich funkcjonowanie i nasilać generację wolnych rodników [3, 4]. Aldehyd octowy, toksyczny metabolit alkoholu reaguje z grupami aminowymi, hydroksylowymi, i sulfydrylowymi białek, zmienia ich strukturę i powoduje inhibicję enzymów. Jest silnym generatorem wolnych rodników. Reaguje z lipidami i nasila peroksydację lipidów błon komórkowych. Sprzyja konwersji dehydrogenazy ksantynowej do oksydazy ksantynowej, co prowadzi do zwiększonej generacji anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenu wodoru. Addukty aldehydu octowego z białkami i kwasami nukleinowymi wykrywane w tkance mózgowej alkoholików, odpowiedzialne są za uszkodzenie komórek i degenerację neuronów [3]. Podczas przewlekłego nadużywania alkoholu znacząco zwiększa się rola mikrosomalnego układu utleniania etanolu (Microsomal Ethanol Oxidizing System, MEOS) z udziałem cytochromu P450 2E1 (głównie izoenzymu CYP2E1), szczególnie aktywnego w generacji wolnych rodników. Ta droga metaboliczna prowadzi do wytworzenia aldehydu octowego i rodnika 1-hydroksyetylowego [1]. Powsta-

wanie stresu oksydacyjnego w mózgu jest nie tylko związane z procesami metabolizowania etanolu i działaniem jego toksycznych metabolitów, lecz również z powodowanym przez alkohol obniżeniem obrony antyoksydacyjnej, w tym zmniejszeniem aktywności enzymów antyoksydacyjnych i stężenia zredukowanego glutationu [2, 5]. Spadek wydolności antyoksydacyjnej jest pogłębiany, przez obserwowane u alkoholików niedożywienie i deficyt substancji odżywczych (witamin, składników mineralnych) [6, 7]. Spożywanie alkoholu utrudnia wchłanianie, nasila wydalanie i zaburza metabolizm witamin i biopierwiastków, biorących udział w obronie antyoksydacyjnej tkanek, w tym również magnezu i selenu [7–9]. Selen jest biogennym, pierwiastkiem śladowym a jego niedobór wiąże się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju chorób układu krążenia, neurodegeneracyjnych i nowotworowych [10, 11]. Wchodzi w skład selenobiałek i selenoenzymów takich jak m.in. reduktaza sulfotlenku metioniny, reduktaza tioredoksyny czy peroksydaza glutationowa, biorących udział w obronie antyoksydacyjnej, utrzymaniu i przywracaniu wewnątrzkomórkowej równowagi oksydacyjno-redukcyjnej. Peroksydaza glutationowa (GPx) stanowi pierwszą linię obrony, usuwa H_2O_2 i toksyczne nadtlarki zmniejszając uszkodzenia komórek powodowane przez reaktywne formy tlenu. Selen jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania układu nerwowego [8, 10]. Obniżone stężenie tego pierwiastka i spadek aktywności enzymów selenozależnych zwiększa utratę komórek nerwowych w zwierzęcych modelach chorób neurodegeneracyjnych. Genetycznie uwarunkowany niedobór GPx zwiększa wrażliwość mózgu na niedokrwienie i neurotoksyny. Natomiast zwiększenie jej aktywności w wyniku wzrostu podaży Se lub nadekspresji genu dla GPx łagodzi uszkodzenia powodowane przez te czynniki [10]. Średnie stężenia Se w surowicy ludzi różnią się również w zależności od obszaru geograficznego i w znacznej mierze zależą od zawartości tego pierwiastka w glebie, wodzie i spożywanych produktach [12]. Europa środkowo-wschodnia, w tym Polska, nie należą do terenów szczególnie zasobnych w ten

pierwiastek. U znacznej części badanych osób z różnych regionów kraju obserwuje się relatywnie niskie stężenie Se w surowicy, na poziomie 50–55 µg/l, odpowiadające dziennemu spożyciu 30–40 µg, przy zalecanym, wynoszącym 55 µg/dobę [12]. Na przykład w populacji Górnego Śląska bardzo niskie stężenie selenu w surowicy < 40 µg/L stwierdzono u 13,5% mężczyzn i 14,2% kobiet, a stężenia z przedziału 40–60 µg/L miało aż 46,2% kobiet i 37,5% mężczyzn. Jedynie u 10,2% kobiet i 11,7% mężczyzn zawartość selenu w surowicy była optymalna (> 80 µg/L) [13]. Magnez aktywuje około 350 enzymów, jest drugim po potasie kationem wewnątrzkomórkowym, uczestniczy w metabolizmie lipidów, białek, węglowodanów i kwasów nukleinowych. Stabilizuje błony komórkowe i reguluje przez błonowy transport wapnia, sodu i potasu. Jako aktywator enzymów uczestniczących w wytwarzaniu, magazynowaniu i wykorzystaniu wysokoenergetycznych wiązań w cząsteczkach ATP (adenozynotrójfosforanu) odpowiada za gospodarkę energetyczną i wywiera pośredni wpływ na większość procesów zachodzących w organizmie. Zmniejszenie wewnątrzkomórkowego magnezu wpływa niekorzystnie na funkcjonowanie mitochondriów i produkcję energii, zmienia przepuszczalność błon komórkowych, zwiększa stężenie jonów Ca^{2+} w komórce, produkcję wolnych rodników i czynników prozapalnych [14]. W Polsce 30–60% populacji przyjmuje niewystarczającą ilość magnezu, a średnia podaż z dietą jest mniejsza o ok. 15% od zalecanej dawki [15]. Nadużywanie alkoholu i alkoholizm również zaburza metabolizm i redukuje zasoby magnezu w różnych tkankach, w tym także w mózgu. Jest to związane z niedożywieniem, utrudnionym wchłanianiem, nasileniem diurezy, a także utratą jelitowego magnezu podczas wymiotów [9]. Powodowane przez alkohol uszkodzenie mózgu i udar są poprzedzane przez szybki spadek wewnątrzkomórkowego magnezu, wzrost jonów Ca^{2+} w cytoplazmie i związane z tym zwężenie naczyń tętniczych. Podawanie magnezu moduluje przepływ jonów wapnia przez błony komórkowe, powodując rozszerzenie naczyń krwionośnych. Obniżanie stężenia jonów Mg^{2+} w błonach komórkowych mięśni gładkich naczyń krwionośnych może być istotnym mechanizmem odpowiedzialnym za uszkodzenie tkanki mózgowej. Powoduje generację reaktywnych form tlenu i wzrost stężenia wewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} . Prowadzi to do aktywacji izoenzymów kinazy białkowej C i indukcji jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, zaangażowanych w uszkodzenie komórek i tkanki mózgowej [15]. W badaniach *in vitro*, obserwowano, że wrażliwość neuronów korowych na stres oksydacyjny zwiększa się w medium pozba-

wionym magnezu. Brak magnezu destabilizuje błony komórkowe, powoduje uwalnianie zredukowanego glutationu do medium i spadek jego stężenia w komórkach, a w końcu śmierć neuronów w wyniku ich uszkodzenia oksydacyjnego [16].

Cel pracy

Wysokie spożycie alkoholu w naszym kraju przy jednoczesnej, niskiej podaży selenu i magnezu z pożywieniem uzasadnia podejmowanie badań nad wpływem tych pierwiastków na zahamowanie, indukowanych alkoholem niekorzystnych zmian w organizmie. Wpływ chronicznego i dość intensywnego spożywania alkoholu (kilka razy w tygodniu przez 3 miesiące) na procesy oksydacyjne w mózgu badaliśmy na modelu zwierzęcym. Celem pracy była ocena wpływu podawania selenu i/lub magnezem z wodą pitną w okresach abstynenckich na aktywność enzymów antyoksydacyjnych i zła-godzenie, indukowanego przez alkohol, stresu oksydacyjnego w mózgu szczurów.

Materiał i metody

Zwierzęta i protokół eksperymentu

Doświadczenie przeprowadzono na 40 szczurach, samcach szczepu Wistar. Na początku eksperymentu zwierzęta miały 6–7 tygodni i ważyły ok. 200 g. Szczury zostały podzielone na 5 grup (po 8 zwierząt w każdej): grupę kontrolną (**K**) i 4 grupy zatrutowane alkoholem. Zwierzęta zatrutowane alkoholem otrzymywały do picia 15% roztwór etanolu przez 4 dni w tygodniu, a przez kolejne 3 dni podawano im czystą wodę (**grupa Et**) lub wodę z dodatkiem magnezu (100 mg Mg/l H_2O) (**grupa Et+Mg**) lub selenu (0,4 mg Se/l H_2O) (**grupa Et+Se**) lub jednocześnie magnezu i selenu (**grupa Et+Mg+Se**). Szczury przebywały w plastikowych klatkach, w naturalnych warunkach oświetleniowych i w temperaturze pokojowej. Karmione były standardową paszą dla szczurów *ad libitum*. Eksperyment prowadzono przez 3 miesiące. Ilość wypijanych płynów i waga szczurów były systematycznie mierzone podczas eksperymentu. Po upływie tego czasu, ok. 72 h od ostatniego podania alkoholu, szczury dekapitowano przez domięśniowe podanie ketaminy i dyslokację kręgow szyjnych. Mózgi zostały pobrane, zamrożone w temp. $-80^{\circ}C$ i trzymane w takim stanie do momentu oznaczeń biochemicznych.

Eksperyment przeprowadzony został za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach we Wrocławiu, nr pozwolenia 47/2007.

Przyrost wagi ciała, ilość wypijanych płynów, oraz pobór przez szczury alkoholu, magnezu i selenu przedstawiono w naszym poprzednim doniesie-

niu z badań przeprowadzonych na tym samym modelu doświadczalnym [17]. Średnia dawka alkoholu pobierana przez zwierzęta podczas zatrucia etanolem (4 dni w tygodniu) wynosiła ok. 7,4 g/kg/m.c./dobę. Natomiast w dniach suplementacji selenem i/lub magnezem (okres abstynencji, 3 dni w tygodniu) szczury przyjmowały odpowiednio: ok. 2 g mg /kg/m. c./dobę i 19,4 g Se/kg/m.c./dobę [17].

Oznaczenia biochemiczne

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i katalazy (CAT) zmierzono spektrofotometrycznie, przy użyciu gotowych, zestawów odczynników firmy Cayman Chemical: nr kat 707002 (dla CAT) i nr kat 706002 (dla SOD). Natomiast pomiar aktywność peroksydazy glutationowej (GPx) i stężenia malonyldialdehydu wykonano przy użyciu testów firmy OxisResearch: Kit GPx-340TM (Nr kat. 21017) oraz MDA-586 (Nr kat. 21044), odpowiednio. Pomiary biochemiczne zostały wykonane ściśle według zamieszczonych instrukcji. Tkanki homogenizowano w odpowiednich buforach i odwirowywano, a do oznaczeń pobierano supernatanty. Bufory uży-

wane do homogenizacji tkanek i parametry wirowania były zgodne z zaleceniami producenta.

Stężenie białka w próbkach, oznaczone zostało za pomocą testu Protein Assay Kit Procedure No. P 5656 firmy SIGMA DIAGNOSTICS. Albumina wołowa została użyta jako standard.

Analiza statystyczna

Wyniki oznaczeń przedstawiono jako średnia (\pm SD). Analizę statystyczną wykonano za pomocą programu STATISTICA 8.0 dla Windows. Do badania istotności różnic między grupami zmiennych stosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie testy post hoc (NIR). Jeśli wariancje były niejednorodne korzystano z testu Cochran-Coxa. Istnienie korelacji między grupami zmiennych o rozkładach normalnych badano testem Pearsona.

Wyniki badań

Enzymy antyoksydacyjne

Wyniki oznaczeń enzymów antyoksydacyjnych przedstawiono w tabeli I.

Tabela I. Aktywności enzymów antyoksydacyjnych: katalazy (CAT), peroksydazy glutationowej (GPx), dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w mózgach szczurów

Table I. Activities of antioxidative enzymes: catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD) in brains of rats

Grupy szczurów (n = 8)	Katalaza (CAT) [U _{CAT} /mg białka]	Peroksydaza glutationowa (GPx) [mU _{GPx} /mg białka]	Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) [U _{SOD} /mg białka]
Kontrolna (K)	8,58 (\pm 1,65)	171,9 (\pm 35,5)	0,99 (\pm 0,32)
Et	6,61 (\pm 1,55) ^a	221,8 (\pm 50,1) ^a	1,32 (\pm 0,34)
Et + Mg	7,91 (\pm 1,39) ^c	196,2 (\pm 39,9) ^{c d}	1,64 (\pm 0,13) ^{a b}
Et + Se	8,95 (\pm 1,43) ^{b c}	234,4 (\pm 27,7) ^a	1,86 (\pm 0,30) ^{a b}
Et + Mg + Se	12,28 (\pm 2,17) ^{a b}	249,9 (\pm 30,6) ^a	1,78 (\pm 0,35) ^{a b}

Objaśnienia: Grupy szczurów: K – kontrolna, Et – intoksykowana alkoholem, Et + Mg, Et + Se, Et + Se + Mg – intoksykowane alkoholem, suplementowane magnezem lub/i selenem, odpowiednio

^{a, b, c, d} – różnice statystycznie istotne między grupami szczurów, $p < 0,05$

^a – różnica statystycznie istotna między grupą kontrolną, a grupami pojonymi alkoholem, $p < 0,05$

^b – różnica statystycznie istotna między grupą intoksykowaną alkoholem (Et), a grupami intoksykowanymi etanolem i suplementowanymi magnezem i/lub selenem, Et+Mg, Et+Se, Et+Se+Mg, $p < 0,05$

^c – różnica statystycznie istotna między grupami Et+Mg, Et+Se, a grupą Et+Se+Mg, $p < 0,05$

^d – różnica statystycznie istotna między grupę Et+Mg a grupę Et+Se, $p < 0,05$.

Explanation: Groups of rats: K – control, Et – intoxicated with alcohol, Et + Mg, Et + Se, Et + Se + Mg – intoxicated with alcohol, supplemented with magnesium or/and selenium, respectively

^{a, b, c, d} – significant differences between groups of rats, $p < 0.05$

^a – Intoxicated with alcohol groups: Et, Et+Mg, Et+Se, Et+Se+Mg significantly different from control group C, $p < 0.05$

^b – Groups supplemented with Mg and/or Se (Et + Mg, Et + Se, Et + Se + Mg) significantly different from group intoxicated with alcohol alone Et, $p < 0.05$

^c – Et + Mg, Et + Se groups significantly different from group Et+Se+Mg, $p < 0.05$

^d – Et + Mg significantly different from Et + Se, $p < 0.05$.

Peroksydaza glutationowa (GPx)

Peroksydaza glutationowa wzrastała w grupach pojonych alkoholem (Et, Et + Mg, Et + Se, Et + Se + Mg), odpowiednio o 29%, 14%, 36% i 45% w porównaniu do grupy kontrolnej. Jedynie w grupie Et + Mg wzrost ten nie był statystycznie znaczący. Aktywność tego enzymu była niższa w grupie suplementowanej tylko magnezem (Et + Mg) niż w grupach Et + Se i Et + Se + Mg, $p < 0,05$.

Katalaza (CAT)

Alkohol obniżał aktywność katalazy (o 20%). Podawanie Se i/lub Mg (grupy: Et + Mg, Et + Se, Et + Se + Mg), zwiększało aktywność tego enzymu odpowiednio o 20%, 35% i 86% w porównaniu do grupy Et. W przypadku grupy Et + Mg wzrost ten jednak nie był statystycznie istotny. Najwyższy wzrost aktywności katalazy odnotowano w grupie suplementowanej jednocześnie Se i Mg (Et + Se + Mg). Aktywność CAT w tej grupie była wyższa o 43% w porównaniu do grupy K, o 55% niż w grupie Et + Mg i o 37% niż w grupie Et + Se.

Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD)

U szczurów suplementowanych Se i Mg, grupy: Et + Mg, Et + Se i Et + Mg + Se obserwowano istotny statystycznie wzrost aktywności dysmutazy ponad-

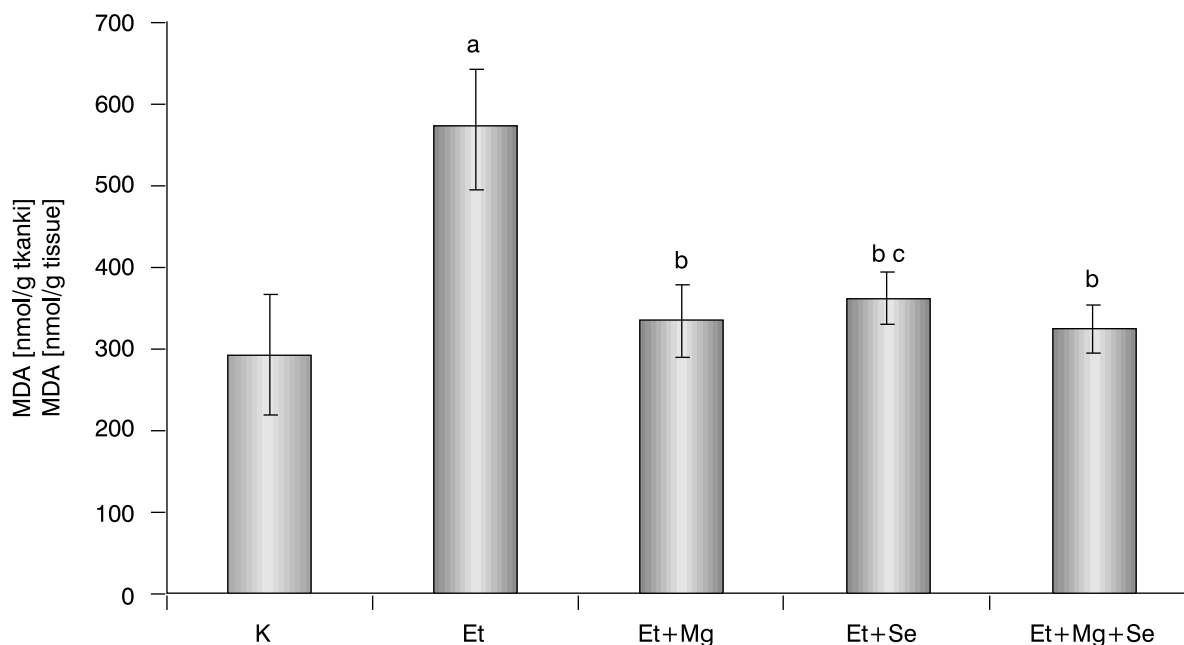
tlenkowej (SOD), odpowiednio o 66%, 88% i 80% w porównaniu do grupy K oraz o 24%, 41% i 35% w porównaniu do grupy zatrwanej etanolem, niesuplementowanej (Et), $p < 0,05$.

Stężenie malonyldialdehydu (MDA)

Wyniki pomiarów malonyldialdehydu w mózgach szczurów przedstawiono na rycinie 1. Zatrucie etanolem (grupa Et), powodowała znaczący wzrost stężenia MDA w mózgach szczurów, w porównaniu do grupy kontrolnej (K). Zwiększenie podaży selenu i magnezu w okresach abstynenckich (grupy: Et + Mg, Et + Se, Et + Mg + Se) obniżało poziom produktów peroksydacji lipidów odpowiednio o 41%, 37% i 43% w porównaniu do grupy pijącej alkohol, niesuplementowanej (Et + Se), $p < 0,05$. Stężenie MDA w grupie otrzymującej jednocześnie selen i magnez (Et + Mg + Se) było niższe o 10% niż u suplementowanej tylko selenem (Et + Se), $p < 0,05$.

Analiza korelacji

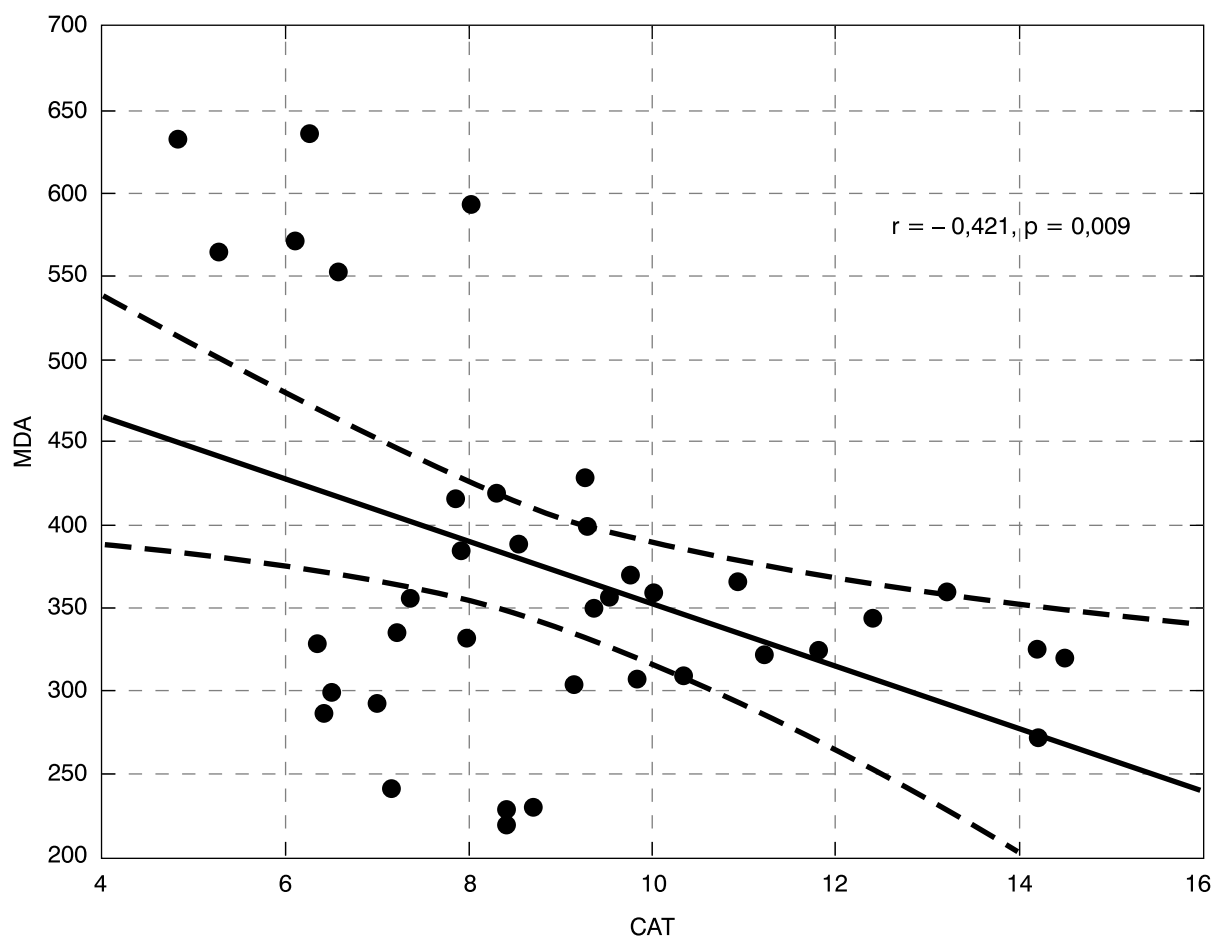
Analiza korelacji wykazała silną zależność między wzrostem aktywności katalazy a spadkiem stężenia produktów peroksydacji lipidów (malonyldialdehydu) w mózgach szczurów ($r = -0,421$, $p = 0,009$) – rycina 2.



Objaśnienia: patrz pod tabelą 1
Explanation: see under table 1

Rycina 1. Wpływ intoksykacji alkoholem, suplementacji magnezem i/lub selenem na stężenie malonyldialdehydu (MDA) w mózgach szczurów

Figure 1. Influence of alcohol intoxication, and with magnesium and/or selenium supplementation on concentration of malonyldialdehyde (MDA) in brains of rats



r – współczynnik korelacji, p – poziom istotności
 r – coefficients of correlation, p – level of significant

Rycina 2. Korelacja między stężeniem malonyldialdehydu (MDA) i aktywnością katalazy (CAT) w móz-
 gach szczurów

Figure 2. Correlation between concentration of malonyldialdehyde (MDA) level and catalase (CAT)
 activity in the rats brains

Dyskusja

Udział reakcji wolnorodnikowych i stresu oksydacyjnego w poalkoholowym uszkodzeniu organów, w tym mózgu jest dobrze udokumentowany w literaturze [1–3, 5, 16]. Mechanizm uszkodzenia mózgu przez alkohol jest złożony i wielokierunkowy. Stres oksydacyjny jest prawdopodobnie początkowym i zasadniczym etapem rozwoju zmian patologicznych w mózgu, a wzrost jego poziomu jest obserwowany jeszcze przed wystąpieniem znaczących zmian histopatologicznych i fizjologicznych w tym organie [5]. Wyniki naszych badań wskazują, że długotrwałe spożywanie alkoholu (przez trzy miesiące, kilka razy w tygodniu, w dawce wynoszącej ok. 7,4 g etanolu/kg masy ciała/24h), zaburza równowagę oksydacyjno-redukcyjną i nasila peroksydację lipidów w mózgu szczurów. Jest to zgod-

ne z doniesieniami innych autorów, którzy również stwierdzali zwiększenie stężenia produktów peroksydacji lipidów w mózgu podczas chronicznego zatrucia etanolem [18, 19]. Zaobserwowaliśmy, że poziom stresu oksydacyjnego, monitorowany jako wzrost stężenia MDA korelował ze spadkiem aktywności katalazy ($r = -0,421$, $p = 0,009$), a podwyższone stężenie malonyldialdehydu, utrzymywało się jeszcze po dwóch dniach abstynencji. Istotne znaczenie katalazy w ochronie przed powodowanymi przez alkohol uszkodzeniami wykazali Li i wsp. [20]. Badania przeprowadzili na hodowlach komórkowych mięśni gładkich naczyń mózgowych. Obecność katalazy w medium zapobiegała, w sposób zależny od aktywności enzymu wzrostowi stężenia jonów Ca^{2+} w komórkach. Wzrost tych jonów zwiększa kurczliwość komórek mięśni gładkich, co może prowadzić do ich uszkodzenia. Według tych

autorów generacja nadtlenu wodoru jest najwcześniejszym etapem, indukowanego przez alkohol uszkodzenia naczyń mózgowych, pociągającego za sobą zmiany neurobehawioralne i zwiększone ryzyko udaru mózgu. Zatem neutralizacja H_2O_2 przez katalazę może odgrywać znaczącą rolę w hamowaniu rozwoju zmian chorobowych w mózgu. Utrzymywanie się zwiększonego stężenia produktów peroksydacji lipidów w czasie abstynencji występuje również w płynach ustrojowych alkoholików, poddawanych detoksykacji [21–23]. Huang i wsp. [21] obserwował obniżanie się aktywności katalazy w surowicy podczas tygodnia abstynencji i odwrotną korelację między aktywnością tego enzymu, a wskaźnikami stresu oksydacyjnego. W naszym doświadczeniu u szczurów spożywających alkohol wystąpił spadek aktywności katalazy, jednak zaobserwowaliśmy wzrost aktywności GPX oraz niewielki, statystycznie nieistotny wzrost aktywności SOD. Adaptacyjne mechanizmy obronne mające na celu zmniejszenie stresu oksydacyjnego podczas zatrucia alkoholem okazały się jednak niewydolne. Indukowane przez alkohol procesy oksydacyjne nie zostały skutecznie zahamowane, zwiększając ryzyko uszkodzenia tkanki mózgowej. Z badań Tsai i wsp. [22] wynika, że podwyższone stężenie produktów peroksydacji lipidów i obniżona aktywność SOD w płynie mózgoworzdzeniowym alkoholików może się utrzymywać po tygodniu, a nawet po miesiącu abstynencji. Spadek aktywności enzymów antyoksydacyjnych obserwowany u alkoholików, zwiększa wrażliwość neuronów na uszkodzenia oksydacyjne. Również Chen i wsp. [23] obserwowali utrzymywanie się wyższego poziomu wskaźników peroksydacji lipidów (MDA) i DNA (8-hydroksy-2 -deoksyguanozyny, 8-OHdG) w surowicy alkoholików w czasie detoksykacji. Po tygodniu abstynencji stężenie MDA zaczynało spadać, jednak wskaźniki uszkodzenia oksydacyjnego DNA utrzymywały się nadal na wysokim poziomie, korelując dodatnio z nasileniem zespołu abstynencyjnego (mierzonego w skali Clinical Institute Withdrawal Assessment for Alcohol). MDA jest jednym z końcowych produktów peroksydacji lipidów i często jest używany jako wskaźnik ich generacji i stężenia w tkankach. Zarówno MDA jak i inne produkty peroksydacji lipidów takie jak m. in.: 4-hydroksynonenal (4-HNE), 4-okso-2-nonenal (ONE), akroleina są bardzo reaktywnymi związkami, które charakteryzują się znacznie dłuższym czasem półtrwania niż wolne rodniki oraz zdolnością do dyfuzji do obszarów odległych od miejsc ich powstawania. Tworzą wiązania kowalencyjne z białkami, enzymami, kwasami nukleinowymi zmieniając ich strukturę i funkcjonowanie. Zaburzają funkcjonowanie mitochondriów i oddychania

komórkowego, co powoduje generację nowych rodników tlenowych, zapoczątkowujących kolejne, łańcuchowe reakcje oksydacyjne. Powodują zahamowanie aktywności enzymów i zmiany w strukturze błon komórkowych, zwiększenie ich przepuszczalności, depolaryzację, zaburzenie funkcjonowania kanałów i transporterów błonowych, prowadząc do zniszczenia komórki [24]. Znacząca rola produktów peroksydacji lipidów w uszkodzeniu neuronów i chorobach neurodegeneracyjnych jest obecnie coraz lepiej rozumiana i uznawana przez badaczy [25]. Stymulacja obrony antyoksydacyjnej przez regularne ćwiczenia fizyczne [26], lub podawanie antyoksydantów [18, 19] łagodzi, indukowany alkoholem stres oksydacyjny i zmniejsza ryzyko uszkodzenia tkanki mózgowej. Wyniki naszych badań sugerują, że oksydacyjne uszkodzenia mogą być także zredukowane przez zwiększoną podaż pierwiastków biogennych, o właściwościach antyoksydacyjnych. Podawanie szczurom selenu i magnezu w okresach abstynencji zwiększało potencjał antyoksydacyjny i zmniejszało, powodowany przez alkohol wzrost poziomu MDA w mózgu. Podawanie selenu z wodą pitną (w stężeniu 0,4 mg Se/L) w okresach abstynencyjnych powodowało wzrost aktywności enzymów neutralizujących wolne rodniki: SOD, GPX i CAT i obniżało stężenie malonyldialdehydu. Korzystny wpływ suplementacji selenem nawet przy niższych stężeniach (0,15 mg SeO₂/L wody) na obronę antyoksydacyjną i obniżenie peroksydacji lipidów w mózgu szczurów wykazali również Adebayo i wsp. [27]. Długotrwałe karmienie szczurów dietą niskobiałkową powodowało znaczące nasilenie peroksydacji lipidów w tym organie, spadek stężenia białka całkowitego i zredukowanego glutationu, aktywności katalazy oraz obniżenie wagi mózgu. Zaburzenia te są podobne do zmian powodowanych przez alkohol. U szczurów, którym przez ostatnie 3 tygodnie eksperymentu podawano selen z wodą pitną aktywność katalazy, stężenie białka i waga mózgu były znacznie wyższe, a wskaźniki stresu oksydacyjnego niższe niż u zwierząt karmionych dietą niskobiałkową, nie otrzymujących selenu. Magnez podobnie jak selen redukuje poziom stresu oksydacyjnego w mózgu, jednak tylko w niewielkim stopniu zwiększał aktywność dysmutazy ponadtlenukowej i nie powodował istotnego wzrostu aktywności peroksydazy glutationowej i katalazy. Neuroprotektoryjne działanie magnezu związane jest głównie z jego antagonizującym wpływem na jony Ca^{+2} w neuronach i komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Nadmierny napływ tych jonów do komórek powoduje ich uszkodzenie. Alkohol zwiększa kurczliwość mięśni gładkich naczyń krwionośnych, co prowadzi do uszkodzenia drobnych tętniczek

i wystąpienia ognisk mikrokrwawień w tkance mózgowej. Mechanizmy, dzięki którym magnez wykazuje działanie rozkurczające naczynia związane są z jego regulacyjnym działaniem na stężenie wewnątrzkomórkowych jonów wapnia w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Powodowane przez etanol uszkodzenie mózgu jest w części związane z jego oddziaływaniem na receptory NMDA (N-metylo-D-asparaginianu). Protekcyjne i antyskurczowe działanie jonów Mg^{2+} wynika również z blokowania receptorów NMDA w neuronach i naczyniach krwionośnych [28]. Ochronny wpływ magnezu przed indukowanym przez hemoglobinę stresem oksydacyjnym obserwowano w hodowlach komórek kory mózgowej. Wrażliwość neuronów na zależne od jonów żelaza uszkodzenie oksydacyjne wykazywała odwrotną zależność od stężenia magnezu w medium. W wysokich stężeniach, magnez bezpośrednio hamował peroksydację lipidów, co mogło wynikać z współzawodniczenia z jonami żelaza o wiązanie z fosfolipidami błonowymi. Przy niskich stężeniach magnezu obserwowano zwiększenie aktywności receptora NMDA, nasilenie peroksydacji lipidów, spadek stężenia glutationu zredukowanego i znaczne zwiększenie obumierania neuronów [29]. Antyoksydacyjne działanie magnezu wydaje się być bardziej związane z bezpośrednim hamowaniem, indukowanej przez różne czynniki m.in. alkohol generacji oksydantów niż aktywacji obronny antyoksydacyjnej. Taki wpływ może wynikać z konkurencji Mg^{2+} z jonami żelaza i ograniczenie ich oddziaływania na komórki, stabilizacji błon komórkowych oraz warunkowania przez magnez prawidłowego funkcjonowania mitochondriów. Niektórzy autorzy obserwowali jednak występowanie związku między stężeniem magnezu w diecie, a aktywnością enzymów antyoksydacyjnych. Badania Liu i wsp. [30] wykazały, że suplementacja kurczą magnezem powoduje liniowy, zależny od dawki wzrost aktywności katalazy w wątrobie oraz zwiększenie ekspresji m-RNA dla tego enzymu. Natomiast Marin i wsp. [31] zauważyli wzrost aktywności peroksydazy glutationowej w wątrobie szczurów suplementowanych magnezem w porównaniu do zwierząt otrzymujących dietę deficytową w magnez. W naszym eksperymencie podawanie magnezu razem z selenem silniej stymulowało aktywność SOD, CAT i GPX, zatem w większym stopniu zwiększało ochronę tkanki mózgowej przez łańcuchowymi procesami oksydacyjnymi niż podawanie samego selenu.

Wnioski

Wyniki naszych badań wskazują, że podawanie Se i/lub Mg w okresach abstynenckich, zwiększa potencjał antyoksydacyjny i łagodzi, indukowany

przez alkohol stres oksydacyjny w mózgach szczurów.

Badanie finansowane ze środków przeznaczonych na badania statutowe Katedry i Zakładu Higieny Akademii Medycznej we Wrocławiu. Nr grantu ST-31.

Wykaz piśmiennictwa

1. Defeng W., Cederbaum A. I.: Alcohol, oxidative stress, and free radical damage; *Alcohol Health Re World* 2003; 27; 4: 277-284.
2. Augustyniak A., Michalak K., Skrzydlewska E. Wpływ stresu oksydacyjnego indukowanego etanolem na ośrodkowy układ nerwowy (OUN). *Postepy Hig Med Dośw.* 2005; 59: 464-471.
3. Nakamura K., Iwahashi K., Furukawa A. i wsp.: Acetaldehyde adducts in the brain of alcoholics. *Arch Toxicol* 2003; 77: 591-593.
4. Czech E., Hartleb M. Non-oxidative metabolism of ethanol and its influence on the metabolic pathway of serotonin and transferrin. *Probl Forensic Sci* 2002; 52: 37-51.
5. Das S. K., Hiran K. R., Mukherjee S.: Oxidative stress is the primary event: effects of ethanol consumption in brain. *Indian J Clin Biochem* 2007; 22, 1: 99-104.
6. Addolorato G., Capristo E., Greco A. V.: Influence of chronic alcohol abuse on body weight and energy metabolism: is excess ethanol consumption a risk factor for obesity or malnutrition? *J Intern Med* 1998; 244, 5: 387-395.
7. Gueguen S. et al.: Changes in serum retinol, α -tocopherol, vitamin C, carotenoids, zinc and selenium after micronutrient supplementation during alcohol rehabilitation. *J Am Coll Nutr* 2003; 22, 4, s. 303-310.
8. Sher L.: Role of selenium depletion in the etiopathogenesis of depression in patient with alcoholism. *Med. Hypotheses* 2002; 59, 3: 330-333.
9. Romani A. M. P. Magnesium homeostasis and alcohol consumption. *Magnes Res* 2008; 21,4: 197-204.
10. Schweizer U., Bräuer A. U., Köhrle J. i wsp.: Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. *Brain Res Brain Res Rev* 2004; 45,3: 164-78.
11. Navarro-Alarcon M., Lopez-Martinez M. C.: Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *Sci Total Environ* 2000; 249: 347-371.
12. Wasowicz W., Gromadzinska J., Rydzynski K. i wsp.: Selenium status of low-selenium area residents: Polish experience. *Toxicol Lett* 2003; 137: 95-101.
13. Kłapcińska B., Poprzęcki S., Danch A.: Blood Selenium Concentration of Residents of Upper Silesia: Relation to Age and Gender. *Polish J of Environ Stud.* 2006; 15, 5: 753-758.
14. Laires M. J., Monteiro C. P., Bicho M.: Role of cellular magnesium in health and human disease. *Front Biosci* 2004; 9, 1: 262-276.
15. Pacewicz T., Moniuszko-Jakoniuk J., Brzóska M. M.: The Influence of Ethanol on Magnesium Body Status. *Polish J of Environ Stud* 2008; 17, 4: 447-456.
16. Regan R. F., Guo Y.: Magnesium deprivation decreases cellular reduced glutathione and causes oxidative neuronal death in murine cortical cultures. *Brain Res* 2001; 890: 177-183.
17. Markiewicz-Górka I., Zawadzki M., Januszewska L., Hombek-Urbaniak K., Pawlas K. Influence of selenium and/or magnesium on alleviation alcohol induced oxidative stress in rats, normalization function of liver and changes in serum lipid parameters. *Hum Exp Toxicol* 2011; 30, 11: 1811-1827.

18. Turkcu U. O., Bilgihan A., Biberoglu G. i wsp.: Carnosine supplementation protects rat brain tissue against ethanol-induced oxidative stress. *Mol Cell Biochem* 2010; 339: 55-61.
19. Rumpa T. J., Muneera P. M. A., Szlachetka A. M.: Acetyl-L-carnitine protects neuronal function from alcohol induced oxidative damage in the brain. *Free Radic Biol Med* 2010; 49,10: 1494-1504.
20. Li W., Liu W., Altura B. T., Altura B. M.: Catalase prevents elevation of [Ca²⁺] i induced by alcohol in cultured canine cerebral vascular smooth muscle cells: Possible relationship to alcohol-induced stroke and brain pathology. *Brain Res Bull* 2003; 59, 4: 315-318.
21. Huang M. C., Chen C. H., Peng F. C., Tang S. H., Chen C. C.: Alterations in Oxidative Stress Status During Early Alcohol Withdrawal in Alcoholic Patients. *J Formos Med Assoc* 2009; 108, 7, 560-569.
22. Tsai G. E., Ragan P., Chang R. et al.: Increased Glutamatergic Neurotransmission and Oxidative Stress After Alcohol Withdrawal. *Am J Psychiatry* 1998; 155: 726-732.
23. Chen C. H., Pan C. H., Chen C. C. i wsp.: Increased Oxidative DNA Damage in Patients With Alcohol Dependence and Its Correlation With Alcohol Withdrawal Severity. *Alcohol Clin Exp Res* 2011; 35, 2: 338-344.
24. Czczot H., Ścibior-Bentkowska D., Skrzycki M., Podsiad M.: Ocena poziomu peroksydacji lipidów w surowicy chorych z nowotworami przewodu pokarmowego. *Wiad Lek* 2010, LXIII, 3; 180-187.
25. Sayre L. M., Perry G., Smit M. A.: Oxidative Stress and Neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* 2008; 21: 172-188.
26. Somani S. M. and Husain K.: Interaction of Exercise Training and Chronic Ethanol Ingestion on Antioxidant System of Rat Brain Regions. *J Appl Toxicol* 1997; 17, 5: 329-336.
27. Adebayo O. L., Adenuga G. A.: Protective Effect of Selenium on Protein-Undernutrition-Induced Brain Damage in Rats. *Biol Trace Elem Res* 2007; 116: 227-234.
28. Ema M., Gebrewold A., Altura B. T. i wsp.: Alcohol-Induced Vascular Damage of Brain Is Ameliorated by Administration of Magnesium. *Alcohol* 1998; 15, 2: 95-103.
29. Regan R. F., Jasper E., Guo Y. and Panter S. S.: The Effect of Magnesium on Oxidative Neuronal Injury In Vitro. *J Neurochem* 1998; 70: 77-85.
30. Liu Y., Guo Y., Wang Z. and Nie W.: Effects of source and level of magnesium on catalase activity and its gene expression in livers of broiler chickens. *Arch Anim Nutr* 2007; 61,4: 292-300.
31. Martin H., Uring-Lambert B., Adrian M. i wsp.: Effects of long-term dietary intake of magnesium on oxidative stress, apoptosis and ageing in rat liver. *Magnes Res* 2008; 21, 2: 124-130.

Adres do korespondencji
dr Iwona Markiewicz-Górka
Katedra i Zakład Higieny
Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
ul. J. Mikulicza-Radeckiego 7
50-368 Wrocław
tel. +48 71 7841505, fax +48 71 7841503
e-mail: iwona.markiewicz-gorka@am.wroc.pl