

UNIwersytet PEDAGOGICZNY
IM. KOMISJI EDUKACJI NARODOWEJ W KRAKOWIE
WYDZIAŁ GEOGRAFICZNO-BIOLOGICZNY



mgr Martyna Magdalena Błaszczyk

**Interakcja pomiędzy tauryną i etanolem jako czynnik wpływający
na parametry fizjologiczne myszy laboratoryjnej Swiss**

**Praca doktorska wykonana
w Zakładzie Zoologii Kręgowców
i Biologii Człowieka Instytutu Biologii
Uniwersytetu Pedagogicznego**

Promotor:

dr hab. Robert Stawarz, prof. nadzw. UP

Promotor pomocniczy:

dr Łukasz J. Binkowski

Kraków 2018

Panu dr hab. Robertowi Stawarzowi, prof. nadzw. UP
pragnę serdecznie podziękować za opiekę naukową,
życzliwość oraz wszechstronną pomoc
w rozwiązywaniu problemów.

Panu dr Łukaszowi Binkowskiemu
bardzo dziękuję za pomoc w realizacji niniejszej pracy,
konstruktywną dyskusję nad wynikami badań,
a przede wszystkim wkład w mój rozwój intelektualny.

Pracownikom Zakładu Zoologii Kręgowców i Biologii Człowieka
oraz Zakładu Fizjologii Zwierząt i Toksykologii
bardzo dziękuję za okazaną życzliwość oraz
pomoc w trakcie wykonywania badań.

SPIS TREŚCI

I.	INDEKS SKRÓTÓW NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH W PRACY	5
II.	WSTĘP.....	7
1.	Tauryna	7
1.1.	Synteza tauryny	8
1.2.	Źródła tauryny	9
1.3.	Funkcje tauryny	10
2.	Alkohol etylowy	13
2.1.	Metabolizm alkoholu.....	13
2.2.	Szkody somatyczne wywołane działaniem alkoholu	15
3.	Metabolizm tlenowy jako źródło reaktywnych form tlenu (RFT).....	19
3.1.	Stres oksydacyjny oraz jego konsekwencje	20
3.2.	Dialdehyd malonowy jako biomarker stresu oksydacyjnego	20
3.3.	Charakterystyka układu antyoksydacyjnego organizmu	21
4.	Jony metali w organizmach żywych	23
5.	Użyteczność badań hematologicznych dla oceny stanu zdrowia organizmów żywych	23
III.	CEL BADAŃ	24
IV.	MATERIAŁ I METODY	25
1.	Zwierzęta eksperymentalne, warunki hodowli oraz dawki	25
2.	Morfologia krwi	26
3.	Biochemia krwi.....	26
3.1.	Oznaczanie poziomu cholesterolu HDL.....	26
3.2.	Oznaczanie poziomu cholesterolu LDL	27
3.3.	Oznaczanie aktywności fosfatazy zasadowej (ALP).....	28
3.4.	Oznaczanie aktywności aminotransferazy alaninowej (ALT).....	29
3.5.	Oznaczanie aktywności aminotransferazy asparaginowej (AST)	30
4.	Enzymy antyoksydacyjne	31
4.1.	Odczynniki chemiczne użyte do oznaczenia aktywności enzymów antyoksydacyjnych	31
4.2.	Przygotowanie supernatantów	31
4.3.	Oznaczanie aktywności SOD według metody Rice-Evans (1991) w supernatantach mózgu oraz jąder	32
4.4.	Oznaczanie aktywności GPx według zmodyfikowanej metody Lück (1962) w supernatantach mózgu oraz jąder	32

4.5.	Oznaczanie aktywności CAT według metody Aebi (1962) w supernatantach mózgu oraz jąder	33
5.	Zredukowany glutation (GSH)	34
5.1.	Odczynniki chemiczne użyte do oznaczenia stężenia GSH	34
5.2.	Przygotowanie supernatantów	34
5.3.	Oznaczanie poziomu GSH kolorymetryczną metodą Ellmana (1959) w supernatantach mózgu	34
5.4.	Oznaczanie zawartości białka całkowitego	35
6.	Dialdehyd malonowy (MDA)	35
6.1.	Odczynniki chemiczne użyte do oznaczenia stężenia dialdehydu malonowego....	35
6.2.	Przygotowanie supernatantów	36
6.3.	Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej	36
6.4.	Oznaczanie stężenia dialdehydu malonowego (MDA) metodą TBARS (według Okhawy, 1979; zmodyfikowaną) w supernatantach z jąder	36
7.	Analiza zmian histopatologicznych w wybranych narządach	36
8.	Oznaczanie stężenia mikro- i makroelementów w wybranych narządach	37
9.	Analiza statystyczna	38
V.	WYNIKI	39
1.	Parametry morfologiczne krwi	39
2.	Parametry biochemiczne krwi	41
3.	Aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz poziom MDA w jądrach	45
4.	Aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz poziom GSH w mózgu	47
5.	Ocena histologiczna jąder	50
6.	Ocena histologiczna nerek	50
7.	Stężenie mikro- i makroelementów w nerkach.....	52
8.	Stężenie mikro- i makroelementów w wątrobie	55
VI.	DYSKUSJA	58
VII.	WNIOSKI	70
VIII.	STRESZCZENIE	71
IX.	SUMMARY	72
X.	LITERATURA.....	73
XI.	SPIS TABEL.....	89
XII.	SPIS RYCIN	89

I. INDEKS SKRÓTÓW NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH W PRACY

ACAT	acylotransferaza acylo-CoA: cholesterol (ang. Acyl-CoA: cholesterol acyl transferase)
ADH	dehydrogenaza alkoholowa (ang. alcohol dehydrogenase)
ALD	alkoholowa choroba wątroby (ang. alcoholic liver disease)
ALDH	dehydrogenaza aldehydowa (ang. aldehyde dehydrogenase)
ALP	fosfataza zasadowa (ang. alkaline phosphatase)
ALT	aminotransferaza alaninowa (ang. alanine aminotransferase)
AMP	2-amino-2-metylo-1-propanol (ang. 2-amino-2-methyl-1-propanol)
apoA-I	apolipoproteina A-I (ang. apolipoprotein A-I)
apoA-II	apolipoproteina A-II (ang. apolipoprotein A-II)
apoB-100	apolipoproteina B-100 (ang. apolipoprotein B-100)
AST	aminotransferaza asparaginowa (ang. aspartate aminotransferase)
barwienie HE	barwienie hematoksyliną i eozyną
CAT	katalaza (ang. catalase)
CDO	dioksygenaza cysteinowa (ang. cysteine deoxygenase)
CSD	dekarboksylaza kwasu L-cysteiniosulfonowego (ang. cysteine sulfinate decarboxylase)
CuZnSOD	dysmutaza ponadtlenkowa cytoplazmatyczna zawierająca miedź i cynk (ang. CuZn-superoxide dismutase)
CYP2E1	oksydaza cytochromowa P450IIE1 (ang. cytochrome P450 2E1)
CYP7A1	7 α -hydroksylaza cholesterolowa (ang. cholesterol 7 alpha-hydroxylase)
DSBmT	N,N-bis(4-sulfobutylo)-m-toluidyna (ang. N,N-bis(4-sulphobutyl)-m-disodium)
FSH	hormon folikulotropowy (ang. follicle-stimulating hormone)
GABA	kwas γ -aminomasłowy (ang. gamma aminobutyric acid)
GPx	peroksydaza glutationowa (ang. glutathione peroxidase)
GSH	zredukowany glutation (ang. reduced glutathione)
HDL	lipoproteina o wysokiej gęstości (ang. high-density lipoprotein)
Hb	hemoglobina (ang. hemoglobin)
HSC	komórki gwiazdziste wątroby (ang. hematopoietic stem cells)
IL-6	interleukina 6 (ang. interleukin-6)
LDH	dehydrogenaza mleczanowa (ang. lactate dehydrogenase)

- LDL** lipoproteina o niskiej gęstości (ang. low-density lipoprotein)
- LH** hormon lutropowy (ang. luteinizing hormone)
- MCV** średnia objętość czerwonej krwinki (ang. mean corpuscular volume)
- MDA** dialdehyd malonowy (ang. malonedialdehyde)
- MDH** dehydrogenaza jabłczanowa (ang. malate dehydrogenase)
- MEOS** mikrosomalny system utleniający alkohol (ang. microsomal ethanol oxidizing system)
- MnSOD** dysmutaza ponadtlenkowa mitochondrialna zawierająca mangan (Mn-superoxide dismutase)
- O₂^{·-}** anionorodnik ponadtlenkowy (ang. superoxide anion)
- OH[·]** rodnik hydroksylowy (ang. hydroxyl radical)
- PLT** płytki krwi (ang. platelets)
- RBC** czerwone krwinki (ang. red blood cells)
- RFT** reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species)
- SDS** siarczan dodecyl sodu (ang. sodium dodecyl sulfate)
- SOD** dysmutaza ponadtlenkowa (ang. superoxide dismutase)
- TBA** kwas tiobarbiturowy (ang. thiobarbituric acid)
- TNF- α** czynnik martwicy nowotworu α (ang. tumor necrosis factor α)
- TNF- β** czynnik martwicy nowotworu β (ang. tumor necrosis factor β)
- VLDL** lipoproteina o bardzo niskiej gęstości (ang. very low density lipoprotein)
- WBC** białe krwinki (ang. white blood cells)

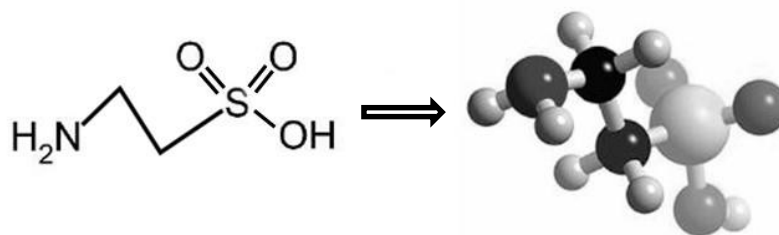
II. WSTĘP

Tauryna stanowi obiekt intensywnych badań, których wyniki pozwalają na odkrywanie zarówno nowych funkcji fizjologicznych aminokwasu, jak i jego zastosowanie w leczeniu wielu schorzeń (Szymański i Winiarska, 2008). Jest również jednym ze składników napojów energetyzujących, których spożycie w ciągu ostatnich kilkunastu lat znacząco wzrosło (Hashem i inni, 2017). Rosnącą popularnością - głównie wśród młodych ludzi - cieszy się także łączenie napojów energetyzujących z alkoholem, co uważane jest za szczególnie ryzykowne ze względu na brak danych dotyczących skutków ich spożywania (Chang i inni, 2017).

1. Tauryna

Tauryna (kwas 2-aminoetylosulfonowy) jest endogennym aminokwasem siarkowym, powszechnie występującym w tkankach zwierzęcych (Sinha i inni, 2008). Po raz pierwszy została wyizolowana w XIX wieku z żółci byka (*Bos taurus*), którego łacińskiej nazwie gatunkowej aminokwas zawdzięcza swoją nazwa. Znaczenie tauryny jako istotnego składnika odżywczego odkryli Japończycy, którzy od roku 1949 rozpoczęli sprzedaż jej ekstraktu (Stapleton, 1997). W latach 70 XX wieku zaobserwowano, że dieta uboga w ten aminokwas skutkuje degeneracją siatkówki, co spowodowało znaczący wzrost zainteresowania tauryną. (Szymański i Winiarska, 2008).

Od typowego aminokwasu taurynę odróżnia to, że w miejscu grupy karboksylowej (-COOH) posiada grupę sulfonową (-SO₃H), nie tworzy więc wiązań peptydowych z innymi aminokwasami, w konsekwencji czego w organizmie występuje głównie w postaci wolnej (Ryc. 1; Kulasek i inni, 2004).



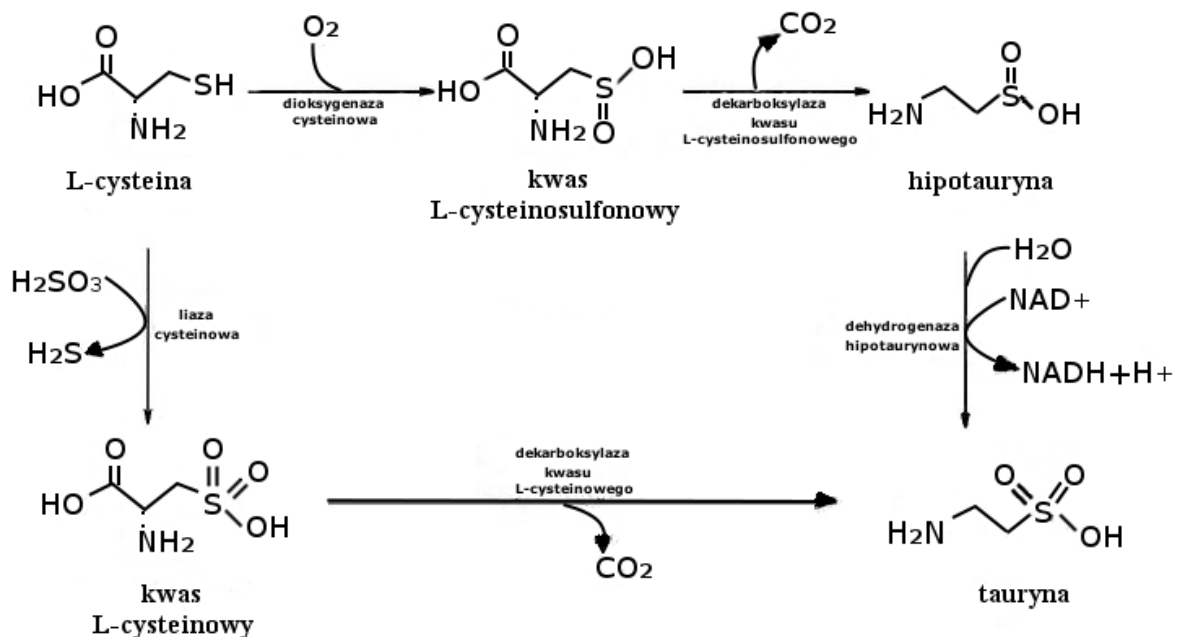
Rycina 1. Wzór strukturalny i przestrzenny tauryny (Szymański i Winiarska, 2008; zmienione).

Obecność grupy sulfonowej w miejscu karboksylowej zwiększa kwasowość tauryny - czyniąc ją związkami prawie całkowicie dipolarnym - w ten sposób zwiększa się rozpuszczalność tauryny w wodzie, przy jednoczesnym obniżeniu lipofilności. Skutkiem takiej budowy chemicznej jest spowolnienie transportu tauryny przez błony biologiczne

w porównaniu z aminokwasami posiadającymi grupę karboksylową (Huxtable, 1992). Z kolei grupa aminowa tauryny jest silnie zaangażowana w reakcje koniugacji, które odgrywają kluczową rolę w usuwaniu substancji toksycznych z organizmu. Związane są one także z metabolizmem tłuszczów oraz wpływają na aktywność warstwy fosfolipidowej (Schaffer i inni, 2010).

1.1. Synteza tauryny

Stężenie tauryny w organizmie jest wypadkową jej syntezy endogennej i suplementacji egzogennej. Endogenna synteza tauryny zachodzi z wykorzystaniem cysteiny (Cys) i metioniny (Met) jako substratów (Kulasek i inni, 2004). Do tej pory poznano pięć szlaków metabolicznych prowadzących do syntezy tauryny, jednak za główne jej źródło uważana jest synteza z cysteiny (Ryc. 2). W pierwszym etapie takiej syntezy dochodzi do oksygenacji L-cysteiny pod wpływem dioksygenazy cysteinowej (CDO), w efekcie czego powstaje kwas L-cysteinosulfonowy. Następnie kwas ten ulega dekarboksylacji pod wpływem dekarboksylazy kwasu L-cysteinosulfonowego (CSD). Powstała hipotauryna jest utleniana do tauryny, a reakcja katalizowana jest przez dehydrogenazę hipotaurynową.



Rycina 2. Synteza tauryny z cysteiny (Szymański i Winiarska, 2008; zmienione).

Organami, w których w głównej mierze dochodzi do syntezy tauryny są wątroba oraz mózg, przy czym w tym drugim jest ona zdecydowanie mniej efektywna (Kulasek i inni, 2004). Prawdopodobnie ma to związek z aktywnością CDO w komórkach Purkiniego, komórkach

piramidalnych oraz astrocytach, podczas gdy CSD wykazuje aktywność tylko w tych ostatnich (Szymański i Winiarska, 2008).

Najważniejszym czynnikiem warunkującym tempo biosyntezy tauryny jest dostępność aminokwasów siarkowych, tj. metioniny i cysteiny (Tappaz, 2004). Do innych czynników wpływających na tempo jej syntezy zaliczyć można także gatunek, płeć oraz wiek (Hayes, 1981). Co więcej, enzymy szlaku metabolicznego zmierzającego do produkcji tauryny wykorzystują witaminę B₆ jako kofaktor, zatem niedobór witaminy B₆ może także powodować zaburzenia w wytwarzaniu omawianego aminokwasu. Kolejnym czynnikiem wpływającym na tempo syntezy tauryny są zmiany w stopniu uwodnienia komórki. Badania wykazały, iż chroniczne podawanie szczurom zastrzyków z hipertonicznym roztworem NaCl prowadzi do wyciekania wody z komórek mózgu, co z kolei prowadzi do akumulacji osmolitów takich jak, np. tauryna (Bitoun i Tappaz, 2000). Również poziom glukozy we krwi wpływa na tempo syntezy tauryny. W literaturze istnieją jednak sprzeczne informacje na ten temat - badania *in vitro* wskazują na spadek aktywności przenośnika tauryny przy wysokim poziomie glukozy (Stevens i inni, 1999), podczas gdy badania *in vivo* sugerują, iż wysoki poziom glukozy we krwi stymuluje aktywność tego przenośnika (Bridges i inni, 2001).

1.2. Źródła tauryny

Całkowity poziom tauryny w organizmie ssaków jest wypadkową trzech czynników: syntezy *de novo* w wątrobie, jej zawartości w spożywanych pokarmach oraz resorpcji w nerkach (Szymański i Winiarska, 2008). Określenie ilości tauryny w diecie jest niezwykle trudne, ze względu na niewielką ilość lub całkowity brak informacji o jej zawartości w spożywanych produktach. Następstwem czego jest brak zalecanej dziennej dawki tauryny dla człowieka (Stapleton i inni, 1997). Szacuje się jednak, że dzienna dawka tauryny, którą dostarczamy do organizmu wraz z pokarmem wynosi około 58 mg (Schuller-Levis i Park, 2003).

Produkty pochodzenia zwierzęcego uważane są za główne źródło tego aminokwasu w diecie (Lourenço i Camillo, 2002). Utrzymanie właściwego poziomu tauryny w tkankach możliwe jest przede wszystkim dzięki konsumpcji mięsa oraz owoców morza (Divakaran, 2006; Ripps i Shen, 2012). Stosunkowo duża ilość tauryny znajduje się w mięsie indyków - około 200 mg w 100 g świeżego produktu, nieco mniejszą jej zawartością cechuje się wątroba bydłęca, wieprzowa i drobiowa - odpowiednio około 69, 89 oraz 110 mg w 100 g świeżego produktu (Kulasek i inni, 2004). W trakcie obróbki produktu może jednak dochodzić do częściowych strat w zawartości tauryny. Dotyczy to przede wszystkim gotowania, w trakcie którego związek

wycieka do zewnętrznego płynu oraz mrożenia produktów (Rana i Sanders, 1986). Produkty pochodzenia roślinnego, tj. owoce, soki owocowe, warzywa, zboża i produkty zbożowe, orzechy, ziarna sezamu, tapioka czy nasiona roślin strączkowych cechują się na tyle niską zawartością tauryny, że trudną do oznaczenia przy użyciu znanych metod analitycznych (Spitze i inni, 2003). Badania naukowe dowodzą także, że niektóre rodzaje diety wiążą się z utratą tauryny: przyjmowaniu wraz z pokarmem dużych ilości żywic towarzyszy wzmożona utrata kwasów żółciowych oraz ich koniugatów z tauryną. Podobna zależność ma miejsce w warunkach nadmiernego wzrostu flory bakteryjnej w jelitach. Uważa się, że wzrost wydzielania cholecystokininy (CCK) również przyczynia się do zmniejszenia puli tauryny w organizmie poprzez przyspieszenie cyklu enterohepatycznego. Wzrost poziomu CCK obserwowany jest między innymi przy stosowaniu diety charakteryzującej się dużą zawartością białka - przede wszystkim sojowego (Backus i inni, 1995).

Do wchłaniania tauryny z przewodu pokarmowego dochodzi zarówno w jelicie cienkim, jak i grubym. Tempo wchłaniania jest jednak zdecydowanie wyższe w jelicie cienkim, niż w jelicie grubym (Tomei i inni, 2003). Głównym regulatorem odpowiedzialnym za utrzymanie właściwego poziomu tauryny w organizmie są nerki (Szymański i Winiarska, 2008). Jej stężenie w nerkach wzrasta wraz ze wzrostem spożycia produktów bogatych w białka i aminokwasy siarkowe (Stipanuk i inni, 2002). Wewnątrzkomórkowe stężenie tauryny decyduje natomiast o tempie jej wypływu z nerek, przy czym warunkiem zajścia tego procesu jest obecność jonów zarówno Na^+ jak i Cl^- (Chesney i inni, 2010). Tauryna w niewielkim stopniu ulega metabolizowaniu w organizmie, dlatego usuwana jest przede wszystkim w postaci niezmienionej wraz z moczem (Kulasek i inni, 2004). Może być również wydalana wraz z kałem - w postaci wolnej, w koniugatach z kwasami tłuszczowymi, bądź w komórkach mikroorganizmów (Szymański i Winiarska, 2008).

1.3. Funkcje tauryny

Tauryna pełni wiele funkcji fizjologicznych. Bierze udział w tworzeniu kwasów żółciowych, modulowaniu stężenia jonów Ca^{2+} , jest także zaangażowana w procesy osmoregulacyjne oraz stabilizację błon komórkowych. Wykazuje również działanie antyoksydacyjne oraz pełni funkcję neuroprzekaźnika i neuromodulatora (De Luca i inni, 2015). W dysertacji skupiono się na krótkiej charakterystyce wybranych funkcji tauryny bezpośrednio związanych z tematyką badawczą pracy.

- 1.3.1. Tauryna jako składnik żółci. Do kwasów żółciowych zawartych w żółci zaliczamy: kwas cholowy, kwas chenodeoksycholowy, kwas deoksycholowy oraz kwas lithocholowy (Szymański i Winiarska, 2008). W trakcie złożonego procesu enzymatycznego dochodzi do ich sprzęgania z tauryną oraz glicyną. Koniugaty tauryny stanowią ok. 30% całkowitej puli sprzężonych kwasów wątrobowych, podczas gdy koniugaty z glicyną ok. 70%. Należy zauważyć, że te pierwsze są lepiej rozpuszczalne w wodzie i mniej toksyczne (Bellentani i inni, 1987). Jako składnik żółci tauryna bierze udział także w trawieniu tłuszczów, regulowaniu poziomu cholesterolu w surowicy krwi oraz absorpcji witamin rozpuszczalnych w tłuszczach (Menon i Natraj, 1984).
- 1.3.2. Tauryna w mięśniach poprzecznie prążkowanych szkieletowych i mięśniu sercowym. Stężenie tauryny w mięśniach szkieletowych utrzymywane jest na wysokim poziomie dzięki obecności specyficznego przekaźnika TauT. Eksperymentalne badania na myszach, których genetycznie pozbawiono przekaźnika TauT wykazały obniżenie zawartości tauryny w mięśniach, a co za tym idzie ich uszkodzenie oraz spadek wytrzymałości fizycznej nawet o 80% (Spriet i Whitfield, 2015). Koncentracja tauryny ulega zmianie w zależności od typu włókna mięśniowego - włókna wolnokurczliwe charakteryzuje wyższa zawartość tauryny w porównaniu do włókien szybko kurczliwych, co może mieć wpływ na ich funkcje fizjologiczne (Ishikura i inni, 2011). Tauryna reguluje także uwalnianie jonów Ca^{2+} z retikulum sarkoplazmatycznego oraz odpowiada za utrzymywanie wrażliwości elementów kurczliwych włókna mięśniowego na obecność jonów Ca^{2+} , co ma bezpośredni związek z jego skurczem i rozkurczem (Spriet i Whitfield, 2015). Badania eksperymentalne oraz kliniczne potwierdzają pozytywny wpływ tauryny na układ sercowo-naczyniowy. Wiąże się to z kilkoma mechanizmami działania aminokwasu w obrębie wcześniej wspomnianego układu. Po pierwsze suplementacja tauryny prowadzi do poprawy profilu lipidowego organizmu, po drugie wykazuje działanie antyoksydacyjne, po trzecie utrzymuje właściwy poziom Ca^{2+} w organizmie i w końcu po czwarte częściowo redukuje skutki działania angiotensyny II, która bierze udział w generowaniu hipertrofii serca (Xu i inni, 2008).
- 1.3.3. Funkcje tauryny w ośrodkowym układzie nerwowym. Tauryna stanowi czynnik troficzny w trakcie rozwoju ośrodkowego układu nerwowego (Schuller-Levis i Park, 2003). W obrębie OUN tauryna wiąże się ze specyficznym receptorem

TauR, co sprzyja hiperpolaryzacji neuronalnej poprzez hamowanie aktywności neuronów, do których została podana (Chung i inni, 2012; Ripps i Shen, 2012). Istnieją badania sugerujące zaangażowanie tauryny w system neurotransmisji GABA-ergiczej (Kim, 2003). Ma to związek ze strukturalnym podobieństwem tauryny do kwasu γ -aminomasłowego, który pełni funkcję głównego neuroprzekaźnika o właściwościach inhibicyjnych w układzie nerwowym. Strukturalne podobieństwo tych dwóch związków wiąże się ze zdolnością tauryny do naśladowania efektów działania GABA, związanych z intensyfikacją przepływu jonów chlorkowych przez błony neuronów (Olive, 2002). Jednak do intensyfikacji przepływu jonów Cl^- dochodzi tylko przy wysokim stężeniu tauryny, niskie stężenie aminokwasu wiąże się z hamowaniem przepływu jonów chlorkowych przez membrany neuronalne (Oja i Saransaari, 2007). Niedobór tauryny w OUN wiąże się z rozwojem chorób takich jak choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, uszkodzenie nerwów siatkówkowych czy padaczka (Chung i inni, 2012). Naukowcy są także zgodni, co do neuroochronnego działania tauryny w układzie nerwowym, które przejawia się redukcją wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} oraz w ochroną komórek przed uszkodzeniami spowodowanymi działaniem stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem H_2O_2 (Wu i Prentice, 2010).

- 1.3.4. Związek tauryny z rozwojem i funkcjonowaniem nerek. Niedobór tauryny w diecie ma związek ze zmianami w mikroskopowym obrazie nerek, do których zalicza się m.in. powiększenie kłębuszków nerkowych, spłaszczenie kanalików proksymalnych oraz spadek ich liczby w porównaniu z kontrolą, czy też zmniejszenie liczby mitochondriów w szczytowej części kanalików (Szymański i Winiarska, 2008). Działanie tauryny w układzie wydalniczym wiąże się z obniżeniem przepływu krwi przez nerki (Schaffer i inni, 2000). Poprzez wzmaganie ekskrecji Na^+ , tauryna bierze udział również w regulacji gospodarki wodno-elektrolitycznej organizmu, działając antagonistycznie w stosunku do skutków wywołanych działaniem angiotensyny II (Chesney i inni, 2010).
- 1.3.5. Rola tauryny w układzie rozrodczym. W obrębie męskiego układu rozrodczego obecność tauryny została wykazana m.in. w komórkach Leydiga, komórkach śródmiąższowych jąder oraz w komórkach śródbłonna dróg wyprowadzających (Lobo i inni, 2008). Co więcej, w układzie tym tauryna została zidentyfikowana jako czynnik o działaniu antyoksydacyjnym, stabilizującym membrany plemników

i tym samym zapewniającym prawidłowy ruch plemników oraz jako czynnik zaangażowany we właściwy przebieg procesu kapacytacji (Yang i inni, 2010).

1.3.6. Właściwości antyoksydacyjne tauryny. Tauryna nie jest zdolna do bezpośredniego usuwania reaktywnych form tlenu (RFT) takich jak anionorodnik ponadtlenkowy czy nadtlenek wodoru. W sposób pośredni uczestniczy jednak w ochronie komórki przed uszkodzeniami będącymi następstwem działania RFT. Przejawem antyoksydacyjnego działania tauryny jest oddziaływanie na mitochondria. Mitochondrialne kompleksy I i III łańcucha oddechowego uważane są za miejsca generowania nadtlenczków, a ich aktywność zmniejsza się przy niedoborze tauryny. Następstwem zwolnienia przepływu elektronów przez łańcuch oddechowy może być m.in. zmiana kierunku przepływu elektronów z kompleksów na alternatywne akceptory. Tauryna usprawniając przepływ elektronów przez łańcuch oddechowy, zapobiega przekształcaniu się elektronów w toksyczne nadtlencki (Jong i inni, 2012). Omawiany aminokwas wykazuje również zdolność do bezpośredniej neutralizacji bakteryjnego oksydantu jakim jest kwas podchlorawy, do mniej reaktywnej chloraminy tauryny (Tsvetkova i inni, 2015).

2. Alkohol etylowy

Do najprostszych alkoholi zaliczamy: metanol, alkohol izopropylowy oraz etanol. Dwa pierwsze są silnie toksyczne, w związku z czym ich spożywanie nie jest wskazane. Etanol - (potocznie nazywamy alkoholem) mimo tego iż jest substancją odurzającą - zawarty jest w piwach, winach oraz innych napojach alkoholowych, które od setek lat uważane są za komponent posiłków, znany ze swoich właściwości relaksacyjnych oraz zwiększający naszą towarzyskość (Guo i Ren, 2010).

2.1. Metabolizm alkoholu

Etanol jest substancją lipofilną, która z łatwością przekracza barierę krew-mózg, wnikając do wszystkich tkanek oraz narządów organizmu. Ponad 95% spożytego alkoholu ulega metabolizowaniu, pozostała część wydalana jest w formie niezmienionej wraz z moczem oraz wraz z wydychanym powietrzem (Lis, 2009). Narządem szczególnie narażonym na działanie alkoholu jest wątroba, w której metabolizowane jest ponad 90% spożytego alkoholu. Do innych narządów narażonych na działanie etanolu oraz jego metabolitów możemy zaliczyć także błonę śluzową żołądka, trzustkę oraz układ nerwowy (Ignatowicz i inni, 2011).

W obrębie organizmu istnieją trzy enzymatyczne systemy odpowiedzialne za metabolizowanie alkoholu:

- 1) dehydrogenaza alkoholowa (ADH),
- 2) mikrosomalny system utleniający alkohol (MEOS),
- 3) katalaza (CAT) (Dinu i inni, 2005).

Ponad 85% alkoholu utleniane jest przy udziale ADH, która jest enzymem cytoplazmatycznym, dlatego pierwszy etap reakcji utleniania alkoholu do aldehydu octowego zachodzi w cytoplazmie hepatocytów. Produktem tej reakcji jest również NADH. Aldehyd octowy dyfunduje do mitochondriów, gdzie zachodzi drugi etap reakcji utleniania - tym razem przy udziale dehydrogenazy aldehydowej (ALDH). W jego wyniku powstaje kwas octowy oraz NADH (Teplova i inni, 2010). Aldehyd octowy oraz kwas octowy uważane są za bezpośrednią przyczynę toksyczności alkoholu (Ignatowicz i inni, 2011). Aldehyd octowy jest zdolny do zmiany aktywności oraz funkcji białek, ponieważ z łatwością wiąże się z ich grupami aminowymi, sulfhydrylowymi oraz hydroksylowymi. Ma również zdolność do tworzenia wiązań krzyżowych pomiędzy nićmi DNA, prowadząc w ten sposób do uszkodzeń szpiku kostnego oraz generacji nowotworów (O'Brien i inni, 2005).

Okolo 15% alkoholu metabolizowane jest z udziałem MEOS, w skład którego wchodzi cytochrom P450. W obecności tlenu, NADPH, reduktazy NADPH oraz cytochromu c etanol utleniany jest do aldehydu octowego (Plewka i inni, 2009). Reakcji utleniania etanolu do aldehydu octowego towarzyszy produkcja anionorodnika ponadtlenkowego (Teplova i inni, 2010). Chroniczne spożywanie alkoholu powoduje kilkukrotne zwiększenie aktywności oksydazy cytochromowej P450III_{E1} (CYP2E1), co wiąże się z przyspieszeniem tempa peroksydacji lipidów, w konsekwencji prowadząc do zmian w strukturze i funkcjonowaniu błon komórkowych hepatocytów (Comporti i inni, 2010; Jelski i inni, 2007).

W trzecim systemie odpowiedzialnym za utlenianie alkoholu do aldehydu octowego bierze udział nadtlenek wodoru. Reakcja ta katalizowana jest przez katalazę (Dinu i inni, 2005).

2.1.1. Czynniki wpływające na tempo wchłaniania oraz metabolizowania alkoholu.

Jednym z czynników regulujących tempo wchłaniania oraz metabolizowania alkoholu jest rodzaj i ilość pokarmu znajdującego się w żołądku. Szybkość z jaką treść żołądkowa dociera do jelit warunkuje tempo wchłaniania alkoholu: im wyższa zawartość tłuszczów w treści żołądkowej, tym wolniej dociera ona do jelit, powodując tym samym zwolnienie tempa wchłaniania alkoholu (Ślósarska, 1999).

Kolejnym czynnikiem mającym wpływ na tempo zarówno wchłaniania, jak i metabolizowania alkoholu jest płeć. Wiąże się to z faktem mniejszej średniej masy ciała kobiet w porównaniu do średniej masy ciała mężczyzn, dlatego przy spożyciu tej samej dawki alkoholu, jego stężenie we krwi będzie wyższe u kobiety. Co więcej, zawartość wody na kilogram masy ciała jest mniejsza u kobiet, alkohol będzie się więc rozpuszczał w mniejszej ilości wody, skutkując wyższym stężeniem we krwi (Nolen-Hoeksema, 2004). Również wiek jest czynnikiem warunkującym tempo metabolizowania alkoholu. Mniejsza zawartość wody w organizmie, mniejsza aktywność ADH oraz mniejszy rozmiar wątroby w podeszłym wieku, przyczyniają się do obniżenia tempa metabolizowania alkoholu (Kim i inni, 2003).

2.2. Szkody somatyczne wywołane działaniem alkoholu

2.2.1. Układ pokarmowy. Układ ten jest szczególnie narażony na szkodliwe działanie alkoholu, ponieważ stanowi miejsce jego absorpcji. W układzie pokarmowym dochodzi do bezpośredniego kontaktu etanolu ze śluzówką układu pokarmowego, co może powodować zaburzenia zarówno funkcjonalne, jak i metaboliczne. Co więcej nieprawidłowe funkcjonowanie błony śluzowej układu pokarmowego, jak i jej uszkodzenia prowadzą do zaburzeń trawienia, a co za tym idzie zaburzeń w przyswajaniu substancji odżywczych. Uszkodzenia błony śluzowej przede wszystkim jelita cienkiego powodują zwiększoną przepuszczalnością makromolekuł, np. endotoksyn do układu krwionośnego i limfy (Bode i Bode, 1997).

Kontakt alkoholu z elementami jamy ustnej przyczynia się do uszkodzenia ślinianek, a więc również zaburzenia wydzielania śliny. Dość często obserwowane są także stany zapalne języka i warg oraz negatywny wpływ na uzębienie (Bode i Bode, 1997). Charakterystycznym objawem uzależnienia alkoholowego jest występowanie choroby refluksowej. Alkohol poprzez zmniejszanie napięcia dolnego zwieracza przełyku przyczynia się do zaostrzenia objawów chorobowych, prowadzących do wystąpienia tzw. przełyku Barreta (Stermer, 2002). Toksyczne działanie alkoholu etylowego wiąże się ze zmianami w wydzielaniu kwasu solnego - napoje o niskiej zawartości alkoholu (poniżej 5%) zwiększają wydzielanie HCl prawdopodobnie na skutek działania histaminy, natomiast napoje o wyższej zawartości alkoholu (powyżej 5%) obniżają wydzielanie kwasu, w następstwie zwiększonego wydzielania inhibitorów gastryny (Klusek i Klusek, 2012). Atrofia

śliny żołądka wywołana chronicznym spożywaniem alkoholu prowadzi do spadku jej aktywności wydzielniczej - zmniejsza to zdolność żołądka do niszczenia potencjalnie chorobotwórczych bakterii, które dostają się do niego wraz z żywnością (Bode i Bode, 1997).

W największym stopniu na szkodliwe działanie alkoholu narażona jest wątroba. Przy przewlekłym jej spożywaniu obserwuje się zachwianie biochemicznej homeostazy wątroby, prowadzącej do rozwoju alkoholowej choroby wątroby - ALD (Szymczak i inni, 2009). Oksydacyjny metabolizm etanolu ma związek z gromadzeniem się w wątrobie zredukowanych form NADH, co prowadzi do kumulacji kwasu mlekowego, który nie mogąc zostać utlenionym do pirogronianu, hamuje glukoneogenezę (Klusek i Klusek, 2012). Z kolei stres oksydacyjny - będący pośrednim efektem działania alkoholu - wywołuje niedobór zredukowanego glutationu (GSH) w mitochondriach, co skutkuje peroksydacją lipidów oraz uszkodzeniem błon komórkowych. Zaburzenia w β -oksydacji kwasów tłuszczowych prowadzą do wzrostu poziomu trójglicerydów, które odkładając się w wątrobie wywołują rozdzęcie hepatocytów (Klusek i Klusek, 2012). Spożywanie nadmiernej ilości alkoholu przyczynia się również do wzmożonej produkcji cytokin prozapalnych takich jak: TNF- α , TGF- β czy IL-6, które promują włóknienie wątroby (Bąbała i inni, 2011). Niedotlenienie i martwica hepatocytów inicjuje produkcję kolagenu przez komórki gwiazdziste wątroby - HSC. W warunkach chronicznego spożywania alkoholu dochodzi do powtarzania cykli naprawczych HSC, co w konsekwencji prowadzi do gromadzenia się tkanki łącznej, która z fizjologicznego punktu widzenia jest bezużyteczna (Kasztelan-Szczerbińska i inni, 2010). Liczne dane literaturowe potwierdzają również związek pomiędzy intensywnym spożywaniem alkoholu, a wystąpieniem nowotworów układu pokarmowego - przede wszystkim nowotworami jamy ustnej, gardła i przełyku, w mniejszym stopniu nowotworami wątroby czy jelita grubego (Szymczak i inni, 2009).

- 2.2.2. Układ sercowo-naczyniowy. Alkohol etylowy może wywierać zarówno pozytywny, jak i negatywny wpływ na układ sercowo-naczyniowy, w zależności od ilości w jakiej został spożyty. Umiarkowane ilości alkoholu wpływają korzystnie na układ krążenia. Prawdopodobnie efekt ten uzyskiwany jest dzięki zawartym w piwie i winie polifenolom, które cechują się właściwościami

antyoksydacyjnymi, przeciwzapalnymi, przeciwnowotworowymi, antykoagulacyjnymi oraz obniżającymi ciśnienie krwi. Dzięki takim właściwościom, dochodzi do podwyższenia poziomu cholesterolu HDL, obniżenia poziomu fibrynogenu oraz zmniejszenia stopnia agregacji płytek krwi, co wiąże się przede wszystkim z przeciwdziałaniem miażdżycy, a w następnej kolejności chorobie niedokrwiennej serca (Arranz i inni, 2012). Jednak nadużywanie alkoholu oraz jego przewlekłe picie ma szkodliwy wpływ na układ sercowo-naczyniowy. Spożywanie nadmiernych ilości alkoholu wiąże się z elektrofizjologicznymi zmianami w rytmie pracy serca. Jedną z teorii tłumaczących występowanie arytmii serca u osób nadużywających alkoholu głosi, że jest ona konsekwencją bliznowacenia otaczającej tkanki łącznej oraz jej pogrubienia. Inna zakłada, że dochodzi do wzrostu stężenia m.in. katecholamin, które biorą udział w przekazywaniu impulsów z nerwów do mięśni (Zakhari, 1997). U osób nadużywających alkoholu obserwowana jest również wzmożona produkcja RFT, uważana za przyczynę przerostu mięśnia sercowego oraz apoptozy kardiomiocytów prowadzących do zastoinowej niewydolności serca (Lucas i inni, 2005).

- 2.2.3. Układ nerwowy. Alkohol wpływa na produkcję, uwalnianie oraz sygnalizację neuroprzekaźników takich jak: serotonina, glutaminian, kwas γ -aminomasłowy (GABA) czy endokannabinoidy, co prowadzi do zmniejszenia aktywności centralnego układu nerwowego i tym samym pogorszenia koordynacji ruchowej oraz zmian behawioralnych (Manzo-Avalos i Saavedra-Molina, 2010). Przy jednorazowym spożyciu alkoholu efekty zatrucia mogą przyjmować różnorodną postać w zależności od jego przyjętej ilości. Wieloletnie picie alkoholu może być natomiast przyczyną pogłębiającej się demencji, do której dochodzi na skutek kurczenia się oraz rozpadu jąder komórkowych neuronów, które stopniowo zastępowane są przez głąz i płyn mózgowy (Piotrowicz i Ochwanowska, 2012; Manzo-Avalos i Saavedra-Molina, 2010).

Chroniczne spożywanie alkoholu - na drodze modyfikacji aktywności substancji neuroprzekaźnikowych odpowiedzialnych za utrzymywanie prawidłowej aktywności ośrodkowego układu nerwowego - powoduje zaburzenie architektury snu oraz trudności w zasypianiu (Piotrowicz i Ochwanowska, 2012). Badania potwierdzają, że długotrwałe spożywanie alkoholu wiąże się ze spadkiem objętości istoty białej w obrębie hipokampa oraz zmniejszeniem ilości komórek Purkiniego i neuronów ziarnistych w obrębie mózdzku, prowadząc do pogorszenia się pamięci

krótkotrwałej, obniżenia zdolności poznawczych i uczenia się (za które odpowiada hipokamp) oraz utrudnień w koordynacji ruchowej, w kontroli postawy ciała i w utrzymywaniu równowagi (za które odpowiada mózdzek; Riikonen, 2004).

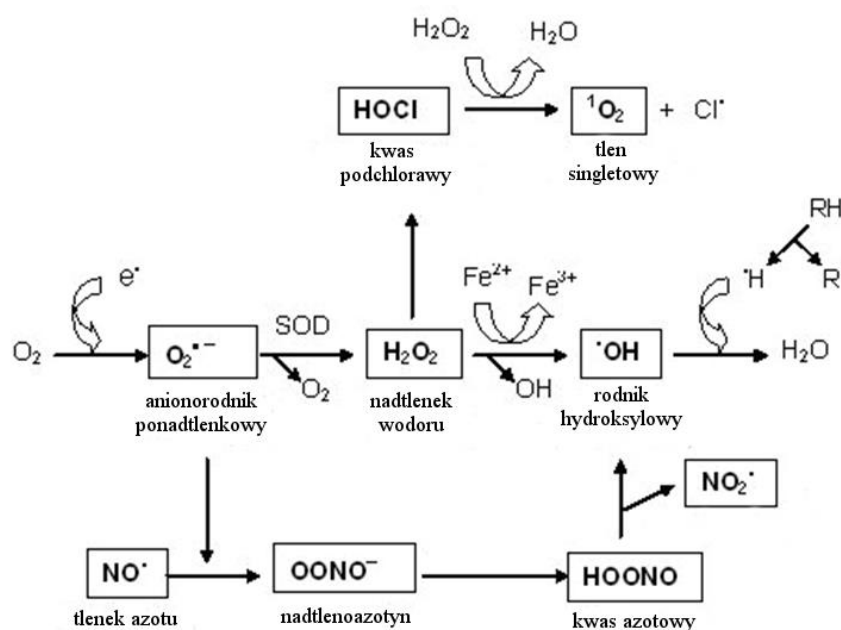
W trakcie rozwoju choroby alkoholowej dochodzi do gromadzenia się pośredniego produktu metabolizmu alkoholu - aldehydu octowego, który biorąc udział w produkcji RFT oraz tlenku azotu, przyczynia się do generowania stresu oksydacyjnego w obrębie mózgu. Zdolności antyoksydacyjne ośrodkowego układu nerwowego zależne są w głównej mierze od sprawności układu antyoksydacyjnego organizmu (Piotrowicz i Ochwanowska, 2012). Mechanizmy naprawcze w obrębie mózgu przebiegają jednak wolno, a zawartość enzymów antyoksydacyjnych jest stosunkowo niewielka w porównaniu z innymi narządami, dlatego niezwykle ważną rolę w zmniejszaniu poziomu mózgowego stresu oksydacyjnego odgrywają niskocząsteczkowe antyoksydanty egzogenne, m.in. witamina E, A oraz C (Shohami i inni, 1997).

- 2.2.4. Układ rozrodczy. Alkohol może oddziaływać na układ rozrodczy w sposób zarówno bezpośredni, jak i pośredni. Bezpośrednie działanie polega przede wszystkim na wywieraniu negatywnego wpływu na jądra. Alkohol z łatwością przekracza barierę krew-jądra, stanowiąc dla nich pierwotną substancję toksyczną, której działanie przejawia się w atrofii jąder. Badania prowadzone na szczurach traktowanych etanolem potwierdzają, że dochodzi u nich do zwężenia światła kanalików nasiennych, zmniejszenia liczby komórek Leydiga oraz pojawienia się zdegenerowanych postaci gamet (Albadri i inni, 2013). Pośrednie oddziaływanie alkoholu na układ rozrodczy ma natomiast związek z wytwarzaniem metabolitów pośrednich - oksydantów, odpowiedzialnych za generowanie stresu oksydacyjnego (Dosumu i inni, 2010). Nadużywanie alkoholu wywołuje stan długotrwałego stresu oksydacyjnego, którego skutkiem jest uszkodzenie komórek, a w efekcie końcowym ich śmierć na drodze nekrozy lub apoptozy (Emanuele i Emanuele, 2001). Pośrednie działanie alkoholu na układ rozrodczy ma także związek z zaburzeniem czynności gruczołów dokrewnych, prowadząc do nieprawidłowości w wydzielaniu hormonów, tj. spadku poziomu testosteronu oraz zmian poziomu folitropiny - FSH i lutropiny - LH (Kumar i inni, 2009).
- 2.2.5. Alkohol etylowy, a stres oksydacyjny. W warunkach chronicznej ekspozycji na alkohol etylowy dochodzi do zwiększonej produkcji RFT oraz generowania stresu oksydacyjnego, połączonego z jednoczesnym zmniejszeniem aktywności

antyoksydantów organizmu. Taki stan może prowadzić do oksydacji makromolekuł - białek, lipidów oraz DNA. Następstwem peroksydacji lipidów może być uszkodzenie membran komórkowych, natomiast oksydacji białek zmiany w ekspresji genów wpływające na metabolizm komórki - jej cykl, a także śmierć (Sid i inni, 2012).

3. Metabolizm tlenowy jako źródło reaktywnych form tlenu (RFT)

Życie na Ziemi zależne jest od obecności tlenu. Większość energii organizmu pozyskiwana jest w trakcie jego redukcji w mitochondriach podczas oddychania komórkowego (Sies, 1993). Procesowi oddychania komórkowego towarzyszy powstanie anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$) oraz innych RFT. Definiowane są one jako atomy, bądź cząsteczki posiadające na orbitalu walencyjnym niesparowany elektron lub elektrony (Izyumov i inni, 2010). Pierwotną postacią RFT jest anionorodnik ponadtlenkowy, który może ulec przekształceniom metabolicznym w inne RFT, m.in. nadtlenek wodoru (H_2O_2) lub rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$) (Ryc. 3; Tremellen, 2008). Niewielkie ilości RFT są wymagane dla prawidłowego funkcjonowania organizmu, ponieważ biorą udział w procesach chroniących komórkę przed stresem oksydacyjnym oraz przywracających jej równowagę redoks (Tvrdá, 2011). Jednak nadmierna produkcja tych wysoce reaktywnych cząsteczek może wiązać się z uszkodzeniem lipidów błonowych, aminokwasów białkowych i węglowodorowych oraz z uszkodzeniem DNA (Ochsendorf, 1999).



Rycina 3. Metaboliczne zależności pomiędzy reaktywnymi formami tlenu (Ďuračková, 2010; zmienione).

3.1. Stres oksydacyjny oraz jego konsekwencje

Termin „stres oksydacyjny” w naukach biologicznych oraz biomedycznych został po raz pierwszy użyty około 30 lat temu i od tego momentu stał się jednym z najczęściej badanych procesów biologicznych (Breitenbach i Eckl, 2015). Mimo to, sięgając do literatury możemy trafić na różne jego definicje. Według jednej z nich jest to proces, w którym biorą udział wolne rodniki oraz reaktywne metabolity organizmu (Ďuračková, 2010), według innej jest to stan organizmu, w którym zawartość RFT stale i chronicznie wzrasta, powodując rozregulowanie oraz zakłócenie metabolizmu komórki, co w konsekwencji prowadzi do uszkodzeń jej składników (Breitenbach i Eckl, 2015).

Najczęściej stres oksydacyjny definiowany jest jednak jako stan organizmu wywołany zachwianiem równowagi pomiędzy prooksydantami, a antyoksydantami organizmu. Zakłócenie tej równowagi może mieć związek zarówno ze wzrostem poziomu RFT w organizmie, jak i zmniejszeniem aktywności antyoksydacyjnych mechanizmów obronnych (Agarwal i inni, 2012). Mimo wyposażenia organizmu w antyoksydacyjne mechanizmy obronne, uważa się, że oksydacyjne uszkodzenia lipidów, białek oraz DNA kumulujące się przez całe życie, związane są z rozwojem licznych stanów chorobowych, do których można zaliczyć m.in. miażdżycę, syndrom chronicznego zmęczenia, reumatoidalne zapalenie stawów, nowotwory, chorobę Huntingtona, a także choroby neurodegeneracyjne, tj. chorobę Parkinsona oraz Alzheimerera (Rahman i inni, 2012; Valko i inni, 2006).

3.2. Dialdehyd malonowy jako biomarker stresu oksydacyjnego

Określenie „biomarker” zdefiniowano jako cechę mierzoną i ocenianą jako wskaźnik zarówno prawidłowego, jak i patologicznego przebiegu procesów biologicznych lub jako wskaźnik odpowiedzi farmakologicznej na terapię medyczną. Za najbardziej pożądane biomarkery uważane są te, które silnie skorelowane są z danymi, zachodzącymi w organizmie procesami patofizjologicznymi. Biomarkery stresu oksydacyjnego możemy sklasyfikować jako cząsteczki ulegające modyfikacji pod wpływem RFT lub jako składniki systemu antyoksydacyjnego, które na skutek zwiększającego się stresu zmieniają swoją odpowiedź (Ho i inni, 2013). Jako, że uszkodzenia wywołane działaniem stresu oksydacyjnego dotyczą przede wszystkim białek, lipidów oraz DNA, biomarkery stresu oksydacyjnego podzielono w zależności od komponentu komórki, który uległ uszkodzeniu pod jego wpływem (Tab. 1; Giammarioli i inni, 1999; Naito i inni, 2010).

Jednym z najczęściej stosowanych markerów stresu oksydacyjnego oraz wolnorodnikowych uszkodzeń komórki jest dialdehyd malonowy (MDA), będący produktem końcowym peroksydacji lipidów (Kasperska-Zajac i inni, 2008).

Tabela 1. Główne biomarkery stresu oksydacyjnego

MARKERY OKSYDACYJNYCH USZKODZEŃ DNA	MARKERY OKSYDACYJNYCH USZKODZEŃ BIAŁEK	MARKERY OKSYDACYJNYCH USZKODZEŃ LIPIDÓW
1. 8-hydrokso-deokso-guanozyna	1. całkowita zawartość grup	1. dialdehyd malonowy
2. 8-hydrokso-guanina	karbonylowych	2. 4-hydroksynonenal
3. 8-okso-2'-deokso-guanozyna	2. dityrozyna	3. izoprostany
4. 8-okso-guanina	3. 2-okso-histydyna	4. całkowita zawartość aldehydów
	4. 3-nitrotyrozyna	

3.3. Charakterystyka układu antyoksydacyjnego organizmu

Do walki z niekorzystnymi skutkami działania RFT, komórki zwierzęce wykształciły szereg mechanizmów obronnych związanych m.in. z produkcją antyoksydantów. Ich zadaniem jest nie tylko zapobieganie oksydacyjnym uszkodzeniom komórek, ale także usuwanie już powstałych uszkodzeń oraz przywracanie równowagi redoks organizmu (Weydert i Cullen, 2010). Funkcje te spełniane są przez związki chemiczne, które umownie podzielono na dwie kategorie: związki o charakterze enzymatycznym oraz związki o charakterze nieenzymatycznym (Birben i inni, 2012). Do głównych enzymatycznych antyoksydantów organizmu należą:

- a) dysmutaza ponadtlenkowa (SOD, EC 1.15.1.11) - metaloproteina zawierająca w swoim centrum aktywnym jony metali przejściowych (Cu, Fe, Mn). SOD katalizuje dwuetapową reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego. W pierwszym etapie reakcji dochodzi do redukcji jonu metalu znajdującego się w centrum aktywnym przez anionorodnik. Reakcji tej towarzyszy uwolnienie cząsteczki tlenu. Drugi etap reakcji wiąże się z ponownym utlenieniem atomu metalu przez kolejny anionorodnik z jednoczesnym powstaniem cząsteczki nadtlenu wodoru. W zależności od jonu metalu jaki znajduje się w centrum aktywnym enzymu, dysmutazy podzielono na trzy klasy: MnSOD (występuje głównie w mitochondriach komórek eukariotycznych), CuZnSOD (występuje przede wszystkim w cytoplazmie oraz jądrze komórek eukariotycznych) oraz FeSOD (obecna wyłącznie w cytoplazmie, mitochondriach i chloroplastach komórek prokariotycznych; Wielkoszyński i inni, 2007),
- b) katalaza (CAT, EC 1.11.1.6) - ludzka katalaza jest homotetramerem złożonym z czterech identycznych podjednostek, z których każda posiada układ hemowy

z centralnie położonym atomem żelaza (Fe^{3+}). Podstawową funkcją katalazy w komórkach jest dysproporcjonowanie nadtlenu wodoru - jest to reakcja dwuetapowa. W pierwszym etapie reakcji dochodzi do redukcji nadtlenu wodoru z żelazem układu hemowego enzymu, w wyniku czego powstaje produkt zawierający żelazo na V stopniu utlenienia (Fe(V)-CAT). W kolejnym etapie tej reakcji kolejna cząsteczka nadtlenu wodoru zostaje utleniona przez Fe(V)-CAT , w wyniku czego powstaje tlen cząsteczkowy oraz woda, a żelazo powraca do swojego stanu wyjściowego. Katalaza jest enzymem występującym w komórkach bakteryjnych, roślinnych oraz zwierzęcych. W komórkach eukariotycznych umiejscowiona jest głównie w peroksysomach, w niewielkich ilościach także w mitochondriach oraz retikulum endoplazmatycznym (Ścibior i Czeczot, 2006),

- c) peroksydazy glutationowe (GPx, EC 1.11.1.9) - rodzina enzymów, dla których substratem jest zredukowany glutation oraz nadtlenek wodoru lub wodoronadtlenek lipidowy. Proces redukcji zarówno nadtlenu wodoru, jak i wodoronadtlenków lipidowych katalizowany jest przez izoformę peroksydazy glutationowej zawierającej w swojej cząsteczce selen w postaci selenocysteiny. Aktywność peroksydaz glutationowych zależy jest więc od ilości selenu dostarczanego do organizmu wraz z dietą. GPx występują głównie w cytozolu, a w niewielkich ilościach także w mitochondriach oraz osoczu (Wielkoszyński i inni, 2007).

Głównym nieenzymatycznym związkiem antyoksydacyjnym organizmu jest zredukowany glutation (GSH) - γ -glutamylcysteinyloglicyna, najbardziej rozpowszechniony tiol występujący we wszystkich komórkach prokariotycznych i eukariotycznych (Cacciatore i inni, 2010). Glutation cechuje się dość osobliwą strukturą: grupa α -aminowa cysteiny wiąże się z grupą γ -karboksylową glutaminianu, tworząc w ten sposób wiązanie izopeptydowe, chroniące GSH przed działaniem wewnątrzkomórkowych peptydaz. Drugą ważną cechą strukturalną glutationu jest obecność grupy tiolowej (-SH), z której wynika biologiczna rola glutationu w organizmie. Antyoksydacyjne działanie tego związku polega na detoksykacji nadtlenu wodoru, nadtlenu organicznych oraz innych RFT, a także na zdolności chelatowania jonów metali (Bilska i inni, 2007).

4. Jony metali w organizmach żywych

Minerały to nieorganiczne substancje obecne we wszystkich tkankach oraz płynach ustrojowych organizmów, które zostały sklasyfikowane jako:

- a) makroelementy - pierwiastki mające największy ilościowy udział w budowie organizmu. Zaliczamy do nich: chlor, fosfor, magnez, potas, siarkę, sód oraz wapń,
- b) mikroelementy - pierwiastki, których udział w budowie organizmu jest nieznaczny, aczkolwiek nieodzowny. Do mikroelementów zaliczamy: chrom, cynk, fluor, jod, kobalt, mangan, miedź, molibden, selen i żelazo (Soetan i inni, 2010).

Obecność mikro- i makroelementów jest niezbędna dla utrzymania homeostazy organizmu. Ważnym jest, aby ich poziom w organizmie był właściwy. Jeśli dojdzie do zmian zawartości mikro- i makroelementów mogą pojawić się toksyczne efekty, a w konsekwencji stan chorobowy (Gecit i inni, 2011).

Do czterech najważniejszych funkcji pierwiastków śladowych zalicza się: 1) stanowienie elementu strukturalnego organizmu, 2) pełnienie roli stabilizatora, 3) utrzymywanie funkcji hormonalnych organizmu, 4) stanowienie kofaktorów enzymów (Mulware, 2013). Ostatnia rola jest szczególnie istotna dla utrzymania równowagi oksydacyjno-redukcyjnej organizmu, a tym samym dla przeciwdziałania stresowi oksydacyjnemu, gdyż metale takie jak selen, cynk, mangan czy żelazo stanowią kofaktory dla wcześniej omówionych składników bariery antyoksydacyjnej organizmu (Heyland i inni, 2005).

5. Użyteczność badań hematologicznych dla oceny stanu zdrowia organizmów żywych

Hematologia jest nauką zajmującą się morfologią oraz fizjologią składników krwi, a wyniki prowadzonych analiz wykorzystuje się w celu zdiagnozowania chorób oraz ich monitoringu (Etim, 2013). Fakt, że krew jest głównym systemem transportowym całego organizmu, czyni analizy hematologiczne niezwykle użytecznymi. Co więcej, pobranie materiału potrzebnego do ich wykonania jest proste i mało inwazyjne (Etim i inni, 2014a). Badania hematologiczne są istotne nie tylko z fizjologicznego, ale także z ekotoksykologicznego punktu widzenia, gdyż pozwalają znaleźć zależność pomiędzy otrzymanymi wynikami, a środowiskiem (Etim i inni, 2014b).

III. CEL BADAŃ

Dostępne dane literaturowe potwierdzają rosnącą popularność napojów na bazie alkoholu oraz napoju energetyzującego (Lubman i inni, 2013; Nowak i Jasionowski, 2015), niemniej jednak konsekwencje ich spożywania nadal nie są dobrze poznane. Co więcej, większość badań prowadzonych nad interakcją pomiędzy etanolem, a jednym ze składników napojów energetycznych - tauryną, dotyczy aspektów behawioralnych oraz funkcji lokomotorycznych (Aragon i inni, 1992; Ginsburg i Lamb, 2008; Olive, 2002), a tylko nieliczne skupiają się na ocenie kondycji fizjologicznej organizmu (Taranukhin i inni, 2010).

W związku z powyższym celem pracy była weryfikacja hipotezy według której suplementacja tauryny zmniejsza negatywny wpływ alkoholu na homeostazę organizmu. W celu weryfikacji hipotezy głównej sformułowano następujące hipotezy pomocnicze:

- tauryna wpływa na regulację parametrów morfologicznych krwi oraz na regulację profilu lipidowego zaburzonego działaniem alkoholu,
- tauryna wpływa na aktywność enzymów wątrobowych (ALP, ALT, AST) zmienioną wskutek metabolizowania alkoholu,
- tauryna wpływa na aktywność bariery antyoksydacyjnej organizmu (CAT, GPx, SOD oraz GSH) oraz na stopień peroksydacji lipidów (MDA) zmienione działaniem alkoholu,
- tauryna i etanol mają związek ze zmianami stężenia mikro- i makroelementów (Cu, Fe, Zn, Mg) w organizmie,
- tauryna i etanol mają związek ze zmianami histologicznymi w obrębie narządów.

IV. MATERIAŁ I METODY

1. Zwierzęta eksperymentalne, warunki hodowli oraz dawki

Całkowita liczba zwierząt w eksperymencie wynosiła 98 osobników. Badania były prowadzone na 8-tygodniowych samcach myszy szczepu SWISS pochodzących z hodowli prowadzonej w Instytucie Biologii Wydziału Geograficzno-Biologicznego Uniwersytetu Pedagogicznego w Krakowie. Zwierzętarnia wyposażona była w sprzęt hodowlany typu Tecniplast. Zwierzęta trzymane w klatkach z poliwęglanu wyposażonych w drucianą pokrywę. Uwzględniając założenia eksperymentu w klatkach hodowano po 14 myszy. Wyściółkę klatek stanowiły trociny dla gryzoni. W pomieszczeniu hodowlanym utrzymywano następujące warunki: temperatura 21°C (+/- 2°C), wilgotność względna 55-60%. Wszystkie osobniki od 21 dnia życia przyzwyczajano do manipulacji ze strony eksperymentatora, w trakcie cotygodniowego sprzątania klatek. Przed sprzątnięciem zwierzęta wyciągano z klatek za podstawę ogona i umieszczano na ich pokrywie. Następnie delikatnie chwymano za skórę karku i podawano 0,9% roztwór NaCl *per os*. Po uprzątnięciu klatek, zwierzęta ponownie umieszczano w ich wnętrzu. Przed przystąpieniem do eksperymentu, jak i w jego trakcie zwierzęta karmiono standardową, pełnoporcjową karmą LSM (Agropol, Polska) *ad libitum* oraz poiono wodą wodociągową z butelek z półnikiem rurkowym, zachowując cykl światła i ciemności 12 h/12 h. Zwierzęta podzielono na 7 grup: kontrolną oraz 6 grup eksperymentalnych, z których każda liczyła 14 osobników. Osobniki należące do danej grupy hodowano wspólnie, aby zminimalizować stres związany z życiem w pojedynkę, w środowisku wzbogaconym o przedmioty pozytywnie wpływające na ich funkcje motoryczne i sensoryczne.

Doświadczenie prowadzono przez 24 h. Zwierzęta z grup eksperymentalnych, którym podawana była tauryna otrzymywały ją *per os* w objętości 20 μ l w dawce 20 mg·kg⁻¹ masy ciała (T20) i 40 mg·kg⁻¹ masy ciała (T40) o godzinie 10.00 rano. Zwierzęta z tej grupy miały stały dostęp do wody pitnej. Zwierzęta z grup eksperymentalnych, którym podawany był alkohol otrzymywały 15% roztwór alkoholu (A15) oraz 30% roztwór alkoholu (A30) *ad libitum* przez okres 12 h (podczas cyklu ciemności). Podczas cyklu światła miały stały dostęp do wody pitnej. Zwierzęta z tych grup otrzymywały również 0,9% NaCl *per os* w objętości 20 μ l o godzinie 10.00 rano. Zwierzęta z grup eksperymentalnych, interakcyjnych otrzymywały odpowiednio taurynę w dawce 20 mg·kg⁻¹ masy ciała i 15% alkohol (INT1) oraz taurynę w dawce 40 mg·kg⁻¹ masy ciała i 30% alkohol (INT2). Sposób podawania obu substancji był dokładnie taki, jak opisano powyżej. Dawki tauryny i alkoholu oraz sposób ich podania ustalono na podstawie doświadczeń przeprowadzonych przez innych autorów (Ginsburg

i Lamb, 2008; Jagadeesan i Sankarsami Pillai, 2007; Rhodes et al., 2005; Sinha et al., 2008; Tan et al., 2007). Myszy z grupy kontrolnej (K) miały stały dostęp do wody pitnej, otrzymywały również 0,9% NaCl *per os* w dawce 20 µl o godzinie 10.00 rano (Tab. 2).

Po zakończeniu eksperymentu zwierzęta usypiano i dekapitowano, a następnie pobierano: mózg, wątrobę, nerki oraz jądra. Materiał po pobraniu płukany był w roztworze PBS w celu pozbycia się krwi. Następnie tkanki umieszczono w temperaturze -80°C i przetrzymywano w tej temperaturze aż do rozpoczęcia analiz. Wszystkie badania były wykonywane za zgodą Lokalnej Komisji Bioetycznej (nr 132/2013).

Tabela 2. Charakterystyka grup oraz dawki użyte w eksperymencie

SYMBOLICZNE OZNACZENIE GRUPY	TAURYNA	ALKOHOL
K (n=14)	-	-
T20 (n=14)	20 mg·kg ⁻¹	-
T40 (n=14)	40 mg·kg ⁻¹	-
A15 (n=14)	-	15%
A30 (n=14)	-	30%
INT1 (n=14)	20 mg·kg ⁻¹	15%
INT2 (n=14)	40 mg·kg ⁻¹	30%

2. Morfologia krwi

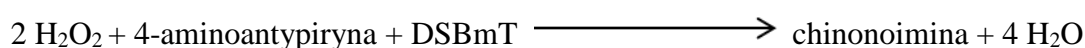
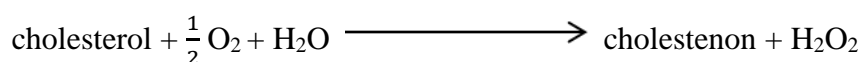
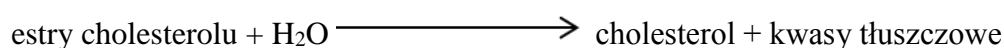
Parametry morfologiczne krwi (Hb, MCV, PLT, RBC i WBC) oznaczono przy użyciu analizatora BC-3600 Auto Hematology Blood Analyzer (Mindray, Niemcy) w 17 µl krwi pełnej.

3. Biochemia krwi

3.1. Oznaczanie poziomu cholesterolu HDL

Do oznaczenia stężenia cholesterolu frakcji HDL wykorzystano gotowy zestaw firmy BioSystems S.A. (Hiszpania). Oznaczenie wykonano na spektrofotometrze UV/VIS Marcel s330 przy długości fali $\lambda=600$ nm oraz w temperaturze 37°C.

Zasada metody. Jest to metoda enzymatyczna, w której dochodzi do kolorymetrycznego oznaczenia cholesterolu obu frakcji w oparciu o sprzężone reakcje.



Skład zestawu. W skład zestawu do oznaczania cholesterolu HDL wchodzi:

- **odczynnik A** (bufor Good'a, oksydaza cholesterolowa w stężeniu wyższym niż $1 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$, peroksydaza w stężeniu niższym niż $1 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$, $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ N,N-bis(4-sulfobutylo)-m-toluidyna (DSBmT) oraz $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ akcelerator),
- **odczynnik B** (bufor Good'a, esteraza cholesterolowa w stężeniu większym niż $1,5 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$, $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 4-aminoantypiryna, oksydaza askorbinowa w stężeniu niższym niż $3 \text{ KU}\cdot\text{l}^{-1}$, detergent),
- **kalibrator** (surowica o znanym stężeniu HDL = $57,1 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ oraz LDL = $67,1 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$).

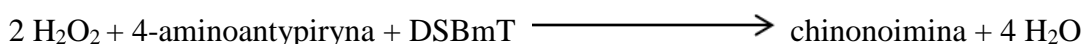
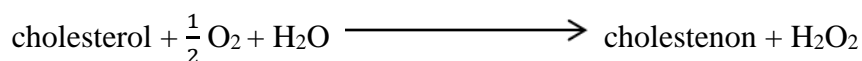
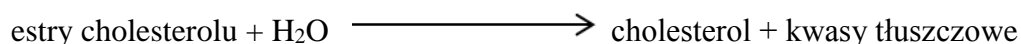
Wykonanie oznaczenia. W kuwecie o drodze optycznej 1 cm zmieszano $750 \mu\text{l}$ odczynnika A z $7 \mu\text{l}$ badanej próbki (lub z $7 \mu\text{l}$ kalibratora w przypadku próby ślepej) i odczytano absorbancję po 5 minutach pomiaru. Następnie do kuwety dodano $250 \mu\text{l}$ odczynnika B, ponownie zmieszano, odczytano absorbancję po kolejnych 5 minutach pomiaru. Otrzymane wyniki zostały przeliczone na stężenie cholesterolu wyrażone w $\text{mM}\cdot\text{l}^{-1}$ przy zastosowaniu poniższego wzoru:

$$C \text{ kalibratora} \times \frac{(A_2 - A_1)_{\text{próbki}}}{(A_2 - A_1)_{\text{kalibratora}}} = C \text{ cholesterolu w próbce}$$

3.2. Oznaczanie poziomu cholesterolu LDL

Do oznaczenia stężenia cholesterolu frakcji LDL wykorzystano gotowy zestaw firmy BioSystems S.A. (Hiszpania). Oznaczenie wykonano na spektrofotometrze UV/VIS Marcel s330 przy długości fali $\lambda = 546 \text{ nm}$ oraz w temperaturze 37°C .

Zasada metody. Jest to metoda enzymatyczna, w której dochodzi do kolorymetrycznego oznaczenia cholesterolu obu frakcji w oparciu o sprzężone reakcje.



Skład zestawu. W skład zestawu do oznaczania cholesterolu LDL wchodzi:

- **odczynnik A** (bufor MES w stężeniu wyższym niż $30 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, oksydaza cholesterolowa w stężeniu niższym niż $1,5 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$, esteraza cholesterolowa w stężeniu niższym niż $1,5 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 4-aminoantypiryna, oksydaza askorbinowa w stężeniu wyższym niż $3 \text{ U}\cdot\text{l}^{-1}$, peroksydaza w stężeniu wyższym niż $1 \text{ U}\cdot\text{l}^{-1}$, detergent o $\text{pH}=6,3$),

- **odczynnik B** (bufor MES w stężeniu wyższym niż $30 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ N,N-bis(4-sulfobutylo)-m-toluidyna (DSBmT), detergent o $\text{pH}=6,3$),
- **kalibrator** (surowica o znanym stężeniu HDL = $57,1 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ oraz LDL = $67,1 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$).

Wykonanie oznaczenia. W kuwecie o drodze optycznej 1 cm zmieszano 750 μl odczynnika A z 7 μl badanej próbki (lub z 7 μl kalibratora w przypadku próby ślepej) i odczytano absorbancję po 3 minutach pomiaru. Następnie do kuwety dodano 250 μl odczynnika B, ponownie zmieszano, odczytano absorbancję po kolejnych 5 minutach pomiaru. Otrzymane wyniki zostały przeliczone na stężenie cholesterolu wyrażone w $\text{mM}\cdot\text{l}^{-1}$ przy zastosowaniu poniższego wzoru:

$$C \text{ kalibratora} \times \frac{(A_2 - A_1)_{\text{próbki}}}{(A_2 - A_1)_{\text{kalibratora}}} = C \text{ cholesterolu w próbce}$$

3.3. Oznaczanie aktywności fosfatazy zasadowej (ALP)

Oznaczenie wykonano w surowicy krwi przy użyciu gotowego zestawu do oznaczania aktywności fosfatazy zasadowej (BioSystems S.A., Hiszpania). Do oznaczenia wykorzystano spektrofotometr UV/VIS Marcel s330 przy długości fali $\lambda=405 \text{ nm}$ oraz w temperaturze 37°C . Zasada metody. Fosfataza zasadowa w środowisku alkalicznym katalizuje przeniesienie grupy fosforanowej z 4-nitrofenylofosforanu na 2-amino-2-metylo-1-propanol (AMP). Produktem reakcji, zgodnie z poniższym równaniem jest 4-nitrofenol, a katalityczne stężenie ALP oznaczane jest na podstawie szybkości tworzenia się 4-nitrofenolu.



Skład zestawu. W skład zestawu do oznaczania aktywności ALP wchodzi:

- **odczynnik A** ($0,4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 2-amino-2-metylo-1-propanol, $1,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ siarczan cynku, $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ kwas N-hydroksyetyloetylenodiaminotrioctowy, $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ octan magnezu),
- **odczynnik B** ($60 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 4-nitrofenylofosforan).

Odczynniki po zmieszaniu w stosunku 4:1 stanowią odczynnik roboczy.

Wykonanie oznaczenia. W kuwecie o drodze optycznej 1 cm zmieszano 1 ml odczynnika roboczego z 20 μl badanej próbki (lub z 20 μl wody destylowanej w przypadku próby ślepej). Wymieszano, włożono do spektrofotometru i odczytano absorbancję początkową. Pomiaru dokonywano przez 3 minuty (3 kolejne pomiary w odstępach jednonminutowych). Następnie

obliczano różnicę pomiędzy kolejnymi pomiarami absorbancji oraz średnią absorbancję na minutę ($\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$). Uzyskane wyniki przeliczono na aktywność ALP wyrażoną w $\text{U} \cdot \text{l}^{-1}$ według poniższego wzoru:

$$\Delta A \cdot \text{min}^{-1} \times \frac{V_t \times 10^6}{\epsilon \times l \times V_s} = \text{U} \cdot \text{l}^{-1}$$

ϵ - absorbancja molowa,

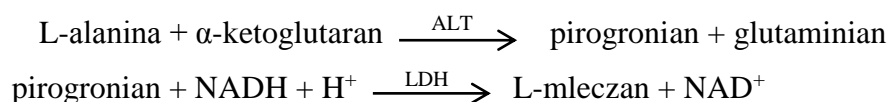
l – droga optyczna,

V_t – całkowita objętość reakcji,

V_s – objętość badanej próby,

3.4. Oznaczanie aktywności aminotransferazy alaninowej (ALT)

Oznaczenie wykonano w surowicy krwi przy użyciu gotowego zestawu do oznaczania aktywności aminotransferazy alaninowej (Stamar, Polska). Do oznaczenia wykorzystano spektrofotometr UV/VIS Marcel s330 przy długości fali $\lambda=340$ nm oraz w temperaturze 37°C . Zasada metody. Aminotransferaza alaninowa katalizuje przeniesienie grupy aminowej z L-alaniny na α -ketoglutaran, tworząc pirogronian i L-glutaminian. Stężenie katalityczne ALT oznacza się na podstawie szybkości utleniania NADH do NAD^+ podczas sprzężonej reakcji z dehydrogenazą mleczanową (LDH):



Skład zestawu. W skład zestawu do oznaczania aktywności ALT wchodzi:

- **odczynnik A** ($125 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ bufor TRIS o $\text{pH}=7,4$, $680 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ L-alanina, dehydrogenaza mleczanowa w stężeniu równym bądź wyższym $2000 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$),
- **odczynnik B** ($97 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ 2-oksoglutaran, $1,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NADH).

Odczynniki po zmieszaniu w stosunku 4:1 stanowią odczynnik roboczy.

Wykonanie oznaczenia. W kuwecie o drodze optycznej 1 cm mieszało 1 ml odczynnika roboczego z $120 \mu\text{l}$ badanej próbki (lub z $120 \mu\text{l}$ wody destylowanej w przypadku próby ślepej). Wymieszano, włożono do spektrofotometru, inkubowano przez minutę w temperaturze 37°C i odczytano absorbancję początkową. Pomiaru dokonywano przez 3 minuty (3 kolejne pomiary

w odstępach jednoczynowych). Następnie obliczano różnicę pomiędzy kolejnymi pomiarami absorbancji oraz średnią absorbancję na minutę ($\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$). Uzyskane wyniki przeliczono na aktywność ALT wyrażoną w $\text{U} \cdot \text{l}^{-1}$ według poniższego wzoru:

$$\Delta A \cdot \text{min}^{-1} \times \frac{V_t \times 10^6}{\epsilon \times l \times V_s} = \text{U} \cdot \text{l}^{-1}$$

ϵ - absorbancja molowa,

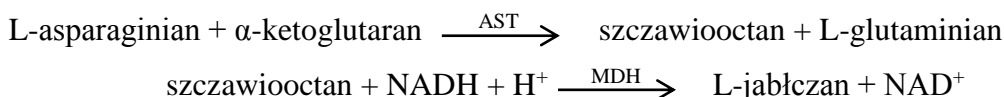
l - droga optyczna,

V_t - całkowita objętość reakcji,

V_s - objętość badanej próby,

3.5. Oznaczanie aktywności aminotransferazy asparaginowej (AST)

Oznaczenie wykonano w surowicy krwi przy użyciu gotowego zestawu do oznaczania aktywności aminotransferazy asparaginowej (Stamar, Polska). Do oznaczenia wykorzystano spektrofotometr UV/VIS Marcel s330 przy długości fali $\lambda=340$ nm oraz w temperaturze 37°C . Zasada metody. Aminotransferaza asparaginowa katalizuje przeniesienie grupy aminowej z L-asparaginianu na α -ketoglutaran, tworząc szczawiooctan i L-glutaminian. Stężenie katalityczne ALT oznacza się na podstawie szybkości utleniania NADH do NAD^+ podczas sprzężonej reakcji z dehydrogenazą jabłczanową (MDH):



Skład zestawu. W skład zestawu do oznaczania aktywności ALT wchodzi:

- **odczynnik A** ($100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ bufor TRIS o $\text{pH}=7,8$, $330 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ L-asparaginian, dehydrogenaza mleczanowa w stężeniu równym bądź wyższym $2000 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$, dehydrogenaza jabłczanowa w stężeniu równym bądź wyższym $1000 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$),
- **odczynnik B** ($78 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ 2-oksoglutaran, $1,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NADH).

Odczynniki po zmieszaniu w stosunku 4:1 stanowią odczynnik roboczy.

Wykonanie oznaczenia. W kuwecie o drodze optycznej 1 cm mieszało 1 ml odczynnika roboczego ze $100 \mu\text{l}$ badanej próbki (lub ze $100 \mu\text{l}$ wody destylowanej w przypadku próby ślepej). Wymieszano, włożono do spektrofotometru, inkubowano przez minutę w temperaturze 37°C i odczytano absorbancję początkową. Pomiaru dokonywano przez 3 minuty (3 kolejne

pomiary w odstępach jednonominutowych). Następnie obliczano różnicę pomiędzy kolejnymi pomiarami absorbancji oraz średnią absorbancję na minutę ($\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$). Uzyskane wyniki przeliczono na aktywność AST wyrażoną w $\text{U} \cdot \text{l}^{-1}$ według poniższego wzoru:

$$\Delta A \cdot \text{min}^{-1} \times \frac{V_t \times 10^6}{\epsilon \times l \times V_s} = \text{U} \cdot \text{l}^{-1}$$

ϵ - absorbancja molowa,

l – droga optyczna,

V_t – całkowita objętość reakcji,

V_s – objętość badanej próby,

4. Enzymy antyoksydacyjne

4.1. Odczynniki chemiczne użyte do oznaczenia aktywności enzymów antyoksydacyjnych

Do analizy aktywności enzymów antyoksydacyjnych użyto następujących odczynników:

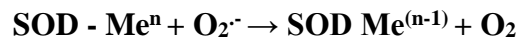
- **buforu KP** (8,7 g K_2HPO_4 rozpuszczone w 1000 ml wody destylowanej + 6,8 g KH_2PO_4 (w drugiej zlewce) rozpuszczone w 1000 ml wody destylowanej - dodane do roztworu K_2HPO_4 aż do uzyskania roztworu o $\text{pH}=7,0$ + 10 mg BSA - rozpuszczone w 100 ml buforu KP,
- **roztworu ksantyny** (1,87 mg ksantyny + 0,5 ml 1M NaOH + bufor KP),
- **cytochromu C**,
- **1% p-fenylo-diaminy**,
- **30% H_2O_2** .

4.2. Przygotowanie supernatantów

Homogenizacji 200 mg tkanki (w przypadku mózgu) oraz 42 mg tkanki (uśredniona masa dla jąder) dokonano w homogenizatorze CAT X 360 (CAT, Niemcy) w 2 ml buforu KP. Otrzymane homogenaty wirowano przez 10 minut w wirówce z chłodzeniem MPW-365 (Med. Instruments, Polska) w temperaturze 4°C przy 14 000 obrotów na minutę.

4.3. Oznaczanie aktywności SOD według metody Rice-Evans (1991) w supernatantach mózgu oraz jąder

Wszystkie znane dysmutazy są enzymami efektywnymi, katalizującymi reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego do tlenu cząsteczkowego i nadtlenu wodoru. Reakcja ta jest reakcją dwuetapową. W pierwszym etapie dochodzi do redukcji jonu metalu z równoczesnym uwolnieniem tlenu cząsteczkowego. W drugim etapie reakcji dochodzi do utlenienia jonu metalu w obecności anionorodnika ponadtlenkowego oraz wodoru z równoległym wygenerowaniem nadtlenu wodoru.



Do oznaczania aktywności SOD niezbędne jest przygotowanie mieszaniny reakcyjnej składającej się z:

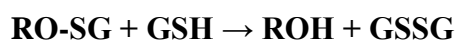
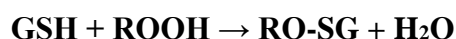
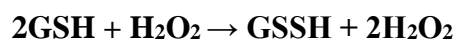
- 23 ml buforu KP,
- 2,5 ml ksantyny,
- 5 mg cytochromu C.

Tak przygotowana mieszanina wymaga godzinnego napowietrzania w ciemności, na mieszadle magnetycznym.

Oznaczenia aktywności SOD dokonano umieszczając w kuwecie o drodze optycznej 1 cm próbki zawierające: 900 µl mieszaniny reakcyjnej, 4 µl oksydazy ksantynowej oraz 4 µl badanego supernatantu (w przypadku próby ślepej wyłącznie 900 µl mieszaniny reakcyjnej oraz 4 µl oksydazy ksantynowej). Kuwetę z całą zawartością umieszczono w spektrofotometrze UV/VIS Marcel s330, a następnie dokonywano odczytu ekstynkcyj przy długości fali $\lambda=550$ nm, co 30 sekund przez 2 minuty. Aktywność SOD wyrażono w $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka.

4.4. Oznaczanie aktywności GPx według zmodyfikowanej metody Lück (1962) w supernatantach mózgu oraz jąder

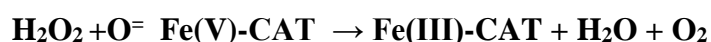
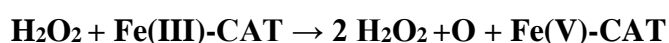
Peroksydazy stanowią grupę enzymów charakteryzujących się zdolnością redukcji zarówno nadtlenu wodoru nieorganicznych (H_2O_2) jak i organicznych (ROOH). Produktem pośrednim tych reakcji jest kwas selenowy. GPx katalizuje reakcje pomiędzy H_2O_2 oraz ROOH, a GSH. Produktami tej tych reakcji są utleniony glutation (GSSG) oraz H_2O , zgodnie z poniższymi reakcjami:



Oznaczenia aktywności GPx dokonano umieszczając w kuwecie o drodze optycznej 1 cm próbki zawierające: 900 μl buforu KP, 50 μl 1% p-fenylodiaminy, 50 μl 30% H_2O_2 oraz 20 μl badanego supernatantu (w przypadku próby ślepej wyłącznie 900 μl buforu KP z EDTA, 50 μl 1% p-fenylodiaminy oraz 50 μl 30% H_2O_2). Kuwetę z całą zawartością umieszczono w spektrofotometrze UV/VIS Marcel s330, a następnie dokonywano odczytu ekstynkcji przy długości fali $\lambda = 460 \text{ nm}$, co 20 sekund przez 1 minutę. Aktywność GPx wyrażono w $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka.

4.5. Oznaczanie aktywności CAT według metody Aebi (1962) w supernatantach mózgu oraz jąder

Oznaczanie aktywności CAT bazuje na pomiarze szybkości rozkładu H_2O_2 . Cechą charakterystyczną H_2O_2 jest łatwość absorpcji promieniowania nadfioletowego. Zatem wprowadzenie do mieszaniny katalazy pozwala odnotować spadek absorpcji promieniowania przez roztwór zawierający H_2O_2 . Reakcja rozkładu H_2O_2 jest reakcją dwuetapową. Pierwszy jej etap polega na redukcji H_2O_2 do H_2O z równoczesnym powstaniem Fe(V)-CAT. Drugi etap reakcji związany jest z utlenieniem kolejnej cząsteczki H_2O_2 , przy udziale uzyskanego w pierwszym etapie Fe(V)-CAT, efektem czego jest powstanie cząsteczki O_2 oraz H_2O .



Rozkład nadtlenu wodoru z udziałem katalazy następuje szybko - w ciągu minuty enzym ten rozkłada 6 mln cząsteczek H_2O_2 . Za jednostkę aktywności przyjmuje się taką ilość enzymu, która w ciągu minuty rozkłada 1 μmol nadtlenu wodoru, czyli powoduje szybkość spadku absorbancji nadtlenu wodoru równą 0,036 jednostek absorbancji w ciągu minuty (w obecności 1 ml H_2O_2 , w kuwecie o drodze optycznej 1 cm). Do wykonania oznaczenia niezbędne jest przygotowanie mieszaniny reakcyjnej złożonej z: 10 ml buforu KP (podgrzany w łaźni wodnej w temp. 25°C , a następnie ustawiony na mieszadle magnetycznym) oraz 200 μl H_2O_2 (woda destylowana + 30% H_2O_2 - proporcja 2:1). Po ustabilizowaniu się tlenomierza HI 9143 (Hanna

Instruments, USA) dokonano oznaczenia aktywności katalazy poprzez dodanie do mieszaniny reakcyjne 15 μ l próbki. Pomiar prowadzono przez 1 minutę, odczytując wynik co 10 sekund. Aktywność CAT wyrażono w $U \cdot mg^{-1}$ białka.

5. Zredukowany glutation (GSH)

5.1. Odczynniki chemiczne użyte do oznaczenia stężenia GSH

Do analizy poziomu GSH użyto następujących odczynników:

- **0,05M bufor octanowy o pH=5,0** (1,439 g $C_2H_3O_2Na$ + 0,43 ml CH_3COOH + woda destylowana do objętości 500 ml),
- **0,1M bufor fosforanowy o pH=7,4** (5,2 g NaH_2PO_4 + 58,1 g $Na_2HPO_4 \times 12 H_2O$ + 7,44 g $C_{10}H_{16}N_2O_8$ + woda destylowana do objętości 2000 ml),
- **10 mM roztwór EDTA** (7,44 g $C_{10}H_{16}N_2O_8$ + woda destylowana do objętości 2000 ml),
- **3,2 M bufor TRIS z HCl o pH=8,1** (387,2 g $H_2NC(CH_2OH)_3$ + woda destylowana + stężony HCl dodawany do uzyskania pożądanego stężenia),
- **10% TCA** (100 g TCA + woda destylowana do objętości 1000 ml),
- **DTNB** (10,5 mg DTNB + 10 ml 0,05M buforu octanowego o pH=5,0).

5.2. Przygotowanie supernatantów

Homogenizacji 100 mg tkanki dokonano w homogenizatorze z teflonowym tłokiem CAT X 360 (CAT, Niemcy) w 1 ml buforu fosforanowego 0,1M (4°C) o pH=7,4. Otrzymane homogenaty wirowano przez 15 minut w wirówce MPW-365 (Med. Instruments, Polska) przy 14 000 obrotów na minutę. Odbiałczanie supernatantów uzyskanych z homogenatów mózgu przeprowadzono poprzez dodanie 100 μ l 10% TCA oraz 100 μ l EDTA do 500 μ l supernatantu. Tak przygotowane próbki umieszczono w lodówce (4°C) na 10 minut, a następnie ponownie wirowano 5 minut przy 6 300 obrotów na minutę.

5.3. Oznaczenie poziomu GSH kolorymetryczną metodą Ellmana (1959) w supernatantach mózgu

Metoda Ellmana jest wykorzystywana do ilościowego oznaczenia GSH. Daje możliwość oznaczania niebiałkowych grup -SH w supernatantach tkanek, które wcześniej zostały odbiałczone TCA.

Oznaczenia zawartości GSH dokonano umieszczając na mikropłytkę próbki zawierające: 15 μ l 10 mM EDTA, 20 μ l 3,2 M buforu TRIS z HCl o pH=8,1 oraz 180 μ l wody destylowanej oraz 20 μ l odbiałczonych wcześniej supernatantów. Następnie do próbek odmierzone 10 μ l

DTNB. Po schłodzeniu w lodówce odczytano ekstynkcję, przy długości fali $\lambda=412$ nm, wykorzystując czytnik mikroplótek SUNRISE Infinite® F50 (TECAN, Szwajcaria). Stężenia GSH obliczono na podstawie krzywej kalibracyjnej i wyrażono w $\mu\text{M}\cdot\text{mg}^{-1}$ białka. Do przygotowania krzywej kalibracyjnej wykorzystano czysty glutation zredukowany (Sigma Aldrich, USA).

Żółte zabarwienie, jakie pojawia się po dodaniu DTNB jest wynikiem reakcji zachodzących pomiędzy DTNB, a grupami -SH. Produktem reakcji jest kwas nitrobenzoesowy (TNBA).

5.4. Oznaczanie zawartości białka całkowitego

Białko całkowite zostało oznaczone metodą Bradford (1976). W skład odczynnika Bradford wchodzi 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 ml 95% etanolu, 100 ml 85% kwasu ortofosforowego i 100 ml H_2O . W metodzie tej wykorzystywana jest zdolność wiązania barwnika błękitu brylantynowego Coomassie Brilliant Blue G-250 z białkami. Widmo absorpcji barwnika w środowisku kwaśnym charakteryzuje się maksimum przy 465 nm. Gdy białko zostanie związane maksimum to przesuwa się w stronę fal dłuższych i występuje przy 595 nm. Krzywą kalibracyjną wyznaczono na podstawie pomiarów białka wzorcowego BSA (albumina wołowa). Liniową zależność absorbancji od stężenia ustalono w zakresie stężenia białka 0,1-1,4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

W celu wykonania pomiarów na mikroplótkę naniesiono 4 μl badanej próbki i 200 μl odczynnika Bradford. Pomiaru dokonano na czytniku mikroplótek SUNRISE Infinite® F50 (TECAN, Szwajcaria), przy długości fali $\lambda=595$ nm.

6. Dialdehyd malonowy (MDA)

6.1. Odczynniki chemiczne użyte do oznaczenia stężenia dialdehydu malonowego

Do analizy stężenia dialdehydu malonowego użyto następujących odczynników:

- **bufor RIPA** (8,76 g NaCl + 10 ml 1M TRIS o pH=7,2 + 10 ml 10% SDS + 1 ml Triton X-100 + 10 g deoksychołanu + 10 ml 0,5M EDTA, dopełniono wodą do objętości 1000 ml),
- **inhibitor proteazy,**
- **kwas tiobarbiturowy (TBA),**
- **kwas octowy,**
- **1-2% NaOH,**
- **standard MDA,**
- **5% SDS.**

6.2. Przygotowanie supernatantów

Odważono 25 mg tkanki, a następnie przygotowano roztwór do homogenizacji używając 10 ml buforu RIPA i 10 μ l inhibitora proteazy w lodzie w stosunku 10:1. Materiał homogenizowano przy użyciu ultradźwiękowego homogenizatora SLPe (Branson, USA) z przygotowanym roztworem w proporcjach 25 mg tkanki na 250 μ l roztworu. Otrzymane homogenaty wirowano przy 4500 obrotów na minutę przez 20 minut w temperaturze -4°C w wirówce Universal 320R (Hettich Lab Technology, Niemcy).

6.3. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej

W celu przygotowania mieszaniny reakcyjnej zmieszano: 50 ml kwasu octowego + 37,5 ml NaOH + 12,5 ml wody destylowanej (pH=3,5). Do tak przygotowanej mieszaniny dodawano TBA w stosunku 530 mg TBA na każde 100 ml mieszaniny reakcyjnej.

6.4. Oznaczanie stężenia dialdehydu malonowego (MDA) metodą TBARS (według Okhawy, 1979; zmodyfikowaną) w supernatantach z jąder

Produktami końcowymi peroksydacji lipidów są toksyczne aldehydy, w tym m.in. dialdehyd malonowy. Przy oznaczaniu ich stężenia w tkankach wykorzystuje się fakt, iż związki te reagując z TBA tworzą barwne addukty, które z powodzeniem mogą być oznaczone spektrofotometrycznie.

W celu oznaczenia poziomu dialdehydu malonowego pobrano 100 μ l supernatantu i przelano do probówek odpornych na wysoką temperaturę. Następnie dodano 100 μ l 5% SDS, mieszano, a następnie dodano 4 ml mieszaniny reakcyjnej z TBA i gotowano przez 1 godzinę w 100°C . Następnie próbki schładzano na lodzie przez 10 minut w celu zablokowania reakcji i wirowano przy 3800 obrotach na minutę przez 10 minut w temperaturze -4°C . Badany materiał umieszczono na mikropłytkach w ilości 150 μ l i odczytywano ekstynkcje na czytniku mikropłytek Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific, USA) przy długości fali $\lambda=540$ nm. Stężenie MDA wyrażono w $\mu\text{M}\cdot\text{mg}^{-1}$ białka.

7. Analiza zmian histopatologicznych w wybranych narządach

Po zakończeniu eksperymentu, do oceny histopatologicznych zmian narządowych zostały pobrane wycinki (ok. 1 cm^3) nerek oraz jąder. Organy tuż po pobraniu zostały utrwalone poprzez zanurzenie w zneutralizowanym roztworze 10% formaliny buforowanej (Avantor, Polska) na okres 24 h. Celem przygotowania narządów do zatopienia w parafinie, odwodniono je przeprowadzając przez szereg alkoholi (etanol) o rosnącym stężeniu i prześwietlono

benzenem w łącznym czasie 23 h. Wycinki narządów zatopiono w parafinie. Skrawki parafinowe o grubości ok. 6 μm krojono za pomocą mikrotomu rotacyjnego HM 340E (Thermo Scientific, USA) i barwiono z użyciem hematoksyliny Harrisa i eozyny wodnej 1% (barwienie HE) zgodnie z przyjętą metodyką histologiczną (Bancroft i Gamble, 2008; Paulsen, 2010), a następnie poddano ocenie histopatologicznych zmian narządowych wykorzystując program NIS-Elements BR (Holandia) połączony z mikroskopem Nikon Eclipse Ni (Holandia) oraz z aparatem Nikon DS-Fi1c.

8. Oznaczanie stężenia mikro- i makroelementów w wybranych narządach

Materiał pozyskany w trakcie sekcji zwierząt (Tab. 3) i przeznaczony do analiz zawartości metali, tuż po pobraniu został zamrożony w temperaturze -20°C , w której był przechowywany do czasu prowadzenia analiz. W celu określenia średniego stężenia mikro- (Cu, Fe, Zn) i makroelementów (Mg) próbki wysuszono (do uzyskania stałej masy, 60°C , suszarka SUP-100W, WAMED, Polska). Po uzyskaniu suchej masy próbki mineralizowano w kwasie azotowym (65%, Baker Analyzed, JT Baker, USA) wykorzystując otwarty system mineralizacji (Velp Scientifica DK20, Włochy), w temperaturze do 140°C . Gotowe mineralizaty rozcieńczono ultraczystą wodą ($18.2\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ w 25°C , Direct-Q 3, Merck-Millipore, USA) do objętości 10 ml.

Tabela 3. Charakterystyka procesu mineralizacji wybranych narządów

MATRYCA	ŚREDNIA ŚWIEŻA MASA PRÓBK (g)	OBJĘTOŚĆ UŻYTEGO 65% KWASU AZOTOWEGO (V) (ml)	CZAS MINERALIZACJI PRÓBK (h)
wątroba	0,96	4	8-16
nerki	0,21	4	7-15

Oznaczeń wybranych mikro- i makroelementów dokonano wykorzystując spektrometr absorpcji atomowej z atomizacją płomieniową (AAAnalyst 200, PerkinElmer, USA). Źródło promieniowania stanowiły lampy z katodą wnątkową. Wyniki końcowe (po uwzględnieniu granic oznaczalności oraz po przeliczeniu) przedstawiono w postaci μg metalu na 1 g suchej masy tkanki ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m.). Poprawność metody została sprawdzona względem certyfikowanych materiałów odniesienia. Długości fal oraz granice oznaczalności dla poszczególnych metali przedstawiono w Tabeli 4. Każda próbka oznaczana była dwukrotnie, a wartość średnia wykorzystywana była do dalszych analiz.

Tabela 4. Charakterystyka użytej metody analitycznej: długość fal, granice oznaczalności dla analizowanych metali, odzyski uzyskane dla certyfikowanych materiałów odniesienia (CRM) oraz względne odchylenie standardowe dla 10 powtórzeń

METAL	DŁUGOŚĆ FALI (nm)	GRANICE OZNACZALNOŚCI* (mg/l)	CRM	ODZYSK (%)	RSD (%)
Cu	324,8	0,035	SRM1577b	99,6	2,7
Fe	248,3	0,415	SRM1577b	101,6	6,2
Mg	285,2	0,017	-	-	-
Zn	213,9	0,024	SRM1577b	106,2	5,3

* granice wyliczone dla roztworu analizowanego,

Nie znaleziono odpowiedniego CRM dla Mg.

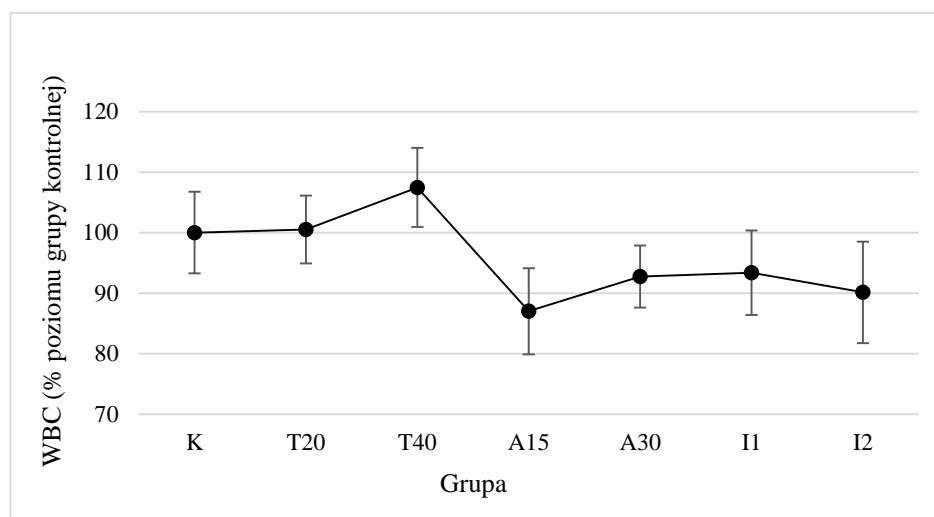
9. Analiza statystyczna

Ponieważ założenia dotyczące jednorodności wariancji nie zostały spełnione, dane przeanalizowano testem Welcha (nieparametryczna ANOVA z niezależnym szacowaniem wariancji). Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami zbadano wykonując analizę post-hoc testem RIR Tukey'a. We wszystkich analizach poziom istotności α wynosił 0,05. Wszystkich obliczeń i analiz dokonano z wykorzystaniem Excel 2013 (Microsoft) oraz STATISTICA 12 (StatSoft). Uzyskane wyniki zostały przedstawione na wykresach prezentujących wartości średnie \pm błąd standardowy (SE).

V. WYNIKI

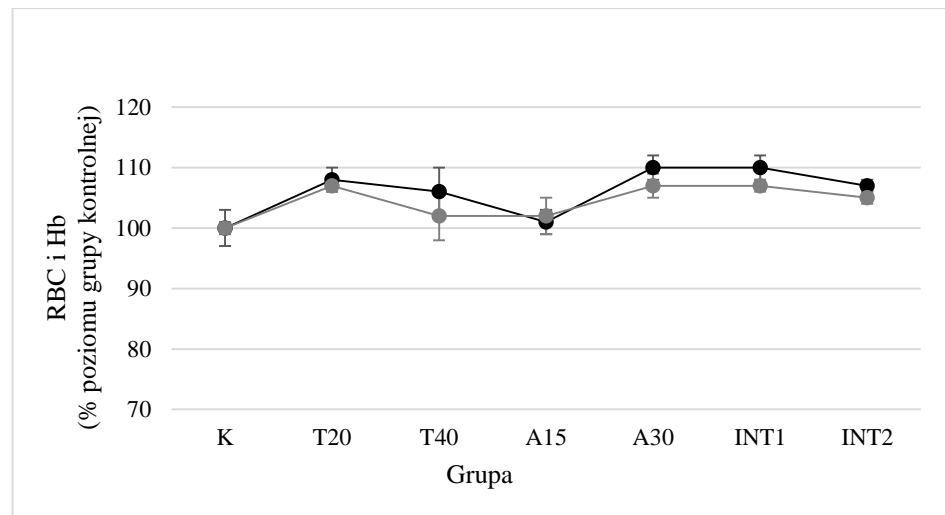
1. Parametry morfologiczne krwi

Poziom podstawowy zawartości leukocytów we krwi myszy z grupy kontrolnej wynosił $13,7 \pm 0,9 \times 10^3 \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Podawanie tauryny wywołało trend wzrostowy w zawartości leukocytów nawet do 7% (u zwierząt z grupy T40) w porównaniu z poziomem kontroli. Podawanie alkoholu, jak i obu substancji jednocześnie skutkowało trendem spadkowym w zawartości leukocytów maksymalnie do 87% poziomu podstawowego (u zwierząt z grupy A15). W grupach INT1 oraz INT2 zawartość leukocytów utrzymywała się na poziomie uzyskanym dla grupy A30 (Ryc. 4). Porównując zawartość leukocytów we wszystkich badanych grupach, zauważono znaczne różnice w wariancji i brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami (test Welcha, $p=0,397$).



Rycina 4. Procent zmian zawartości leukocytów ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) we krwi myszy z grup eksperymentalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Brak statystycznie istotnych różnic.

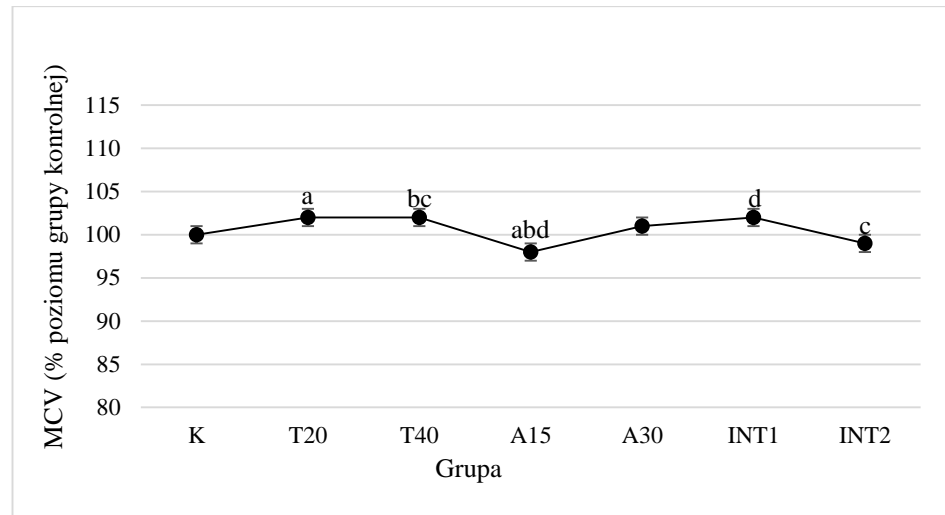
Poziom podstawowy zawartości erytrocytów oraz hemoglobiny wynosił odpowiednio $8,2 \pm 0,1 \times 10^6 \cdot \mu\text{l}^{-1}$ oraz $12,7 \pm 0,4 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1}$ we krwi myszy z grupy kontrolnej. U zwierząt ze wszystkich grup eksperymentalnych odnotowano wyższą zawartości erytrocytów o 2-7%, a także hemoglobiny o 1-10% w porównaniu z poziomem kontroli. Zawartość zarówno RBC, jak i hemoglobiny w grupach interakcyjnych, utrzymywała się na poziomie ich zawartości w grupie A30 (Ryc. 5). Porównując zawartość erytrocytów oraz hemoglobiny we wszystkich testowanych grupach, obserwowano brak różnic istotnych statystycznie pomiędzy tymi grupami (test Welcha, $p=0,266$ dla RBC oraz $p=0,063$ dla Hb).



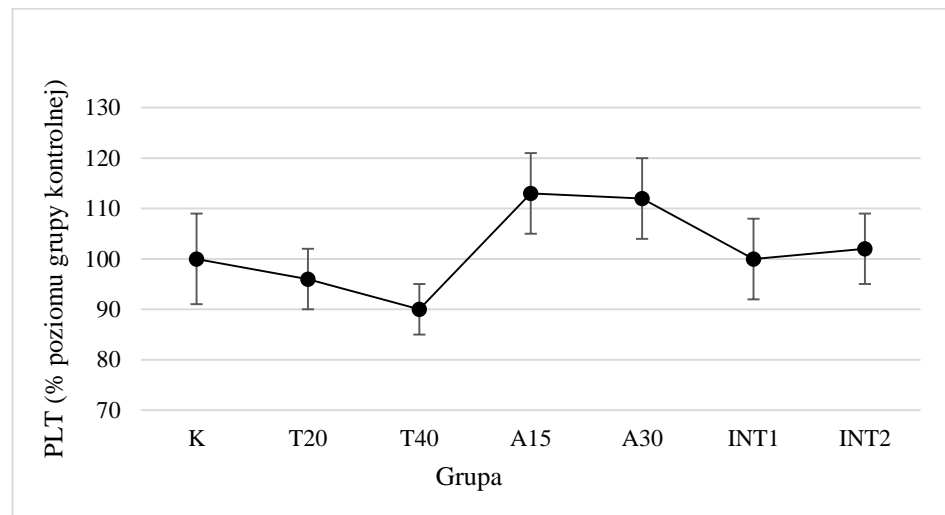
Rycina 5. Procent zmian zawartości erytrocytów (kolor szary) oraz hemoglobiny (kolor czarny) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) we krwi myszy z grup eksperymentalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Brak statystycznie istotnych różnic.

Średnia objętość erytrocytu (MCV) dla grupy kontrolnej wynosiła $48,9 \pm 0,3$ fl i stanowiła poziom podstawowy dla grup eksperymentalnych. W grupach T20, T40 oraz INT1 zaobserwowano trend wzrostowy w średniej objętości erytrocytu - o 2% w porównaniu z grupą kontrolną. Trend wzrostowy obserwowano również w grupie A30 - o 1% w porównaniu z grupą kontrolną. Trend spadkowy w porównaniu z poziomem kontroli odnotowano w grupach A15 oraz INT2, odpowiednio o 2% i 1% (Ryc. 6). W grupie INT1 obserwowano zwiększenie średniej objętości erytrocytu w stosunku do obu grup, w którym zwierzętom podawany był alkohol. W grupie INT2 efekt ten obserwowano tylko względem grupy A15. Analiza statystyczna wykazała istotne statystycznie różnice w średniej objętości erytrocytu pomiędzy zwierzętami z grupy A15, a zwierzętami z grup którym podawana była tauryna - T20 i T40 oraz zwierzętami z grupy interakcyjnej INT1, a także pomiędzy grupą T40, a INT2.

Poziom podstawowy zawartości trombocytów (PLT) we krwi myszy z grupy kontrolnej wynosił $320 \pm 28 \times 10^3 \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Ekspozycja na taurynę skutkowała obniżeniem zawartości trombocytów we krwi myszy do 10% (u zwierząt z grupy T40), natomiast ekspozycja na alkohol wiązała się z trendem wzrostowym w zawartości trombocytów nawet do 113% (u zwierząt z grupy A15), w porównaniu z grupą kontrolną. W obu grupach interakcyjnych zawartość płytek krwi zmniejszyła się w porównaniu do grup eksponowanych na alkohol. Porównując zawartość trombocytów pomiędzy badanymi grupami, nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy nimi (test Welcha, $p=0,325$) (Ryc. 7).



Rycina 6. Procent zmian średniej objętości erythrocytu ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) we krwi myszy z grup eksperymentalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Tymi samymi literami oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami.

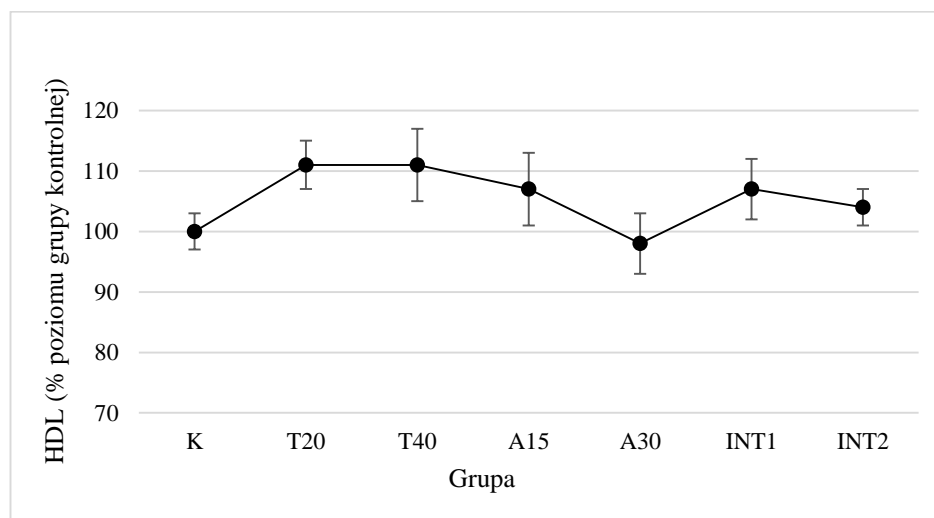


Rycina 7. Procent zmian zawartości trombocytów ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) we krwi myszy z grup eksperymentalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Brak statystycznie istotnych różnic.

2. Parametry biochemiczne krwi

Poziom podstawowy zawartości cholesterolu HDL w surowicy krwi myszy z grupy kontrolnej wyniósł $1,48 \pm 0,04 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Suplementacja tauryną spowodowała trend wzrostowy w poziomie cholesterolu HDL o 11% w porównaniu z grupą kontrolną. Również alkohol w niższej dawce (u zwierząt z grupy A15) wywołał wzrostowy trend w poziomie cholesterolu HDL - o 7%. Odwrotna reakcja obserwowana była u zwierząt z grupy A30, u których wyższa dawka alkoholu spowodowała 2% obniżenie poziomu cholesterolu HDL w porównaniu z grupą kontrolną. Podawanie obu substancji biologicznie czynnych jednocześnie skutkowało trendem wzrostowym w poziomie cholesterolu HDL o 4% i 7%, odpowiednio dla grup INT2 oraz INT1

(Ryc. 8). Porównując wartość tego parametru pomiędzy wszystkimi grupami, nie odnotowano statystycznie istotnych różnic pomiędzy nimi (test Welcha, $p=0,294$).

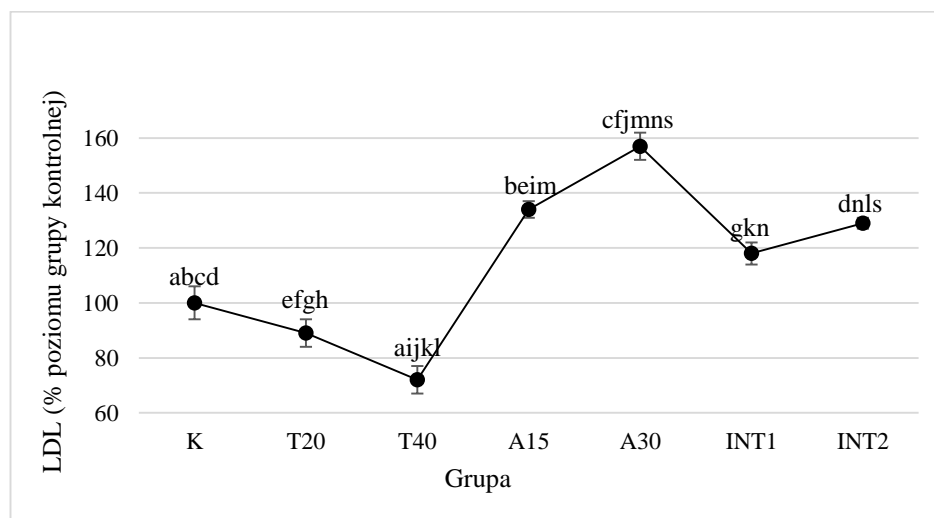


Rycina 8. Procent zmian poziomu cholesterolu HDL ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w surowicy krwi myszy z grup eksperymentalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Brak statystycznie istotnych różnic.

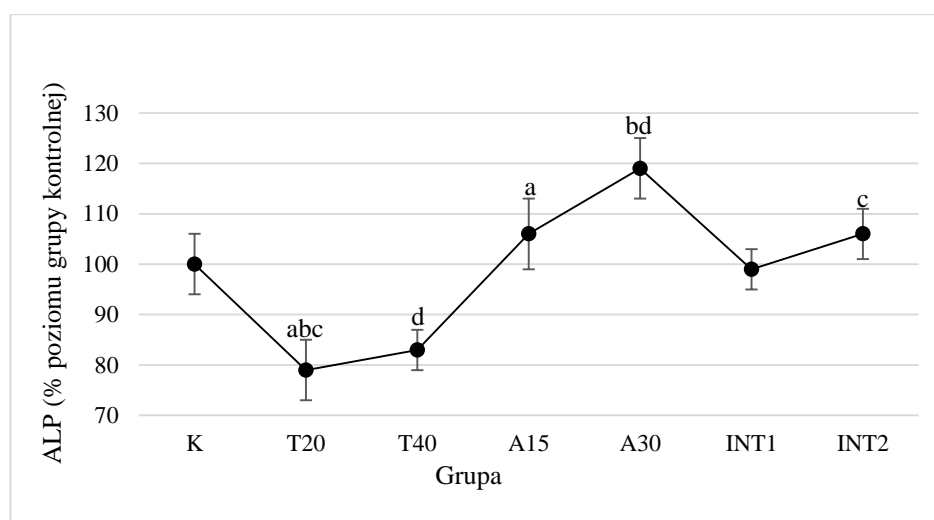
Poziom podstawowy zawartości cholesterolu LDL w surowicy krwi wynosił $1,68 \pm 0,11 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (u zwierząt z grupy kontrolnej). U zwierząt, którym podawana była tauryna obserwowano obniżenie poziomu cholesterolu LDL o 11% (dla grupy T20) i 18% (dla grupy T40). Podawanie samego alkoholu (niezależnie od dawki), jak i w połączeniu z tauryną skutkowało wzrostem poziomu cholesterolu LDL do 118%, 129%, 134% oraz 157% odpowiednio dla zwierząt z grup INT1, INT2, A15 oraz A30, w porównaniu do poziomu podstawowego (Ryc. 9). Analiza statystyczna wykazała istotne statystycznie różnice w zawartości cholesterolu LDL pomiędzy grupą kontrolną oraz grupami T40, A15, A30 oraz INT2. Istotne statystycznie różnice odnotowano także pomiędzy grupą T20, a grupami A15 i A30 oraz grupami interakcyjnymi (INT1 oraz INT2). Identyczną tendencję zaobserwowano dla grupy T40. Statystycznie istotne różnice wystąpiły także pomiędzy grupą A30, a grupami A15, INT1 oraz INT2.

Aktywność fosfatazy zasadowej w grupie kontrolnej wynosiła $39,12 \pm 2,44 \text{ U}\cdot\text{l}^{-1}$ i stanowiła poziom podstawowy dla grup eksperymentalnych. U zwierząt z grup T20, T40 oraz INT1 odnotowano trend spadkowy w jej aktywności: największy o 21% (dla zwierząt z grupy T20), najmniejszy o 1% (dla zwierząt z grupy INT1). Z kolei u zwierząt z grup A15, A30 i INT2 obserwowano trend wzrostowy w aktywności fosfatazy, nawet do 119% w porównaniu z poziomem podstawowym (dla zwierząt z grupy A30). W grupach, którym podawane były obie substancje biologicznie czynne odnotowano obniżenie aktywności ALP w stosunku do

grup A15 i A30. Aktywność enzymu istotnie różniła się pomiędzy grupą T20, a grupami A15, A30 i INT2 oraz pomiędzy grupami T40 i A30 (Ryc. 10).



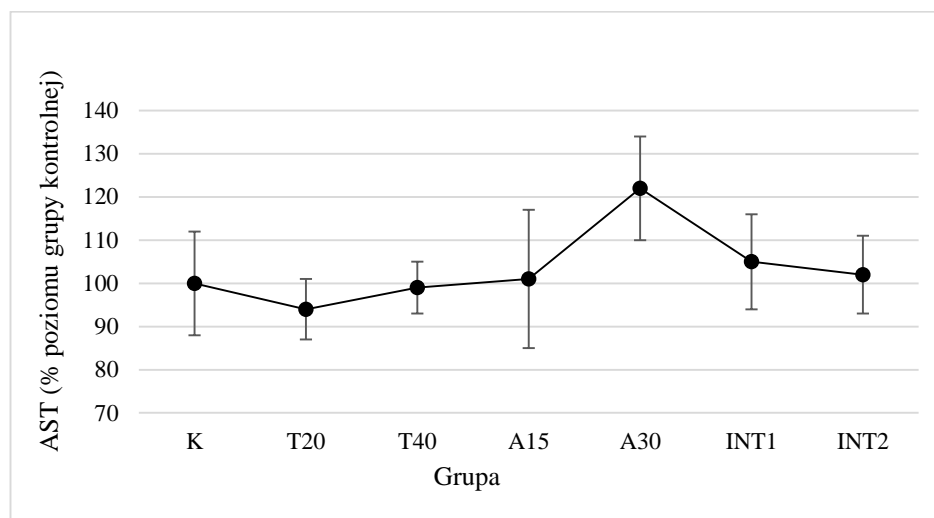
Rycina 9. Procent zmian poziomu cholesterolu LDL ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w surowicy krwi myszy z grup eksperymentalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Tymi samymi literami oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami.



Rycina 10. Procent zmian aktywności ALP ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w surowicy krwi myszy z grup eksperymentalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Tymi samymi literami oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami.

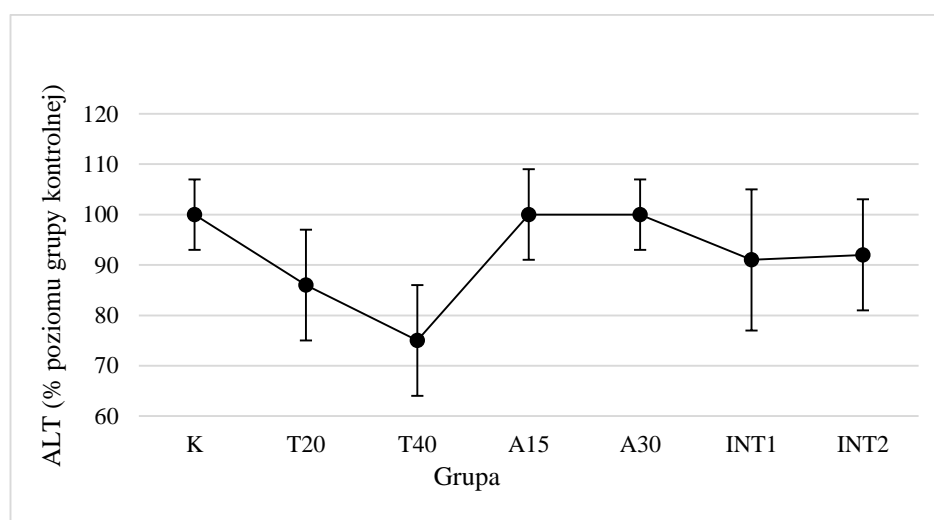
Poziom podstawowy aktywności aminotransferazy asparaginowej u zwierząt z grupy kontrolnej wyniósł $79,2 \pm 9,77 \text{ U}\cdot\text{l}^{-1}$ (Ryc. 11). Suplementacja tauryną wywołała trend spadkowy w aktywności enzymu - do 6% (w grupie T20). W pozostałych grupach eksperymentalnych obserwowano trend wzrostowy w aktywności aminotransferazy asparaginowej: najmniejszy o 1% (dla zwierząt z grupy A15), a największy o 22% (dla zwierząt z grupy A30). Co więcej, aktywność enzymu w grupach INT1 oraz INT2 uległa obniżeniu w porównaniu do grupy A30 i utrzymywała się na poziomie uzyskanym dla grupy A15.

Porównując aktywność enzymu pomiędzy badanymi grupami, nie wykazano istotnie statystycznych różnic pomiędzy nimi (test Welcha, $p=0,809$).



Rycina 11. Procent zmian aktywności AST ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w surowicy krwi myszy z grup eksperymentalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Brak statystycznie istotnych różnic.

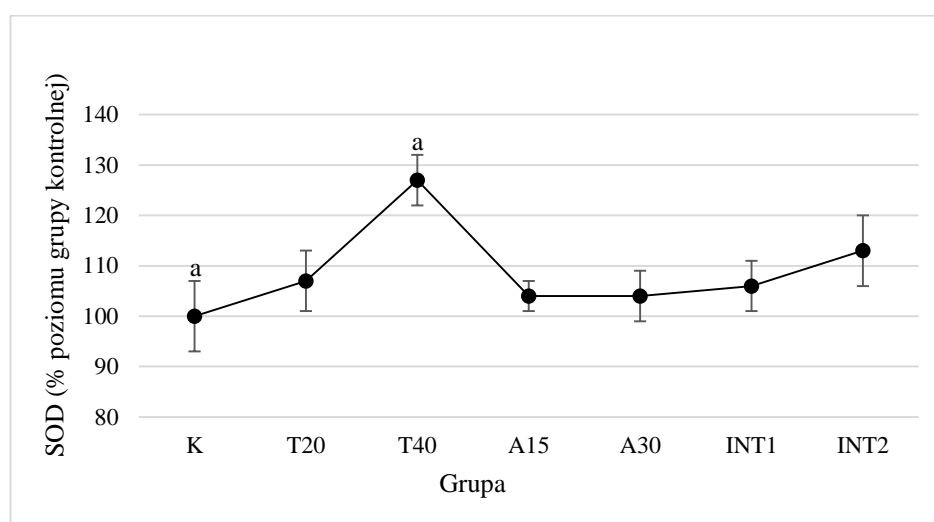
Poziom podstawowy aktywności aminotransferazy alaninowej dla zwierząt z grupy kontrolnej wynosił $31,18 \pm 2,05 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$. Ekspozycja na alkohol nie zmieniła aktywności enzymu - zarówno w grupie A15, jak i A30 utrzymywała się ona na poziomie kontroli. W pozostałych grupach odnotowano trend spadkowy w aktywności aminotransferazy alaninowej nawet do 75% (u zwierząt z grupy T40) w porównaniu do poziomu podstawowego (Ryc. 12). Porównując aktywność aminotransferazy alaninowej pomiędzy testowanymi grupami, nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie w jej aktywności (test Welcha, $p=0,334$).



Rycina 12. Procent zmian aktywności ALT ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w surowicy krwi myszy z grup eksperymentalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Brak statystycznie istotnych różnic.

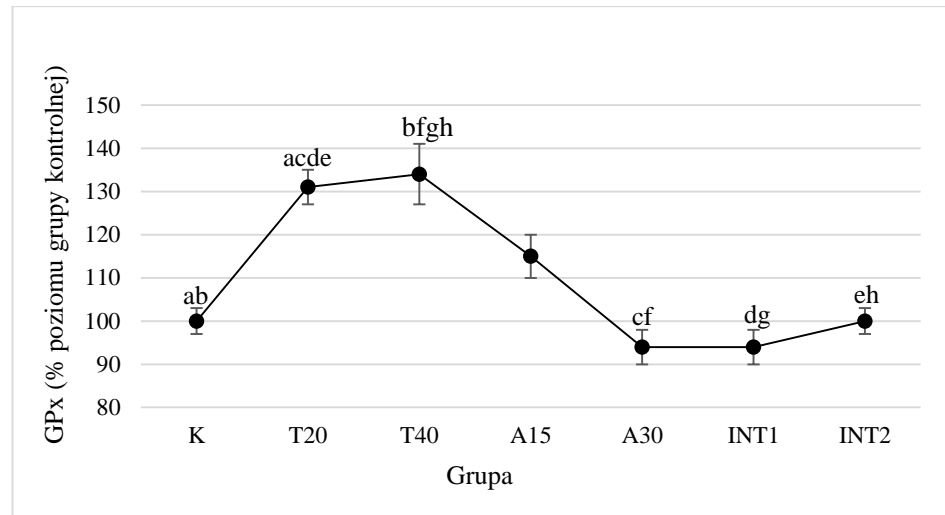
3. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz poziom MDA w jądrach

Poziom podstawowy aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w jądrach zwierząt z grupy kontrolnej wynosił $6,64 \pm 0,44 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka. We wszystkich z badanych grup odnotowano wzrost aktywności enzymu: najmniejszy dla zwierząt z grup A15 i A30 - o 4%, a najwyższy dla zwierząt z grupy T40 - o 27% w porównaniu z poziomem uzyskanym dla grupy kontrolnej (Ryc. 13). Analiza statystyczna wykazała istotne statystycznie różnice w aktywności dysmutazy ponadtlenkowej pomiędzy grupą kontrolną i grupą T40.



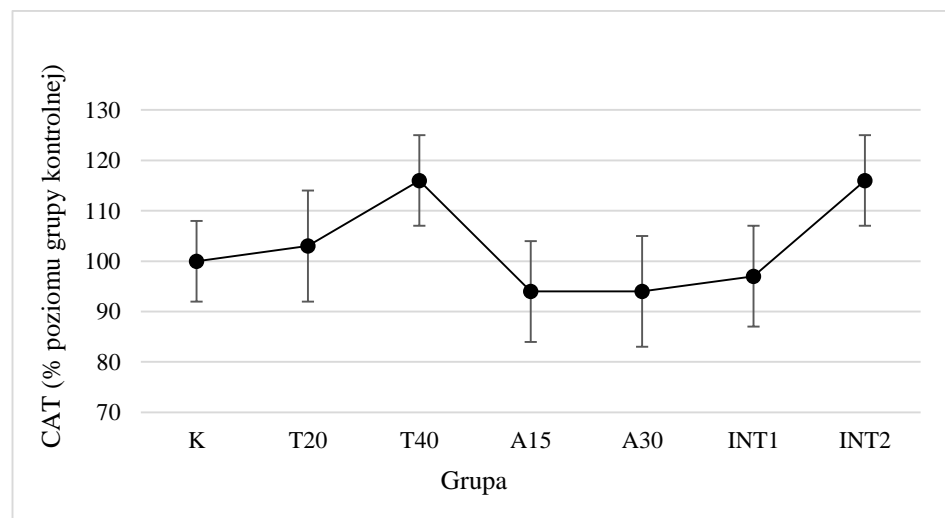
Rycina 13. Procent zmian aktywności SOD ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w jądrach myszy z grup eksperymentalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Tymi samymi literami oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami.

Aktywność peroksydazy glutationowej w jądrach myszy wynosiła $0,064 \pm 0,002 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka i stanowiła poziom podstawowy dla grup eksperymentalnych. W grupach suplementowanych tauryną oraz w grupie A15 obserwowano wzrost aktywności peroksydazy glutationowej nawet do 134% w porównaniu z poziomem grupy kontrolnej (dla zwierząt z grupy T40) (Ryc. 14). W grupach A30 oraz INT1 obserwowano 6% spadek aktywności enzymu, a w grupie INT2 aktywność peroksydazy utrzymywała się na poziomie uzyskanym dla grupy kontrolnej. Istotne statystycznie różnice w aktywności enzymu odnotowano pomiędzy grupą kontrolną, a grupami T20 i T40; pomiędzy grupą T20, a grupami A30, INT1 i INT2 oraz pomiędzy grupą T40, a grupami A30, INT1 oraz INT2.



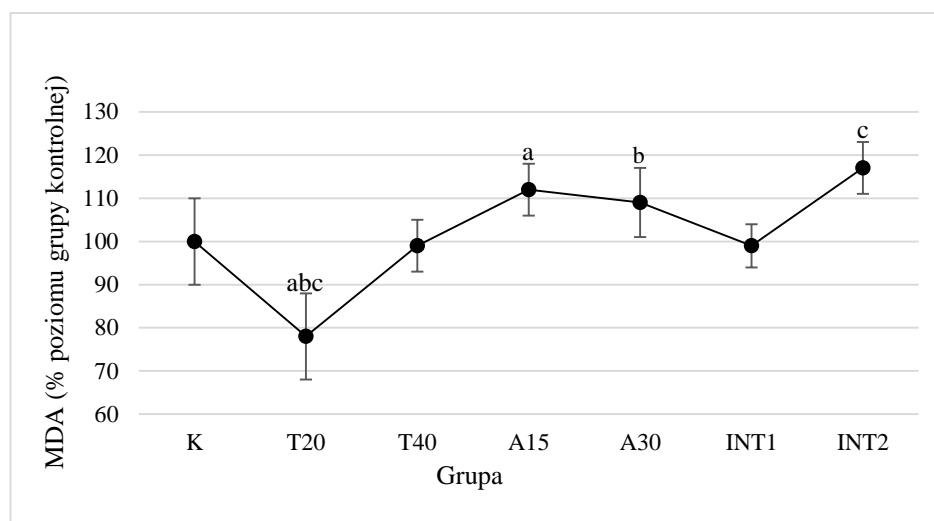
Rycina 14. Procent zmian aktywności GPx ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w jądrach myszy z grup eksperymentalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Tymi samymi literami oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami.

Aktywność katalazy w jądrach zwierząt z grupy kontrolnej wynosiła $1,35 \pm 0,11 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka, co stanowiło poziom podstawowy dla pozostałych grup. Trend wzrostowy w aktywności enzymu obserwowano w grupach suplementowanych tauryną oraz w grupie interakcyjnej INT2. Najwyższy wzrost - do 116% poziomu podstawowego - odnotowano w grupach T40 i INT2. Ekspozycja na alkohol wiązała się z trendem spadkowym w aktywności katalazy w jądrach o 6% dla obu grup. Także w grupie interakcyjnej INT1 odnotowano trend spadkowy w aktywności enzymu do 97% poziomu podstawowego (Ryc. 15). Aktywność katalazy w grupach INT1 i INT2 podwyższyła się w porównaniu do jej aktywności w grupach A15 i A30. Porównując aktywność katalazy pomiędzy badanymi grupami nie odnotowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy nimi (test Welcha, $p=0,578$).



Rycina 15. Procent zmian aktywności CAT ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w jądrach myszy z grup eksperymentalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Brak statystycznie istotnych różnic.

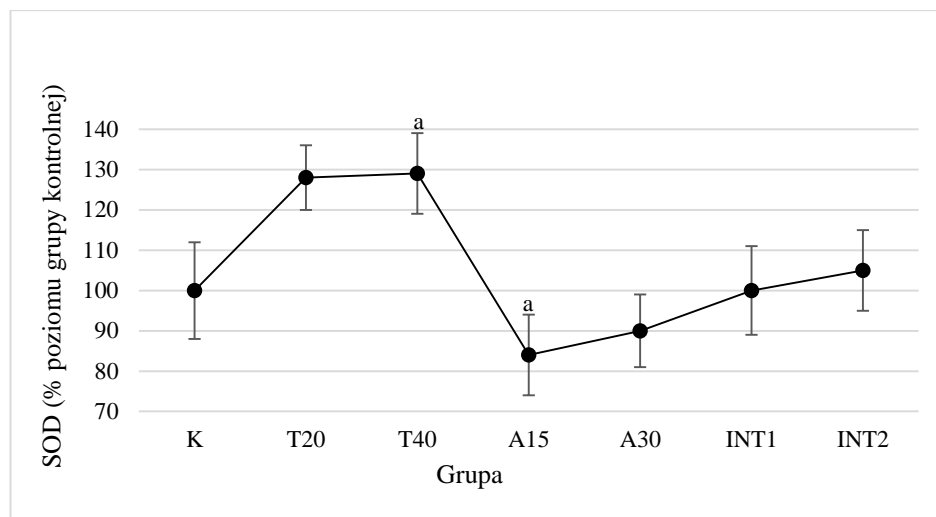
Poziom podstawowy zawartości dialdehydu malonowego w jądrach myszy z grupy kontrolnej wynosił $1,53 \pm 0,16 \mu\text{M}\cdot\text{mg}^{-1}$ białka. Suplementacja tauryną wywołała trend spadkowy w poziomie MDA w jądrach nawet o 22% w porównaniu z poziomem podstawowym (dla zwierząt z grupy T20). Trend ten był także widoczny w grupie INT1. W grupach A15, A30 oraz INT2 odnotowano trend wzrostowy w zawartości MDA odpowiednio do 112%, 109% oraz 117% w porównaniu do poziomu podstawowego (Ryc. 16). Tylko w grupie INT1 zawartość MDA spadła względem grup eksponowanych na alkohol. Analiza statystyczna wykazała istotne statystycznie różnice w poziomie MDA pomiędzy grupą T20, a grupami A15, A30 oraz INT2.



Rycina 16. Procent zmian zawartości MDA ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w jądrach myszy z grup eksperymentalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Tymi samymi literami oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami.

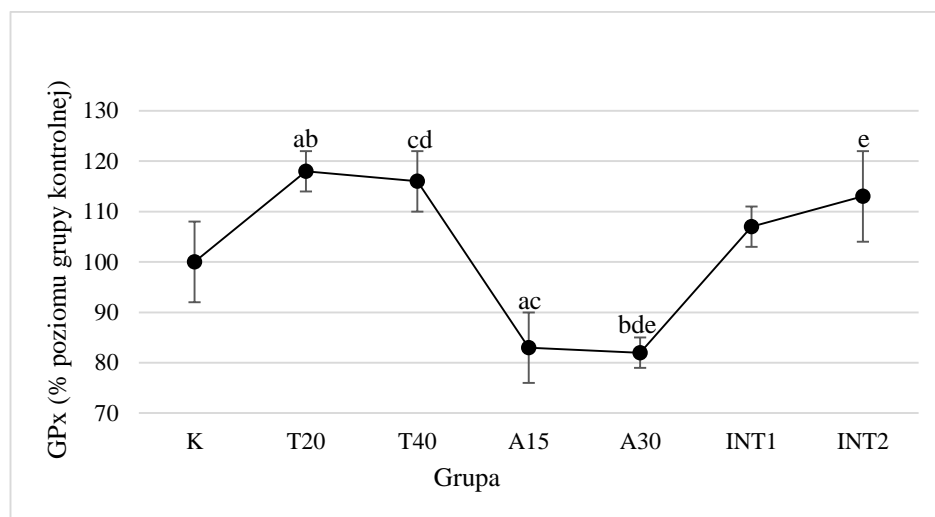
4. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz poziom GSH w mózgu

Poziom podstawowy aktywności SOD w mózgu wynosił $4,29 \pm 0,5 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ białka dla zwierząt z grupy kontrolnej. U zwierząt z grup suplementowanych tauryną oraz z grupy INT2 obserwowano trend wzrostowy w aktywności enzymu do 105%, 128% i 129% poziomu podstawowego, odpowiednio dla grup INT2, T20 i T40. W grupach A15 i A30 odnotowano trend spadkowy w aktywności dysmutazy ponadtlenkowej nawet o 16% w porównaniu z grupą kontrolną (u zwierząt z grupy A15). W grupie INT1 aktywność enzymu wróciła do poziomu kontroli. (Ryc. 17). W obu grupach interakcyjnych aktywność SOD wzrosła w porównaniu do grup A15 i A30. Statystycznie istotne różnice w aktywności enzymu występowały pomiędzy grupą T40 i A15.



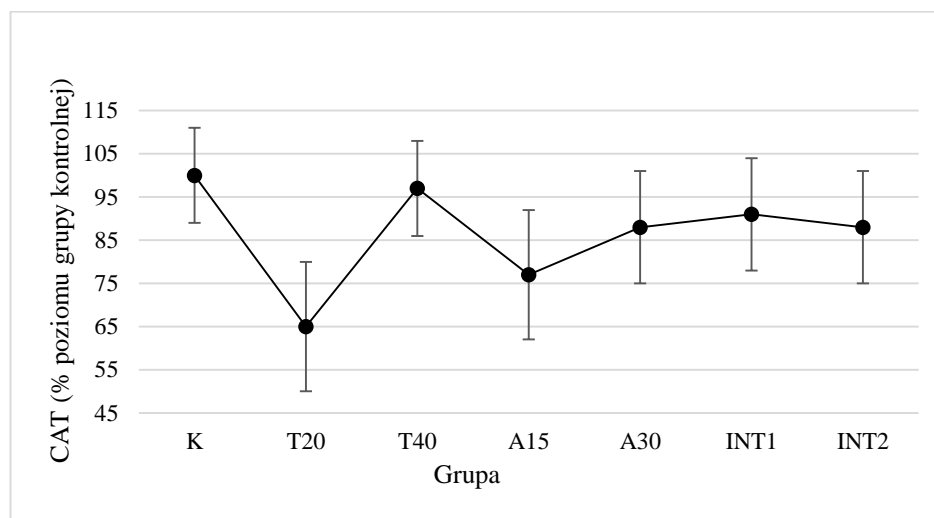
Rycina 17. Procent zmian aktywności SOD ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w mózgu myszy z grup eksperymentalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Tymi samymi literami oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami.

Aktywność GPx w mózgu myszy z grupy kontrolnej wynosiła $0,065 \pm 0,005 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka i stanowiła poziom podstawowy dla zwierząt z grup eksperymentalnych. Trend spadkowy w aktywności GPx w porównaniu do poziomu kontroli zaobserwowano w grupach A15 i A30, odpowiednio o 17% i 18%. W pozostałych grupach, to jest T20, T40, INT1 i INT2 obserwowano trend wzrostowy w aktywności enzymu nawet do 118% poziomu podstawowego (dla zwierząt z grupy T20). Aktywność GPx w grupach INT1 oraz INT2 uległa podwyższeniu w porównaniu do grupy A15, jak i A30 (Ryc. 18). Analiza statystyczna wykazała istnienie istotnych różnic w aktywności GPx w mózgu pomiędzy grupą T20, a grupami A15 i A30, pomiędzy grupą T40, a grupami A15 oraz A30, a także pomiędzy grupą A30 i grupą INT2.



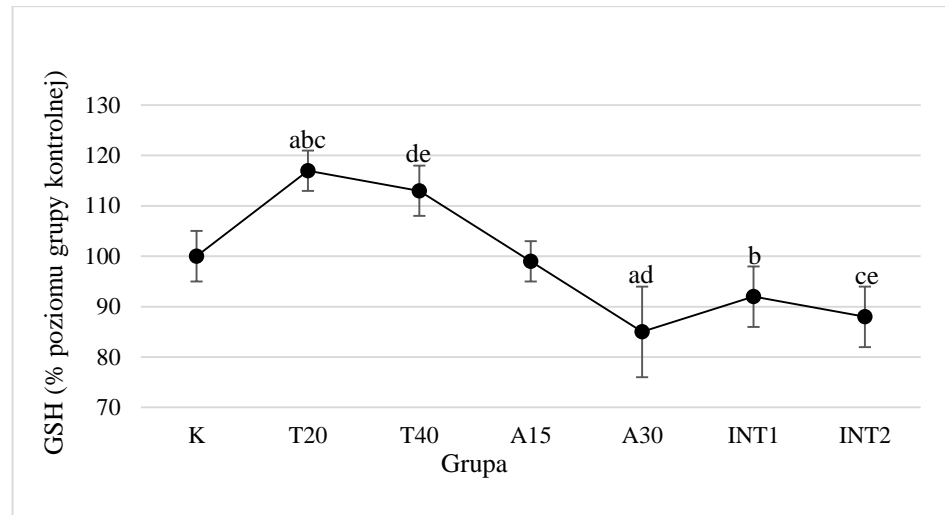
Rycina 18. Procent zmian aktywności GPx ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w mózgu myszy z grup eksperymentalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Tymi samymi literami oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami.

Poziom podstawowy aktywności CAT w mózgu myszy z grupy kontrolnej wynosił $2,07 \pm 0,23 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka. We wszystkich analizowanych grupach obserwowano trend spadkowy w aktywności enzymu: najmniejszy o 3% (dla zwierząt z grupy T40), a największy o 35% (dla zwierząt z grupy T20). Aktywność katalazy w grupach INT1 oraz INT2, utrzymywała się na poziomie uzyskanym dla grupy A30. Porównując aktywność katalazy pomiędzy wszystkimi badanymi grupami, obserwowano znaczne różnice w wariancji i brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami (test Welcha, $p=0,264$) (Ryc. 19).



Rycina 19. Procent zmian aktywności CAT ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w mózgu myszy z grup eksperymentalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Brak statystycznie istotnych różnic.

Poziom GSH w mózgu myszy z grupy kontrolnej wynosił $1,08 \pm 0,05 \mu\text{M} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka i stanowił poziom podstawowy dla grup eksperymentalnych. Suplementacja tauryną wywołała trend wzrostowy w poziomie GSH w mózgu do 117% oraz 113% w stosunku do poziomu kontroli, odpowiednio dla zwierząt z grup T20 i T40. W pozostałych grupach eksperymentalnych odnotowano trend spadkowy w poziomie GSH, nawet o 15% w porównaniu z grupą kontrolną (dla zwierząt z grupy A30). Jednak poziom GSH w mózgu zwierząt z grup INT1 oraz INT2 uległ podwyższeniu w porównaniu do poziomu uzyskanego dla grupy A30 (Ryc. 20). Statystycznie istotne różnice w poziomie mózgowego GSH występowały pomiędzy grupą T20, a grupami A30, INT1 i INT2, a także pomiędzy grupą T40 i grupami A30 oraz INT2.



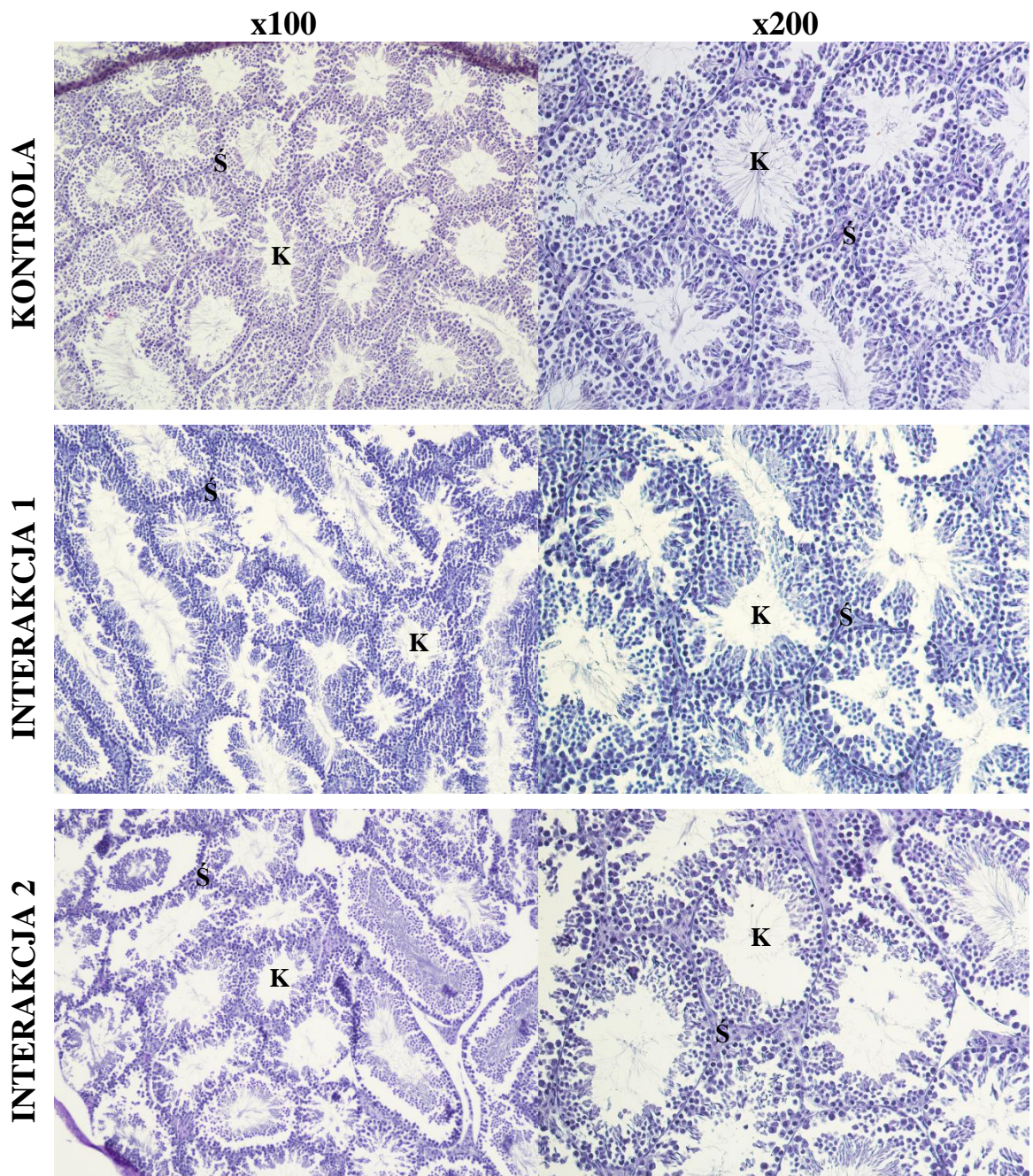
Rycina 20. Procent zmian zawartości GSH ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w mózgu myszy z grup eksperymentalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Tymi samymi literami oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami.

5. Ocena histologiczna jąder

Ośmiotygodniowe myszy z grupy kontrolnej wykazywały prawidłową budowę histologiczną jąder, odpowiednią dla ich wieku. Jądra myszy z grup eksperymentalnych po ekspozycji na taurynę, etanol, bądź kombinację obu substancji w ustalonych dawkach, nie wykazywały żadnych różnic w budowie histologicznej w porównaniu z grupą kontrolną (Ryc. 21).

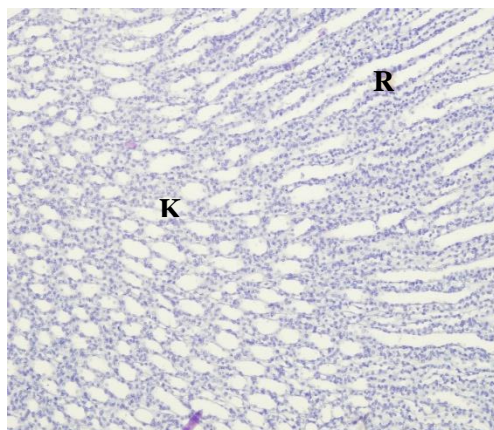
6. Ocena histologiczna nerek

Ośmiotygodniowe myszy z grupy kontrolnej wykazywały prawidłową i odpowiednią dla wieku zwierząt budowę histologiczną nerek. Także nerki myszy, którym podawana była tauryna, alkohol oraz kombinacja obu substancji we wcześniej ustalonych dawkach wykazywały prawidłową budowę histologiczną oraz brak istotnych różnic w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 22).

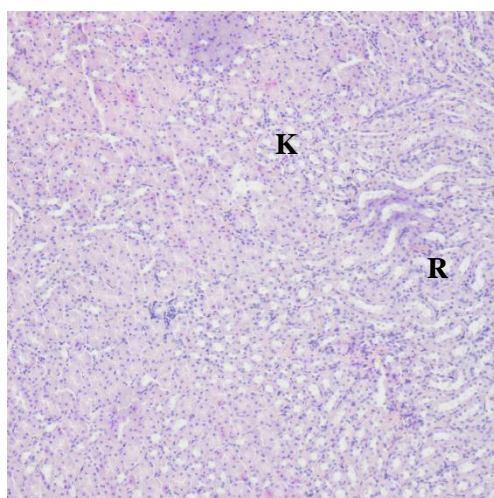


Rycina 21. Przekrój przez jądra dojrzałych myszy Swiss z grup kontrolnej, INT1 oraz INT2.
Barwienie H+E (K - kanaliki nasienne, Ś - tkanka śródmiąższowa).

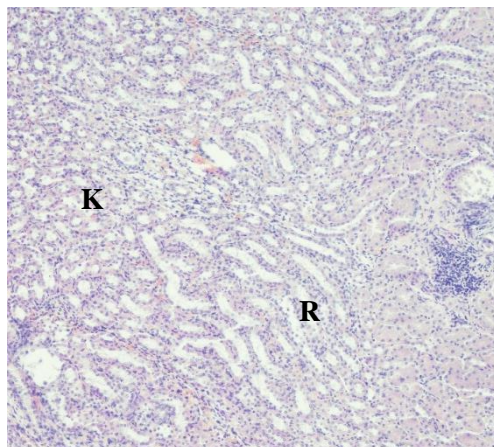
KONTROLA



INTERAKCJA 1



INTERAKCJA 2

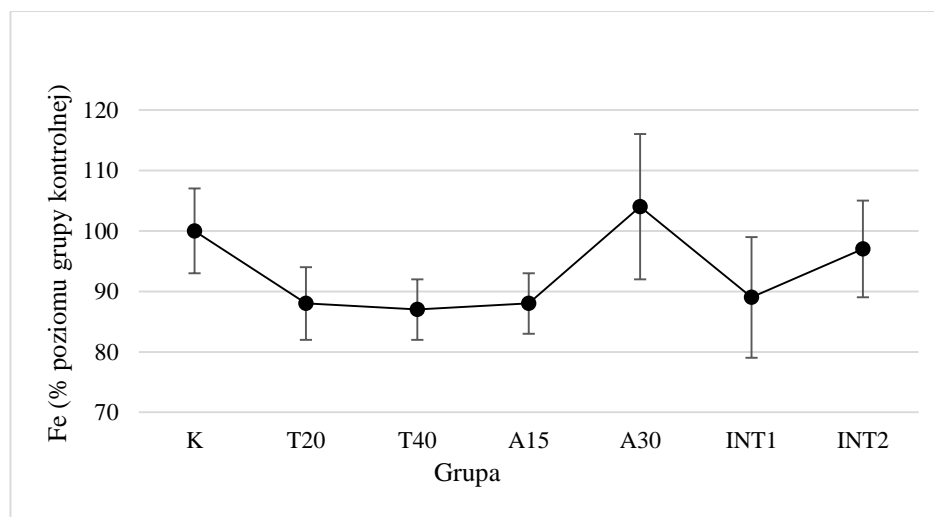


Rycina 22. Przekrój przez nerki dojrzałych myszy Swiss z grupy kontrolnej, INT1 oraz INT2. Barwienie H+E, x100 (K - część korowa, R - część rdzeniowa).

7. Stężenie mikro- i makroelementów w nerkach

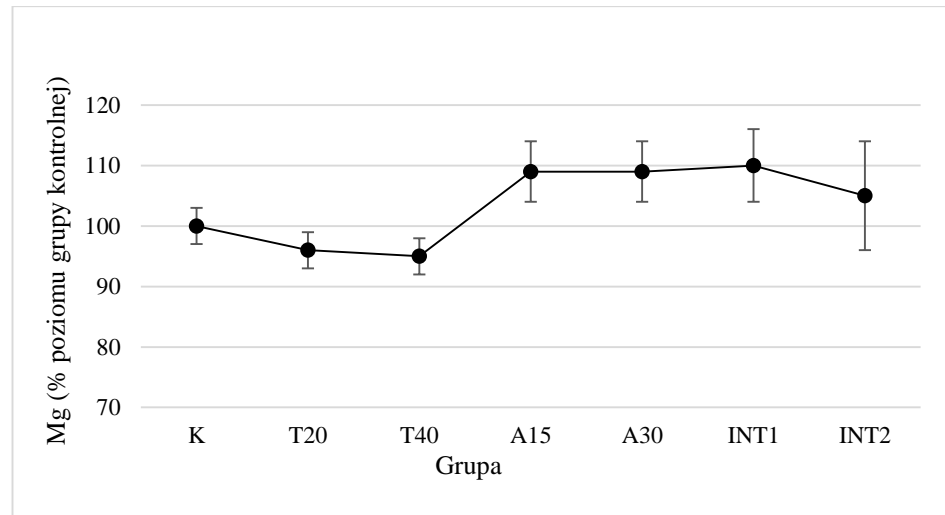
Poziom podstawowy stężenia Fe w nerkach zwierząt z grupy kontrolnej wynosił $66,619 \pm 4,897 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m. W grupach suplementowanych tauryną, w grupach interakcyjnych, a także w grupie A15 odnotowano trend spadkowy w stężeniu Fe w nerkach nawet o 13% w porównaniu z grupą kontrolną (dla zwierząt z grupy T40). Najmniejszy spadek zaobserwowano w grupie INT2 - o 3%. Trend wzrostowy w stężeniu żelaza obserwowany był

tylko i wyłącznie w grupie A30 - do 104% w porównaniu z poziomem kontrolnym. W grupach interakcyjnych stężenie Fe w nerkach uległa obniżeniu w porównaniu do grupy A30 (Ryc. 23). Porównując stężenie Fe w nerkach pomiędzy analizowanymi grupami, nie odnotowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy nimi (test Welcha, $p=0,594$).



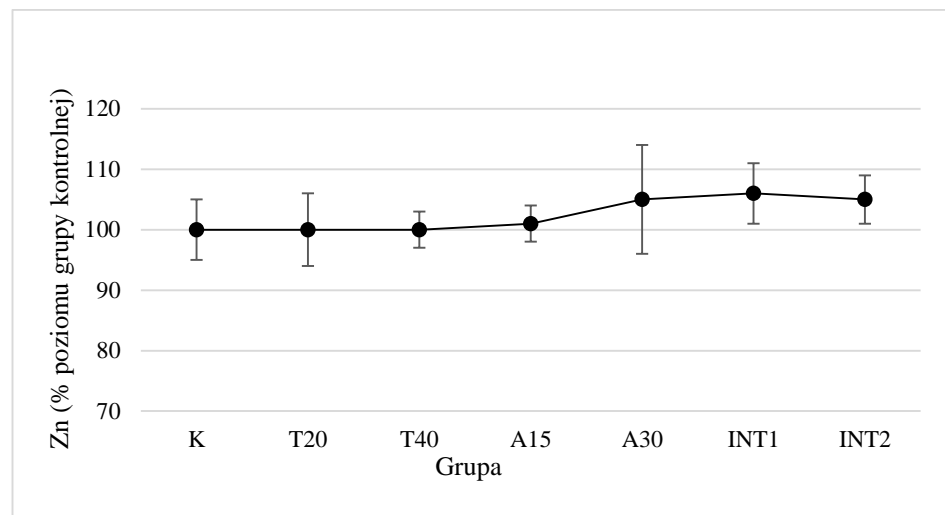
Rycina 23. Procent zmian stężenia Fe ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w nerkach myszy z grup eksperymentalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Brak statystycznie istotnych różnic.

Średnie stężenie Mg w nerkach zwierząt z grupy kontrolnej wynosiło $345,222 \pm 10,235 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m. i stanowiło poziom podstawowy dla grup eksperymentalnych. W grupach suplementowanych tauryną obserwowano trend spadkowy w stężeniu Mg w nerkach o 4% i 5% w porównaniu do poziomu podstawowego (odpowiednio dla zwierząt z grupy T20 oraz T40). W pozostałych grupach obserwowano trend wzrostowy w stężeniu Mg nawet o 10% w porównaniu do poziomu kontrolnego (dla zwierząt z grupy INT1) (Ryc. 24). Stężenie Mg w nerkach zwierząt z grup interakcyjnych utrzymywała się na poziomie uzyskanym dla grup A15 i A30. Analiza statystyczna nie wykazała istotnych statystycznie różnic w zawartości Mg pomiędzy badanymi grupami (test Welcha, $p=0,067$).



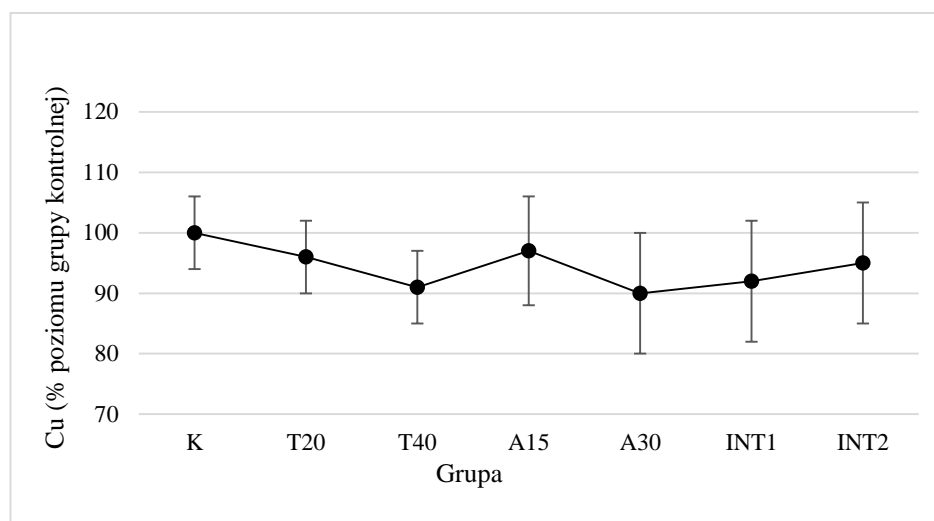
Rycina 24. Procent zmian stężenia Mg ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w nerkach myszy z grup eksperymentalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Brak statystycznie istotnych różnic.

Poziom podstawowy stężenia Zn w nerkach zwierząt z grupy kontrolnej wyniósł $31,029 \pm 1,432 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m. W grupie T20 oraz T40 stężenie Zn w nerkach nie zmieniło się i utrzymywało na poziomie uzyskanym dla grupy kontrolnej. W pozostałych grupach odnotowano niewielki trend wzrostowy w stężeniu Zn w stosunku do grupy kontrolnej - najmniejszy o 1% (dla zwierząt z grupy A15), a największy o 6% (dla zwierząt z grupy INT1). Rycina 25 przedstawia wyżej opisane zmiany stężenia mikroelementu. W grupach interakcyjnych zawartość Zn utrzymywała się na poziomie uzyskanym dla grupy A30. W przypadku zawartości Zn w nerkach nie odnotowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy testowanymi grupami (test Welcha, $p=0,928$).



Rycina 25. Procent zmian stężenia Zn ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w nerkach myszy z grup eksperymentalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Brak statystycznie istotnych różnic.

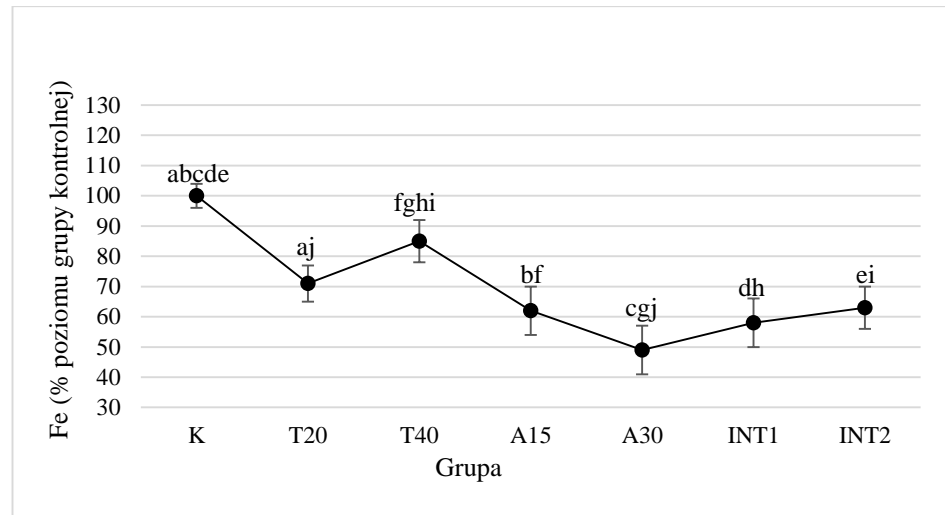
Średnie stężenie Cu w nerkach zwierząt z grupy kontrolnej wynosiło $5,602 \pm 0,31 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m. i stanowiło poziom podstawowy dla grup badawczych. W tym przypadku obserwowano obniżenie poziomu Cu we wszystkich z testowanych grupach. Najmniejszy spadek - do 97% poziomu podstawowego obserwowano w grupie A15, a największy - do 90% poziomu podstawowego w grupie A30. W grupach INT1 oraz INT2 zawartość Cu w nerkach spadła względem grupy A15 i jednocześnie wzrosła względem grupy A30 (Ryc. 26). Porównując stężenie Cu w nerkach pomiędzy wszystkimi badanymi grupami, nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami (test Welcha, $p=0,945$).



Rycina 26. Procent zmian stężenia Cu ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w nerkach myszy z grup eksperymentalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Brak statystycznie istotnych różnic.

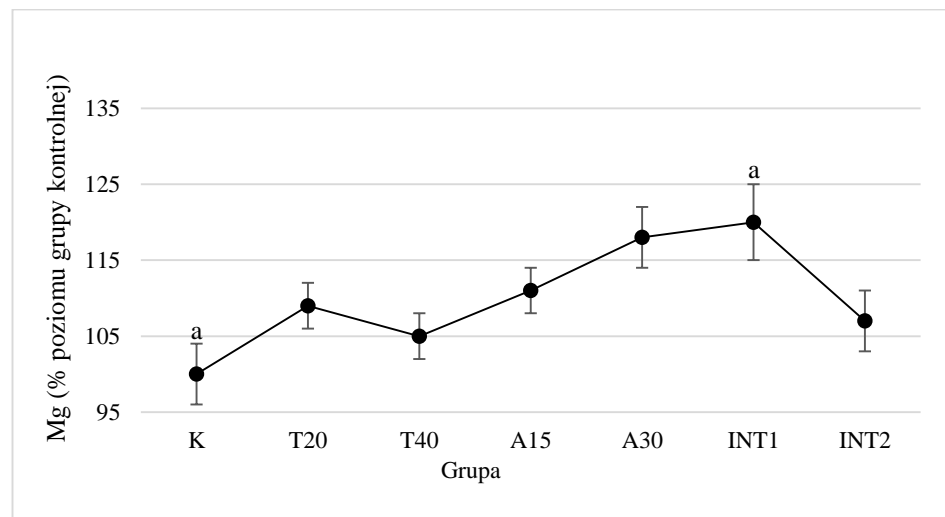
8. Stężenie mikro- i makroelementów w wątrobie

Poziom podstawowy stężenia Fe w wątrobie myszy z grupy kontrolnej wynosił $130,226 \pm 4,665 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m. We wszystkich badanych grupach obserwowano trend spadkowy w stężeniu Fe w wątrobie w porównaniu do grupy kontrolnej. Najmniejszy spadek odnotowano u zwierząt z grupy T40 - do 85% poziomu podstawowego, a największy u zwierząt z grupy A30 - do 58% poziomu podstawowego (Ryc. 27). Stężenie Fe w wątrobie myszy z grup INT1 oraz INT2 było wyższe niż stężenie obserwowane w grupie A30. Analiza statystyczna wykazała istotne statystycznie różnice w stężeniu Fe w wątrobie pomiędzy grupą kontrolną, a grupami T20, A15, A30, INT1 i INT2 oraz pomiędzy grupą T40, a grupami A15, A30, INT1 i INT2. Stężenie Fe w wątrobie różniło się również istotnie pomiędzy grupą T20 i A30.



Rycina 27. Procent zmian stężenia Fe ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w wątrobie myszy z grup eksperymentalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Tymi samymi literami oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami.

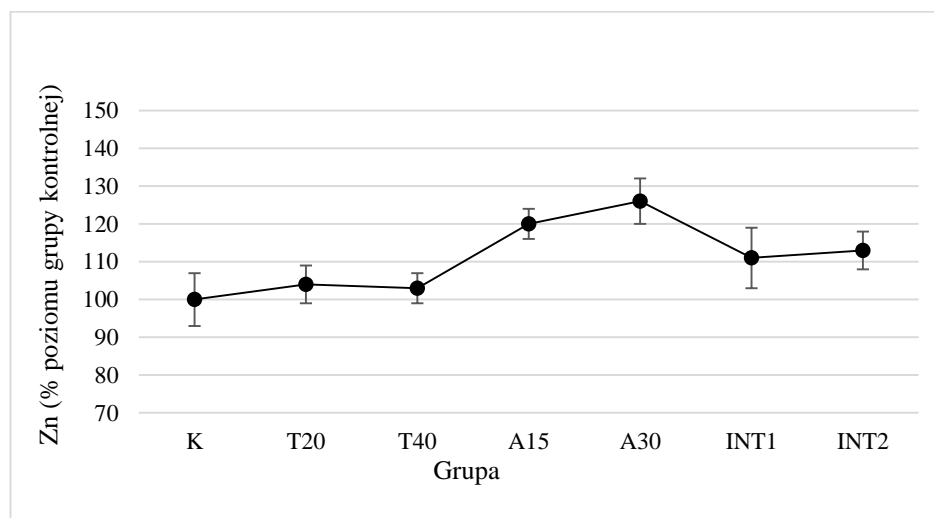
Średnie stężenie Mg w wątrobie zwierząt z grupy kontrolnej wynosiło $320,842 \pm 12,359 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m. i stanowiło poziom podstawowy dla grup eksperymentalnych. We wszystkich testowanych grupach obserwowano trend wzrostowy w stężeniu Mg w wątrobie zwierząt. Najmniejszy wzrost - do 105% poziomu podstawowego odnotowano dla zwierząt z grupy T40, natomiast największy wzrost - do 120% poziomu podstawowego zanotowano w grupie INT1 (Ryc. 28). Istotne statystycznie różnice w zawartości Mg w wątrobie obserwowano tylko pomiędzy grupą kontrolną i grupą INT1.



Rycina 28. Procent zmian stężenia Mg ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w wątrobie myszy z grup eksperymentalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Tymi samymi literami oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami.

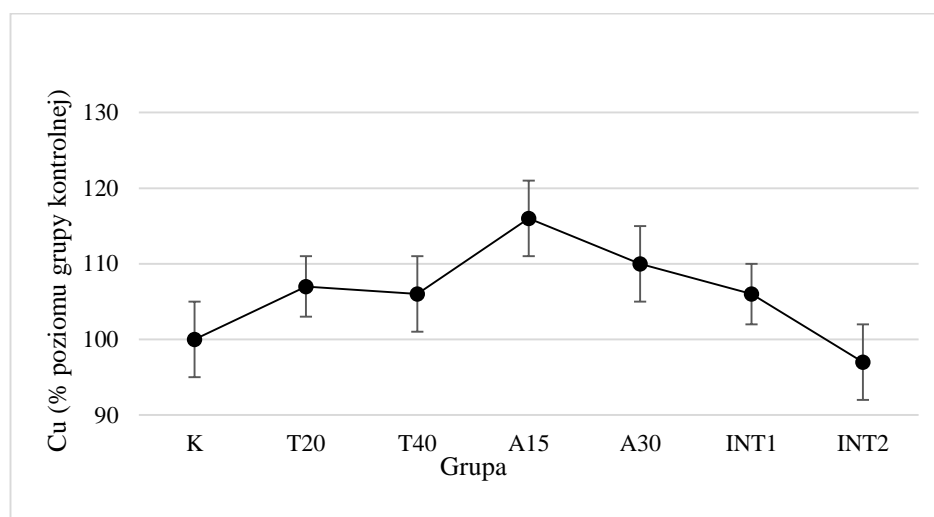
Poziom podstawowy stężenia Zn w wątrobie zwierząt z grupy kontrolnej wynosił $34,907 \pm 2,92 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m. We wszystkich badanych grupach odnotowano trend wzrostowy w stężeniu Zn w wątrobie o: 4%, 3%, 20%, 26%, 11%, 13% odpowiednio dla grup T20, T40, A15, A30, INT1

oraz INT2 (Ryc. 29). Analiza statystyczna nie wykazała statystycznie istotnych różnic w wartości tego parametru pomiędzy testowanymi grupami (test Welcha, $p=0,0502$).



Rycina 29. Procent zmian stężenia Zn ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w wątrobie myszy z grup eksperymentalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Brak statystycznie istotnych różnic.

Stężenie Cu w wątrobie zwierząt z grupy kontrolnej wynosiło $6,623 \pm 0,361 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m. i stanowiło poziom podstawowy dla grup eksperymentalnych. Obniżenie stężenia Cu w wątrobie odnotowano tylko dla zwierząt z grupy INT2 - do 97% poziomu podstawowego. W pozostałych grupach obserwowano trend wzrostowy w stężeniu Cu: najmniejszy o 6% (dla zwierząt z grup T40 i INT1), największy o 16% (dla zwierząt z grupy A15) (Ryc. 30). Stężenie Cu w wątrobie nie różniło się istotnie pomiędzy testowanymi grupami (test Welcha, $p=0,274$).



Rycina 30. Procent zmian stężenia Cu ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w wątrobie myszy z grup eksperymentalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Brak statystycznie istotnych różnic.

VI. DYSKUSJA

W niniejszych badaniach zaobserwowano zmiany w profilu lipidowym oraz w aktywności enzymów wątrobowych i enzymów antyoksydacyjnych pomiędzy zwierzętami eksponowanymi na alkohol, a zwierzętami dodatkowo suplementowanymi tauryną. Pomiary parametrów morfologicznych krwi wskazują, że krótkotrwała ekspozycja na alkohol, taurynę, jak i obie substancje biologicznie czynne jednocześnie nie powoduje odchylenia od wyznaczonych dla tych parametrów wartości referencyjnych. Nie wykazano zasadniczych różnic w histologicznej strukturze jąder i nerek oraz istotnych różnic w gospodarce mikro- i makroelementami w nerkach i wątrobie pomiędzy badanymi grupami.

Parametry morfologiczne krwi. Wszystkie z otrzymanych wyników badań morfologicznych mieszczą się w wartościach referencyjnych wyznaczonych dla parametrów hematologicznych myszy. Zatem wpływ żadnej z zastosowanych substancji biologicznie czynnych nie prowadził do odchylenia od normy oraz stanów chorobowych.

Suplementacja tauryną pozytywnie wpływa na układ immunologiczny poprzez zwiększanie aktywności fagocytarnej makrofagów i monocytów, ochronę neutrofilii przed apoptozą oraz zwiększenie liczby limfocytów (Islambulchilar i inni, 2015). Wyjaśnia to zaobserwowany w prowadzonych badaniach własnych trend wzrostowy w liczbie leukocytów w grupach T20 oraz T40. U osób nadużywających alkohol, obserwuje się pobudzenie układu odpornościowego, przejawiające się wzrostem liczby leukocytów - jest to jednak wzrost ponadnormatywny (Asuk i inni, 2013). W niniejszych badaniach obserwowano obniżenie liczby leukocytów u zwierząt z grup A15 i A30, co sugeruje że krótkotrwała ekspozycja na alkohol, nie wywołuje wyżej opisanego efektu. U zwierząt z grup interakcyjnych również obserwowano obniżenie liczby leukocytów, w porównaniu z grupą kontrolną; utrzymujące się na poziomie uzyskanym dla grupy A30. Prawdopodobnie ma to związek z faktem, że działanie alkoholu - nawet mimo krótkotrwałej ekspozycji - jest na tyle silne, by znieść działanie tauryny. Hipoteza ta jest zgodna z wynikami badań, w których odnotowano podobną tendencję w przypadku innych substancji o znanym działaniu antyoksydacyjnym - witaminy C i E (Joharapurkar i inni, 2003).

Rozpatrując liczbę erytrocytów oraz zawartość hemoglobiny, w grupach T20 i T40 obserwowano zarówno wyższą liczbę erytrocytów, jak i zawartość hemoglobiny, co jest zgodne z danymi literaturowymi (Sunha i Rajkumar, 2015). Efekt ten przypisywany jest antyoksydacyjnemu działaniu tauryny, związanemu z usuwaniem wolnych rodników

stymulujących peroksydację lipidów błonowych, a tym samym stabilizującemu błony erytrocytów (Sirdah i inni, 2013). Z kolei alkohol znany jest ze szkodliwego wpływu na hematopoezę, przejawiającego się hamowaniem erytropoezy, syntezy hemoglobiny, a także zwiększeniem tempa rozpadu erytrocytów (Maralla i Reddy, 2012). Fakt ten nie znalazł potwierdzenia w niniejszych badaniach, ponieważ w grupach A15 i A30 obserwowano wyższą liczbę erytrocytów oraz wyższą zawartość hemoglobiny w porównaniu do grupy kontrolnej. Być może ma to związek z krótkim czasem ekspozycji na alkohol, ponieważ zaburzenia hematopoezy obserwowane są przy długoterminowym narażeniu (Elanchezhian i inni, 2017). W grupach INT1 oraz INT2 również odnotowano trend wzrostowy dla obu omawianych parametrów (utrzymujący się na poziomie uzyskanym dla grupy A30), co w tym wypadku najprawdopodobniej jest skutkiem synergistycznego działania tauryny i alkoholu.

Średnia objętość erytrocytu (MCV) uważana jest za biomarker ilości spożytego alkoholu (Niemelä, 2016). W związku z powyższym, dziwi wzrost parametru MCV w grupach T20 i T40, który został jednak wcześniej zaobserwowany również przez innych naukowców badających wpływ tauryny (Anand i inni, 2010; Sirdah i inni, 2013). W grupie A15 odnotowano spadek, natomiast w grupie A30 wzrost średniej objętości czerwonej krwinki względem grupy kontrolnej. Podobną tendencję obserwowali badacze testujący różne wzorce spożywania alkoholu, zatem przypuszczalnie ma to związek z jego dawką (Oudoula, 2005; Elanchezhian i inni, 2017). W grupach interakcyjnych otrzymane wyniki są niejednoznaczne: w grupie INT1 odnotowano wzrost, a w grupie INT2 spadek średniej objętości czerwonej krwinki w porównaniu do grupy kontrolnej, co wymaga dalszych badań w celu poznania mechanizmu leżącego u podstaw takiego działania.

Suplementacja tauryną spowodowała obniżenie zawartości trombocytów, co jest zgodne z obserwacjami innych badaczy, którzy odnotowali spadek zawartości trombocytów w odpowiedzi na zwiększaną dawkę tauryny (Anand i inni, 2010; Sudha i Rajkumar, 2015). Najprawdopodobniej ma to związek ze strukturalnym podobieństwem tauryny do sulfonamidów znanych z indukowania spadku liczby trombocytów (Pasin i inni, 2014). Uważa się, że działanie alkoholu na trombocyty ma związek z ich częściową aktywacją, połączoną z niekompletną degranulacją - w efekcie powstają nowe trombocyty, są one jednak uszkodzone (Adams, 2010). Wyniki badań własnych potwierdzają powstanie nowych płytek krwi, ponieważ w grupach A15 i A30 obserwowano wyższą ich liczbę w porównaniu do grupy kontrolnej. Zdolność trombocytów do pełnienia swoich funkcji nie stanowiła przedmiotu badań, dlatego nie sprawdzano czy nowo powstałe płytki krwi były uszkodzone. W grupach interakcyjnych także odnotowano wyższą liczbę trombocytów w stosunku do grupy kontrolnej,

a jednocześnie niższą w stosunku do grup A15 i A30. Wskazuje to, że jednorazowa intoksykacja alkoholem działa stymulująco na płytki krwi i jest to zgodne z obserwacjami innych badaczy (Oduola, 2005). Sugeruje również, że działanie tauryny w tym wypadku jest na tyle silne, aby odwracać skutki działania alkoholu.

Parametry biochemiczne krwi. Wszystkie z otrzymanych wyników badań biochemicznych krwi mieszczą się w wartościach referencyjnych wyznaczonych dla myszy, sugerując że wpływ badanych substancji nie powodował ani odchyleń od normy, ani stanu chorobowego.

Obserwowany w niniejszych badaniach trend wzrostowy w poziomie cholesterolu HDL oraz obniżenie poziomu cholesterolu LDL w surowicy krwi zwierząt, którym podawana była tauryna jest zgodny z wynikami badań innych naukowców (Choi i inni, 2006). Wywołany podawaniem tauryny trend wzrostowy w poziomie cholesterolu HDL jest wynikiem wzmożonej syntezy tej frakcji cholesterolu w wątrobie, poprzez zwiększanie wątrobowej zawartości apolipoproteiny A-I (apoA-I), będącej białkowym składnikiem lipoprotein - zwłaszcza tych o dużej gęstości (HDL) (Mochizuki i inni, 2014). Umiarkowane picie alkoholu również związane jest ze wzrostem zawartości apoA-I, ale także ze wzrostem zawartości apolipoproteiny A-II (apoA-II) i obniżeniem stopnia degradacji cholesterolu HDL, co skutkuje wzrostem jego poziomu we krwi (de Oliveira e Silva i inni, 2000; Cardoso Fernanses Toffolo i inni, 2012). Wyjaśnia to zaobserwowany wyższy poziom cholesterolu HDL w grupie A15. Pozytywny wpływ alkoholu na poziom cholesterolu HDL zmniejsza się jednak wraz ze wzrostem jego spożycia, co widoczne jest zarówno w badaniach własnych, jak i badaniach innych naukowców (Oduola i inni, 2005). W prowadzonym eksperymencie odnotowano trend wzrostowy w poziomie cholesterolu HDL w obu grupach interakcyjnych. Większy przyrost w porównaniu do poziomu kontroli zaobserwowano w grupie INT1, co ma związek nie tylko z pozytywnym wpływem tauryny, ale także alkoholu w umiarkowanych dawkach na jego poziom we krwi. W grupie INT2 przyrost ten był nieco niższy, jednak może świadczyć o zdolności tauryny do przeciwdziałania spadkom poziomu cholesterolu HDL wywołanym działaniem alkoholu.

Widoczne w eksperymencie obniżenie poziomu cholesterolu LDL wywołane suplementacją tauryny, można powiązać ze zdolnością indukowania przez ten związek kilku mechanizmów: 1) zmniejszenia wydzielania apolipoproteiny B-100 (apo-B100), będącej niezbędną składową lipoprotein o niskiej gęstości (LDL), a tym samym zmniejszeniem wydzielania LDL, 2) zmniejszenia aktywności acylotransferazy acylo-CoA: cholesterol (ACAT), odpowiedzialnej za estryfikację cholesterolu i powstawanie lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (VLDL), 3)

zwiększenia aktywności 7α -hydroksylazy cholesterolowej (CYP7A1) odpowiedzialnej za syntezę kwasów żółciowych z cholesterolu, związaną ze wzrostem degradacji samego cholesterolu, 4) stymulowania aktywności receptora LDL i przyspieszania usuwania tej lipoproteiny przez wątrobę (Murakami i inni, 2002; Militante i Lombardini, 2004; Chen i inni, 2012). Z kolei ekspozycja na alkohol wiąże się z podwyższeniem poziomu cholesterolu LDL we krwi, co może mieć związek ze zmianami w strukturze apo-B100, prowadzącymi do powstania konformacji o większej wydajności energetycznej lub ze zmianami w aktywności receptora LDL (Wood i inni, 2001). Stanowi to wyjaśnienie obserwowanego w eksperymencie wzrostu poziomu cholesterolu LDL w grupach A15 i A30. Wzrost ten odnotowano także w obu grupach interakcyjnych, jednak tylko względem poziomu podstawowego. Porównując wyniki uzyskane dla grup interakcyjnych z wynikami otrzymanymi dla grup A15 i A30 - w grupach INT1 i INT2 obserwowano obniżenie poziomu LDL co sugeruje, że tauryna prawdopodobnie może przeciwdziałać hipercholesterolemii wywołanej ekspozycją na alkohol.

Rozpatrując aktywność ALP, ALT oraz AST - należy stwierdzić, że mogą one służyć jako biomarkery uszkodzeń wątroby, ponieważ wzrost ich stężenia we krwi może świadczyć o uszkodzeniu hepatocytów (Oloyede i Sunmonu, 2008). Obniżenie aktywności enzymów wątrobowych przez taurynę najprawdopodobniej jest wynikiem jej zdolności do stabilizacji membran poprzez zapobieganie wyciekaniu jonów z komórki, przy jednoczesnym zapobieganiu napływowi wody do komórki (Jagadeesan i Pillai, 2007), co może wyjaśniać otrzymane wyniki. Wzmocnieniu spożyciu alkoholu towarzyszy wzrost aktywności enzymów wątrobowych, związany z ich wyciekaniem z komórek do krwioobiegu (Okafor i inni, 2011). Uważa się, że uszkodzenia komórek wątrobowych wywołane działaniem alkoholu mogą być spowodowane: 1) nasiloną produkcją RFT, które powstają jako produkty metabolizmu alkoholu, 2) zaburzeniem katabolizmu białek w wątrobie i ich akumulacją, 3) wywołanym przez działanie aldehydu octowego hamowaniem aktywności proteosomu, odpowiedzialnego za usuwanie z organizmu niepotrzebnych białek (Ebrahim i inni, 2012; Wang i inni, 2018). Wyniki, otrzymane dla aktywności ALP i AST są zgodne z wynikami wyżej cytowanych doniesień. Jednak aktywność ALT w grupach A15 i A30 nie zmieniła się w porównaniu do grupy kontrolnej. Biorąc pod uwagę fakt, że podwyższenie aktywności ALT jest nieznaczne w porównaniu do podwyższenia aktywności innych enzymów wątrobowych (Szutowicz i Raszei-Szpecht, 2009) - niezależnie od przyczyny uszkodzenia komórek - jest prawdopodobnym, że 24 h ekspozycja na alkohol była zbyt krótka, aby wpłynąć na aktywność ALT, tak jak wpłynęła na aktywność ALP i AST. Hipoteza ta wymaga jednak weryfikacji. Co więcej, tylko ALT jest enzymem specyficznym dla wątroby, a wyższa aktywność pozostałych

enzymów wątrobowych może świadczyć o uszkodzeniu, np. mięśni lub kości (NPT, 2006). Wprowadzenie do diety produktów takich jak: ananas, czosnek, imbir czy pomidor - zawierających naturalne antyoksydanty - poprawia aktywność enzymów wątrobowych, zaburzoną na skutek spożywania alkoholu (Okafor i inni, 2011; Ebrahim i inni, 2012; Mani i inni, 2016). W przypadku niniejszych badań również obserwowano taki trend dla aktywności ALP i ALT w obu grupach interakcyjnych. Rozpatrując aktywność AST, zarówno w grupie INT1, jak i INT2 aktywność enzymu utrzymywała się na poziomie otrzymanym dla grupy A15, jednak względem grupy A30 aktywność AST spadła w obu grupach.

Aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz poziom MDA w jądrach. W dostępnej literaturze brak jest informacji dotyczących wartości referencyjnych zarówno dla aktywności enzymów antyoksydacyjnych, jak i poziomu MDA oraz GSH w różnych tkankach myszy.

CAT, GPx oraz SOD są uważane za najważniejsze enzymy antyoksydacyjne, stanowiące pierwszą linię obrony organizmu w walce ze stresem oksydacyjnym (Aluwong i inni, 2013). Uważa się, że suplementacja tauryną przyczynia się do wzrostu aktywności enzymów antyoksydacyjnych (Nonaka i inni, 2001; Abbasoglu i inni, 2012; Adedara, 2017). Zostało to potwierdzone w prowadzonych badaniach, w których odnotowano podwyższenie aktywności wszystkich testowanych enzymów antyoksydacyjnych zarówno w grupie T20, jak i T40. Ekspozycja na alkohol może wiązać się z dwojaką odpowiedzią układu antyoksydacyjnego - badania sugerują zarówno wzrost, jak i spadek aktywności enzymów antyoksydacyjnych (Maneesh i inni, 2006; Abarikwu i inni, 2016). W prowadzonych badaniach, u zwierząt eksponowanych na alkohol odnotowano wyższą aktywność SOD w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej. Najprawdopodobniej stanowi to odpowiedź adaptacyjną organizmu na warunki stresowe, przejawiającą się wzmożoną dysmutacją O_2^- do H_2O_2 . (Maneesh i inni, 2006). Spośród wszystkich enzymów układu antyoksydacyjnego, GPx jest najbardziej wrażliwa na zmiany zawartości RFT, których wzrost związany jest ze spadkiem aktywności enzymu (Nandhini i inni, 2005). Wyjaśnia to odnotowane w eksperymencie obniżenie aktywności GPx w grupie A30, zgodne z wynikami innych badań (Maneesh i inni, 2006; Abarikwu i inni, 2016). Natomiast odnotowany w grupie A15 wzrost aktywności GPx sugeruje, że wpływ alkoholu na aktywność peroksydazy w jądrach zależy jest od przyjętej dawki. Obserwowany w przypadku CAT trend spadkowy w aktywności enzymu, potwierdza obserwacje innych naukowców badających jej aktywność w jądrach zwierząt eksponowanych na alkohol (Abarikwu i inni, 2016). Badania, w których testowano wpływ tauryny i alkoholu na aktywność enzymów antyoksydacyjnych w różnych narządach szczurów wykazały, że

tauryna przywraca zaburzoną wskutek działania alkoholu aktywność enzymów antyoksydacyjnych (Pushpakiran i inni, 2004). Zostało to częściowo potwierdzone w niniejszym eksperymencie. Aktywność SOD oraz CAT w jądrach myszy z grup interakcyjnych wzrosła w porównaniu z aktywnością enzymów w grupach A15 i A30. W przypadku GPx, w grupie INT1 obserwowano niższą aktywność enzymu w porównaniu do grupy kontrolnej (utrzymującą się na poziomie uzyskanym dla grupy A30). Z kolei w grupie INT2 odnotowano aktywność enzymu na poziomie uzyskanym dla grupy kontrolnej (podwyższoną w stosunku do grup eksponowanych na alkohol). Należy pamiętać, że rozbieżności pomiędzy uzyskanymi wynikami, a wynikami cytowanymi powyżej mogą być skutkiem nie tylko użycia różnych dawek tauryny i alkoholu oraz różnej długości trwania eksperymentu, ale także odmienną aktywnością enzymów w różnych narządach (Anand i inni, 2011).

Zmiana zawartości RFT - powyżej, jak i poniżej stężenia fizjologicznego - wiąże się z wystąpieniem stresu oksydacyjnego, co w przypadku jąder może modyfikować funkcję komórek Leydiga, prowadzić do zaburzeń steroidogenezy, apoptozy komórek, a w konsekwencji do bezpłodności (Gautam i inni, 2006; Mohamed i Abdel Gawad, 2017). Tauryna wykazuje zdolność do obniżania stopnia peroksydacji lipidów bezpośrednio poprzez usuwanie wolnych rodników lub pośrednio poprzez wiązanie wolnych atomów metali - jak Cu^{2+} czy Fe^{2+} - przez grupę sulfonową oraz poprzez zmniejszanie produkcji grup karbonylowych (Parildar-Karpuzoğlu i inni, 2008). Wyjaśnia to zaobserwowane w badaniach własnych obniżenie poziomu MDA w grupach T20 i T40. W grupach, w których zwierzętom podawano alkohol odnotowano wzmożenie peroksydacji lipidów, mierzone wzrostem poziomu MDA. Najprawdopodobniej jest to skutkiem zwiększonej aktywności CYP2E1 - metabolizującej alkohol do aldehydu octowego - w wyniku której powstają RFT, intensyfikujące peroksydację lipidów i przyczyniające się do wzrostu poziomu MDA (Dosumu i inni, 2014). Suplementacja naturalnymi antyoksydantami, np. witaminą E jest w stanie przywrócić zaburzony na skutek działania alkoholu poziom MDA (Singhishetti i inni, 2012). Potwierdza to zaobserwowane w badaniach własnych obniżenie poziomu MDA do poziomu podstawowego w grupie INT1. Jednak w grupie INT2 odnotowano wzrost poziomu MDA, zarówno w porównaniu do poziomu podstawowego, jak i w stosunku do poziomu otrzymanego dla grup A15 i A30. Aby wykluczyć wystąpienie błędu analitycznego, należałoby powtórzyć część analiz budzących wątpliwości.

Aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz poziom GSH w mózgu. Dane dotyczące zmian aktywności enzymów antyoksydacyjnych w mózgu, związanych z podażą tauryny są niejednoznaczne. W niektórych notowano wzrost, a w innych spadek aktywności enzymów antyoksydacyjnych w odpowiedzi na suplementację tauryną (Anand i inni, 2011; Yildirim i Kilic, 2011; Adedara i inni, 2017). W prowadzonych badaniach zaobserwowano wzrost aktywności GPx oraz SOD w grupach, w których zwierzęta suplementowano tauryną. Takie działanie tauryny może być wynikiem jej zdolności antyoksydacyjnych związanych z obniżaniem stopnia peroksydacji lipidów oraz wzmacnianiem potencjału antyoksydacyjnego organizmu (Pushpakiran i inni, 2004; Sochor i inni, 2014). U zwierząt suplementowanych tauryną obserwowano także obniżenie aktywności CAT, co może wskazywać na mniejszą wrażliwość enzymu na działanie tauryny w mózgu. Hipoteza ta wymaga jednak weryfikacji poprzez prowadzenie eksperymentu chronicznego. W niniejszych badaniach ekspozycja na alkohol wiązała się z trendem spadkowym w aktywności CAT, GPx i SOD w mózgu, co jest zgodne z wynikami innych eksperymentów, w których badano wpływ alkoholu na aktywność enzymów antyoksydacyjnych (Das i inni, 2007; Ramezani i inni, 2012). Obserwowane obniżenie aktywności CAT, GPx i SOD może wskazywać na oksydacyjną inaktywację enzymów w następstwie nadmiernej produkcji RFT, a w przypadku GPx również na niedobór kosubstratów takich jak, np. GSH lub NADPH (Swaroop, 2013; Kumar i inni, 2016). Uzyskane wyniki potwierdzają także wcześniejsze obserwacje innych badaczy monitorujących zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych w mózgu narażonym na działanie alkoholu (Ramezani i inni, 2012). W grupach interakcyjnych odnotowano podwyższenie aktywności GPx i SOD sugerujące normalizację aktywności enzymów wywołaną suplementacją tauryny, co obserwowali również inni naukowcy badający interakcję alkoholu z tauryną oraz fluorku sodu z tauryną (Pushpakiran i inni, 2004; Adedara i inni, 2017). Wskazuje to, że tauryna może modyfikować czynniki decydujące o wrażliwości tkanki na działanie substancji toksycznych (Pushpakiran i inni, 2004). Aktywność CAT w grupach interakcyjnych utrzymywała się na poziomie uzyskanym dla grupy A30, co może świadczyć o braku wpływu tauryny na odpowiedź tego enzymu w mózgu, zmienioną wskutek działania alkoholu.

Biosynteza tauryny oraz GSH w organizmie wymaga wykorzystania Cys jako substratu reakcji, dlatego uważa się, że suplementacja tauryną przyczynia się do wzrostu poziomu GSH w organizmie poprzez bezpośrednie zwiększenie dostępności Cys wymaganej do biosyntezy GSH (Hagar, 2004). Tłumaczy to odnotowany w badaniach własnych trend wzrostowy w poziomie GSH w grupach suplementowanych tauryną. Ponadto, działanie tauryny związane ze zwiększaniem poziomu GSH może mieć również związek z zapobieganiem przez taurynę

jego utlenieniu (Anand i inni, 2011). Z kolei ekspozycja na alkohol wiązała się z obniżeniem poziomu GSH w mózgu. Najprawdopodobniej jest to wynikiem wzrostu poziomu produktów utleniania lipidów, prowadzącego do zmniejszenia dostępności NADPH niezbędnego do aktywacji reduktazy glutationowej, która odpowiada za przekształcenie utlenionego glutationu do GSH (Kumar i inni, 2016). W grupach INT1 oraz INT2 poziom GSH utrzymywał się na poziomie otrzymanym dla grupy A30. Wskazuje to, że na mózgowy poziom GSH większy wpływ wywiera alkohol niż tauryna w zastosowanych w eksperymencie dawkach. Porównując uzyskany wynik z wynikami innych badaczy można podejrzewać, że rozbieżności wynikają z użycia odmiennych dawek tauryny, bądź z różnej długości trwania eksperymentu.

Ocena histologiczna jąder. Według wiedzy autorki tej pracy są to pierwsze badania histologiczne dotyczące interakcji pomiędzy tauryną i etanolem, co może wiązać się z utrudnioną interpretacją i brakiem możliwości porównania otrzymanych wyników.

Liczne badania naukowe wskazują, że poprzez nadmierną produkcję ROS oraz wywoływanie apoptozy komórek szlaku spermatogenicznego, alkohol negatywnie oddziałuje na strukturę histologiczną jąder (Zhu i inni, 2000; Erpek i inni, 2004; He i inni, 2010). Nie zostało to potwierdzone w badaniach własnych, co prawdopodobnie ma związek z odmiennym czasem ekspozycji wykorzystanym w badaniach. Większość procedur badawczych oparta jest na chronicznym czasie ekspozycji, w przypadku niniejszych badań była to ekspozycja ostra. Co prawda istnieją dane literaturowe, wskazujące na istnienie zmian w histologicznej strukturze jąder już po 24 h ekspozycji, jednak wykorzystują one potencjalnie silniej działające substancje toksyczne jak, np. $AlCl_3$ (Abdel-Moneim, 2013).

Tauryna znana ze swoich właściwości antyoksydacyjnych oraz zdolności do zmiatania wolnych rodników wywiera efekt ochronny na strukturę histologiczną jąder, dlatego w świetle mikroskopu narządy po ekspozycji na nią dają obraz podobny do kontroli (Elshawi i inni, 2014). Jest to zgodne z otrzymanymi wynikami. Konsekwencją wyżej opisanych właściwości tauryny jest również jej zdolność do przeciwdziałania zmianom histopatologicznym w strukturze jąder, wywołanym działaniem substancji toksycznych (Mohamed i Gawad, 2017). W przypadku niniejszych badań, nie zaobserwowano żadnych zasadniczych różnic w strukturze histologicznej jąder zwierząt z grup interakcyjnych w porównaniu do jąder zwierząt z grupy kontrolnej, co najprawdopodobniej ma również związek z krótkim czasem ekspozycji na testowane substancje biologicznie czynne.

Ocena histologiczna nerek. Nefrotoksyczne działanie alkoholu ma związek ze wzmożoną oksydacją białek oraz podwyższoną produkcją RFT, które w głównej mierze są produktami

utleniania aldehydu octowego (Epstein i inni, 1997). Generowany w ten sposób stres oksydacyjny stanowi przyczynę powstawania zmian w histologicznej strukturze nerek (Brzóska i inni, 2003; Shanmugam i inni, 2010). W prowadzonych badaniach nie zaobserwowano jednak zmian histologicznych w strukturze nerek, a otrzymane różnice najprawdopodobniej wynikają z wykorzystania różnych czasów ekspozycji na alkohol. Histopatologiczne zmiany w strukturze nerek obserwowane są zwykle po kilku tygodniach narażenia. Ostra intoksykacja alkoholem, poprzez zaburzenie homeostazy elektrolitów oraz nadmierną produkcję moczu (obserwowaną nawet w 20 minut po spożyciu) może generować widoczne zmiany w obrazie mikroskopowym nerek, mające postać zgrubień cytoplazmy (Epstein, 1997). Otrzymane wyniki nie potwierdzają także tych doniesień, co może być konsekwencją zastosowanych stężeń alkoholu. Liczne badania naukowe potwierdzają, że stopień zaburzeń w strukturze i funkcjonowaniu nerek zależy od koncentracji etanolu (Hassan i inni, 2015).

Uzyskane wyniki własne oraz wyniki innych eksperymentatorów wykazały normalną strukturę histologiczną nerek w świetle mikroskopu, w grupach którym podawana była tauryna. Takie działanie tauryny przypisuje się jej zdolności do osłabiania negatywnych skutków działania stresu oksydacyjnego oraz do zapobieganiu apoptozy kanalików, poprzez stopniowe odkładanie się aminokwasu w rdzeniu nerki (Al Kahtani, 2010; Abd El Kader i inni, 2015). Ponadto, wyniki badań pokazują, że wyżej opisane działanie tauryny jest na tyle efektywne, aby przeciwdziałać powstawaniu histopatologicznych zmian w strukturze nerek wywołanych działaniem m.in. gentamycyny oraz bromianu (V) potasu (Erdem i inni, 2010; Ahmad i inni, 2013). Wyniki własne, otrzymane dla grup interakcyjnych nie potwierdzają tych doniesień, co można jednak wytłumaczyć brakiem jakichkolwiek zmian histologicznych wywołanych podaniem alkoholu.

Zmiany stężenia mikro- i makroelementów w nerkach. Żelazo spełnia kilka kluczowych funkcji w organizmie. Zdecydowana większość występującego w organizmie żelaza związana jest z hemoglobina i bierze udział w transporcie tlenu z płuc do innych tkanek. Żelazo wchodzi również w skład mioglobiny, uczestnicząc w przechowywaniu tlenu w mięśniach. Inną ważną funkcją tego mikroelementu jest współtworzenie enzymów, np. cytochromu P450 odpowiedzialnego m.in. za syntezę hormonów steroidowych oraz detoksykację substancji obcych w organizmie (Gupta, 2014). We wszystkich grupach z wyjątkiem grupy A30 obserwowano obniżenie stężenia Fe w nerkach, w porównaniu do grupy kontrolnej. Być może ma to związek z obserwowanym w tych grupach wzrostem poziomu Hb - jony żelaza zostały związane z Hb i zmniejszyła się ich dostępność w organizmie, a tym samym stężenie

w narządach. Niemniej jednak hipoteza ta wymaga weryfikacji. W grupie A30 obserwowano niewielki wzrost stężenia Fe w nerkach, zgodny z wynikami uzyskanymi przez innych naukowców badających wpływ wzmożonej konsumpcji alkoholu na metabolizm Fe (Lieb i inni, 2011). Należy pamiętać, że utrzymujący się podwyższony poziom Fe w narządach może stanowić przyczynę ich uszkodzenia poprzez stymulowanie peroksydacji lipidów oraz apoptozy komórek (Macdougall i inni, 2016).

Magnez bierze udział między innymi w prawidłowym funkcjonowaniu ATP i metabolizmie glukozy, a także kontrolowaniu funkcji mięśni szkieletowych i sercowych (Moe, 2008). W grupach suplementowanych tauryną obserwowano obniżenie stężenia Mg w nerkach, które mogło być spowodowane zmianami w stężeniu innych elektrolitów, np. Ca^{2+} (Moe, 2008). Uważa się, że ekspozycja na alkohol sprzyja obniżeniu stężenia Mg w organizmie, ponieważ wówczas wzrasta jego wydalanie wraz z moczem (Epstein, 1997). W prowadzonych przeze mnie badaniach odnotowano jednak trend wzrostowy w stężeniu Mg w nerkach myszy z grup A15 oraz A30. Najprawdopodobniej przyczynę odmiennych rezultatów stanowił inny czas ekspozycji. Obserwowany również w grupach interakcyjnych trend wzrostowy w stężeniu Mg w nerce, wskazuje na silniejsze działanie alkoholu niż tauryny w przypadku tego makroelementu.

Cynk występuje we wszystkich tkankach ciała, a w szczególności w mózgu, mięśniach, kościach, nerkach i wątrobie. Odgrywa kluczową rolę w prawidłowym rozwoju i wzroście organizmu, bierze udział w syntezie białek oraz podziałach komórkowych. Jako składnik enzymów zaangażowany jest w pełnienie licznych funkcji biochemicznych. Wykazuje także działanie antyoksydacyjne i przeciwzapalne (Teslariu i inni, 2016). W grupach T20 i T40 stężenie Zn w nerkach nie zmieniło się w porównaniu do poziomu podstawowego sugerując, że przy zastosowanych założeniach eksperymentu (czas ekspozycji oraz dawka), tauryna nie wpływa na jego stężenie w nerkach. Wyniki licznych eksperymentów naukowych sugerują, że narażenie na alkohol wiąże się z uszkodzeniem narządów (w tym nerek), przejawiającym się obniżeniem w nich stężenia Zn (Bhogade i inni, 2013; Teslariu i inni, 2016). Nie zostało to potwierdzone w bieżących badaniach, ponieważ stężenie Zn w nerkach zwierząt z grup A15 i A30 w niewielkim stopniu wzrosło w porównaniu z poziomem podstawowym. Można zatem założyć, że ekspozycja była na tyle krótka, że nie doszło do uszkodzenia narządu, co potwierdzają również wyniki badań histologicznych. W grupach interakcyjnych także odnotowano wzrost zawartości Zn w nerkach co wskazuje, że przy zastosowanym czasie ekspozycji oraz dawkach, działanie alkoholu jest silniejsze niż działanie tauryny.

Miedź odgrywa ważną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu metabolizmu, poprzez gwarantowanie prawidłowego funkcjonowania wielu enzymów. Bierze udział w produkcji hemoglobiny, mieliny oraz melaniny, utrzymuje również właściwe funkcjonowanie tarczycy. Miedź wykazuje działanie antyoksydacyjne, ale w zbyt dużym stężeniu może działać także jako prooksydant związany z rozwojem choroby Alzheimera (Osredkar i Sustar, 2011). Obniżenie stężenia Cu w nerkach obserwowano u pacjentów ze zdiagnozowanymi ostrymi oraz przewlekłymi chorobami nerek (Bhogade i inni, 2013). Również wzrost stężenia Zn może wiązać się z obniżeniem stężenia Cu (Osredkar i Sustar, 2011). Zależność ta może stanowić wyjaśnienie dla odnotowanego w grupach A15 i A30 oraz w grupach interakcyjnych obniżenia stężenia Cu w nerkach, któremu towarzyszyło jednoczesne podwyższenie stężenia Zn. W grupach suplementowanych tauryną również obserwowano obniżenie stężenia Cu w nerkach, co potwierdza obserwacje innych naukowców i może wynikać z antyoksydacyjnego działania tauryny (Hwang i inni, 1998).

Zmiany stężenia mikro- i makroelementów w wątrobie. Suplementacja tauryną wiąże się z obniżeniem stężenia Fe w narządach, co najprawdopodobniej wynika z jej zdolności antyoksydacyjnych (Biasetti i Dawson Jr., 2002). Tendencja ta jest zgodna z wynikami badań własnych, otrzymanymi dla grup T20 i T40. Z kolei chroniczne picie alkoholu sprzyja kumulacji tego mikroelementu w narządach, zwłaszcza w wątrobie. Konsekwencją kumulacji Fe w wątrobie jest wzmożona produkcja RFT oraz generowanie stresu oksydacyjnego, co w następstwie może prowadzić do alkoholowej choroby wątroby (Whitfield i inni, 2001). Umiarkowane picie alkoholu, podobnie jak i jednorazowa intoksykacja sprzyjają wzrostowi stężenia Fe tylko w osoczu, co wynika z uwalniania Fe z hepatocytów prowadzącego do obniżenia jego zawartości w narządzie (Ioannou i inni, 2004). Wyjaśnia to odnotowane w grupach A15 i A30 obniżenie stężenia Fe w wątrobie. Obserwowane w grupach interakcyjnych obniżenie stężenia Fe w wątrobie najpewniej jest wynikiem synergistycznego działania obu substancji biologicznie czynnych użytych w eksperymencie.

Synteza tauryny w wątrobie wymaga dostarczenia jonów Mg^{2+} jako katalizatora metylacji Met do hemocysteiny (Wójcik i inni, 2010). Być może suplementacja tauryną zmniejsza intensywność syntezy tauryny w wątrobie, zmniejszając zużycie puli Mg w wątrobie. Hipoteza ta tłumaczyłaby wzrost stężenia Mg w wątrobie u zwierząt suplementowanych tauryną, ale wymaga weryfikacji. Spożywanie alkoholu w nadmiarze wiąże się z obniżeniem stężenia Mg w narządach takich jak: mózg, wątroba czy serce. Jednak jednorazowe spożycie alkoholu - nawet w dużej dawce - sprzyja wzrostowi zawartości Mg w wyżej wymienionych narządach

(Kokot i inni, 2013). Tłumaczy to obserwowany po ekspozycji na alkohol wzrost stężenia Mg w wątrobie. Wyższe stężenie Mg w grupach INT1 oraz INT2 prawdopodobnie jest wynikiem synergistycznego działania tauryny i alkoholu.

Badania nad interakcją tauryny i Zn sugerują, że mało prawdopodobnym jest, aby badany aminokwas w jakikolwiek sposób zmieniał komórkową pulę Zn (Gottschall-Pass, 1998). Potwierdzają to również badania nad wpływem tauryny i wieku na stan organizmu, w których nie obserwowano istotnych zmian w stężeniu Zn w wątrobie po podaniu tauryny (Kilic i Yildirim, 2009). Podobne obserwacje odnotowano w prowadzonych badaniach. Chroniczna ekspozycja na alkohol wiąże się z obniżeniem stężenia Zn w surowicy krwi oraz w narządach, co ma związek z zaburzeniem homeostazy Zn w organizmie w następstwie zmian w funkcjonowaniu bariery jelitowej (Mohammad i inni, 2012). W przypadku niniejszych badań zwierzęta z grup A15 oraz A30 narażone były na jednorazową ekspozycję na alkohol, co prawdopodobnie jest przyczyną różnic pomiędzy badaniami własnymi, a wyżej cytowanymi. W grupach interakcyjnych również obserwowano podwyższone stężenie Zn w wątrobie w porównaniu z grupą kontrolną, jednak niższe w grupach A15 i A30.

Stężenie Cu w wątrobie szczurów suplementowanych tauryną nie różniło się istotnie od jej stężenia w wątrobie zwierząt z grupy kontrolnej, jednak zmieniała się w zależności od wieku zwierząt: u zwierząt młodszych obserwowano tendencję spadkową, a u starszych tendencję wzrostową w stężeniu Cu w wątrobie (Kilic i Yildirim, 2009). W prowadzonych przez mnie badaniach (na młodych samcach myszy) odnotowano podwyższenie stężenia Cu w wątrobie zwierząt suplementowanych tauryną, jednak przyczynę uzyskania odmiennych wyników może stanowić wykorzystanie innego modelu zwierzęcego. W badaniach własnych wzrost stężenia Cu w wątrobie obserwowano także u zwierząt ekspozycyjnych na alkohol - nie różnił się on istotnie od poziomu podstawowego, ale był wyższy niż w przypadku zwierząt z grup suplementowanych tauryną. Jest to zgodne z wynikami badań, których autorzy sugerują, że długotrwały wzrost stężenia Cu w wątrobie sprzyja nekrozie hepatocytów, w konsekwencji prowadząc do alkoholowej choroby wątroby (Rodriguez-Moreno i inni, 1997). W prowadzonych badaniach podawanie tauryny i etanolu jednocześnie skutkowało podwyższeniem stężenia Cu w wątrobie w porównaniu do grupy kontrolnej, jednak tylko u zwierząt z grupy INT1. Stężenie Cu w grupie INT1 utrzymywało się na poziomie uzyskanym dla grup suplementowanych wyłącznie tauryną, świadcząc o silniejszym działaniu aminokwasu na ten parametr. Co ciekawe w grupie INT2 odnotowano obniżenie stężenia Cu w wątrobie, poniżej poziomu podstawowego. Aby wykluczyć wystąpienie błędu należałoby sprawdzić czy chroniczna podaż obu substancji wywołałaby podobny efekt.

VII. WNIOSKI

1. Tauryna niweluje niektóre z negatywnych skutków działania alkoholu i sprzyja przywracaniu homeostazy organizmu:
 - suplementacja tauryną korzystnie wpływa na profil lipidowy powodując niewielki wzrost zawartości cholesterolu HDL (obniżony wskutek działania alkoholu) oraz spadek zawartości cholesterolu LDL (podwyższony wskutek działania alkoholu),
 - suplementacja tauryną korzystnie wpływa na aktywność ALP, ALT i AST podwyższoną wskutek spożywania alkoholu,
 - suplementacja tauryną normalizuje aktywność bariery antyoksydacyjnej obniżoną wskutek działania alkoholu,
 - suplementacja tauryną może częściowo obniżyć stopień peroksydacji lipidów podwyższony wskutek narażenia na alkohol.
2. Działanie tauryny w obecności alkoholu nie zapewnia utrzymania homeostazy w wielu badanych aspektach fizjologicznych:
 - zarówno krótkotrwała suplementacja tauryną, ekspozycja na alkohol, jak i jednoczesna ekspozycja na obie substancje biologicznie czynne nie wywołuje istotnych zmian w przypadku większości parametrów morfologicznych krwi,
 - tauryna nie wpływa na mózgowy poziom GSH zmieniony działaniem alkoholu,
 - krótkotrwała ekspozycja na taurynę, alkohol, jak i obie substancje jednocześnie nie wywołuje zasadniczych zmian w histologicznej strukturze jąder i nerek,
 - suplementacja tauryną nie powoduje istotnych zmian w stężeniu większości mikro- i makroelementów w nerkach oraz w wątrobie, w porównaniu do ich stężenia uzyskanego dla zwierząt, którym podawany był alkohol (z wyjątkiem stężenia Fe w wątrobie).
3. Aby w pełni zrozumieć ochronne działanie tauryny przeciwko szkodliwym skutkom spożywania alkoholu i rozwiązać niektóre z pojawiających się w eksperymencie ostrym wątpliwości uzasadnione jest przeprowadzenie w przyszłości eksperymentu chronicznego.

VIII. STRESZCZENIE

W ciągu ostatnich kilkunastu lat tauryna oraz alkohol stały się przedmiotem licznych badań. Badania dotyczące ich wzajemnej interakcji skupiają się przede wszystkim na aspektach behawioralnych oraz lokomotorycznych, a tylko nieliczne testują ich wpływ na parametry fizjologiczne. Niniejsza praca powstała w celu uzupełnienia tej luki w dotychczasowym stanie wiedzy.

W związku z tym, że tauryna znana jest ze swoich właściwości antyoksydacyjnych celem niniejszej pracy było sprawdzenie czy jej suplementacja jest w stanie zmniejszyć negatywny wpływ alkoholu na homeostazę organizmu. Przeprowadzona analiza wykazała, że suplementacja tauryną prowadzi do podwyższenia poziomu cholesterolu HDL oraz obniżenia poziomu cholesterolu LDL zmienionych wskutek spożycia alkoholu. Co więcej, analiza ujawniła również, że suplementacja tauryną poprawia aktywność enzymów wątrobowych (ALP, ALT i AST) oraz normalizuje działanie bariery antyoksydacyjnej organizmu (CAT, GPx i SOD) zaburzonej działaniem alkoholu. Przeprowadzona analiza wskazała także, że tauryna może wykazywać zdolność do częściowego obniżenia stopnia peroksydacji lipidów, podwyższonego wskutek spożywania alkoholu. Analiza danych wykazała też, że krótkotrwała ekspozycja na obie badane substancje nie powoduje istotnych zmian w przypadku większości parametrów morfologicznych krwi, w histologicznej strukturze jąder i nerek oraz w stężeniu większości mikro- i makroelementów w nerkach i wątrobie.

Uzyskane wyniki wskazują, że tauryna wykazuje potencjał do przeciwdziałania negatywnym skutkom działania alkoholu i przywracania zaburzonej homeostazy organizmu. Badania własne prowadzone były tylko w jednym interwale czasowym - 24 h, dlatego aby w pełni zrozumieć wyżej opisane ochronne działanie tauryny uzasadnione jest uzupełnienie badań o eksperyment chroniczny.

SŁOWA KLUCZOWE: alkohol etylowy, CAT, Cu, Fe, GPx, GSH, histologia, MDA, Mg, parametry biochemiczne krwi, parametry morfologiczne krwi, SOD, tauryna, Zn.

IX. SUMMARY

In recent years, both taurine and ethanol are the subject of numerous research. However, most of research on the interaction between these two substances is focused mainly on the behavioral and locomotor functions, and only a few test the taurine and ethanol influence on physiological parameters. The present dissertation arose to fill the existing gap in the current state of knowledge.

Due to the fact that taurine is well-known for its antioxidant properties, the aim of this research was to determine if taurine supplementation is capable of decreasing ethanol's negative influence on body's homeostasis. Statistical analysis of the obtained results revealed that taurine supplementation increases the HDL cholesterol level and decreases the LDL cholesterol level, both changed due to the ethanol consumption. Furthermore, it was noted that the taurine supplementation improves hepatic enzymes activity (ALP, ALT and AST), as well as, normalizes the activity of body's natural antioxidant barrier (CAT, GPx and SOD). This research also revealed that taurine may partially decrease the lipid peroxidation level, which has increased also due to the ethanol exposure. Statistical analysis showed that short exposure to both substances did not lead to significant changes in levels of most blood morphological parameters tested, in histopathological structure of kidneys and testicles, as well as, in the concentrations of most of the tested micro- and macronutrients in liver and kidneys.

In conclusion, the obtained results suggest that taurine demonstrates the potential to counteract the negative effects of the ethanol consumption and to restore the disturbed body's homeostasis. However, the present research was conducted only in the acute time interval. Thus, to fully understand above-described taurine protective effect on body's homeostasis, the present research should be extended to the chronic exposure.

KEYWORDS: blood biochemical parameters, blood morphological parameters, CAT, Cu, ethyl alcohol, Fe, GPx, GSH, histology, MDA, Mg, SOD, taurine, Zn.

X. LITERATURA

1. Abarikwu S.O., Duru Q.C., Chinonso O.V., Njoku R.C. (2016). Antioxidant enzymes activity, lipid peroxidation, oxidative damage in the testis and epididymis, and steroidogenesis in rats after co-exposure to atrazine and ethanol. *Andrologia* 48: 548-557.
2. Abbasoglu L., Kalaz E.B., Soluk-Tekkesin M., Olgac V., Dogru-Abbasoglu S., Uysal M. (2012). Beneficial effects of taurine and carnosine in experimental ischemia/reperfusion injury in testis. *Pediatric Surgery International* 28: 1125-1131.
3. Abd El Kader M.A., El Kafrawy M.H., Tolba A.M.A., Ali M.M., Mohamed A.S. (2015). Evaluation of taurine role on some biochemical and histological alterations in γ -irradiated rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 30(1): 263-271.
4. Abdel-Moneim A.M. (2013). Effects of taurine against histomorphological and ultrastructural changes in the testes of mice exposed to aluminium chloride. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju* 64: 405-414.
5. Adams C. (2014). Anaesthetic implications of acute and chronic alcohol abuse. *Southern African Journal of Anaesthesia and Analgesia* 16(3): 42-29.
6. Adedara I., Olabivi B., Ojuade T.J., Idris U., Onibivo E., Farombi E. (2017). Taurine reverses sodium fluoride-mediated increase in inflammation, caspase-3 activity, and oxidative damage along the brain-pituitary-gonadal axis in male rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 95(9): 1019-1029.
7. Agarwal A., Aponte-Mellado A., Premkumar B.J., Shaman A., Gupta S. (2012). The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology* 10(49): 1-31.
8. Ahmad M.K., Khan A.A., Mahmood R. (2013). Taurine ameliorates potassium bromate-induced kidney damage in rats. *Amino Acids* 45: 1109-1121.
9. Albadri C.T., Al Ani I.M., Hiba H.M.A. (2013). Alcohol consumption and its effect on testicular structure and on sperm count and motility in parent mice and their offspring. *International Medical Journal Malaysia* 12(1): 43-48.
10. Al Kaktani M. (2010). Renal damage mediated by oxidative stress in mice treated with aluminium chloride: protective effect of taurine. *Journal of Biological Science* 10(7): 584-595.

11. Aluwong T., Kawu M., Raji M., Dzenda T., Govwang F., Sinkalu V., Ayo J. (2013). Effect of yeast probiotic on growth, antioxidant enzyme activities and malodialdehyde concentration of broiler chicken. *Antioxidants* 2: 326-339.
12. Anand P., Rajakumar D., Felix A.J.W., Balasubramanian T. (2010). Effect of oral administration of antioxidant taurine on haematological parameters in Wistar rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 13(16): 785-793.
13. Anand P., Rajakumar D., Jeraud M., Felix A.J.W., Balasubramanian T. (2011). Effects of taurine on glutathione peroxidase, glutathione reductase and reduced glutathione levels in rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 14(3): 219-225.
14. Aragon C.M.G., Trauden L.E., Amit Z. (1992). Effect of taurine on ethanol-induced changes in open-field locomotor activity. *Psychopharmacology* 107: 337-340.
15. Arranz S., Chiva-Blanch G., Valderas-Martínez P., Medina-Remón A., Lamuela-Raventós R.M., Estruch R. (2012). Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer. *Nutrients* 4: 759-781.
16. Asuk A.A., Ofem O.E., Ajeigbe K.O., Eteng M.U., Omega K. (2013). Effect of multi-fruit wine on some haematological parameters of male and female rats. *World Journal of Medicine and Medical Science Research* 1(6): 108-114.
17. Backus R.C., Rogers Q.R., Rosenquist G.L., Calam J., Morris J.G. (1995). Diets causing taurine depletion in cats substantially elevate postprandial plasma cholecystokinin concentration. *Journal of Nutrition* 125.12 III: 2650-2656.
18. Bancroft J.D., Gamble M. (2008). Theory and practice of histological techniques. *Elsevier Health Science*. Filadelfia, PA, USA.
19. Bąbala A., Działo J., Deptuła W. (2011). Alkohol a zdrowie. *Kosmos – problemy nauk biologicznych* 60(1-2): 189-194.
20. Bellentani S., Pecorari M., Cordoma P., Marchegiano P., Manenti F., Bosisio E., De Fabiani E., Galli G. (1987). Taurine increases bile acid pool size and reduces bile saturation index in the hamster. *Journal of Lipid Research* 28: 1021-1027.
21. Bhogade R.B., Suryakar A.N., Joshi N.G. (2013). Effect of hemodialysis on serum copper and zinc levels in renal failure patients. *European Journal of General Medicine* 10(3): 154-157.
22. Biasetti M., Dawson Jr. R. (2002). Effects of sulphur containing amino acids on iron and nitric oxide stimulated catecholamine oxidation. *Amino Acids* 22(4): 351-368.
23. Bilaska A., Kryczyk A., Włodek L. (2007). Różne oblicza biologicznej roli glutationu. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 61: 438-453.

24. Birben E., Sahiner U.M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal* 5: 9-19.
25. Bitoun M., Tappaz M. (2000). Gene expression of taurine transporter and taurine biosynthetic enzymes in brain of rats with acute and chronic hyperosmotic plasma. A comparative study with gene expression of myo-inositol transporter, betaine transporter and sorbitol biosynthetic enzyme. *Molecular Brain Research* 77: 10-18.
26. Bode C., Bode J.C. (1997). Alcohol's role in gastrointestinal tract disorders. *Alcohol Health and Research World* 21(1): 76-83.
27. Breitenbach M., Eckl P. (2015). Introduction to oxidative stress in biomedical and biological research. *Biomolecules* 5: 1169-1177.
28. Bridges C.C., Shamsul Ola M., Prasad P.D., El-Sherebeny A., Ganapathy V., Smith S.B. (2001). Regulation of taurine transporter expression by NO in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Cell Physiology – American Journal of Physiology* 281: 1825-1836.
29. Brzóska M.M., Moniuszko-Jakoniuk J., Piłat-Marcinkiewicz B., Sawicki B. (2003). Liver and kidney function and histology in rats exposed to cadmium and ethanol. *Alcohol and Alcoholism* 38(1): 2-10.
30. Cacciatore I., Cornacchia C., Pinnen F., Mollica A., Di Stefano A. (2010). Prodrug approach for increasing cellular glutathione levels. *Molecules* 15: 1242-1264.
31. Cardoso Fernandes Toffolo M., Silva de Aguiar-Nemer A., da Silva-Fonseca V.A. (2012). Alcohol: effects on nutritional status, lipid profile and blood pressure. *Journal of Endocrinology and Metabolism* 2(6): 205-211.
32. Chang Y.J., Peng C.Y., Lan Y.C. (2017). Consumption of energy drinks among undergraduate students in Taiwan: related factors and associations with substance use. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14: 954-963.
33. Chen W., Guo J.X., Chang P. (2012). The effect of taurine on cholesterol metabolism. *Molecular Nutrition and Food Research* 56: 681-690.
34. Chesney R.W., Han X., Patters A.B. (2010). Taurine and the renal system. *Journal of Biomedical Science* 17(1): 1-10.
35. Choi M.J., Kim J.H., Chang K.J. (2006). The effect of dietary taurine supplementation on plasma and liver lipid concentrations and free amino acid concentrations in rats fed with a high-cholesterol diet. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 583: 235-242.

36. Chung M.C., Malatesta P., Longhin Bosquesi P., Yamasaki P.R., dos Santos J.L., Oliveira Vizioli E. (2012). Advances in drug design based on the amino acid approach: taurine analogues for the treatment of CNS diseases. *Pharmaceuticals* 5: 1128-1146.
37. Comporti M., Signorini C., Leoncini S., Gardi C., Ciccoli L., Giardini A., Vecchio D., Arezzini B. (2010). Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge. *Genes and Nutrition* 5:101-109.
38. Das S.K., Hiran K.R., Mukherjee S., Vasudevan D.M. (2007). Oxidative stress in the primary event: effects of ethanol consumption in brain. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 22(1): 99-104.
39. De Luca A., Pierno S., Conte Camerino D. (2015). Taurine: the appeal of a safe amino acid for skeletal muscle disorders. *Journal of Translation Medicine* 13: 243-261.
40. De Oliveira e Silva E.R., Foster D., Mc Gee Harper M., Seidman C.E., Smith J.D., Breslow J.L., Brinton E.A. (2000). Alcohol consumption raises HDL cholesterol levels by increasing the transport rate of apolipoproteins A-I and A-II. *Circulation* 102: 2347-2352.
41. Dinu D., Nechifor M.T., Movileanu L. (2005). Ethanol-induced alterations of the antioxidant defense system in rat kidney. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 19(6): 386-395.
42. Divakaran S. (2006). Taurine: an amino acid rich in fish meal, Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
43. Dosumu O.O., Duru F.I.O., Osinubi A.A., Oremosu A.A., Noronha C.C. (2010). Influence of virgin coconut oil (VCNO) on oxidative stress, serum testosterone and gonadotropic hormones (FSH, LH) in chronic ethanol ingestion. *Agriculture and Biology Journal of North America* 1(6): 1126-1132.
44. Dosumu O.O., Osinubi A.A., Duru F.I.O. (2014). Alcohol induced testicular damage: can abstinence equal recovery? *Middle East Fertility Society Journal* 19: 221-228.
45. Ďuračková Z. (2010). Some current insights into oxidative stress. *Physiological Research* 59: 459-469.
46. Ebrahim E.E., Youssef E.M.I., Bayoumy E.S., Samaha S.R. (2012). Natural antioxidant effects on ethanol-induced liver injury in albino rats. *Al-Azhar Assiut Medical Journal* 10(3): 133-155.

47. Elanchezhian, Yoganandh T., Mayilsamy S., Radhakrishnan S. (2017). Comparison of haematological parameters between alcoholics and non-alcoholics. *International Journal of Research in Medical Sciences* 5(11): 5041-5047.
48. Elshawi O.E., Nabil A.I., Mahmoud M.F. (2014). Testicular damages mediated by oxidative stress in Swiss Albino rats exposed to lead acetate and gamma rays co-toxicity. The possible protective role of taurine. *Journal of Applied Environmental and Biological Science* 4(8): 279-291.
49. Emanuele M.A., Emanuele N. (2001). Alcohol and the male reproductive system. *Alcohol Research and Health* 25(4): 282-287.
50. Epstein M. (1997). Alcohol's impact on kidney function. *Alcohol Health and Research World* 21(1): 84-93.
51. Erdem A., Gündoğan N.Ü., Usubütün A., Kiliç K., Erdem R., Kara A., Bozkurt A. (2000). The protective effect of taurine against gentamicin-induced acute tubular necrosis. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 15: 1175-1182.
52. Erpek S., Balkaya M., Ünsal H., Ünsal C. (2004). Effects of alcohol and passive cigarette smoking on the Swiss Albino mice testes. *Inönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 11(1): 1-6.
53. Etim N.A.N., Enyenihi G.E., Williams M.E., Udo M.A.D., Offiong E.E.A. (2013). Haematological parameters: indicators of the physiological status of farm animals. *British Journal of Science* 10(1): 33-45.
54. Etim N.A.N., Enyenihi G.E., Akpabio U., Offiong E.E.A. (2014a). Effects of nutrition on haematology of rabbits: a review. *European Scientific Journal* 10(3): 413-424.
55. Etim N.A.N., Williams M.E., Akpabio U., Offiong E.E.A. (2014b). Haematological parameters and factors affecting their values. *Agricultural Science* 2(1): 37-47.
56. Gautam D.K., Misro M.M., Chaki S.P., Sehgal N. (2006). H₂O₂ at physiological concentrations modulates Leydig cell function, inducing oxidative stress and apoptosis. *Apoptosis* 11: 39-46.
57. Gecit I., Kavak S., Demir H., Güneş M., Pirincci N., Cetin C., Ceylan K., Benli E., Yildiz I. (2011). Serum Trace Element Levels in Patients with Bladder Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 12: 3409-3413.
58. Giammarioli S., Filesi C., Sanzini E. (1999). Oxidative stress markers: specificity and measurements techniques. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* 35(4): 563-576.
59. Ginsburg B.C., Lamb R.J. (2008). Taurine and ethanol interactions: behavioral effects in mice. *European Journal of Pharmacology* 578(2-3): 228-237.

60. Gottschall-Pass K. (1998). Zinc and taurine interactions in maternofetal metabolism. Department of Pharmacy and Nutrition. Saskatchewan University. Saskatoon, Kanada.
61. Guo R., Ren J. (2010). Alcohol and acetaldehyde in public health: from marvel to menace. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7: 1285-1301.
62. Gupta C.P. (2014). Role of iron (Fe) in body. *Journal of Applied Chemistry* 7(2): 38-46.
63. Hagar H.H. (2004). The protective effect of taurine against cyclosporine A-induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *Toxicology letters* 151: 335-343.
64. Han J., Tian H., Lian Y., Yu Y., Lu C., Li X., Zhang R., Xu H. (2015). Quetiapine mitigates the ethanol-induced oxidative stress in brain tissue, but not in the liver, of the rats. *Neuropsychiatric disease and treatment* 11: 1473-1482.
65. Hashem K.M., He F.J., MacGregor G.A. (2017). Cross-sectional surveys of the amount of sugar, energy and caffeine in sugar-sweetened drinks marketed and consumed as energy drinks in the UK between 2015 and 2017: monitoring reformulation progress. *British Medical Journal* 7(12). DOI: 10.1136/bmjopen-2017-018136.
66. Hassan S.M.A., Saeed A.K., Hussein A.J. (2015). Ethanol-induced hepatic and renal histopathological changes BALB/c mice. *Journal of Natural Science Research* 5(10): 12-20.
67. Hayes K.C. (1981). Taurine in metabolism. *Annual Review in Nutrition* 1: 401-425.
68. He Y., Zeng F., Liu Q., Ju W., Fu H., Hao H., Li L., Xie Y. (2010). Protective effect of magnesium isoglycyrhizinate on ethanol-induced testicular injuries in mice. *Journal of Biomedical Research* 24(2): 153-160.
69. Heyland D.K., Dhaliwal R., Suchner U., Berger M.M. (2005). Antioxidant nutrients: a systematic review of trace elements and vitamins in the critically ill patient. *Intensive Care Medicine Journal* 31: 327-337.
70. Ho E., Galuogahi K.K., Liu C.C., Bhindi R. (2013). Biological markers of oxidative stress: applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biology* 1: 483-491.
71. Huxtable R.J. (1992). Physiological actions of taurine. *Physiological Reviews* 72(1): 101-163.
72. Hwang D.F., Wang L.C., Cheng H.M. (1998). Effect of taurine on toxicity of copper in rats. *Food and Chemical Toxicology* 36(3): 239-244.
73. Ignatowicz E., Florek E., Bolt K., Kulza M. (2011). Stres oksydacyjny indukowany przez dym tytoniowy oraz etanol. *Przegląd Lekarski* 68(10): 1021-1026.

74. Ioannou G.N., Dominitz J.A., Weiss N.S., Heagerty P.J., Kowdley K.V. (2004). The effect of alcohol consumption on the prevalence of iron overload, iron deficiency, and iron deficiency anemia. *Gastroenterology* 126: 1293-1301.
75. Ishikura K., Miyazaki T., Ra S.G., Endo S., Nakamura Y., Matsuzaka T., Miyakawa S., Ohmori H. (2011). Effect of taurine supplementation on the alterations in amino acid content in skeletal muscle with exercise in rat. *Journal of Sports Science and Medicine* 10: 306-314.
76. Islambulchilar M., Asvadi I., Sanaat Z., Esfahani A., Sattari M. (2015). Effect of taurine on febrile episodes in acute lymphoblastic leukemia. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 5(1): 103-108.
77. Izyumov D.S., Domnina L.V., Nepryakhina O.K., Avetisyan A.V., Golyshev S.A., Ivanova O.Y., Korotetskaya M.V., Lyamzaev K.G., Pletsjushkina O.Y., Popova E.N., Chernyak B.V. (2010). Mitochondria as source of reactive oxygen species under oxidative stress. Study with novel mitochondria - targeted antioxidants - the "Skulachev-Ion" Derivatives. *Biochemistry* 75(2): 149-157.
78. Jagadeesan G., Sankarsami Pillai S. (2007). Hepatoprotective effects of taurine against mercury induced toxicity in rats. *Journal of Environmental Biology* 28(4): 753-756.
79. Jelski W., Grochowska-Skiba B., Szmitkowski M. (2007). Alcohol dehydrogenase and the metabolism of ethanol in the brain. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 61: 226-230.
80. Joharapurkar A.A., Zambad S.P., Wanjari M.M., Umathe S.N. (2003). *In vivo* evaluation of antioxidant activity of alcoholic extract of *Rubia cordifolia* Linn. and its influence on ethanol-induced immunosuppression. *Indian Journal of Pharmacology* 35: 232-236.
81. Jong C.J., Azuma J., Schaffer S. (2012). Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: prevention of mitochondrial oxidant production. *Amino Acids* 42: 2223-2232.
82. Kasperska-Zajac A., Brzoza Z., Rogala B., Polaniak R., Birkner E. (2008). Antioxidant enzyme activity and malondialdehyde concentration in the plasma and erythrocytes of patients with urticaria induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 18(5): 372-375.
83. Kasztelan-Szczerbińska B., Słomka M., Daniluk J., Celiński K., Cichoż-Lach H., Szczerbiński M., Zwolak A., Jastrzębska I. (2010). Stellate cells as a central regulator of intracellular signaling in the process of liver fibrosis. *Postępy Nauk Medycznych* 1: 69-74.

84. Kilic N., Yildirim Z. (2009). Effects of taurine and age on liver antioxidant status and protein oxidation. *Turkish Journal of Biochemistry* 33(4): 169-174.
85. Kim W. (2003). Debunking the effects of taurine in Red Bull energy drink. *Nutrition Bytes* 9(1): 1-7.
86. Kim Y.C., Kim S.Y., Sohn Y.R. (2003). Effect of age increase on metabolism and toxicity of ethanol in female rats. *Life Sciences* 74: 509-519.
87. Klusek J., Klusek J. (2012). Alkohol a układ pokarmowy. *Kosmos - problemy nauk biologicznych* 61(1): 169-175.
88. Kokot T., Nowakowska-Zajdel E., Muc-Wierzgoń M., Grochowska-Niedworok E. (2013). Magnesium and alcohol. W: Magnesium in Human Health and Disease. Human Press, New York, US.
89. Kulasek G., Jank M., Sawosz E. (2004). Biologiczna rola tauryny u ssaków. *Życie Weterynaryjne* 79(11): 603-608.
90. Kumar S., Kumari A., Murarka S. (2009). Lifestyle factors in deteriorating male reproductive health. *Indian Journal of Experimental Biology* 47: 615-624.
91. Kumar D.V.N., Narasaiah K.L., Rao S.P. (2016). Ameliorative effect of *Bacopa monnieri* on alcohol induced hepatotoxicity and oxidative stress in albino rats. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 5(3): 287-292.
92. Lieb M., Palm U., Hock B., Schwarz M., Domke I., Soyka M. (2011). Effects of alcohol consumption on iron metabolism. *The American Journal of Drug and Alcohol Abuse* 37(1): 68-73.
93. Lis K. (2009). Wpływ spożywania alkoholu etylowego na wyniki badań laboratoryjnych. *Alkoholizm i Narkomania* 22(1): 65-73.
94. Lobo M.V.T., Alonso F.J.M., Rio R.M. (2000). Immunohistochemical localization of taurine in the male reproductive organs of the rat. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 48(3): 313-320.
95. Lourenço R., Camilo M.E. (2002). Taurine: a conditionally essential amino acid in humans? An overview in health and disease. *Nutrición Hospitalaria* XVII(6): 262-270.
96. Lubman D., Peacock A., Droste N., Pennay E., Miller P., Bruno R., Lloyd B., Hyder S., Roxburgh A., Wadds P., Tomsen S., Brown J. (2013). Alcohol and energy drinks in NSW. NSW Government Health Report: 1-231.
97. Lucas D.L., Brown R.A., Wassef M., Giles T.D. (2005). Alcohol and the cardiovascular system research challenges and opportunities. *Journal of the American College of Cardiology* 45(12): 1916-1924.

98. Macdougall I.C., Bircher A.J., Eckardt K.U., Obrador G.T., Pollock C.A., Stenvinkel P., Swinkels D.W., Wanner C., Weiss G., Chertow G.M. (2016). Iron management in chronic kidney disease: conclusion from “Kidney Disease: Improving Global Outcomes” (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney International* 89: 28-39.
99. Mandillo S., Tucci V., Holter S.M., Meziane H., Banchaabouchi M.A., Kallnik M., Lad H.V., Nolan P.M., Ouagazzal A.M., Coghil E.L., Gale K., Golini E., Jacquot S., Krezel W., Parker A., Riet F., Schneider I., Marazziti D., Auwerx J., Brown S.D., Chambon P., Rosenthal P., Tocchini-Valentini G., Wurst W. (2008). Reliability, robustness, and reproducibility in mouse behavioral phenotyping: a cross-laboratory study. *Physiological genomics* 23: 243-255.
100. Maneesh M., Dutta S., Chakrabarti A., Vasudevan D.M. (2006). Alcohol abuse-duration dependent decrease in plasma testosterone and antioxidants in male. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 50(3): 291-296.
101. Mani V., Siddique A.I., Arivalagan S., Thomas N.S., Namasivayam N. (2016). Zingerone ameliorates hepatic and renal damage in alcohol-induced toxicity in experimental rats. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases* 6(3): 125-132.
102. Manzo-Avalos S., Saavedra-Molina A. (2010). Cellular and mitochondrial effects of alcohol consumption. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7: 4281-4304.
103. Maralla S., Reddy K.S. (2012). Protective influence of ginger on hematological parameters and antioxidant system in the blood of rats subjected to withdrawal from long term alcohol consumption. *International Journal of Cell Science and Biotechnology* 1: 104-110.
104. Menon K.K.G., Natraj C.V. (1984). Nutrients in the shadow-nutrients of substance. *Journal of Biosciences* 4: 459-474.
105. Militante J.D., Lombardini J.B. (2004). Dietary taurine supplementation: hypolipidemic and antiatherogenic effects. *Nutrition Research* 24: 787-801.
106. Mochizuki H., Oda H., Yokogoshi H. (2014). Increasing effect of dietary taurine on the serum HDL-cholesterol concentrations in rat. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 62(3): 578-579.
107. Moe S.M. (2008). Disorders involving calcium, phosphorus and magnesium. *Primary Care* 35(2): 215-234.

108. Mohamed N.A., Abdel Gawad H.S. (2017). Taurine dietary supplementation attenuates brain, thyroid, testicular disturbances and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetes mellitus in male rats. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Science* 6(3): 247-252.
109. Mohommad M.K., Zhou Z., Cave M., Barve A., McClain C.J. (2012). Zinc and liver disease. *Nutrition in Clinical Practice* 27(1): 8-20.
110. Mulware S.J. (2013). Comparative trace elemental analysis in cancerous and noncancerous human tissues using PIXE. *Journal of Biophysics*: 1-8.
111. Murakami S., Kondo Y., Toda Y., Kitajima H., Kameo K., Sakono M., Fakuda N. (2002). Effect of taurine on cholesterol metabolism in hamsters: up-regulation of low density lipoprotein (LDL) receptor by taurine. *Life Sciences* 70: 2355-2366.
112. Naito Y., Lee M.C., Kato Y., Nagai R., Yonei Y. (2010). Oxidative stress markers. *Anti-aging medicine* 7(5): 36-44.
113. Nandhini A.T.A., Thirunavukkarasu V., Ravichandran M.K., Anuradha C.V. (2005). Effect of taurine on biomarkers of oxidative stress in tissues of fructose-fed insulin-resistant rats. *Singapore Medical Journal* 46(2): 82-87.
120. Nolen-Hoeksema S. (2004). Gender differences in risk factors and consequences for alcohol use and problems. *Clinical Psychology Review* 24: 981-1010.
114. Nonaka H., Tsujino T., Watari Y., Emoto N., Yokoyama M. (2001). Taurine prevents the decrease in expression and secretion of extracellular superoxide dismutase induced by homocysteine - amelioration of homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress by taurine. *Circulation* 104: 1165-1170.
115. Nowak D., Jasionowski A. (2015). Analysis of the consumption of caffeinated energy drinks among polish adolescents. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 12: 7910-7921.
116. National Toxicology Program. (2006). Biomarkers of toxicity. 20-21 September, Raleigh, NC, USA.
117. O'Brien P.J., Siraki A.G., Shangari N. (2005). Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. *Critical Reviews in Toxicology* 35(7): 609-662.
118. Ochsendorf F.R. (1999). Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Human Reproduction* 5(5): 399-420.

119. Oduola T., Adeosun O.G., Oduola T.A., Agbaje N.R., Raheem Z.A. (2005). Drinking patterns: biochemical and haematological findings in alcohol consumers in Ile-Ife, Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 4(11): 1304-1308.
120. Oja S.S., Saransaari P. (2007). Pharmacology of taurine. *Proceedings of the Western Pharmacology Society Journal* 50: 8-15.
121. Okafor O.Y., Erukainure O.L., Ajiboye J.A., Adejobi R.O., Owolabi F.O., Kosoko S.B. (2011). Modulatory effect of pineapple peel extract on lipid peroxidation, catalase activity and hepatic biomarker levels in blood plasma of alcohol-induced oxidative stressed rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 1(1): 12-14.
122. Olive M.F. (2002). Interactions between taurine and ethanol in the central nervous system. *Amino Acids* 23: 345-357.
123. Oloyede O.B., Sunmonu T.O. (2008). Decrease in activities on selected rat liver enzymes following consumption of chemical effluent. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management* 12(2): 95-100.
124. Osredkar J., Sustar N. (2011). Copper and zinc, biological role and significance of copper/zinc imbalance. *Journal of Clinical Toxicology* s3(1): 1-19.
125. Parildar-Karpuzoğlu H., Mehmetçik G., Özdemirler-Erata G., Doğru-Abbasoğlu S., Koçak-Toker N., Uysal M. (2008). Effect of taurine treatment on pro-oxidant-antioxidant balance in livers and brains of old rats. *Pharmacological Reports* 60: 673-678.
126. Pasin F., Porro E., Frattini F., Vescovi P., Franchini M., Sansoni P. (2014). Thrombocytopenia induced by a taurine-containing energy drink: an adverse reaction to herbal medicine. *Italian Journal of Medicine* 8(4): 259-261.
127. Paulsen D.F. (2012). Histology and cell biology: examination and board review. McGraw-Hill, New York.
128. Piotrowicz Z., Ochwanowska E. (2012). Alkohol a układ nerwowy. *Kosmos - problemy nauk biologicznych* 61(1): 133-142.
129. Plewka K., Szuster-Ciesielska A., Kandefler-Szerszeń M. (2009). Role of stellate cells in alcoholic liver fibrosis. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 63: 303-317.
130. Pushpakiran G., Mahalakshmi K., Anuradha C.V. (2004). Taurine restores ethanol-induced depletion of antioxidants and attenuates oxidative stress in rats tissues. *Amino Acids* 27: 91-96.
131. Rahman T., Hosen I., Towhidul Islam M.M., Uddin Shekhar H. (2012). Oxidative stress and human health. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 3: 997-1019.

132. Ramezani A., Goudarzi I., Lashkarboluki T., Ghorbanian M.T., Abrari K., Salamani M.E. (2012). Role of oxidative stress in ethanol-induced neurotoxicity in the developing cerebellum. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 15(4): 965-974.
133. Rana S.K., Sanders T.A.B. (1986). Taurine concentrations in the diet, plasma, urine and breast milk of vegans compared to omnivores. *British Journal of Nutrition* 56: 17-27.
134. Rhodes J.S., Best K., Belknap J.K., Finn D.A., Crabbe J.C. (2005). Evaluation of a simple model of ethanol drinking to intoxication in C57BL/6J mice. *Physiology and Behavior* 84: 53-63.
135. Riikonen J. (2004). Ethanol-induced alterations in the nervous system of rat, Academic Dissertation of the Faculty of Medicine of the University of Tampere, *Acta Universitatis Tampereensis* 997.
136. Ripps H., Shen W. (2012). Review: Taurine: a “very essential” amino acid. *Molecular Vision* 18: 2673-2686.
137. Rodriguez-Moreno F., González-Reimes E., Santolaria-Fernandez F., Galindo-Martin L., Hernandez-Torres O., Batista-Lopez N., Molina-Perez M. (1997). Zinc, copper, manganese, and iron in chronic alcoholic liver disease. *Alcohol* 14(1): 39-44.
138. Schaffer S.W., Jong C.J., KC R., Azuma J. (2010). Physiological roles of taurine in heart and muscle. *Journal of Biomedical Science* 17(1): 1-8.
139. Schaffer S., Takahashi K., Azuma J. (2010). Role of osmoregulation in the actions of taurine. *Amino Acids* 19(3-4): 527-546.
140. Schuller-Levis G.B., Park E. (2003). Taurine: new implications for an old amino acid. *FEMS Microbiology Letters* 226: 195-202.
141. Scott R.B., Reddy K.S., Husain K., Schlorf E.C., Rybak L.P., Somani S.M. (2000). Dose response of ethanol on antioxidant defense system of liver, lung, and kidney in rats. *Pathophysiology* 7: 25-32.
142. Shohami E., Beit-Yannai E., Horowitz M., Kohen R. (1997). Oxidative stress in closed-head injury: brain antioxidant capacity as an indicator of functional outcome. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 17: 1007-1019.
143. Shanmugam K.R., Ramakrishna C.H., Mallikarjuna K., Sathyavelu Reddy K. (2010). Protective effect of ginger against ethanol-induced renal damage and antioxidant enzymes in male albino rats. *Indian Journal of Experimental Biology* 48: 143-149.

144. Shrivastav A.B., Singh K.P. (2012). Tigers blood: haematological and biochemical studies. W: Moschandreu T.E. Blood Cell – An Overview of Studies in Hematology: 229-242.
145. Sid B., Verrax J., Calderon P.B. (2013). Role of oxidative stress in the pathogenesis of alcohol-induced liver disease. *Free Radical Research* 47(11): 894-904.
146. Sies H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry* 215: 213-219.
147. Sinha M., Manna P., Sil P.C. (2008). Cadmium-induced neurological disorders: prophylactic role of taurine. *Journal of Applied Toxicology* 28: 974-986.
148. Sinha M., Manna P., Sil P.C. (2008). Taurine protects the antioxidant defense system in the erythrocytes of cadmium treated mice. *BMB Reports* 28: 657-663.
149. Sirdah M.M., Abushahla A.K., Al-Sarraj H.A.A. (2013). Effect of the addition of antioxidant taurine on the complement blood count of whole blood stored at room temperature and at 4°C for up to 7 days. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 35(1): 44-51.
150. Sochor J., Nejdil L., Ruttkay-Nedecky B., Bezdekova A., Lukesova K., Zitka O., Cernei N., Mares P., Pohanka M., Adam V., Babula P., Beklova M., Zeman L., Kizek R. (2014). Investigating the influence of taurine on thiol antioxidant status in Wistar rats with multi-analytical approach. *Journal of Applied Biomedicine* 12(2): 97-110.
151. Soetan K.O., Olaiya C.O., Oyewole O.E. (2010). The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants: a review. *African Journal of Food Science* 4(5): 200-222.
152. Spitze A.R., Wong D.L., Rogers Q.R., Fascetti A.J. (2003). Taurine concentrations in animal fed ingredients; cooking influences taurine content. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 87: 251-262.
153. Spriet L.L., Whitfield J. (2015). Taurine and skeletal muscle function. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 18: 1-6.
154. Stapleton P.P., Charles R.P., Redmont H.P., Bouchier-Hayes D.J. (1997). Taurine and human nutrition. *Clinical Nutrition* 16: 103-108.
155. Stermer E. (2002). Alcohol consumption and the gastrointestinal tract. *The Israel Medical Association Journal* 4: 200-204.
156. Stevens M.J., Hosaka Y., Masterson J.A., Jones S.M., Thomas T.P., Larkin D.D. (1999). Downregulation of the human taurine transporter by glucose in cultured retinal pigment epithelial cells. *American Journal of Physiology* 277: 760-771.

157. Stipanuk M.H., Londono M., Lee J.I., Hu M., Yu A.F. (2002). Enzymes and metabolites of cysteine metabolism in nonhepatic tissues of rats show little response to changes in dietary protein or sulfur amino acid levels. *The Journal of Nutrition* 132(11): 3369-3378.
158. Sudha M., Rajkumar D. (2015). Effect of taurine pre-treatment on hematological parameters in isoproterenol induced myocardial infarction in Albino rats. *Scholars Journal of Applied Medical Sciences* 3(3E): 1362-1364.
159. Swaroop M. (2013). Remediation of hepatic antioxidant defense system during ethanol withdrawal stress with dietary ginger. *European Journal of Experimental Biology* 3(5): 262-267.
160. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A. (2009). Diagnostyka laboratoryjna Tom I. Gdański Uniwersytet Medyczny. Gdańsk: 61-62.
161. Szymański K., Winiarska K. (2008). Tauryna i jej potencjalnie wykorzystanie w terapii. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 62: 75-86.
162. Szymczak A., Niškiewicz I., Krela-Kaźmierczak I., Linke K. (2009). Influence of alcohol on selected gastrointestinal disorders. *Nowiny Lekarskie* 78(3-4): 222-227.
163. Ścibior D., Czeczot H. (2006). Katalaza - budowa, właściwości, funkcje. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 60: 170-180.
164. Ślósarska M. (1999). Metabolizm alkoholu. *Alkohol i Nauka* 4: 1-6.
165. Tan W., Bailey A.P., Shparago M., Busby B., Covington J., Johnson J.W., Young E., Gu J.W. (2007). Chronic alcohol consumption stimulates VEGF expression, tumor angiogenesis and progression of melanoma in mice. *Cancer Biology and Therapy* 6(8): 1222-1228.
166. Tappaz M.L. (2004). Taurine biosynthetic enzymes and taurine transporter: molecular identification and regulations. *Neurochemical Research* 29(1): 83-96.
167. Taranukhin A.G., Taranukhina E., Saransaari P., Podkletnova I.M., Pelto-Huikko M., Oja S.M. (2010). Neuroprotection by taurine in ethanol-induced apoptosis in the developing cerebellum. *Journal of Biomedical Science* 17(1): 1-12.
168. Teplova V.V., Belosludtseva K.K., Belosludtsevab N.V., Holmuhamedova E.L. (2010). Role of mitochondria in hepatotoxicity of ethanol. *Biophysics* 55(6): 1038-1047.
169. Teslariu O., Pasca A.S., Mititelu-Tartau L., Schiriac C.E., Gales C., Saftencu P.M., Nechifor M. (2016). The protective effect of zinc in experimental gentamicin induced acute renal failure in rats. *Journal of Physiology and Pharmacology* 67(5): 751-757.

170. Tomei S., Torimoto M., Hayashi Y., Inoue K., Yuasa H., Watanabe J. (2003). Kinetic characterization of carrier-mediated transport systems for D-glucose and taurocholate in the everted sacs of colon. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 26: 899–901.
171. Tremellen K. (2008). Oxidative stress and male infertility - a clinical perspective. *Human Reproduction* 14(3): 243-258.
172. Tsvetkova D.D., Klisurov R.C., Pankova S.A., Zlatkov B.A. (2015). Investigation of some pharmacological effects of caffeine and taurine in food supplements. *International Journal of Nutrition and Food Sciences* 4(1-1): 18-23.
173. Tvrđá E., Kňazická Z., Bárdos L., Massányi P., Lukáč N. (2011). Impact of oxidative stress on male fertility - a review. *Acta Veterinaria Hungarica* 59(4): 465-484.
174. Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160: 1-40.
175. Wang X., Liu M., Zhang C., Li S., Yang Q., Zhang J., Gong Z., Han J., Jia L. (2018). Antioxidant activity and protective effects of enzyme-extracted *Oudemansiella radiata* polysaccharides on alcohol-induced liver injury. *Molecules* 23: 481-495.
176. Weydert C.J., Cullen J.J. (2010). Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in cultured cells and tissues. *Nature Protocols* 5(1): 51-66.
177. Whitfield J.B., Zhu G., Heath A.C., Powell L.W., Martin N.G. (2001). Effects of alcohol consumption on indices of iron stores and of iron stores on alcohol intake markers. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 25(7): 1037-1045.
178. Wielkoszyński T., Zawadzki M., Lebek-Ordon A., Olek J., Korzonek-Szlacheta I. (2007). Enzymatyczne układy antyoksydacyjne - właściwości, występowanie i rola biologiczna. *Diagnostyka Laboratoryjna* 43: 283-294.
179. Wood W.G., Avdulov N.A., Chochina S.V., Igbavbao U. (2001). Lipid carried proteins and ethanol. *Journal of Biomedical Science* 8: 114-118.
180. Wójcik O.P., Koenig K.L., Zeleniuch-Jacquotte A., Costa M., Chen Y. (2010). The potential protective effects of taurine on coronary heart disease. *Atherosclerosis* 208: 19-25.
181. Wu J.Y., Prentice H. (2010). Role of taurine in the central nervous system. *Journal of Biomedical Science* 17: 1-6.
182. Xu Y.J., Arneja A.S., Tappia P.S., Dhalla N.S. (2008). The potential health benefits of taurine in cardiovascular disease. *Journal of Experimental and Clinical Cardiology* 13(2): 57-65.

183. Yang J., Wu G., Feng Y., Lv Q., Lin S., Hu J. (2010). Effects of taurine in male reproduction in rats of different ages. *Journal of Biomedical Science* 17(1): 1-9.
184. Yildirim Z., Kilic N. (2011). Effect of taurine and age on cerebellum antioxidant status and oxidative stress. *International Journal of Gerontology* 5: 166-170.
185. Zakhari S. (1997). Alcohol and the cardiovascular system: molecular mechanisms for beneficial and harmful action. *Alcohol Health and Research World* 21(1): 21-29.
186. Zhu J., Gao Z.Y. (2008). Clinical research for treatment of chronic hepatitis with magnesium isoglycrrhizinate. *Tianjin Pharmacy* 17: 902-904.

XI. SPIS TABEL

Tabela 1. Główne biomarkery stresu oksydacyjnego.

Tabela 2. Charakterystyka grup oraz dawki użyte w eksperymencie.

Tabela 3. Charakterystyka procesu mineralizacji wybranych narządów.

Tabela 4. Charakterystyka użytej metody analitycznej: długość fal, granice oznaczalności dla analizowanych metali, odzyski uzyskane dla certyfikowanych materiałów odniesienia (CRM) oraz względne odchylenie standardowe dla 10 powtórzeń.

XII. SPIS RYCIN

Rycina 1. Wzór strukturalny i przestrzenny tauryny.

Rycina 2. Synteza tauryny z cysteiny.

Rycina 3. Metaboliczne zależności pomiędzy reaktywnymi formami tlenu.

Rycina 4. Procent zmian zawartości leukocytów ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) we krwi myszy z grup eksperymentalnych w porównaniu do grupy kontrolnej.

Rycina 5. Procent zmian zawartości erytrocytów oraz hemoglobiny ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) we krwi myszy z grup ...

Rycina 6. Procent zmian średniej objętości erytrocytu ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) we krwi myszy z grup ...

Rycina 7. Procent zmian zawartości trombocytów ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) we krwi myszy z grup ...

Rycina 8. Procent zmian poziomu cholesterolu HDL ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w surowicy krwi myszy z grup ...

Rycina 9. Procent zmian poziomu cholesterolu LDL ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w surowicy krwi myszy z grup ...

Rycina 10. Procent zmian aktywności ALP ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w surowicy krwi myszy z grup ...

Rycina 11. Procent zmian aktywności AST ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w surowicy krwi myszy z grup ...

Rycina 12. Procent zmian aktywności ALT ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w surowicy krwi myszy z grup ...

- Rycina 13.** Procent zmian aktywności SOD ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w jądrach myszy z grup ...
- Rycina 14.** Procent zmian aktywności GPx ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w jądrach myszy z grup ...
- Rycina 15.** Procent zmian aktywności CAT ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w jądrach myszy z grup ...
- Rycina 16.** Procent zmian zawartości MDA ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w jądrach myszy z grup ...
- Rycina 17.** Procent zmian aktywności SOD ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w mózgu myszy z grup ...
- Rycina 18.** Procent zmian aktywności GPx ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w mózgu myszy z grup ...
- Rycina 19.** Procent zmian aktywności CAT ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w mózgu myszy z grup ...
- Rycina 20.** Procent zmian zawartości GSH ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w mózgu myszy z grup ...
- Rycina 21.** Przekrój przez jądra dojrzałych myszy Swiss z grup kontrolnej, INT1 oraz INT2.
- Rycina 22.** Przekrój przez nerki dojrzałych myszy Swiss z grupy kontrolnej, INT1 oraz INT2.
- Rycina 23.** Procent zmian stężenia Fe ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w nerkach myszy z grup eksperymentalnych w porównaniu do grupy kontrolnej.
- Rycina 24.** Procent zmian stężenia Mg ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w nerkach myszy z grup ...
- Rycina 25.** Procent zmian stężenia Zn ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w nerkach myszy z grup ...
- Rycina 26.** Procent zmian stężenia Cu ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w nerkach myszy z grup ...
- Rycina 27.** Procent zmian stężenia Fe ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w wątrobie myszy z grup ...
- Rycina 28.** Procent zmian stężenia Mg ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w wątrobie myszy z grup ...
- Rycina 29.** Procent zmian stężenia Zn ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w wątrobie myszy z grup ...
- Rycina 30.** Procent zmian stężenia Cu ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w wątrobie myszy z grup ...