

알코올 투여 방법이 흰쥐의 간과 뇌에서 산화적 스트레스유발에 미치는 영향

박민경[†] · 이영재*
청운대학교 식품영양학과
* 제주대학교 수의학과

Effect of Different Ethanol Treatments on the Oxidative Stress in Liver and Brain of SD Rats

Min-Kyung Park[†], and Yung-Jae Lee*

Dept. of Human Nutrition and Food Science, Chungwoon University, Hongsung, 350-701, Korea

* Dept. of Veterinary Medicine, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea

ABSTRACT – The effect of different ethanol feeding protocols on the oxidative stress in liver and brain of rats was studied. The rats were fed 5%-ethanol solution in drinking water (5%-EtOH group) or 2.5g ethanol/kg body wt. once daily intragastrically (2.5g-EtOH group). The levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and vitamin E in the liver, cerebrum and cerebellum were measured. In the liver of 5%-EtOH group, the level of TBARS was not changed, whereas vitamin E was significantly increased compared to control group. In the liver of 2.5g-EtOH group, the level of TBARS was significantly increased compared to control group and the vitamin E concentration was not affected. The levels of TBARS were increased and the vitamin E concentrations were decreased significantly both in the cerebrum and cerebellum in 5%-EtOH group as well as in 2.5g-EtOH group. These results show that lipid peroxidation and vitamin E concentration in liver were varied according to the conditions of ethanol treatment, however, the vitamin E contents in cerebrum and cerebellum were affected by both ethanol intoxications used in this study.

Key words: ethanol feeding, lipid peroxidation, vitamin E, liver, brain

알코올 섭취는 간을 비롯한 신경계, 소화기계 및 순환기계 등 여러 장기에 장애를 일으키며 그 원인은 복잡적이나 활성산소의 과다생성이 한 원인으로 추정되고 있다¹⁾. 활성산소는 반응성이 큰 것이 특징으로 생성 즉시 세포구성 물질과 반응하여 지질과산화 반응, 단백질 산화, DNA 절단 또는 부가물 생성 등의 산화적 스트레스를 유발하여 조직손상 및 질병발생을 초래할 수 있다²⁾. 알코올 섭취에 의한 산화적 스트레스의 유발은 Diluzio와 Hartman에 의해 알코올을 투여한 쥐의 간에서 지질과산화 반응물이 증가하였다고 보고되면서³⁾ 알려지기 시작하였으며 이 후 알코올에 의한 간 조직 손상과 산화적 스트레스의 관계를 밝히고자하는 연구가 다양하게 진행되었다.

세포막의 지질층 내에 위치하고 있는 비타민 E는 활성산소로부터 세포막을 보호할 수 있는 마지막 방어선이라 할만큼 지질과산화 반응의 억제 측면에 있어서는 중요한 항산화제이다⁴⁾. 비타민 E 결핍 식이를 섭취한 실험동물에 에탄올을 투여하면 간에서 지질과산화물의 증가가 일어난다는 보

고는 비타민 E가 에탄올에 의한 지질과산화 반응에 중요한 항산화제임을 보여주고 있다⁵⁾.

알코올은 간 뿐만 아니라 뇌조직에서도 산화적 스트레스를 유발하는 것으로 알려지고 있다. 한편, 뇌는 부위별 항산화제의 함량이 다를 뿐만 아니라⁶⁾ 특정 뇌 부위가 산화적 스트레스에 더욱 민감한 것으로 알려져⁷⁾, 알코올에 의한 산화적 스트레스의 유발 정도 또한 뇌 부위별로 다를 것으로 추정된다. 또한, 알코올에 의한 산화적 스트레스의 유발 및 조직손상의 정도는 알코올 섭취 수준, 기간, 방법, 성별 또는 함께 섭취한 음식물의 구성성분 등 여러 요인에 의해 달라질 수 있다. 본 연구에서는, 유사한 수준의 알코올을 일시에 또는 일정시간에 걸쳐 1개월간 반복적으로 섭취하였을 경우 알코올이 간과 뇌에서 산화적 스트레스에 미치는 영향을 알아보고 특히, 대뇌와 소뇌에서의 영향을 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

시약

α-tocopherol, tocopheryl acetate, 2-thiobarbituric acid 및

[†]Author to whom correspondence should be addressed.

1,1,3,3-tetraethoxypropane은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA)로부터 구입하였으며, 에탄올, 메탄올 및 핵산은 HPLC 등급을 사용하였다.

실험동물 및 에탄올 투여

실험동물은 Sprague-Dawley계 체중 180 ± 9 g의 웅성 흰쥐로 서울대학교 의과대학으로부터 분양 받아 실험실 환경에 1주 이상 순화시킨 후 1개월간 사육하였다. 사료와 물은 자유롭게 섭취할 수 있게 하였고 사육환경은 온도 $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 10\%$, 명암교대 12시간을 유지하였다.

실험군은, 5%의 에탄올을 함유한 물을 자유롭게 섭취하도록 한 군(5%-EtOH군)과 어떠한 처리도 하지 않은 대조군, 20%의 에탄올을 함유한 증류수를 2.5 g/kg이 되도록 1일 1회 강제 경구 투여한 군(2.5 g-EtOH군)과 생리식염수를 동일한 방법으로 처리한 대조군으로 나누었다.

장기채취

흰쥐를 12시간 절식시킨 후 마취과정 없이 경추탈골하고 즉시 대뇌, 소뇌 및 간을 적출하여 생리식염수로 세척한 후 액체질소로 동결하고 -70°C 에 보관하였다가 분석에 사용하였다.

지질과산화 반응 측정

간조직은 0.15 M-KCl 용액을, 뇌조직은 20 mM-PBS(pH 7.4)을 이용하여 조직 균질기 (Teflon Potter-Elevhiem Homogenizer)로 균질액을 만들고 Mihara 등⁸⁾의 방법으로 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)를 정량하여 측정하였다.

비타민 E 정량

간과 뇌에서의 비타민 E 함량은 Vatassery와 Hagen⁹⁾, Westerberg 등¹⁰⁾의 방법을 변형하여 정량하였다. 즉, 50 mg의 조직에 핵산에 녹인 내부 표준물질 tocopheryl acetate (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 200 μl 와 에탄올 1 ml를 가한 후 조직 균질기를 이용하여 일차 균질화하고 다시 핵산 1.8 ml를 가하여 추출하였다. 이 균질액에 1 ml의 증류수를 가한 후 3000 rpm에서 원심분리 하였다. 상층액을 자동 시료 채취기(MSI660, Kontron, Switzerland)를 통해 HPLC에 주입하고 guard column(5 mm \times 5 cm, HC Pellosil) 및 column(4.9 mm \times 25 cm, Spherisorb S5W)을 통과 시켜 α -tocopherol을 분리하고 fluorescence spectrophotometer(SFM25, Kontron, excitation; 295 nm, emission; 340 nm)를 이용하여 분석하였다. 이동상은 핵산:메탄올(99:1, v/v)을 사용하였으며 2 ml/min의 속도로 하였다.

통계처리

모든 실험치는 평균 \pm 표준오차로 나타내었으며, Student's t-test를 사용하여 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

간의 지질과산화물 및 비타민 E 함량

5%-EtOH군의 1일 평균 에탄올 섭취량은 3 ± 1 g/kg이었다.

Table 1에서 보는 것과 같이 5%-EtOH군의 TBARS 함량은 대조군과 비교하여 차이가 없으나 비타민 E의 함량은 대조군과 비교하여 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$).

반면, 2.5 g-EtOH군의 TBARS 함량은 대조군과 비교하여 유의적으로 증가하였으나($p < 0.01$) 비타민 E의 함량은 대조군과 비교하여 변화가 없었다(Table 2).

에탄올은 시토크롬 P₄₅₀ 2E1(CYP 2E1)의 유도¹¹⁾, 1-hydroxyethyl radical의 생성¹²⁾, 미토콘드리아 호흡연쇄의 교란¹³⁾, xanthine oxidase의 유도¹⁴⁾ 또는 철 대사의 교란¹⁵⁾ 등의 다양한 경로를 통해 활성산소를 생성하므로 산화적 스트레스를 유발하는 것으로 밝혀지고 있다. 그러나, 만성적 에탄올 투여 후 측정된 간 조직에서의 지질과산화물과 비타민 E의 함량은 다양한 양상을 보인다. Meydani 등¹⁶⁾은 총 칼로리의 36%로 하여 3주간 에탄올을 투여한 흰쥐의 간에서 α -tocopherol의 함량에 변화가 없었다고 보고하였다. 한편,

Table 1. Effect of ethanol treatment with 5% ethanol solution in drinking water for 1 month on lipid peroxidation and vitamin E content in liver.

Parameters	Group	
	Control	5%-EtOH
Lipid peroxidation (TBARS nmol/g tissue)	$109.6 \pm 10.7^{1)}$	133.7 ± 11.9
Vitamin E content (nmol/g tissue)	64.8 ± 2.7	$74.2 \pm 7.7^*$

¹⁾Mean \pm SE(n=10).

*; $p < 0.05$.

Table 2. Effect of intragastric ethanol feeding of 2.5 g/kg b.w. for 1 month on lipid peroxidation and vitamin E content in liver.

Parameters	Group	
	Control	2.5 g-EtOH
Lipid peroxidation (TBARS nmol/g tissue)	$113.3 \pm 11.2^{1)}$	$198.3 \pm 11.1^{**}$
Vitamin E content (nmol/g tissue)	63.8 ± 2.6	59.8 ± 2.2

¹⁾Mean \pm SE(n=10).

**; $p < 0.05$.

Wisniewska와 Wronska¹⁷⁾는 10%의 에탄올을 함유한 음용수를 15개월간 투여한 쥐의 간세포 미크로솜에서 지질과산화물이 증가된 반면 비타민 E는 감소되었다고 보고하였다. 5 g/kg의 에탄올을 4주간 경구 투여한 쥐의 간에서 지질과산화물 및 비타민 E의 함량이 변화가 없었으며¹⁸⁾, 고지질 식이와 함께 4주간 에탄올을 투여(혈중농도 200-300 mg%)한 쥐의 간에서는 지질과산화물의 증가와 함께 비타민 E가 감소하였다¹⁹⁾. 이 같은 결과는, 에탄올이 간에서 산화적 스트레스를 유발할 뿐만 아니라 지질대사에도 변화를 일으키기 때문인 것으로 추정된다. 즉, 에탄올의 섭취는 간에서 초저밀도 지단백(VLDL)의 분비 감소를 초래하는데²⁰⁾ 이는 VLDL을 통하여 각 조직으로 운반되는 비타민 E의 수송에도 영향을 미치게 된다²¹⁾. 따라서, 알코올 투여 후 비타민 E의 함량은 간조직에서의 분비감소 및 산화적 스트레스 유발 정도 등의 복합적 요인에 의해 다양하게 나타날 수 있다. 또한, 일시적인 비타민 E의 분비 감소는 지질과산화 반응에도 영향을 미치게 되므로 간은 다른 조직과는 달리 에탄올에 의한 산화적 스트레스의 유발 양상이 여러 결과로 나타날 수 있다.

본 연구에서도, 5%의 에탄올을 함유한 물을 자유롭게 섭취하도록 한 방법에 의해서는 비타민 E의 함량이 증가하면서 지질과산화 반응은 변화가 없었으며, 20%의 에탄올을 함유한 증류수를 2.5 g/kg이 되도록 1일 1회 경구 투여하는 방법에 의해서는 비타민 E의 함량은 변화하지 않았으나 지질과산화 반응은 증가하였다.

대뇌와 소뇌의 지질과산화물 및 비타민 E 함량

5%-EtOH군에서 대뇌의 TBARS 함량은 대조군과 비교하여 약 31% 증가하였으며 비타민 E 함량은 대조군과 비교하여 약 10% 감소하였다(Table 3). 소뇌에서의 TBARS 함량도 약 35% 증가하였으며 비타민 E 함량은 약 12% 감소하였다(Table 4). 즉, 대뇌와 소뇌 모두에서 유사한 정도의 지질과산화물 증가와 비타민 E 함량 감소를 보였다.

2.5 g-EtOH군의 대뇌에서의 TBARS 함량은 대조군과 비교하여 약 43% 증가하였으며 비타민 E 함량은 대조군과 비교하여 약 14% 감소하였다(Table 5). 소뇌에서의 TBARS 함량은 약 44% 증가하였으며 비타민 E 함량은 약 15% 감소하였다(Table 6). 이러한 결과는, 2.5 g-EtOH군에서도 대뇌와 소뇌에서 지질과산화물이 증가하고 비타민 E 함량이 감소하며 그 정도가 유사함을 보여준다. 그러나, 5%-EtOH군에 비해 지질과산화 반응의 증가와 비타민 E의 감소 정도가 큰 경향을 보였다.

뇌에서 에탄올에 의해 산화적 스트레스가 유발되는 원인은 아직까지 정확히 규명되지 않았으나, 에탄올에 의해 뇌조직에서도 CYP 2E1이 증가하는 것으로 밝혀져^{22,23)} 활성산소

Table 3. Effect of ethanol treatment with 5% ethanol solution in drinking water for 1 month on lipid peroxidation and vitamin E content in cerebrum.

Parameters	Group	
	Control	5%-EtOH
Lipid peroxidation (TBARS nmol/g tissue)	84.4 ± 7.8	110.6 ± 7.8*
Vitamin E content (nmol/g tissue)	37.4 ± 1.2	33.6 ± 1.1*

¹⁾Mean ± SE(n=10).

*; p < 0.05.

Table 4. Effect of ethanol treatment with 5% ethanol solution in drinking water for 1 month on lipid peroxidation and vitamin E content in cerebellum.

Parameters	Group	
	Control	5%-EtOH
Lipid peroxidation (TBARS nmol/g tissue)	79.7 ± 8.7 ¹⁾	107.8 ± 8.1*
Vitamin E content (nmol/g tissue)	32.1 ± 1.1	28.2 ± 1.0*

¹⁾Mean ± SE(n=10).

*; p < 0.05.

Table 5. Effect of intragastric ethanol feeding of 2.5 g/kg b.w. for 1 month on lipid peroxidation and vitamin E content in cerebrum.

Parameters	Group	
	Control	2.5 g-EtOH
Lipid peroxidation (TBARS nmol/g tissue)	88.6 ± 8.8 ¹⁾	126.7 ± 9.7**
Vitamin E content (nmol/g tissue)	36.6 ± 1.4	31.3 ± 1.2*

¹⁾Mean ± SE(n=10).

*; p < 0.05, **; p < 0.01

Table 6. Effect of intragastric ethanol feeding of 2.5 g/kg b.w. for 1 month on lipid peroxidation and vitamin E content in cerebellum.

Parameters	Group	
	Control	2.5 g-EtOH
Lipid peroxidation (TBARS nmol/g tissue)	75.9 ± 8.6 ¹⁾	109.2 ± 9.1*
Vitamin E content (nmol/g tissue)	31.1 ± 1.2	26.0 ± 1.0**

¹⁾Mean ± SE(n=10).

*; p < 0.05, **; p < 0.01

의 생성 증가가 그 원인임을 시사하고 있다. Rouach 등²⁴⁾에 의하면, 10%의 에탄올을 함유한 음용수 투여 4주 후 소뇌에서 비타민 E의 함량이 감소하였다. 또한, 만성적 알코올 투여에 의한 해마²⁵⁾와 뇌간²⁶⁾에서의 지질과산화 반응의 증가도 보고되었다. 그러나, 뇌에서의 CYP 2E1의 증가 정도는 부위에 따라 차이가 있어 특정 뇌 부위가 에탄올에 의해 유발되는 조직 손상에 더욱 민감할 것으로 보고되었다^{22,23)}. 뿐만 아니라, 각 뇌 부위는 산화적 스트레스를 방지할 수 있는 항산화제의 함량에도 차이가 있으며⁶⁾ 특히, 지질 함량이 높은 뇌조직에서 중요한 방어작용을 할 것으로 사료되는 비타민 E와 C의 함량도 뇌 부위별로 차이가 있는 것으로 보

고되었다²⁷⁾. 이는 알코올 투여에 의한 산화적 스트레스의 유발 정도가 뇌 부위별로 다르게 나타날 수 있음을 시사한다. 본 연구에서는, 동일한 알코올 투여방법에 의해서는 대뇌와 소뇌 모두에서 유사한 정도로 지질과산화 반응이 증가하고 비타민 E 함량이 감소하는 결과를 얻었다. 그러나, 2.5 g/kg의 에탄올을 1일 1회 경구 투여하는 방법이 5%의 에탄올이 함유된 물을 자유로이 섭취토록 한 방법에 비해 지질과산화 반응의 증가와 비타민 E의 감소 정도가 큰 경향을 보여 더욱 심각하게 산화적 스트레스를 유발할 수 있는 알코올 투여 방법임을 시사하고 있다.

국문요약

본 연구에서는 알코올 섭취 방법이 간과 뇌에서 산화적 스트레스 유발 정도에 미치는 영향을 알아보고자 흰쥐에 5%의 에탄올이 함유된 물을 1개월간 자유로이 섭취하게 하는 방법 또는 2.5 g/kg의 에탄올을 1일 1회 1개월간 경구 투여하는 방법 등 알코올 투여 방법을 달리하고 간, 대뇌 및 소뇌에서 지질과산화 반응과 비타민 E의 함량 변화를 비교하였다. 5%-EtOH군의 간조직에서는 비타민 E의 함량이 증가하고 지질과산화물은 변화가 없었으며, 2.5 g-EtOH군의 간조직에서는 비타민 E의 함량은 변화가 없으나 지질과산화물은 유의적으로 증가하였다. 뇌 조직에서는, 5%-EtOH군의 대뇌와 소뇌 모두에서 지질과산화물이 증가하고 비타민 E의 함량이 감소하였다. 또한, 2.5 g-EtOH군의 대뇌와 소뇌에서도 지질과산화물이 증가하고 비타민 E의 함량이 감소하였으며 그 정도는, 5%-EtOH군에서 보다 큰 경향을 보였다. 결론적으로, 간에서의 지질과산화 반응 및 비타민 E의 함량은 알코올 투여 방법에 따라 다양하게 나타났다. 대뇌와 소뇌에서는 본 연구에서 실시한 투여 방법 모두에 의해 산화적 스트레스가 유발되었다.

감사의 말씀

본 연구의 일부는 1999년도 청운대학교 학술연구조성비로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사 드립니다.

참고문헌

- Nordmann, R., Ribiere, C. and Rouach, H: Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury. *Free Radic. Biol. Med.*, **12**, 219-240(1992).
- Bohr, V., Anson, R.M., Mazur, S. and Dianov, G: Oxidative DNA damage processing and changes with aging. *Toxicol. Lett.*, **102**, 47-52(1998).
- Diluzio, N.R. and Hartman, A.D: Role of lipid peroxidation in the pathogenesis of ethanol-induced fatty liver. *Fed. Proc.*, **26**, 1436-1442(1967).
- Niki, E., Saito, T., Kawakami, A. and Kamiya, A: Inhibition of oxidation of methylglutamate in solution by vitamin E and vitamin C. *J. Biol. Chem.*, **259**, 4177-4182(1984).
- Sadrzadeh, S.M., Nanji, A.A. and Meydani, M: Effect of chronic ethanol feeding on plasma and liver alpha- and gamma-tocopherol levels in normal and vitamin E-deficient rats. Relationship to lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.*, **47**, 2005-2010(1994).
- Vatassery, G.T: Vitamin E and other endogenous antioxidants in the central nervous system. *Geriatrics*, **53**, S25-S27(1998).
- Cardozo-Pelaez, F., Brooks, P.J., Stedeford, T., Song, S. and Sanchez-Ramos, J: DNA damage, repair, and antioxidant systems in brain regions: a correlative study. *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 779-785(2000).
- Mihara, M., Uchiyama, M. and Fukuzawa, K: Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in aging, CCl₄ intoxication and vitamin E deficiency. *Biochem. Med.*, **23**, 302-311(1980).
- Vatassery, G.T. and Hagen D.F: A liquid chromatographic method for quantitative determination of α -tocopherol in rat brain. *Anal. Biochem.*, **79**, 129-134(1997).
- Westerberg, E., Friberg, M. and Akesson, B: Assay of brain tocopherols using high performance liquid chromatography. *J. Liquid Chromatography*, **4**, 109-121(1981).
- Ingelman-Sundberg, M., Ronis, M.J., Lindros, K.O., Eliasson,

- E. and Zhukov, A: Ethanol-inducible cytochrome P4502E1 :regulation, enzymology and molecular biology. *Alcohol Alcohol Suppl.*, **2**, 131-139(1994).
12. Moore, D.R., Reinke, L.A. and McCay, P.B: Metabolism of ethanol to 1-hydroxyethyl radicals in vivo :detection with intravenous administration of alpha-(4-pyridyl-1- oxide)-N-t-butylnitron. *Mol. Pharmacol.*, **47**, 1224-1230(1995).
 13. Cunningham, C.C. and Bailey, S.M: Ethanol consumption and liver mitochondria function. *Biol. Signals Recept.*, **10**, 271-282(2001).
 14. Shaw, S. and Jayatilleke, E: The role of cellular oxidases and catalytic iron in the pathogenesis of ethanol-induced liver injury. *Life Sci.*, **50**, 2045-2052(1992).
 15. Whitfield, J.B., Zhu, H., Heath, A.C., Powell, L.W. and Martin, N.G: Effects of alcohol consumption on indices of iron stores and of iron stores on alcohol intake makers. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **25**, 1037-1045(2001).
 16. Meydani, M., Seitz, H.K., Blumberg, J.B. and Russell, R.M: Effect of chronic ethanol feeding on hepatic and extrahepatic distribution of vitamin E in rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **15**, 771-774(1991).
 17. Wisniewska-Knypl, J.M. and Wronska-Nofer, T: Biological markers of oxidative stress induced by ethanol and iron overload in rat. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health.*, **7**, 355-363(1994).
 18. Coudray, C., Richard, M.J., Faure, H. and Favier, A: Blood and liver lipid peroxide status after chronic ethanol administration in rats. *Clin. Chim. Acta.*, **129**, 35-45(1993).
 19. Rouach, H., Fataccioli, V., Gentil, M., French, S.W., Morimoto, M. and Nordmann, R: Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology. *Hepatology*, **25**, 351-355(1997).
 20. Eaton, S., Record, C.O. and Bartlett, K: Multiple biochemical effects in the pathogenesis of alcoholic fatty liver. *Eur. J. Clin. Invest.*, **27**, 719-722(1997).
 21. Bjorneboe, A., Bjorneboe, G.E., Hagen, B.F. and Drevon, C.A: Acute and chronic effects of ethanol on secretion of alpha-tocopherol from primary cultures of rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **922**, 357-363(1987).
 22. Anandatheerthavarada, H.K., Shankar, S.K., Bhamre, S., Boyd, M.R., Song, B.J. and Ravindraath, V: Induction of brain cytochrome P-450IIE1 by chronic ethanol treatment. *Brain Res.*, **601**, 279-285(1993).
 23. Sohda, T., Shimizu, M., Kamimura, S. and Okumura, M: Immunohistochemical demonstration of ethanol-inducible P450 2E1 in rat brain. *Alcohol Alcohol Suppl.*, **1B**, 69-75(1993).
 24. Rouach, H., Houze, P., Gentil, M., Orfanelli, M.T. and Nordmann, R: Changes in some pro-and antioxidants in rat cerebellum after chronic alcohol intake. *Biochem. Pharmacol.*, **53**, 539-545(1997).
 25. Renis, M., Calabrese, V., Russo, A., Calderone, A., Barcellona, M.L. and Rizza V. Nuclear DNA strand breaks during ethanol-induced oxidative stress in rat brain. *FEBS Lett.*, **390**, 153-156(1996).
 26. Agar, E., Bosnak, M., Amanvermez, R., Demir, S., Ayyildiz, M. and Celik, C: The effect of ethanol on lipid peroxidation and glutathione level in the brain stem of rat. *Neuroreport*, **10**, 1799-1801(1999).
 27. Martin, A., Prior, R., Shukitt-Hale, B., Cao, G. and Joseph, J.A: Effect of fruits, vegetables, or vitamin E-rich diet on vitamins E and C distribution in peripheral and brain tissues. *J. Gerontol.*, **55**, B144-B151(2001).