

만성적으로 알코올을 섭취한 쥐의 조직 내 Fatty Acid Ethyl Esters (FAEEs)와 지질과산화물 형성에 미치는 영향

김민석 · 김세나 · 박현서[§]

경희대학교 생활과학대학 식품영양학과

Effect of Chronical Ethanol Ingestion on the Levels of Fatty Acid Ethyl Esters (FAEEs) and Lipid Peroxidation in Rat Tissues

Kim, Min-Seok · Kim, Se-Na · Park, Hyun-Suh[§]

Department of Food and Nutrition, Kyung-Hee University, Seoul 130-701, Korea

ABSTRACT

The present study was designed to observe the effect of chronically ingested ethanol on the level of fatty acid ethyl esters (FAEEs), which is a non-oxidative metabolite of ethanol metabolism in tissues, and its correlation to the status of oxidative stress in rats. Forty male Sprague Dawley rats weighing 145-155 g were divided into 2 groups, Control and EtOH. All rats were fed Lieber-DeCarli liquid diet for 4 weeks by pair-feeding. An isocaloric maltose dextrin was added in replace of 50 g ethanol (36%kcal) in the control diet. Chronically ingested ethanol significantly increased the content of FAEEs in pancreas and liver, but not in brain. The level of 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) was significantly increased, but α -tocopherol level was significantly decreased in pancreas and liver. However, the levels of TBARS and α -tocopherol in brain were not significantly affected by ethanol ingestion. Therefore, chronically ingested ethanol might cause tissue damage by increasing the levels of FAEEs and TBARS and dissipating more α -tocopherol in tissues. (*Korean J Nutr* 2007; 40(5): 413~418)

KEY WORDS: chronical ethanol ingestion, non-oxidative metabolism, fatty acid ethyl esters, oxidative stress.

서 론

알코올은 크게 산화적 경로와 비산화적 경로를 통해서 대사되며,¹⁾ 알코올이 산화적 대사를 통해서 생성된 acetaldehyde는 주로 간을 손상시키는 주요 인자로 알려져 있다.²⁾ 그러나 알코올 섭취에 의해서 간 이외의 뇌, 췌장 및 심장과 같은 기관이 손상되는 이유는 아직까지는 명백하지 않으며, 알코올 산화능력이 낮은 조직에서는 acetaldehyde가 소량 존재하거나 또는 발견되지 않았다고 보고되었다.³⁾ 최근 이러한 기관에서는 알코올의 산화적 대사가 아닌 비산화적 대사를 통해서 생성되는 대사산물인 fatty acid ethyl esters (FAEEs)의 함량이 높았으며, 또한 알코올의 산화적 대사를 억제시켰을 때에는 FAEEs의 함량이 현저하게

증가하였다는 연구결과가 발표되었다.^{4,5)} FAEEs는 FAEE synthase에 의해 알코올과 지방산이 에스테르 결합을 통해서 생성되는 독성물질로 mitochondria 내막에 축적되어 oxidative phosphorylation의 uncoupler 역할을 하게 되고 이로 인해 mitochondria의 ATP 합성에 손상을 주게 되어 결국 세포의 사멸까지 가능하다.^{3,6-8)} 이 외에도 lysosomal fragility 증가,⁹⁾ cell replication 및 단백질 합성을 감소시키게 되며,¹⁰⁾ 특히 산화적 대사산물인 acetaldehyde와 ethanol 보다 반감기가 길어서 오랫동안 말초조직에 손상을 줄 수도 있다고 알려졌다.¹¹⁾ Oh 등¹²⁾의 연구에 의하면 한국인의 식습관 중에서 고기와 소주의 섭취는 대장암의 발병률을 증가시키는 원인 중의 하나라고 보고하였다. 이러한 식습관은 고기에 함유된 지방산과 과도하게 자주 섭취하는 알코올에 의해서 FAEEs의 생성을 증가시킬 수 있는 가능성이 높아질 것이다. 또한 이로 인해 알코올성 질병을 유발시키는 하나의 요인으로 작용할지도 모르나 이에 관한 연구는 국내 외에 아직 보고된 바가 없다. 지금까지 국내에서는 산화적 대사와 그 대사산물에 집중되어 연구해

접수일: 2007년 6월 25일

채택일: 2007년 7월 16일

[§]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: hspark@khu.ac.kr

왔으며, 고기와 소주의 섭취 빈도가 높은 우리나라 식습관으로 인해 더욱 생성될 수 있는 FAEEs에 관한 연구가 필요한 실정이다. 특히, 급성 알코올 섭취로 인해 생성되는 FAEEs에 관한 연구가 현재까지 많이 이루어지고 있으나 만성적인 알코올 섭취에 관한 연구는 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 만성적으로 알코올을 섭취한 쥐의 뇌, 췌장 및 간 조직에서 FAEEs 함량과 지질 과산화 물질의 생성을 비교 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

실험계획 및 실험식이

Sprague Dawley (평균체중 145~155 g)종 수컷 쥐 40마리를 3일간 고행사료로 적응 시키고, 대조군의 Lieber-DeCarli liquid diet (Dyets, Bethlehem, CA, USA)로 5일 동안 적응시킨 후 체중에 따라 난피 법에 의해 2군, 즉 대조군과 알코올 (EtOH) 군으로 나누어 4주 동안 Lieber-DeCarli liquid diet를 자유롭게 공급하였다. 이 때 대조군은 EtOH군의 섭취량으로 pair-feeding 하였으며 사료 중 알코올 함량은 10일 동안 점진적으로 높이면서 적응시켜 최종적으로 사료 1,000 g 중 50 g의 알코올을 첨가하여 총 열량 중 약 36%kcal로 조절하였다.¹³⁾ Table 1에서와 같이 알코올이 함유되어 있지 않은 대조군의 사료는 알코올 대신 같은 열량의 maltose dextrin으로 대체한 후 증류수로 최종 부피를 맞추었다. 실험식은 매일 식이 공급 전에 제조하였고 동물 사육실은 온도 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 5\%$, 12 hr dark/light cycle로 조절하였다. 사료 섭취량은 매일 같은 시간에 조사하였으며 체중은 일주일에 한번 같은 시간에 측정하였다.

Table 1. Diet composition of experimental groups

Ingredients (g)	Control	EtOH
	g/1,000 g diet	
Casein	41.40	41.40
DL-Methionine	0.30	0.30
L-Cystine	0.50	0.50
Maltose dextrin	115.20	25.60
Cellulose	10.00	10.00
Xanthan gum	3.00	3.00
Corn oil	3.10	3.10
Olive oil	36.80	36.80
Minerals mixture - S11018	8.75	8.75
Vitamins mixture - V10036	2.50	2.50
Choline bitartrate	0.53	0.53
Ethanol, 100%	-	50.00
H ₂ O	777.92	817.52

Fatty acid ethyl esters의 추출과 정량

4주간의 실험기간이 끝난 후 동물을 overnight fasting 하여 ethyl ester로 마취한 후 뇌, 췌장 및 간을 채취하여 분석 전까지 -80°C 에 저장하였다. 채취된 뇌, 췌장 및 간의 조직의 일부분을 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)을 사용하여 20% 균질액을 만들었다. Internal standard (IS)로서 1~10 μg 의 ethyl heptadecanoate (E17:0; Nu-Chek Prep, Elysian, MN, USA)를 함유한 acetone을 각 조직의 균질액에 적정량 첨가하여 혼합한 후 다시 이 혼합물에 hexane을 첨가하여 지질을 추출하였다.¹⁴⁾ 각 지질 추출물에서 FAEEs 추출은 Bernhardt 등¹⁵⁾과 Kaluzny 등¹⁶⁾의 Solid Phase Extraction (SPE; Varian, Harbor City, CA, USA) 사용방법으로 Bond Elut LRC-aminopropyl column (Varian, Harbor City, CA, USA)을 이용하여 FAEEs를 분리하였으며, 용출액은 질소가스로 말리고 소량의 hexane으로 다시 용해한 후 gas chromatography (Hewlett-Packard 5890 series II)를 사용하여 FAEEs 함량을 측정하였다. 이 때 SP-2330 capillary column ($60 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.2 \mu\text{m}$ fused silica Supelco)과 flame ionization detector (FID)를 사용하였고, carrier 가스인 질소가스의 유동율은 1.7 mL/min, 수소가스는 33 mL/min, 공기는 346.5 mL/min으로 유지하였으며, split ratio는 17:1이었다. Injector와 detector의 온도는 각각 260°C 와 280°C 를 유지하였고, 오븐 온도 프로그램은 130°C 에서 2분간 유지, 160°C 까지 $5^\circ\text{C}/\text{min}$ 승온, 다시 180°C 에서 $2^\circ\text{C}/\text{min}$ 승온하여 7분간 유지, 230°C 까지 $3^\circ\text{C}/\text{min}$ 승온시켜 20분간 유지하였다. FAEEs 표준물질 (E16:0, E17:0, E18:0, E18:1, E18:2, E20:4, E20:5, E22:6) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA와 Nu-Chek Prep, Elysian, MN, USA)을 사용하여 각 FAEEs의 retention time을 확인한 후 각 FAEEs 함량을 산출하였다.

2-Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)와 α -Tocopherol 측정

뇌, 췌장 및 간 조직은 0.15 M KCl (pH 7.4)를 사용하여 10% 균질액을 만들었다. 각 균질액의 TBARS 함량은 2-thiobarbituric acid (TBA)를 이용한 Ohkawa 등¹⁷⁾의 방법으로 측정하였으며, 이때 표준물질로 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하였고, TBARS 함량은 nmole/g tissue로 표시하였다. 같은 조직의 10% 균질액의 α -tocopherol 함량은 Desai¹⁸⁾ 방법으로 측정하였다. 이때 표준물질로는 α -tocopherol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을

사용하였으며, α -tocopherol 함량은 $\mu\text{g/g}$ tissue로 표시하였다.

통계처리

결과는 Satatistical Analysis Systems (SAS) Statistical software package version 8.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA)를 사용하여 *t*-test로 분석하였다. 모든 값은 평균 \pm 표준오차로 표시하고 그 차이는 $p < 0.05$ 수준에서 유의성 검증을 하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 만성적인 알코올 공급 시에 각 조직에서 비산화적 대사에 의해 생성되는 FAEEs 함량이 지질과산화물 생성에 어떤 영향을 주는지 관찰하고자 4주 동안 Lieber-DeCarli liquid diet를 Sprague Dawley 중 수컷 쥐에게 공급한 후 뇌, 췌장 및 간 조직에서 FAEEs 함량과 TBARS 함량을 측정하였다.

사료섭취량과 체중

알코올 섭취에 의한 영향을 관찰하기 위해서 사료는 pair-feeding으로 공급되었으며, 이로 인해 두 군 간에 사료 섭취량은 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나 실험기간이 끝난 후의 쥐의 체중은 대조군에 비해 EtOH군에서 유의하게 낮았다 (Table 2). 이와 같은 결과는 알코올은 에너지를 높게 함유하고는 있으나 근육을 만들거나 일을 할 수 있는 에너지가 아니며 체내에서 중성지방 합성을 촉진하여 다른 영양소의 흡수와 대사를 방해하여 건강에 해가 되는 역효과를 주기 때문이다.¹⁹⁾

조직의 FAEEs 함량

알코올에 대한 FAEE synthase의 K_m 값은 200 mM로서 ADH (K_m : 0.2~2 mM)와 MEOS (K_m : 7~15 mM)의 K_m 값보다 높지만 알코올의 생리적 농도인 10~200 mM에서도 FAEEs는 FAEE synthase에 의해서 생성되기 때문에 만성적으로 알코올을 섭취하게 된다면 FAEEs 생성이 과다하게 증가할 것이라 보고되었다.²⁰⁾ 이미 보고된 바에 의하면,²¹⁾ 췌장은 FAEE synthase 활성도가 가장 높은 조직이었고 다음으로 높은 조직이 뇌와 간 조직이었다. 본 연구 결과에 의하면 (Fig. 1), 알코올 섭취에 의해 췌장과 간 조직의 단위 무게 당 총 FAEEs 함량 (nmole/g)은 대조군보다 유의하게 더 높았으나 뇌 조직에서는 알코올 섭취에 의해 유의한 변화가 없이 낮은 수준을 유지하였다. 이와 같이 뇌 조직의 총 FAEEs 함량이 낮았던 것은 뇌 조직

Table 2. Food intake and final body weight in rats during experimental period

Groups	Food intake	Final body weight
	kcal/day	g
Control	58.13 \pm 0.72	263.03 \pm 4.41
EtOH	59.20 \pm 1.26	234.78 \pm 5.18**

** : Significant at $p < 0.01$ (Mean \pm SE for $n = 20$ per group)

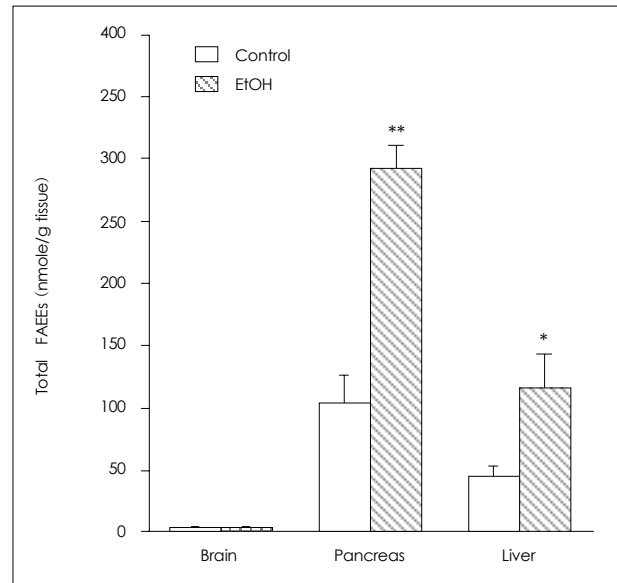


Fig. 1. Effect of chronic ethanol ingestion on the content of total fatty acid ethyl esters (FAEEs) in brain, pancreas, and liver of rats. *: Significant at $p < 0.05$, **: significant at $p < 0.01$ (Mean \pm SE for $n = 7$ per group)

으로 유입되는 알코올이 소량이기 때문에²²⁾ FAEE synthase에 의한 FAEEs 합성이 낮았을 것이라 사료되며, 이때 췌장조직에서는 총 FAEEs 함량 중 지방산 C16:0, C18:0, C18:1, C18:2와 알코올이 ester 결합한 E16:0, E18:0, E18:1, E18:2형이 대조군에 비해 EtOH군에서 유의하게 더 많이 존재하였으며, 간 조직에서는 E18:1, E18:2, E20:4형이 EtOH군에서 유의하게 더 높았다 (Table 3). 그러나 뇌 조직의 총 FAEEs 함량이 낮았던 것처럼 각 지방산 조성에도 알코올 섭취에 의해 유의하게 차이를 보이지 않았다.

본 연구 결과에서는 만성적으로 알코올 섭취 후 췌장과 간 조직에서는 유의하게 증가하였으나 뇌 조직의 총 FAEEs 함량은 만성적으로 알코올을 섭취시켰음에도 불구하고 대조군에 비해 낮게 존재하였다. 이렇게 다른 조직과 다른 패턴을 보인 뇌 조직은 Laposata와 Lange³⁾의 연구에서도 유사한 결과가 보고되었으며, 아마도 알코올 섭취 형태 (급성과 만성)에 의해 각 조직에 함유된 FAEEs 함량은 많은 차이를 보일 수 있다는 것을 암시하지만 아직까지 자세한 기전이 알려져 있지 않으므로 이에 관한 깊은 연구가 더욱

요구된다.

TBARS와 α -Tocopherol 함량

Calabrese 등²³⁾의 연구에 의하면 알코올을 섭취하였을 때 총 FAEEs 함량의 증가와 함께 lipid hydroperoxide 수준이 증가되었다. 본 연구에서도 대조군에 비해 알코올 섭취로 인해 FAEEs 함량이 높았던 췌장과 간 조직에서 TBARS 함량이 유의하게 증가하였던 (Fig. 2) 반면에 α -tocopherol 함량은 대조군에 비해 유의하게 더 낮았다 (Fig. 3). 이와 같이 췌장과 간 조직에서는 알코올 섭취로 인해 생성되는 reactive oxygen species (ROS)에 의해서 TBARS 생성이 높았을 것이며 이로부터 조직의 손상을 보호하기 위해서 α -tocopherol의 소비가 높아 조직 내에는 함량이 낮았을 것이라고 사료된다. 그러나 뇌 조직에서는 알코올 섭취

에 의해 총 FAEEs 함량에 유의한 변화가 없었던 것과 마찬가지로 TBARS 함량과 α -tocopherol 함량에도 유의한 변화가 없었다. 전 보고²⁴⁾에 의하면 알코올을 섭취하였을 때 cerebellum에서는 malondialdehyde (MDA)의 함량이 유의하게 증가하였으나 hippocampus와 cortex에서는 큰 변화가 없었다. Chang의 연구²⁵⁾에서는 알코올을 섭취시켰을 때 cerebellum, cortex 및 striatum에서 MDA 수준이 대조군에 비해 유의한 변화가 없었으며, 알코올과 녹차를 함께 섭취시켰을 때에도 큰 변화를 보이지 않았다. 이와 같이 뇌 부위에 따라서 MDA 함량에 큰 차이를 보이거나 아무런 변화가 없는 것으로 보고되었으나 본 연구에서는 전체 뇌를 사용하여 측정하였기 때문에 TBARS 함량에 큰 차이를 보이지 않았을 가능성이 있다고 사료된다. 만약에 TBARS 이외 lipid peroxide의 또 다른 지표 하나를 추가

Table 3. Effect of chronic ethanol ingestion on the content of FAEEs in rat tissues

FAEEs	Brain		Pancreas		Liver	
	Control	EtOH	Control	EtOH	Control	EtOH
E16:0	0.72 ± 0.15	0.66 ± 0.15	24.96 ± 5.16	139.17 ± 13.73**	26.58 ± 3.70	40.38 ± 8.52
E18:0	0.18 ± 0.05	0.18 ± 0.03	1.45 ± 0.25	8.17 ± 0.84**	2.83 ± 0.45	3.09 ± 0.39
E18:1	0.38 ± 0.11	0.36 ± 0.08	57.26 ± 13.37	113.56 ± 10.12*	11.79 ± 2.23	50.04 ± 12.49*
E18:2	0.22 ± 0.05	0.22 ± 0.04	13.94 ± 2.99	24.39 ± 3.00*	2.53 ± 0.47	13.44 ± 4.30*
E20:4	0.43 ± 0.12	0.32 ± 0.07	2.57 ± 0.63	3.04 ± 0.43	1.04 ± 0.17	5.77 ± 1.43*
E20:5	ND	0.02 ± 0.01	0.07 ± 0.07	0.04 ± 0.02	ND	0.06 ± 0.06
E22:6	1.40 ± 0.18	1.57 ± 0.26	4.18 ± 1.44	4.76 ± 1.41	1.18 ± 0.41	3.48 ± 1.18

E16:0: ethyl palmitate, E18:0: ethyl stearate, E18:1: ethyl oleate, E18:2: ethyl linoleate, E20:4: ethyl arachidonate, E20:5: ethyl eicosapentaenoate, E22:6: ethyl docosaheptaenoate, FAEEs: fatty acid ethyl esters, ND: not detected.

*: Significant at $p < 0.05$, **: significant at $p < 0.01$ (Mean ± SE for $n = 7$ per group)

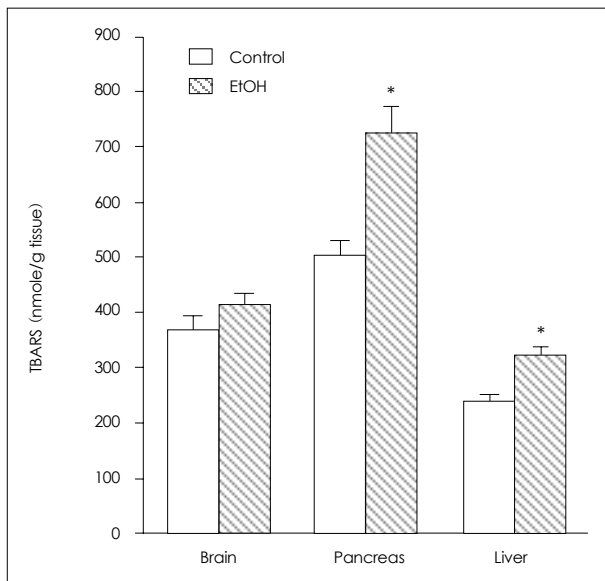


Fig. 2. Effect of chronic ethanol ingestion on the level of 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in brain, pancreas, and liver of rats. *: Significant at $p < 0.05$ (Mean ± SE for $n = 7$ per group).

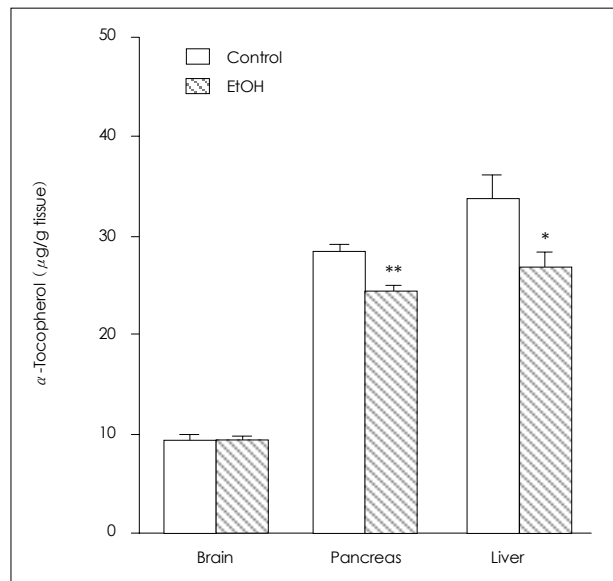


Fig. 3. Effect of chronic ethanol ingestion on the level of α -tocopherol in brain, pancreas, and liver of rats. *: Significant at $p < 0.05$, **: significant at $p < 0.01$ (Mean ± SE for $n = 7$ per group).

하여 측정하였다면 결과해석에 더욱 좋은 판단을 할 수 있었을 것이다. 또한 다른 조직과는 다르게 뇌 조직에서는 다른 기전을 통해서 보호하려는 현상일 것이라 사료되며 이와 같은 연구가 더욱 심도 있게 이루어져야할 것이다.

전체적으로 살펴보면, 국내에서는 산화적 대사에 더욱 집중되어 연구해왔다. 그러므로 우리나라에서 각 조직에 존재하는 비산화적 대사산물인 FAEEs 함량 측정은 처음 연구되어 더욱 의의가 있다고 할 수 있다. 한국인의 식습관 중 삼겹살과 소주의 섭취는 간 조직 뿐만 아니라 여러 조직에 FAEEs 생성을 가중시킬 수 있으며, 한국인의 알코올성 질병 유발에 있어서 중요한 역할을 할 수 있을 것이라 사료된다. 현재 국외에서는 동물실험 뿐만 아니라 임상 실험이 많이 이루어지고 있으며, FAEEs를 이용한 biomarker 구축에 많은 노력을 하고 있으나²⁶⁾ 국내에서는 전혀 이루어지고 있지 않고 있다. 그러므로 비산화적 대사산물인 FAEEs에 관한 연구의 필요성과 이를 이용해 한국인에 맞는 biomarker 개발이 필요함을 제시하고자 한다.

요약 및 결론

본 연구에서는 Sprague Dawley종 수컷 쥐에게 알코올이 36%kcal 함유된 Lieber-DeCarli liquid diet를 4주간 공급한 후 알코올 섭취에 의해 뇌, 췌장 및 간 조직에서 FAEEs 함량과 지질과산화물 생성을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 만성적으로 알코올을 섭취하였을 때 췌장과 간 조직의 총 FAEEs (nmole/g tissue) 함량이 유의하게 더 증가하였으며 간 조직보다 췌장 조직에서 더욱 높았다.

2) 알코올을 섭취에 의해 췌장과 간 조직에서는 총 FAEEs 함량이 유의하게 증가함과 동시에 TBARS (nmole/g tissue) 수준이 증가되었으며, α -tocopherol (μ g/g tissue) 수준은 감소되었다.

총괄해서, 본 연구의 결과에 의하면 만성적인 알코올 섭취에 의해서 알코올의 비산화적 대사산물인 총 FAEEs 함량이 조직마다 다르게 나타났으며, 이 대사산물로 인해 간 조직을 포함한 다른 조직의 손상을 가중시킬 가능성이 있으므로 더욱 심도 깊은 연구가 필요하다.

Literature cited

1) Laposata M. Fatty acid ethyl esters: short-term and long-term serum markers of ethanol intake. *Clin Chem* 1997; 43: 1527-1534
 2) Ramchandani VA, Bosron WF, Li TK. Research advances in

ethanol metabolism. *Pathol Biol* 2001; 49: 676-682
 3) Laposata EA, Lange LG. Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse. *Science* 1986; 231: 497-499
 4) Werner J, Saghir M, Fernandez-del Castillo C, Warshaw AL, Laposata M. Linkage of oxidative and nonoxidative ethanol metabolism in the pancreas and toxicity of nonoxidative ethanol metabolites for pancreatic acinar cells. *Surgery* 2001; 129: 736-744
 5) Werner J, Saghir M, Warshaw AL, Lewandrowski KB, Laposata M, Iozzo RV, Carter EA, Schatz RJ, Fernandez-Del Castillo C. Alcoholic pancreatitis in rats: injury from nonoxidative metabolites of ethanol. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G65-G73
 6) Tyulina OV, Prokopieva VD, Dodd RD, Hawkins JR, Clay SW, Wilson DO, Boldyrev AA, Johnson P. In vitro effects of ethanol, acetaldehyde and fatty acid ethyl esters on human erythrocytes. *Alcohol Alcohol* 2002; 37: 179-186
 7) Hamamoto T, Yamada S, Hirayama C. Nonoxidative metabolism of ethanol in the pancreas: implication in alcoholic pancreatic damage. *Biochem Pharmacol* 1990; 39: 241-245
 8) Lange LG, Sobel BE. Mitochondrial dysfunction induced by fatty acid ethyl esters, myocardial metabolites of ethanol. *J Clin Invest* 1983; 72: 724-731
 9) Haber PS, Wilson JS, Apte MV, Pirola RC. Fatty acid ethyl esters increase rat pancreatic lysosomal fragility. *J Lab Clin Med* 1993; 121: 759-764
 10) Aleryani S, Kabakibi A, Cluette-Brown J, Laposata M. Fatty acid ethyl ester synthase, an enzyme for nonoxidative ethanol metabolism, is present in serum after liver and pancreatic injury. *Clin Chem* 1996; 42: 24-27
 11) Doyle KM, Bird DA, al-Salihi S, Hallaq Y, Cluette-Brown JE, Goss KA, Laposata M. Fatty acid ethyl esters are present in human serum after ethanol ingestion. *J Lipid Res* 1994; 35: 428-437
 12) Oh SY, Lee JH, Kim HJ. Analyses on the associations of dietary patterns with colon cancer risk. *Korean J Nutr* 2004; 37: 550-556
 13) Lieber CS, DeCarli LM, Sorrell MF. Experimental methods of ethanol administration. *Hepatology* 1989; 10: 501-510
 14) Refaai MA, Nguyen PN, Cluette-Brown JE, Laposata M. Ethyl arachidonate is the predominant fatty acid ethyl ester in the brains of alcohol-intoxicated subjects at autopsy. *Lipids* 2003; 38: 269-273
 15) Bernhardt TG, Cannistraro PA, Bird DA, Doyle KM, Laposata M. Purification of fatty acid ethyl esters by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996; 675: 189-196
 16) Kaluzny MA, Duncan LA, Merritt MV, Epps DE. Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *J Lipid Res* 1985; 26: 135-140
 17) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358
 18) Desai ID. Vitamin E analysis methods for animal tissues. *Methods Enzymol* 1984; 105: 138-147
 19) Pirola RC, Lieber CS. Energy wastage in rats given drugs that

- induce microsomal enzymes. *J Nutr* 1975; 105: 1544-1548
- 20) Laposata EA, Scherrer DE, Mazow C, Lange LG. Metabolism of ethanol by human brain to fatty acid ethyl esters. *J Biol Chem* 1987; 262: 4653-4657
- 21) Sharma R, Gupta S, Singhal SS, Ahmad H, Haque A, Awasthi YC. Independent segregation of glutathione S-transferase and fatty acid ethyl ester synthase from pancreas and other human tissues. *Biochem J* 1991; 275: 507-513
- 22) Lieber CS. Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol: 1991 Update. *Alcohol Clin Exp Res* 1991; 15: 573-592
- 23) Calabrese V, Scapagnini G, Catalano C, Dinotta F, Bates TE, Calvani M, Stella AM. Effects of acetyl-L-carnitine on the formation of fatty acid ethyl esters in brain and peripheral organs after short-term ethanol administration in rat. *Neurochem Res* 2001; 26: 167-174
- 24) Smith AM, Zeve DR, Grisel JJ, Chen WJ. Neonatal alcohol exposure increases malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels in the developing cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* 2005; 160: 231-238
- 25) Chang N, Ryu SM. Antioxidant effects of green tea powder diet against ethanol-induced oxidative damage in rat brain regions. *Korean J Nutr* 2001; 34: 525-531
- 26) Wurst FM, Alling C, Aradottir S, Pragst F, Allen JP, Weinmann W, Marmillot P, Ghosh P, Lakshman R, Skipper GE, Neumann T, Spies C, Javors M, Johnson BA, Ait-Daoud N, Akhtar F, Roache JD, Litten R. Emerging biomarkers: New directions and clinical applications. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 3: 465-473