

Alcoholgeïnduceerde oxidatieve stress in het brein

Dafne Piersma
8 juni 2010
Neurowetenschappen

Begeleider: prof. dr. E.A. van der Zee

Beoordelaars: prof. dr. E.A. van der Zee
prof. dr. U.L.M. Eisel

Inhoudsopgave

Pag. 3	Samenvatting en inleiding
Pag. 4	Alcohol en het brein <ul style="list-style-type: none">- Het foetale brein- Het volwassen brein
Pag. 5-6	Oxidatieve stress <ul style="list-style-type: none">- Katalysatoren en antioxidanten- Celschade en celdood
Pag. 7-15	Alcohol en oxidatieve stress <ul style="list-style-type: none">- Transcriptiefactoren NF-κB en CREB- Het metabolisme van alcohol<ul style="list-style-type: none">• Alcoholdehydrogenase• Cytochroom P450• Katalase• Vrije metalen- Antioxidantmechanismen<ul style="list-style-type: none">• Superoxide dismutase en katalase• Gereduceerd glutathion en vitamines• Antioxidanten tegen alcoholgeïnduceerde oxidatieve stress?- Bloedhersenbarrière
Pag. 16	Negatieve effecten van alcoholgeïnduceerde oxidatieve stress
Pag. 17	Positieve effecten van alcoholgeïnduceerde oxidatieve stress
Pag. 18	Discussie
Pag. 19-22	Referenties

Samenvatting

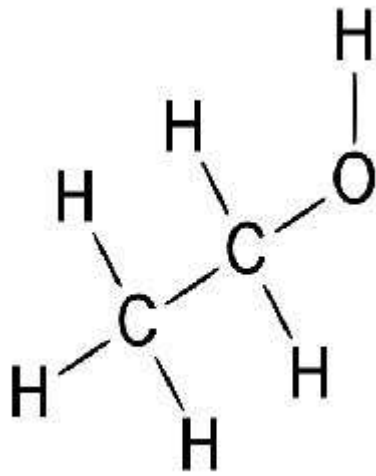
Alcohol heeft verschillende effecten in het brein, waardoor in het foetale brein ernstige dysfuncties kunnen optreden. Ook het volwassen brein ondervindt schade van zwaar alcoholgebruik. Alcoholgeïnduceerde oxidatieve stress wordt gezien als een belangrijk mechanisme dat hersenschade veroorzaakt. Oxidatieve stress is een disbalans tussen de productie van reactive oxygen species (ROS) en de mogelijkheid van het biologische systeem om dit onschadelijk te maken en de schade te herstellen. Omdat alcohol de transcriptie via NF- κ B verhoogt en via CREB verlaagt, verschuift de cel van een overlevingsstaat naar een proinflammatoire staat waarin de cel extra gevoelig is voor oxidatieve stress. Alcohol wordt in het brein gemetaboliseerd door drie enzymen, alcoholdehydrogenase (ADH), cytochroom P450 2E1 (CYP 2E1) en katalase. ADH en CYP 2E1 geven beide een verhoging van de hoeveelheid ROS. Naast deze enzymen veroorzaken alcoholgeïnduceerde vrije metalen ook extra ROS. Tijdens normale metabole processen ontstaan er kleine hoeveelheden ROS, daarom heeft de cel hier beschermingsmechanismen tegen. Dit zijn de antioxidanten zoals superoxide dismutases (SOD), glutathion (GSH) en vitamines. Door alcohol worden de concentraties van de antioxidanten lager, dan is de cel extra gevoelig voor de verhoging van ROS. Dit resulteert in de peroxidatie van koolhydraten (DNA), aminozuren (eiwitten) en lipiden met ernstige gevolgen als chromosomale abnormaliteiten, niet-functionele enzymen en breuken in het celmembraan. Cellen in het brein en de bloedhersenbarrière (BHB) gaan zelfs dood, waardoor neuroinflammatoire ziekten verergeren en negatieve gedragseffecten optreden. Ondanks de desastreuze effecten van alcoholgeïnduceerde oxidatieve stress zijn er ook positieve gevolgen gevonden. ROS vervullen fysiologische functies in de cel, wren micro-organismen en beschermen het brein tegen ischemische schade als de hoeveelheid maar niet te hoog is. Gematigd drinken heeft dus positieve effecten voor volwassenen, terwijl chronische alcoholconsumptie ernstige negatieve gevolgen heeft. Het foetale brein wordt zo zwaar beïnvloed door alcohol dat drinken tijdens de zwangerschap volledig wordt afgeraden.

Inleiding

Alcoholconsumptie kan schade veroorzaken aan veel organen zoals de lever, het hart, de longen en het brein. Mensen die chronisch alcohol drinken merken negatieve gevolgen van de schade aan het brein zoals een verminderde motivatie, minder oplettendheid en inzicht (Crews et al, 2009, Sullivan et al, 2000). Wat gebeurt er in het brein waardoor deze symptomen optreden? Alcohol is neurotoxisch, maar het achterliggende cellulaire mechanisme is niet volledig bekend. Het breinvolume neemt af als er veel alcohol geconsumeerd wordt en het wordt algemeen aangenomen dat oxidatieve stress hierbij een belangrijke rol speelt (Chen et al, 2010, Crews et al, 2009). Alcohol gaat door de BHB en wordt gemetaboliseerd in het brein door enzymen als ADH. Bij dit proces ontstaan ROS, wat tot een verstoorde redoxstaat kan leiden met oxidatieve stress en daarmee cellulaire schade als gevolg (Haorah et al, 2008). In dit artikel wordt het proces waarmee alcohol tot oxidatieve stress leidt verder toegelicht en de gevolgen van de alcoholgeïnduceerde oxidatieve stress worden besproken. Met deze kennis wordt de vraag beantwoord of een volwassene alcohol kan drinken zonder dat er veel oxidatieve neuronale celschade ontstaat.

Alcohol en het brein

Alcohol heeft een chemische structuur die door de BHB getransporteerd kan worden (Hipólito et al, 2007, figuur 1). Het centrale zenuwstelsel is bijzonder gevoelig voor alcohol (Chen et al, 2010). Dit komt door zijn hoge zuurstofconsumptiesnelheid, hoge concentraties



polyonverzadigde vetzuren en ijzer(II) en relatief lage hoeveelheid antioxidanten (Cohen-Kerem et al, 2003, Gerlach et al, 1994). Bij de reacties met zuurstof komen ROS vrij en hierdoor raken onder andere polyonverzadigde vetzuren beschadigd. IJzer(II) katalyseert oxidatiereacties waarbij extra schadelijke ROS ontstaan. Er zijn weinig antioxidanten aanwezig in het brein om de ROS en daarmee samenhangende schade te stoppen. Bij alcoholgebruik neemt de hoeveelheid ROS toe, terwijl het aantal antioxidanten nog lager wordt. Alcohol induceert neuronale celschade en celdood. Dit heeft invloed op het functioneren van het brein waardoor gedragseffecten optreden als verminderde oplettendheid en inzicht (Crews et al, 2009, Sullivan et al, 2000).

Fig. 1 De chemische structuur van alcohol

Het foetale brein

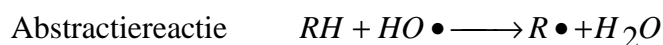
Alcohol is een neuroteratogen, alcoholconsumptie tijdens de zwangerschap kan leiden tot Fetal Alcohol Spectrum Disorders met onder andere mentale retardatie en groeideficiënties als kenmerken (Caprara et al, 2007, Chen et al, 2010). De effecten van alcohol zijn reductie van neurogenese, inhibitie van differentiatie, verstoring van neuronale migratie, verandering van cel-celinteractie en inductie van apoptose (Goodlett et al, 2001, Olney et al, 2000).

Het volwassen brein

Niet alleen het ontwikkelende brein ondervindt schade van chronische alcoholconsumptie, ook het volwassen brein laat neurocognitieve deficiënties zien. Chronische alcoholgebruikers scoren lager op intellectuele en visueelruimtelijke taken (Molina et al, 1994). In combinatie met het Wernicke-Korsakoff syndroom (Vitamine B1-deficiëntie) vindt nog ernstigere neurodegeneratie plaats (Chen et al, 2010, Harper, 2009).

Oxidatieve stress

Bij oxidatiereacties vindt er een overdracht van elektronen plaats. Het ene molecuul, de reductor, staat elektronen af aan het andere molecuul, de oxidator. Oxidatie is een essentiële stap in veel metabole pathways, bijvoorbeeld voor het synthetiseren van celcomponenten, verwerking van metabole afvalstoffen en voedselverbranding. Over het algemeen zijn de oxidanten en reductanten in evenwicht, de normale redoxstaat. Echter worden bij sommige metabole processen, zoals de oxidatie van alcohol, krachtige ROS gegenereerd die bijdragen aan oxidatieve stress (Fernandez-Checa et al, 1997). Er is sprake van oxidatieve stress als er een disbalans is tussen de productie van ROS en de mogelijkheid van het biologische systeem om dit onschadelijk te maken en de schade te herstellen (Halliwell et al, 1999, Hampton et al, 1998). De redoxstaat is dan verstoord door de relatief grote hoeveelheid ROS (Wu et al, 2003). ROS zijn kleine, reactieve zuurstofverbindingen, zoals waterstofperoxide (H_2O_2) en superoxideradicalen ($O_2^{\cdot-}$). In tabel 1 staan een aantal ROS met hun effecten. H_2O_2 is zelf niet reactief genoeg om veel organische moleculen te oxideren, toch is het een belangrijke oxidant. Het molecuul kan namelijk hoogreactieve hydroxylradicalen ($HO\cdot$) genereren via interacties met metalen. $HO\cdot$ gaan diverse reacties aan. Ten eerste additiereacties, bij deze reacties binden twee moleculen aan elkaar, in dit geval bindt $HO\cdot$ aan een organisch molecuul zoals alcohol of acetaldehyde. Ten tweede abstractiereacties waarbij het $HO\cdot$ een organisch molecuul oxideert en water en een organisch radicaal gevormd worden (zie abstractiereactie). Dit organisch radicaal kan door zijn vrije elektron reageren met zuurstof en dan wordt er een peroxyradicaal ($ROO\cdot$) gevormd. Deze kan dan weer een waterstof onttrekken van een ander organisch molecuul, wat dan ook een organisch radicaal wordt. Deze kettingreactie geeft de meeste schade van alle reacties met ROS (Arora et al, 2002). Tot slot is $HO\cdot$ betrokken bij elektrontransferreacties, dit zijn de oxidatiereacties waarbij elektronen overgedragen worden van molecuul op molecuul. Sommige ROS zijn hoog diffuus en verplaatsen zich door de cel. $HO\cdot$ heeft een kleine diffusie-afstand en reageert ongeveer op de plek waar het gevormd is.



Tabel 1 Verschillende ROS met verschillende eigenschappen (Ross et al, 1991)

Soort ROS	Chemisch symbool	Eigenschappen
Superoxideradicaal	$O_2^{\cdot-}$	Goede reductant, slechte oxidant
Hydroxylradicaal	$HO\cdot$	Extreem reactief (additie-, abstractie-, elektrontransferreacties), kleine diffusie-afstand
Perhydroxylradicaal	$HO_2\cdot$	Sterke oxidant, vetoplosbaar, mogelijke initiator van lipideperoxidatie
Peroxyradicaal	$ROO\cdot$	Weinig oxidatief vermogen, hoog diffuus
Alkoxyradicaal	$RO\cdot$	Overgangsvorm bij reacties met lipiden tussen $ROO\cdot$ en $HO\cdot$
Waterstofperoxide	H_2O_2	Oxidant, maar trage reacties, hoog diffuus

Katalysatoren en antioxidanten

Vrije metalen zijn katalysatoren van de redoxreacties die oxidatieve stress veroorzaken. Bij deze reacties accepteert of doneert het metaal een elektron en hierdoor worden er ROS geproduceerd. Aangezien ROS natuurlijk gevormd worden tijdens metabole processen heeft de cel hier beschermingsmechanismen tegen (Yu, 1994). Dit zijn de antioxidanten, die in tegenstelling tot metalen oxidatieve stress tegengaan. Ze voorkomen schadelijke oxidaties door zelf geoxideerd te raken en ze neutraliseren ROS. Voorbeelden van antioxidanten zijn GSH, SOD en katalase. Andere moleculen die bijdragen aan antioxidantactiviteit zijn vitamines als vitamine C, vitamine E en β -caroteen (Cohen-Kerem et al, 2003).

Celschade en celdood

Weefsels beschermen zichzelf tegen milde oxidatieve stress met een verhoging van antioxidanten, maar bij zware of persistente oxidatieve stress is dit niet voldoende en ontstaat celschade en uiteindelijk celdood (Skrzydowska et al, 2005). Oxidatieve stress leidt tot celschade door de peroxidatie van koolhydraten (DNA), aminozuren (eiwitten) en lipiden met ernstige gevolgen als chromosomale abnormaliteiten, niet-functionele enzymen en breuken in het celmembraan (Cohen-Kerem et al, 2003). Oxidatieve stress kan zelfs tot celdood leiden, omdat ROS via caspases het apoptotische programma activeren. Na extreme oxidatieve stress kan er geen apoptose optreden wegens het niet functioneren van caspases in een niet-onderdrukte oxidatieve omgeving (figuur 2). In plaats van apoptose vindt dan necrose plaats (Hampton et al, 1998). Apoptose is gereguleerde celdood en wordt gecontroleerd, de afstervende cel krimpt en wordt opgeruimd door microgliacellen (Sharifi et al, 2010). Necrose is ongecontroleerde celdood, de cel zwelt op en explodeert, waardoor alle compartimenten uit de cel los in het weefsel komen te liggen en extra schade kunnen aanrichten zoals een ontstekingsreactie (Berghe et al, 2010).

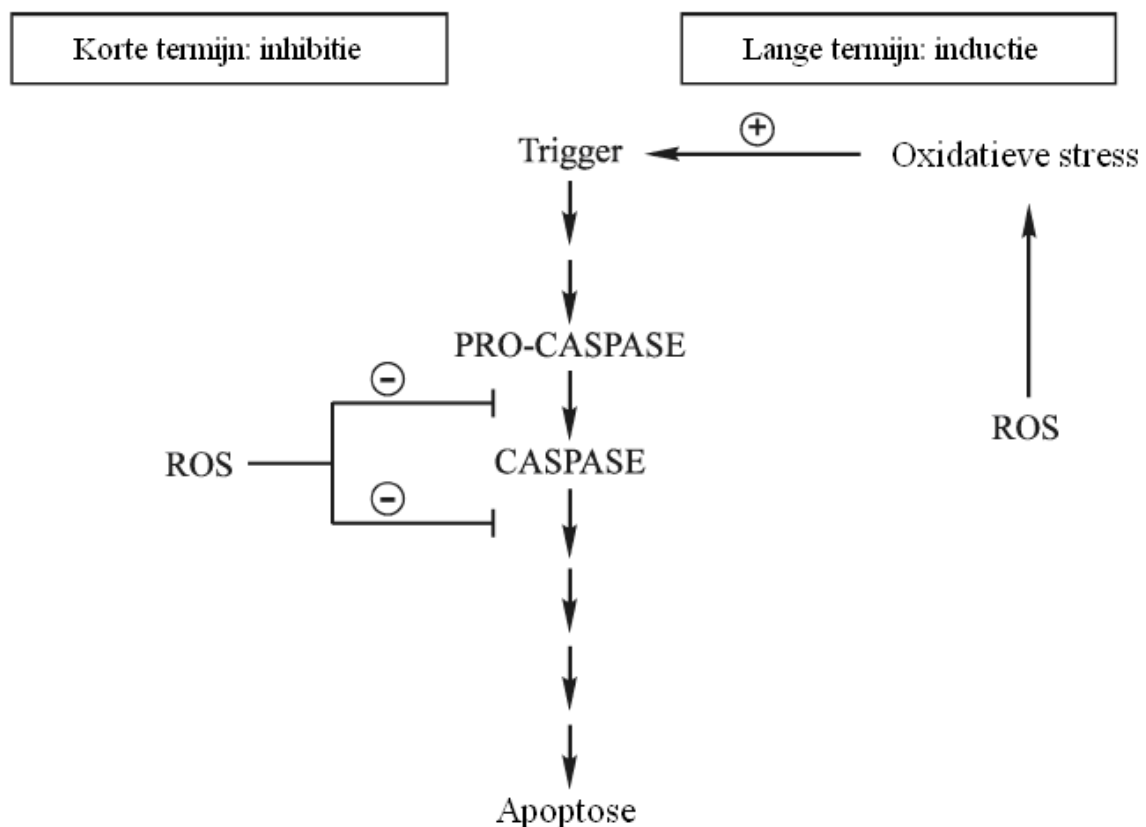


Fig. 2 Duale effecten van oxidatieve stress op apoptose (Hampton et al, 1998)
ROS = reactive oxygen species

Alcohol en oxidatieve stress

Alcohol stimuleert de formatie van ROS en interfereert met de beschermingsmechanismen hiertegen. Zo verhoogt alcohol de hoeveelheid van sommige metalen wat bijdraagt aan ROS-productie en verlaagt het de hoeveelheden antioxidanten die dit tegen kunnen gaan. De cel komt dan in een staat van oxidatieve stress, wat tot celschade kan leiden (Wu et al, 2003). Neuronen, gliacellen en de endotheelcellen van de BHB worden aangetast door alcohol (Haorah et al, 2005). Hieronder worden de verschillende mechanismen besproken die tot alcoholgeïnduceerde oxidatieve stress leiden. Eerst wordt de invloed van alcohol op de transcriptiefactoren NF- κ B en CREB besproken. Vervolgens worden de mechanismen van het alcoholmetabolisme en een aantal antioxidanten uitgelegd. Tot slot volgt er een stukje over de BHB.

Transcriptiefactor NF- κ B

Door alcohol verandert de transcriptie in neuronen en gliacellen. De concentratie van transcriptiefactor NF- κ B is verhoogd (Zou et al, 2006, figuur 3), dit wordt ook gezien in afstervende neuronen na een trauma en bij neurodegeneratieve ziekten (O'Neill et al, 1997, Terai et al, 1996). De factor wordt daarom gelinkt aan neurodegeneratie, wat via de NF- κ B-inductie van oxidatieve en proinflammatoire genen veroorzaakt wordt (Zou et al, 2006). NF- κ B wordt geactiveerd door stimuli van oxidatieve stress, cytokines en glutamaat (Mattson et al, 2001, O'Neill et al, 1997) en zorgt voor de inductie van oxidatieve stressenzymen en een proinflammatoire cascade die bijdraagt aan neurotoxiciteit (Crews et al, 2009). Dit lijkt een vicieuze cirkel van verergerende oxidatieve stress, echter heeft GSH invloed op de activiteit van NF- κ B. Bij een gecontroleerd niveau van GSH is er optimale NF- κ B-activatie door ROS, terwijl bij lage hoeveelheden de activatie van NF- κ B minder wordt en bij hoge hoeveelheden de DNA-binding geïnhibeerd wordt (Dröge et al, 1994). In het geval van alcoholconsumptie is de hoeveelheid NF- κ B verhoogd, maar de hoeveelheid GSH wordt lager. Dan zou NF- κ B minder actief zijn en stopt de transcriptie van proinflammatoire factoren weer. Deze hypothese moet nog onderzocht worden in een model met alcoholconsumptie. Samengaand met veel NF- κ B worden NADPH-oxidase en andere ROS-producerende enzymen verhoogd door alcohol (Qin et al, 2008). NADPH-oxidase veroorzaakt de formatie van $O_2^{\cdot-}$ door een elektrontransferreactie waarbij NADPH een elektron aan zuurstof afstaat (Crews et al, 2009).

Transcriptiefactor CREB

Alcohol werkt niet alleen activerend op transcriptie, maar ook inhiberend. De DNA-binding van CREB wordt namelijk verlaagd door alcohol (Zou et al, 2006, figuur 3). CREB-transcriptiefactoren zorgen voor neuronale overleving door de transcriptie van pro-survival factoren (Lonze et al, 2002). Een verminderde activiteit van CREB maakt de cel dus gevoeliger voor schade. Een omgeving met oxidatieve stress heeft hierdoor eerder toxische effecten op neuronen en gliacellen. Alcohol zorgt door meer transcriptie via NF- κ B en minder via CREB voor een verschuiving van een overlevingsstaat naar een proinflammatoire staat, dit veroorzaakt verhoogde neurotoxiciteit door oxidatieve stress (Zou et al, 2006).

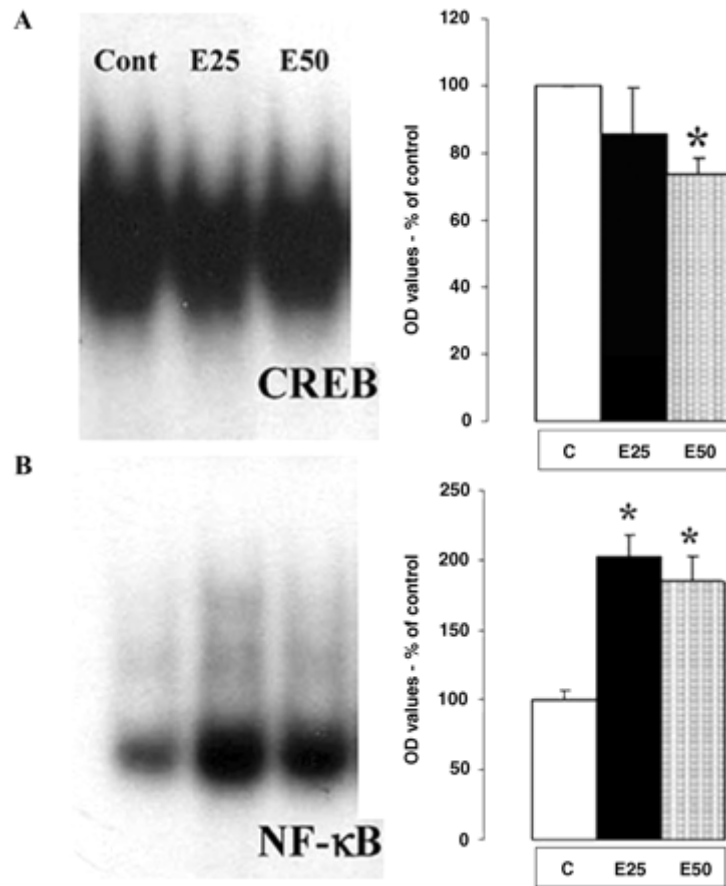


Fig. 3 Transcriptie van CREB en NF-κB. Bij een hoge dosis alcohol neemt de transcriptie via CREB significant af. De transcriptie via NF-κB neemt toe bij alcoholgebruik (Zou et al, 2006)

Het metabolisme van alcohol

Het alcoholmetabolisme in de lever is veel bestudeerd en in het brein blijken dezelfde enzymen aanwezig te zijn, maar wel in een andere verhouding. De drie enzymen die alcohol omzetten in acetaldehyde zijn ADH, CYP450 en katalase. Dit zijn drie oxidatieve pathways, slechts een klein deel van de geconsumeerde alcohol wordt non-oxidatief omgezet waarbij vetzuurethylesters worden gevormd (Hipólito, 2007). De drie oxidatieve pathways worden hieronder besproken evenals de reacties van vrije metalen.

Alcoholdehydrogenase

Het metaboliseren van alcohol via het ADH-pathway gebeurt in twee stappen. Eerst zet het enzym ADH alcohol om in acetaldehyde, een schadelijk, reactief molecuul. Vervolgens zet het enzym aldehydedehydrogenase (ALDH) acetaldehyde om in acetaat. Bij beide reacties wordt één NADH gevormd (figuur 4), dus de hoeveelheid NADH in de cel wordt hoger (Fernandez-Checa et al, 1997). NADH staat aan de start van de respiratoire keten in de mitochondriën, dit zijn de reacties waarbij ATP (energie) gevormd wordt. Als de respiratoire keten vaker doorlopen wordt, is er meer zuurstofgebruik en daarbij meer ROS-formatie. Verder zet alcohol, via de verhoging van NADH, xanthinedehydrogenase om in xanthineoxidase, een enzym dat $O_2^{\cdot-}$ kan genereren en ook katalysator ijzer(II) kan regenereren (Fong et al, 1976, Kato et al, 1990, Yu, 1994). Daarnaast gaat acetaldehyde niet alleen een interactie aan met ALDH, maar tevens met HO^{\cdot} , eiwitten en lipiden, dit leidt tot de formatie van extra radicalen en celschade (Puntarulo et al, 1989, Wu et al, 2003).

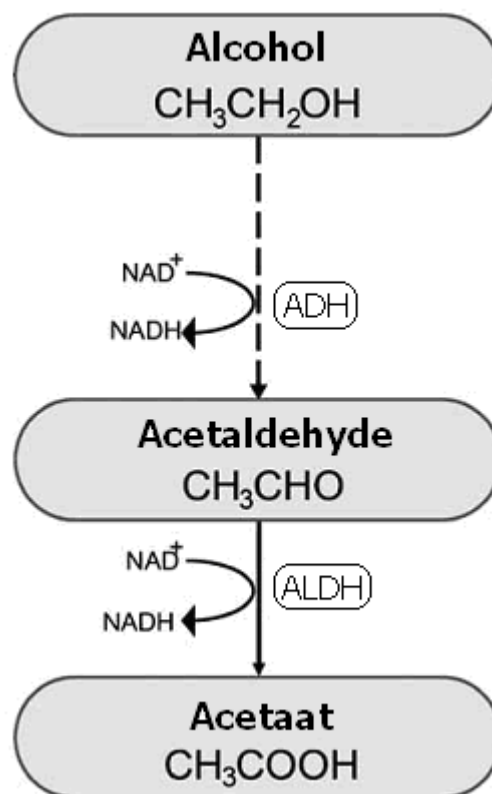


Fig. 4 Het metabolisme van alcohol via het ADH-pathway (Fernandez-Checa et al,1997)

ADH = alcoholdehydrogenase; ALDH = aldehydedehydrogenase; NAD = nicotinamide adenine dinucleotide; NADH = gereduceerd nicotinamide adenine dinucleotide

Cytochroom P450

De tweede belangrijke enzymatische pathway waardoor alcohol in acetaldehyde omgezet wordt, is dat van de CYP450 oxidases (figuur 5). Bij chronische alcoholconsumptie is er een verhoogde activiteit van deze enzymen, vooral van CYP 2E1 (Cohen-Kerem et al, 2003, Hipólito et al, 2007). Dit enzym metaboliseert alcohol en andere moleculen en genereert tijdens deze processen ROS. CYP 2E1 bevindt zich in de microsomen (Zimatkin et al, 1971).

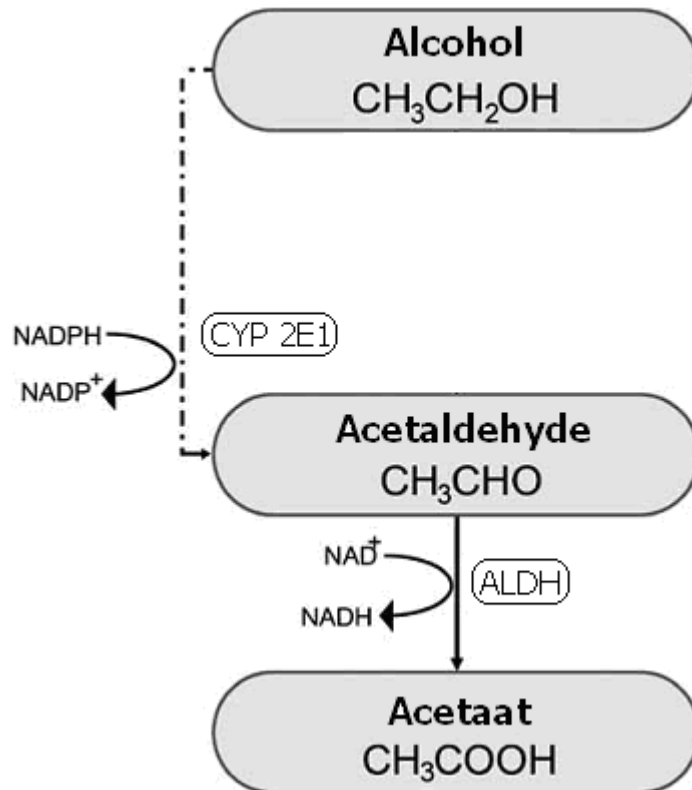
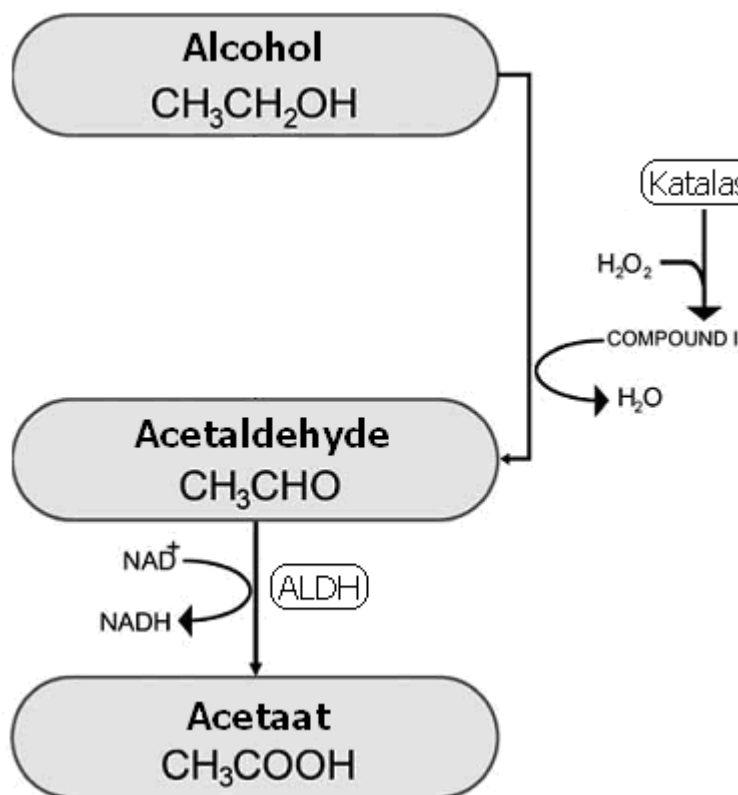


Fig. 5 Het metabolisme van alcohol via het CYP 2E1-pathway (Hipólito et al, 2007)

CYP 2E1 = cytochroom P450 2E1; ALDH = aldehydedehydrogenase; NAD = nicotinamide adenine dinucleotide; NADH = gereduceerd NAD; NADP = nicotinamide adenine dinucleotide fosfaat; NADPH = gereduceerd nicotinamide adenine dinucleotide fosfaat

Katalase

Naast het ADH-pathway en het CYP 2E1-pathway is er nog een derde pathway in het alcoholmetabolisme, namelijk het katalasepathway. Katalase zorgt in het brein zelfs voor de omzetting van meer dan de helft van de aanwezige alcohol, wederom in acetaldehyde (Hipólito et al, 2007, figuur 6). Er zijn hoge concentraties katalase aanwezig in de microperoxisomen evenals allerlei oxidasen en peroxidasen. De oxidasen zorgen voor de formatie van H₂O₂ waar katalase dan mee kan reageren (Zimatkin et al, 1971).

Fig. 6 Het metabolisme van alcohol via het katalase-pathway (Hipólito et al, 2007)

Compound 1 = H₂O₂-katalase; H₂O₂ = waterstofperoxide; H₂O = water; ALDH = aldehydedehydrogenase; NAD = nicotinamide adenine dinucleotide; NADH = gereduceerd nicotinamide adenine dinucleotide

In tegenstelling tot ADH en CYP450 is katalase een antioxidant. ADH en CYP450 veroorzaken ROS-formatie, terwijl katalase H_2O_2 wegvangt.

In figuur 7 staan de drie enzymatische pathways van het alcoholmetabolisme samen weergegeven. Katalase lijkt voor 60% van de omzetting van alcohol te zorgen, CYP 2E1 voor 20% en de rest van de alcoholoxidaties komt door ADH en andere factoren (Zimatkin et al, 2006).

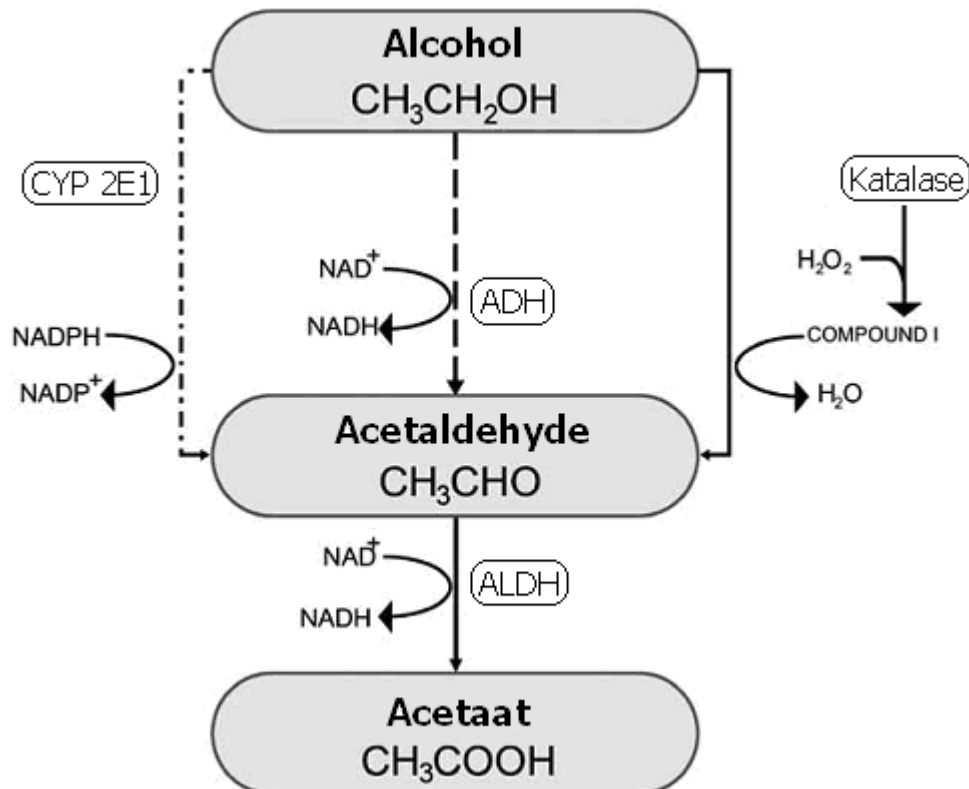


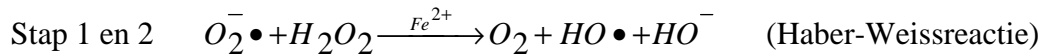
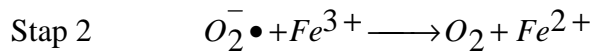
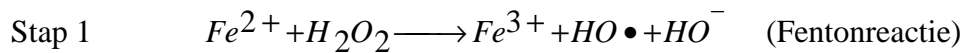
Fig. 7 De drie enzymatische pathways van het alcoholmetabolisme. Alcohol wordt omgezet in acetaldehyde door ADH, CYP 2E1 en katalase. Katalase verzorgt het grootste deel van de omzetting. Bij chronisch alcoholgebruik neemt de bijdrage van CYP 2E1 toe (Hipólito et al, 2007)

ADH = alcoholdehydrogenase; ALDH = aldehydedehydrogenase; NAD = nicotinamide adenine dinucleotide; NADH = gereduceerd nicotinamide adenine dinucleotide; CYP 2E1 = cytochrom P450 2E1; NADP = nicotinamide adenine dinucleotide fosfaat; NADPH = gereduceerd nicotinamide adenine dinucleotide fosfaat; Compound 1 = H_2O_2 -katalase; H_2O_2 = waterstofperoxide; H_2O = water

Vrije metalen

Het ADH- en CYP450-pathway zijn twee alcoholgeïnduceerde bronnen van ROS, maar er zijn meer oxidatieve stressverhogende processen gaande. Bij het consumeren van veel alcohol gaat het niveau van vrij ijzer omhoog. In rode wijn zelf zit ijzer, maar ook chronisch gebruik van andere alcoholische dranken resulteert in een verhoogd ijzerniveau omdat er meer ijzer uit de voeding wordt opgenomen (Wu et al, 2003). Het alcoholgeïnduceerde hoge niveau van vrij ijzer is schadelijk, want dit metaal katalyseert oxidatiereacties waarbij extra reactieve ROS ontstaan. De bovengenoemde systemen produceren vooral $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 . In aanwezigheid van vrije metalen ontstaat hieruit de meest reactieve ROS, namelijk HO^{\cdot} . Vooral vrij ijzer en koper zijn goede katalysatoren voor oxidatieve reacties. In de eerste stap, de Fentonreactie, reageert H_2O_2 met een vrij metaal zoals ijzer(II) tot een HO^{\cdot} , hydroxylion (HO^{\cdot}) en ijzer(III). In de tweede stap regenerereert het $O_2^{\cdot-}$ ijzer(II) vanuit het gevormde ijzer(III). Hierdoor kan

wederom de eerste stap plaatsvinden, waardoor steeds opnieuw HO• gevormd wordt met ijzer(II) als katalysator. De twee stappen samen noemt men de Haber-Weissreactie.



Als alcohol reageert met HO• wordt een ander radicaal 1-hydroxyethyl gevormd (zie abstractiereactie, pag. 5). Dit molecuul blijft lang in stand en veroorzaakt waarschijnlijk celschade. Ook door de alcoholgeïnduceerde activiteit van CYP 2E1 gaat de hoeveelheid hydroxyethylradicalen omhoog (Sun et al, 2001). Door al deze alcoholgeïnduceerde processen is er veel productie van radicalen. Bij deze vele processen zijn veel systemen betrokken die bijdragen aan alcoholgeïnduceerde oxidatieve stress (Wu et al, 2003, figuur 8).

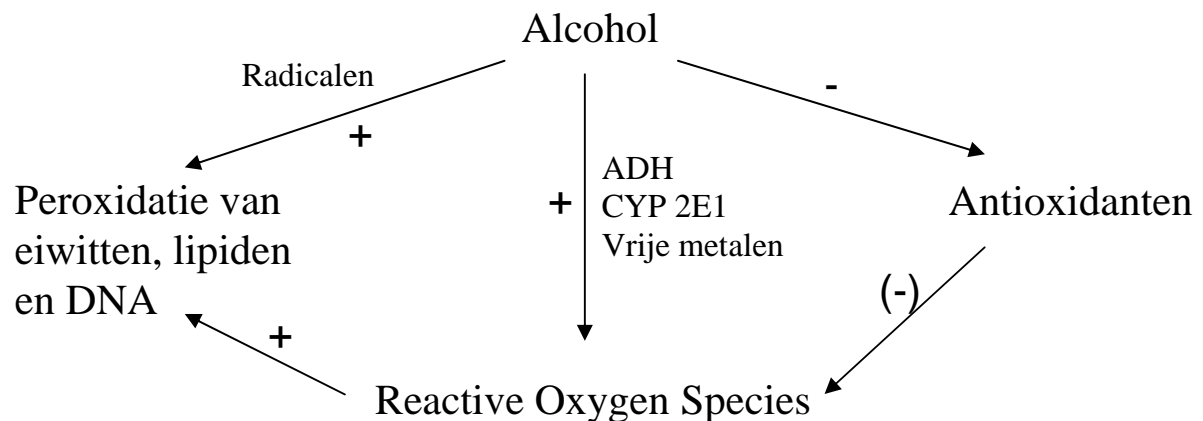


Fig. 8 Alcoholgeïnduceerde oxidatieve stressmechanismen. Alcohol induceert de peroxidaties van eiwitten, lipiden en DNA via radicalen en ROS. Door de inhibitie van antioxidanten zijn er extra veel ROS aanwezig. CYP 2E1 = cytochroom P450 2E1; ADH = alcoholdehydrogenase; + = excitatoir effect; - = inhibitoir effect

Antioxidantmechanismen

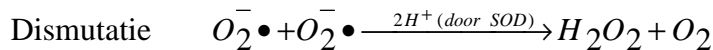
Alcohol zorgt naast de verhoging van ROS ook voor verminderde antioxidantactiviteit, bijvoorbeeld door het verlagen van de hoeveelheid GSH en vitamine E (Skrzydowska et al, 2005). Vermindering van antioxidanten kan neurologische schade in het brein veroorzaken (Calvin et al, 1986). Niet elke antioxidant werkt hetzelfde, de mechanismen van een aantal antioxidanten worden besproken. In tabel 2 staat een overzicht van verschillende antioxidanten en hun reacties.

Tabel 2 Overzicht van antioxidanten (Heffner et al, 1989)

<i>Antioxidant</i>	<i>Structuur</i>	<i>Plaats</i>	<i>Acties</i>
Enzymatische systemen			
Superoxide dismutases	Cu/Zn SOD	Vooraf cytosol, ook de celkern	Katalyseert dismutatie van O_2^- tot H_2O_2
	Mn SOD	Vooraf mitochondria	
	Cu SOD	Vooraf plasma	
Katalase	Tetrameer heemeiwit	Peroxisomen	Katalyseert dismutatie van H_2O_2 , reduceert methyl- en ethylhydroperoxides
GSH redox			
GSH peroxidase	Selenoenzym	Vooraf cytosol, ook mitochondria	Katalyseert reductie van H_2O_2 en andere hydroperoxides
GSH reductase	Dimeer	Vooraf cytosol, ook mitochondria	Katalyseert reductie van disulfides met een laag moleculair gewicht
Vetoplosbare componenten			
Vitamine E	Vetoplosbaar vitamine	Membranen, extracellulair	Zet O_2^- , $HO\cdot$ en lipideperoxyradicalen om in minder reactieve vormen, stopt lipideperoxidatiekettingreacties
β -caroteen	Metabole precursor van vitamine A	Membranen van weefsels	Vangt O_2^- weg, reageert met $ROO\cdot$
Wateroplosbare componenten			
Vitamine C	Wateroplosbaar vitamine	Intracellulair, extracellulair	Vangt O_2^- en $HO\cdot$ weg, werkt mee aan de regeneratie van vitamine E
GSH	Tripeptide	Intracellulair	Substraat in glutathionperoxidasesysteem, reageert met O_2^- , $HO\cdot$ en organische vrije radicalen

Superoxide dismutases en katalase

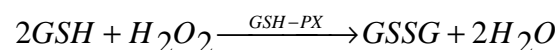
In het brein zijn twee enzymen aanwezig die oxidatieve stress tegengaan, SOD en katalase. Deze antioxidanten bevinden zich zowel in het cytosol als in de mitochondria waar de meeste vrije radicalen ontstaan (Ji et al, 1988). Er zijn drie klassen SOD, ingedeeld per metaalcomponent, de Cu/Zn SOD, Mn SOD en de Fe SOD. Mn SOD is actief in de mitochondria en Cu/Zn SOD in het cytosol. Fe SOD is extracellulair aanwezig of membraangeassocieerd. Cu/Zn SOD is het belangrijkste antioxidantenzym van het centrale zenuwstelsel (Ledig et al, 1980). SOD zijn katalysatoren bij het verwijderen van O_2^- (zie dismutatie). Alcohol verlaagt het cellulaire niveau van SOD (Skrzydowska et al, 2005).



Na de dismutatie van O_2^- is er H_2O_2 ontstaan. Katalase katalyseert de verwijdering van H_2O_2 . Eén van de reacties die katalase kan bewerkstelligen is de omzetting van H_2O_2 in water en zuurstof. Daarnaast stimuleert katalase de interactie van H_2O_2 met waterstofdonors, waardoor H_2O_2 in water omgezet wordt. Alcohol kan als waterstofdonor optreden, maar het verlaagt de activiteit van katalase (Skrzydowska et al, 2005).

Gereduceerd glutathion en vitamines

Naast de enzymen SOD en katalase zijn er ook non-enzymatische moleculen tegen oxidatieve stress, bijvoorbeeld GSH en vitamines. Het glutathionperoxidase-systeem bevat meerdere componenten, waarvan GSH de belangrijkste is. Dit peptide werkt als cofactor voor glutathiontransferase, een enzym dat meewerkt aan het verwijderen van ROS. Daarnaast kan GSH direct $HO\cdot$ neutraliseren en interacties met H_2O_2 en O_2^- aangaan. Dit zorgt ervoor dat er nauwelijks schade optreedt door peroxidatie (Yu, 1994). GSH is door al zijn functies waarschijnlijk één van de belangrijkste antioxidanten. Alcohol verlaagt de hoeveelheid GSH in de cel, met name in de mitochondria (Wu et al, 2003). In deze organellen is juist veel GSH nodig om de ROS weg te vangen die ontstaan bij het doorlopen van de respiratoire keten. Mitochondria synthetiseren zelf geen GSH, maar importeren het vanuit het cytosol via een carrier eiwit. Alcohol lijkt de functie van dit eiwit te verstoren, waardoor er minder GSH in de mitochondria aanwezig is (Fernandez-Checa et al, 1997). De hoeveelheden van meerdere componenten van het glutathionperoxidasesysteem worden lager door alcoholconsumptie, zo ook glutathionperoxidase (GSH-PX). GSH-PX zet H_2O_2 om in water via onderstaande reactie met GSH en het zorgt voor de detoxificatie van lipideperoxiden. GSH-PX is een seleno-enzym, wat betekent dat er geen GSH-PX gesynthetiseerd kan worden als er geen selenium aanwezig is. Alcohol verlaagt de seleniumconcentratie en daarmee dus ook de concentratie GSH-PX (Skrzydowska et al, 2005).



Andere non-enzymatische antioxidanten zijn vitamine E en vitamine C. Vitamine E voorkomt lipideperoxidatie door te reageren met radicalen (Ross et al, 1991). Hierbij worden vitamine E-radicalen gevormd, deze reageren met GSH en vitamine C weer tot vitamine E. Vitamine E raakt niet op zolang er een bepaalde hoeveelheid vitamine C is, dus er is sprake van een besparend effect (Yu, 1994). Vitamine C wordt opgenomen vanuit het plasma en zorgt naast de regeneratie van vitamine E ook voor het wegvangen van O_2^- en $HO\cdot$. Vitamine C voorkomt lipideperoxidatie, echter zorgen grote hoeveelheden vitamine C in aanwezigheid van bepaalde metalen juist voor een verhoogde lipideperoxidatie (Yu, 1994). Alcohol verlaagt naast de hoeveelheid GSH de hoeveelheid vitamine E en C (Wu et al, 2003) en ook vitamine

A en zijn precursor β -caroteen zijn in mindere mate aanwezig (Skrzydowska et al, 2005). β -caroteen vangt radicalen weg en inhibeert daarmee lipideperoxidatie geïnduceerd door het xanthineoxidasysteem (Krinsky et al, 1982). Echter, net als bij vitamine C, kan ook β -caroteen als pro-oxidant in plaats van antioxidant werken bij een te hoge partiële zuurstofdruk (>150 Torr) (Burton et al, 1984).

Antioxidanten tegen alcoholgeïnduceerde oxidatieve stress?

Door alcoholconsumptie neemt het vermogen van het brein om oxidatieve stress te weren sterk af, wat samengaat met een verhoogde oxidatie van lipiden en eiwitten (Skrzydowska et al, 2005). De cel raakt beschadigd en kan zelfs doodgaan door oxidatieve stress. Naast neurodegeneratie is er ook minder vorming van nieuwe hersencellen (Nixon et al, 2002). Het verminderen van oxidatieve stress met extra antioxidant lijkt een logische oplossing. Er zijn veel studies gedaan naar verschillende antioxidant en vaak wordt er een positief effect gevonden (Aydin et al, 2002, Chen et al, 2010, Heaton et al, 2004, Skrzydowska et al, 2005, Zou et al, 2004). Extra antioxidant vangen extra ROS weg, waardoor er minder oxidatie van lipiden en eiwitten op kan treden. De neurodegeneratie vermindert dan evenals foetale groeirestrictie en de kans op een miskraam (Baydas et al, 2005, Toso et al, 2007). Ook de inhibitie van neurogenese kan voorkomen worden met een antioxidant (Herrera et al, 2003). Een aantal studies geven de suggestie dat oxidatieve stress niet het principiële mechanisme is achter alcoholgeïnduceerde neurotoxiciteit, omdat een onderzocht antioxidant geen effect had op alcoholgeïnduceerde schade en oxidatieve stress (Kane et al, 2008, Edwards et al, 2002, Tran et al, 2005). Waarom sommige antioxidant geen effect hebben is een raadsel. De discrepanties tussen studies zouden verklaard kunnen worden door een verschil in biologische beschikbaarheid (Chen et al, 2010).

Bloedhersenbarrière

Niet alleen de neuronen en gliacellen raken beschadigd, ook de BHB ondervindt schade. Alcoholgedieerde oxidatieve stress in endotheelcellen van de BHB leidt tot activatie van de myosin light chain (MLC) kinase, fosforylatie van MLC en tight junction-eiwitten, minder BHB-integriteit en verhoogde monocytmigratie door de BHB. Acetaldehyde en ROS zijn de veroorzakers van deze effecten. Alcoholconsumptie kan via oxidatieve stress zorgen voor afbraak van de BHB en dit verergert neuroinflammatoire ziekten (Haorah et al, 2005).

Negatieve effecten van oxidatieve stress

Oxidatieve stress is via veel wegen toxisch voor de cel, want geen biologische substantie is resistent tegen vrije radicalen (Skrzydowska et al, 2005). Hier worden de drie belangrijkste groepen substanties besproken. Ten eerste raken eiwitten beschadigd door ROS. Sommige aminozuren gaan interacties aan met ROS en dit beïnvloedt de driedimensionele structuur, er treedt fragmentatie, aggregatie en cross-linking van eiwitten op. Daardoor kunnen eiwitten geïnactiveerd worden en dan vervullen ze hun normale functies in de cel niet meer. Fragmentatie houdt in dat een eiwit in stukken wordt geknipt, dit gebeurt bijvoorbeeld met albumine door HO· (Marx et al, 1986). Bij aggregatie worden eiwitten gedenatureerd en vervolgens plakken stukken eiwit aan elkaar. HO· is in staat eiwitten aan elkaar te crosslinken (Yu, 1994). Geoxideerde eiwitten kunnen extra gevoelig zijn voor degradatie door mechanismen in de cel die beschadigde eiwitten opruimen (Wu et al, 2003). Deze proteolytische enzymen vormen een secundair beschermingsmechanisme. Daar waar formatie van ROS plaatsvindt, kan de afbraak van eiwitten door proteolytische enzymen versneld zijn (Yu, 1994).

De tweede groep moleculen die door ROS negatieve veranderingen ondergaan zijn de fosfolipiden, welke in grote mate aanwezig zijn in het brein (Halliwell, 1992). Fosfolipiden bevinden zich in het celmembraan en in de structuren om de celkern en mitochondriën. Complete degradatie of peroxidatie van fosfolipiden is een kenmerk van oxidatieve stress. Eén HO· kan al veel polyonverzadigde vetzuren oxideren, omdat er een cyclische kettingreactie optreedt. Hierdoor raken de membranen ernstig beschadigd. De lipideperoxidatie gaat in drie stappen; initiatie, verspreiding en terminatie. Bij de initiatie worden er dubbele bindingen gevormd door de verwijdering van waterstofatomen. Metalen als ijzer en koper kunnen het initiatieproces versnellen. Vervolgens reageert zuurstof met koolstofgecentreerde vrije radicalen, hierbij worden lipidehydroperoxidasen gevormd. Door metalen vindt de decompositie van hydroperoxidasen plaats waarbij RO· en ROO· ontstaan. Deze radicalen reageren verder, waardoor de lipideperoxidaties verspreiden. Voor de terminatie zijn antioxidanten en enzymen nodig (Girotti, 1985), bijvoorbeeld vitamine E (Heffner et al, 1989). Naast de beschadigingen aan de membranen is er formatie van aldehyden die ook eiwitten en het DNA beschadigen. De gemodificeerde eiwitten hebben cytotoxische en mutagene effecten (Rottkamp et al, 2000, Smith et al, 1989). De overlevingskans van de cel gaat hierdoor sterk omlaag (Wu et al, 2003).

Ten derde wordt het DNA aangetast door ROS. HO· veroorzaakt breuken in DNA-strengen, verwijdering van nucleotiden en basemodificaties (Yu, 1994). Hierdoor kunnen de sequenties voor sommige eiwitten niet meer goed afgelezen worden met niet-functionele eiwitten als gevolg. Grote veranderingen in het DNA kan de cel niet meer repareren, waardoor er permanente schadelijke effecten kunnen optreden (Wu et al, 2003). Echter is de dubbele helix in een cel minder gevoelig voor oxidatieve stress dan geïsoleerd DNA (Dizdaroglu, 1985).

Door deze toxische effecten van alcohol gaan neuronen dood en is er minder neurogenese (Nixon et al, 2002). Cellen in het brein en de BHB ondervinden schade, hierdoor worden neuroinflammatoire ziekten verergerd (Haorah et al, 2005). Daarnaast kunnen er negatieve effecten op het gedrag optreden, omdat verschillende functies van het brein minder goed vervuld worden. Voorbeelden van gedragseffecten zijn een verminderde motivatie, minder oplettendheid en inzicht (Crews et al, 2009, Sullivan et al, 2000). Na chronisch zwaar alcoholgebruik is iemand niet meer cognitief flexibel, problemen oplossen en beslissingen maken lukt niet meer net als het inschatten van risico's (Noël et al, 2007).

Positieve effecten van oxidatieve stress

Het is bekend dat oxidatieve stress celschade en zelfs celdood veroorzaakt, maar is oxidatieve stress dan alleen maar slecht voor het brein? Dit is niet het geval, er is namelijk bewijs dat gematigde alcoholconsumptie beschermende effecten heeft bij neuronale ischemie. Waar zware alcoholconsumptie de kans op een beroerte vergroot, verlaagt gematigde alcoholconsumptie juist de kans hierop (Reynolds et al, 2003). Hoe werkt dit beschermende mechanisme van alcohol? Speelt oxidatieve stress hierbij een rol? Uit onderzoek blijkt dat alcoholconsumptie 24 uur voor ischemie leukocyt-endotheliale celadhesie-interacties voorkomt. ROS, gevormd na de consumptie van alcohol, triggeren de ontwikkeling van een anti-inflammatoir fenotype, waardoor resistentie voor de proadhesieve effecten van ischemie optreedt. Deze ROS worden geproduceerd door alcoholgeïnduceerd NADPH-oxidase (Yamaguchi et al, 2003). Alcoholgeïnduceerde milde oxidatieve stress kan dus beschermend werken, dit wordt alcoholpreconditioning genoemd. De beschermende effecten zijn vermindering van postischemische gedragsdeficiënties, neurodegeneratie, oxidatieve DNA-schade en gliacelactivatie in de hippocampus. Behandeling met een inhibitor van NADPH-oxidase verlaagt de hoeveelheid ROS en de beschermende effecten van alcoholpreconditioning treden dan niet meer op. Dit bewijst dat de beschermende respons na alcoholconsumptie werkt via een ROS-afhankelijk mechanisme. Oxidatieve stress, zoals de ROS-productie door NADPH-oxidase, heeft naast pathologische effecten dus ook een functie in de normale fysiologie van het brein. ROS, geproduceerd door NADPH-oxidase, spelen een dubbele en tegenovergestelde rol bij ischemie, ze zorgen namelijk voor neuronale schade na ischemie, maar zijn ook de belangrijke initiators in de alcoholgeïnduceerde cascade die juist een neuronbeschermend fenotype geeft (Wang et al, 2007). Welke elementen beïnvloed worden door NADPH-oxidasegegenerateerde ROS is niet bekend. Suggesties zijn NO/superoxide-interacties, release van calcitoninegengerelateerd peptide en activatie van specifieke PKC-isoformen (Dayton et al, 2005, Kamada et al, 2006, Yamaguchi et al, 2003). Er is meer onderzoek nodig om de rol van downstream mediators van alcoholgeïnduceerde neuronbeschermende mechanismen te bepalen (Wang et al, 2007).

Naast de alcoholpreconditioning is er nog een ander positief effect van milde oxidatieve stress. ROS gaan namelijk invasies van micro-organismen tegen. Fagocyten scheiden verschillende stoffen uit om micro-organismen te schaden, waaronder H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ en HO^{\cdot} (Rosen et al, 1995). Tijdens de fagocytose wordt een membraangebonden oxidase geactiveerd, waardoor meer zuurstof opgenomen wordt in de cel waaruit $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 gevormd worden. Deze reageren onder andere via de Fentonreactie tot HO^{\cdot} (Yu, 1994). De ROS gaan bacteriën, virussen en tumoren tegen (Lander, 1997). De hoeveelheid ROS moet echter niet te hoog zijn, anders raakt de geïnfecteerde cel er extra door beschadigd (Fernandez-Checa et al, 1997).

Tot slot lijkt er een positieve rol voor ROS te zijn binnen de signaaltransductie. Extracellulaire liganden genereren en/of gebruiken vrije radicalen om hun signalen door te geven aan de celkern. Hoe deze processen precies plaatsvinden is nog niet bekend. ROS kunnen ook direct veel processen in de cel initiëren, zoals ionentransport en apoptose (Lander, 1997). De moleculen zijn niet schadelijk zolang er voldoende antioxidanten zijn om de hoeveelheid ROS beperkt te houden. Bij milde alcoholconsumptie treedt slechts milde oxidatieve stress op en dan kunnen de gevormde ROS fysiologische functies vervullen in de cel.

Discussie

Alcoholgeïnduceerde hersenschade wordt voor een groot deel door oxidatieve stress veroorzaakt (Chen et al, 2010, Crews et al, 2009). Dit komt door de alcoholgeïnduceerde verhoging van ROS en verlaging van antioxidantactiviteit (Fernandez-Checa et al, 1997, Skrzydlewska et al, 2005). Alcohol wordt in het brein gemetaboliseerd door drie enzymen, ADH, CYP 2E1 en katalase (Hipólito et al, 2007). ADH en CYP 2E1 bewerkstelligen beide een verhoging van de hoeveelheid ROS. Naast deze enzymen veroorzaakt vrij ijzer ook extra ROS (Wu et al, 2003). De relatief grote hoeveelheid ROS brengt neuronen in een staat van oxidatieve stress. De cel kan zich niet verweren tegen de oxidatieve stress, omdat de concentraties van antioxidanten lager worden door alcohol. De activiteit van SOD, katalase, GSH en vitamines is dan niet voldoende om de overmaat aan ROS te neutraliseren (Skrzydlewska et al, 2005). Dit resulteert in de peroxidatie van koolhydraten (DNA), aminozuren (eiwitten) en lipiden met ernstige gevolgen als chromosomale abnormaliteiten, niet-functionele enzymen en breuken in het celmembraan (Cohen-Kerem et al, 2003). Cellen in het brein en de BHB gaan zelfs dood, waardoor neuroinflammatoire ziekten verergeren en negatieve gedragseffecten optreden (Haorah et al, 2005, Crews et al, 2009, Sullivan et al, 2000). Ondanks de desastreuze effecten van alcoholgeïnduceerde oxidatieve stress zijn er ook positieve gevolgen gevonden. ROS vervullen fysiologische functies in de cel, weren micro-organismen en beschermen het brein tegen ischemische schade zolang de hoeveelheid niet te hoog is (Wang et al, 2007, Lander, 1997).

Geconcludeerd kan worden dat chronische alcoholconsumptie ernstige negatieve gevolgen heeft voor volwassenen, terwijl gematigd drinken positieve effecten heeft. Bij matige alcoholconsumptie komt het volwassen brein in een beschermde staat, daarom kan weinig alcohol nuttigen zelfs beter zijn dan geheelonthouding. Het foetale brein wordt echter zo zwaar beïnvloed door alcohol dat drinken tijdens de zwangerschap volledig wordt afgeraden. De ontwikkeling van het foetale brein kan niet goed plaatsvinden in de aanwezigheid van alcohol en Fetal Alcohol Spectrum Disorders kunnen het ernstige gevolg zijn (Caprara et al, 2007). In geval van alcoholverslaving is de hersenschade voor volwassenen en embryo's zeer ernstig. Uiteraard is het het beste om van de verslaving af te komen, maar vaak lukt dit niet. Er wordt gezocht naar een therapie om de alcoholgeïnduceerde hersenschade te beperken via het verlagen van de oxidatieve stress. Antioxidanten kunnen uitkomst bieden, maar voorzichtigheid is geboden bij het adviseren van deze therapie. Als er bijvoorbeeld te veel vitamines genuttigd worden voor een antioxidanteffect kan dit omslaan naar een pro-oxidatief effect en dan werkt de therapie dus averechts. Meer onderzoeken moeten uitwijzen of er een antioxidanttherapie mogelijk is. Misschien wordt er een antioxidant ontdekt die niet of niet te snel omslaat naar een pro-oxidant. Toediening daarvan zou de hersenschade kunnen beperken bij zwangere alcoholverslaafden en hun baby's in afkickklinieken. Dit is voorlopig nog toekomstmuziek, want eerst moet er een antioxidant gevonden worden met een geschikt mechanisme en dan moet getest worden op bijwerkingen voordat het verstandig is mensen hiermee te behandelen. Groene thee bevat antioxidanten en is een kandidaat voor verder onderzoek, omdat in ratten verminderde alcoholgeïnduceerde oxidatieve stress is gevonden bij het toedienen van groene thee (Skrzydlewska et al, 2005). Onderzocht moet worden welke stoffen in groene thee als antioxidant werken en welke concentraties daarvan het beste werken. Het is ook nog niet bekend of groene thee alcoholgeïnduceerde oxidatieve stress kan verminderen in het brein van de mens. Vooralsnog is niet of gematigd drinken de enige manier om alcoholgeïnduceerde oxidatieve stress in het brein te voorkomen.

Referenties

1. Arora A, Sairam R, Srivastave G (2002) *Oxidative stress and antioxidative system in plants*. Current Science 82(10):1227-1238
2. Aruoma OI, Halliwell B (1987) *Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radical from hydrogen peroxide in the presence of iron. Are lactoferrin and transferrin promoters of hydroxyl-radical generation?* Biochem. J. 241: 273-278
3. Aydin S, Ozaras R, Uzun H, Belce A, Uslu E, Tahan V, Altug T, Dumen E, Senturk H (2002) *N-acetylcysteine reduced the effect of ethanol on antioxidant system in rat plasma and brain tissue*. Tohoku J. Exp. Med. 198(2):71-7
4. Baydas G, Tuzcu M (2005) *Protective effects of melatonin against ethanol-induced reactive gliosis in hippocampus and cortex of young and aged rats*. Exp. Neurol. 194:175–181
5. Berghe TV, Vanlangenakker N, Parthoens E, Deckers W, Devos M, Festjens N, Guerin CJ, Brunk UT, Declercq W, Vandenabeele P. (2010) *Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features*. Cell Death Differ. 17(6):922-30
6. Burton GW, Ingold KU (1984) *β -Carotene is an unusual type of lipid antioxidant*. Science Wash. DC 224: 569-573
7. Calvin HT, Medvedovsky C, Worgul BV (1986) *Near-total glutathione depletion and age-specific cataracts induced by buthionine sulfoximine in mice*. Science 233:553–555
8. Caprara DL, Nash K, Greenbaum R, Rovet J, Koren G (2007) *Novel approaches to the diagnosis of fetal alcohol spectrum disorder*. Neurosci. Biobehav. Rev. 31:254–260
9. Chen G, Luo J (2010) *Anthocyanins: Are they beneficial in treating ethanol neurotoxicity?* Neurotox. Res. 17: 91-101
10. Cohen-Kerem R, Koren G (2003) *Antioxidants and fetal protection against ethanol teratogenicity*. Neurotoxicol. Teratol. 25:1–9
11. Crews FT, Nixon K (2009) *Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism*. Alcohol 44:115–127
12. Davis RL, Syapin PJ (2004) *Ethanol increases nuclear factor-kappa B activity in human astroglial cells*. Neurosci. Lett. 23;371(2-3):128-32
13. Dayton C, Yamaguchi T, Kamada K, Carter P, Korthuis RJ (2005) *Antecedent ethanol ingestion prevents postischemic leukocyte adhesion and P-selectin expression by a protein kinase C-dependent mechanism*. Dig. Dis. Sci. 50:684–690
14. Dizdaroglu M (1985) *Formation of an 8-hydroxyguanine moiety in deoxyribonucleic acid on gamma-irradiation in aqueous solution*. Biochemistry 24: 4476-4481
15. Dröge W, Schulze-Osthoff K, Mihm S, Galter D, Schenk H, Eck H-P, Roth S, Gmünder H (1994) *Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology*. FASEB J. 8:1131-1138
16. Edwards RB, Manzana EJ, Chen WJ (2002) *Melatonin (an antioxidant) does not ameliorate alcohol-induced Purkinje cell loss in the developing cerebellum*. Alcohol Clin. Exp. Res. 26:1003–1009
17. Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N, Colell A, Garcia-Ruiz C (1997) *Oxidative stress and alcoholic liver disease*. Alcohol Health & Research World 21:321-324

18. Fong KL, McCay PB, Poyer JL (1976) *Evidence for superoxide-dependent reduction of Fe³⁺ and its role in enzyme-generated hydroxyl radical formation.* Chem. Biol. Interact. 15(1):77-89
19. Gerlach M, Ben-Shachar D, Riederer P, Youdim MBH (1994) *Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases?* J. Neurochem. 63:793–807
20. Girotti AW (1985) *Mechanisms of lipid peroxidation.* Free Radical BioZ. Med. 1: 87-95
21. Goodlett CR, Horn KH (2001) *Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system.* Alcohol Res. Health 25:175–184
22. Halliwell B (1992) *Reactive oxygen species and the central nervous system.* J. Neurochem. 59:1609–1623
23. Halliwell B (1999) *Antioxidant defense mechanisms: From the beginning to the end.* Free Radical Research 31:261-272
24. Hampton MB, Orrenius S (1998) *Redox regulation of apoptotic cell death.* Biofactors 8:1–5
25. Haorah J, Knipe B, Leibhart J, Ghorpade A, Persidsky Y (2005) *Alcohol-induced oxidative stress in brain endothelial cells causes blood-brain barrier dysfunction.* J. Leukoc. Biol. 78(6):1223-32
26. Haorah J, Ramirez SH, Floreani N, Gorantla S, Morsey B, Persidsky Y (2008) *Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury.* Free Radic. Biol. Med. 45:1542–1550
27. Harper C (2009) *The neuropathology of alcohol-related brain damage.* Alcohol 44:136–140
28. Heaton MB, Madorsky I, Paiva M, Siler-Marsiglio KI (2004) *Vitamin E amelioration of ethanol neurotoxicity involves modulation of apoptotic-related protein levels in neonatal rat cerebellar granule cells.* Brain Res. Dev. Brain Res. 21;150(2):117-24
29. Heffner JE, Repine JE (1989) *Pulmonary strategies of antioxidant defense.* Am. Rev. Respir. Dis. 140: 531-554
30. Herrera DG, Yague AG, Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Collado-Morente L, Muriach M, Romero FJ, Garcia-Verdugo JM (2003) *Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: protective effects of an antioxidant.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:7919–7924
31. Hipólito L, Sánchez MJ, Polache A, Granero L (2007) *Brain Metabolism of Ethanol and Alcoholism: An Update.* Current Drug Metabolism 8:716-727
32. Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ, Wozniak DF, Koch C, Genz K, Price MT, Stefovská V, Horster F, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW (2000) *Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome.* Science 287:1056-1060
33. Ji LL, Stratman FW, Lardy HA (1988) *Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise.* Arch. Biochem. Biophys. 263: 150-160
34. Kamada K, Gaskin FS, Yamaguchi T, Carter P, Yoshikawa T, Yusof M, Korhuis RJ (2006) *Role of calcitonin gene-related peptide in the postischemic anti-inflammatory effects of antecedent ethanol ingestion.* Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 290:H531–537
35. Kane CJ, Chang JY, Roberson PK, Garg TK, Han L (2008) *Ethanol exposure of neonatal rats does not increase biomarkers of oxidative stress in isolated cerebellar granule neurons.* Alcohol 42:29–36

36. Kato S, Kawase T, Alderman J, Inatori N, Lieber CS (1990) *Role of xanthine oxidase in ethanol-induced lipid peroxidation*. Gastroenterology 98:203–210
37. Krinsky NI, Deneke SM (1982) *Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoid*. J. NatZ. Cancer Inst. 69: 205-209
38. Lander HM (1997) *An essential role for free radicals and derived species in signal transduction*. FASEB J. 11:118-124
39. Ledig M, M'Paria JR, Louis JC, Freid R, Mandel P (1980) *Effect of ethanol on superoxide dismutase activity in cultured neural cells*. Neurochem. Res. 5:1155–1162
40. Lonze BE, Ginty DD (2002) *Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system*. Neuron 15;35(4):605-23
41. Marx G, Chevion M (1986) *Site-specific modification of albumin by free radicals. Reaction with copper (II) and ascorbate*. Biochem. J. 236:397-400
42. Mattson MP, Camandola S (2001) *NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders*. J. Clin. Invest. 107(3):247-54
43. Molina JA, Bermejo F, del Ser T, Jiménez-Jiménez FJ, Herranz A, Fernández-Calle P, Ortuño B, Villanueva C, Sainz MJ (1994) *Alcoholic cognitive deterioration and nutritional deficiencies*. Acta Neurol. Scand. 89(5):384-90
44. Nixon K, Crews FT (2002) *Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus*. J. Neurochem. 83(5):1087-93
45. Noël X, Bechara A, Dan B, Hanak C, Verbanck P (2007) *Response inhibition deficit is involved in poor decision making under risk in nonamnesic individuals with alcoholism*. Neuropsychology 21(6):778-86
46. Olney JW, Ishimaru MJ, Bittigau P, Ikonomidou C (2000) *Ethanolinduced apoptotic neurodegeneration in the developing brain*. Apoptosis 5:515–521
47. O'Neill LA, Kaltschmidt C (1997) *NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function*. Trends Neurosci. 20(6):252-8
48. Puntarulo LA, Cederbaum AI (1989) *Chemiluminescence from acetaldehyde oxidation by xanthine oxidase involves generation of and interactions with hydroxyl radicals*. Alcohol Clin. Exp. Res. 13:84–90
49. Qin L, He J, Hanes RN, Pluzarev O, Hong JS, Crews FT (2008) *Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment*. J. Neuroinflammation 18;5:10
50. Reynolds K, Lewis B, Nolen JD, Kinney GL, Sathya B, He J (2003) *Alcohol consumption and risk of stroke: a meta-analysis*. JAMA. 5;289(5):579-88
51. Rosen GM, Pou S, Ramos CL, Cohen MS, Britigan BE (1995) *Free radicals and phagocytic cells*. FASEB J. 9:200-209
52. Ross D, Moldeus P (1991) *Antioxidant defense systems and oxidative stress*. Membrane Lipid Oxidation, 2:151-170
53. Rottkamp CA, Nunomura A, Raina AK, Sayre LM, Perry G, Smith MA (2000) *Oxidative stress, antioxidant, and Alzheimer disease*. Alzheimer Dis. Assoc. Disord. 14:62–66
54. Sharifi AM, Hoda FE, Noor AM (2010) *Studying the effect of LPS on cytotoxicity and apoptosis in PC12 neuronal cells: Role of Bax, Bcl-2, and Caspase-3 protein expression*. Toxicol Mech Methods. 2010 Jun 3. [Epub ahead of print]
55. Skrzydlewska E, Augustyniak A, Michalak K, Farbiszewski R (2005) *Green tea supplementation in rats of different ages mitigates ethanol-induced changes in brain antioxidant abilities*. Alcohol 37(2):89-98
56. Smith LL, Johnson BH (1989) *Biological activities of oxysterols*. Free Radic. Biol. Med. 7:285–332

57. Sullivan EV, Rosenbloom MJ, Lim KO, Pfefferbaum A (2000) *Longitudinal changes in cognition, gait, and balance in abstinent and relapsed alcoholic men: relationships to changes in brain structure*. *Neuropsychology* 14:178–88
58. Sun AY, Sun GY (2001) *Ethanol and oxidative mechanisms in the brain*. *J. Biomed. Sci.* 8:37–43
59. Terai K, Matsuo A, McGeer EG, McGeer PL (1996) *Enhancement of immunoreactivity for NF-kappa B in human cerebral infarctions*. *Brain Res.* 11;739(1-2):343-9
60. Toso L, Roberson R, Abebe D, Spong CY (2007) *Neuroprotective peptides prevent some alcohol-induced alteration in gammaaminobutyric acid A-beta3, which plays a role in cleft lip and palate and learning in fetal alcohol syndrome*. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 196:259
61. Tran TD, Jackson HD, Horn KH, Goodlett CR (2005) *Vitamin E does not protect against neonatal ethanol-induced cerebellar damage or deficits in eyeblink classical conditioning in rats*. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 29:117–129
62. Wang Q, Sun AY, Simonyi A, Kalogeris TJ, Miller DK, Sun GY, Korthuis RJ (2007) *Ethanol preconditioning protects against ischemia/reperfusion-induced brain damage: role of NADPH oxidase-derived ROS*. *Free Radic. Biol. Med.* 1;43(7):1048-60
63. Wu D, Cederbaum AI (2003) *Alcohol, oxidative stress, and free radical damage*. *Alcohol Res. Health.* 27(4):277-84
64. Yamaguchi T, Dayton CB, Ross CR, Yoshikawa T, Gute DC, Korthuis RJ (2003) *Late preconditioning by ethanol is initiated via an oxidant-dependent signaling pathway*. *Free Radic. Biol. Med.* 1;34(3):365-76
65. Yu BP (1994) *Cellular defenses against damage from reactive oxygen species*. *Physiological Reviews* 74:139-162
66. Zimatkin SM, Pronko SP, Vasiliou V, Gonzalez FJ, Deitrich RA (2006) *Enzymatic mechanisms of ethanol oxidation in the brain*. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 30(9):1500-5
67. Zou J, Crews F (2004) *Binge ethanol induced changes in transcription factors in rat brains identified by transgene protein/DNA array analysis*. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 28:9A
68. Zou J, Crews F (2006) *CREB and NF-kappaB transcription factors regulate sensitivity to excitotoxic and oxidative stress induced neuronal cell death*. *Cell. Mol. Neurobiol.* 26:385–405