

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ZORAN BAČIĆ

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ZORAN BAČIĆ

**TRANSFERIN Z ZMANJŠANO VSEBNOSTJO OGLJIKOHIDRATOV
IN GAMA-GLUTAMIL TRANSFERAZA KOT BIOKEMIČNA
OZNAČEVALCA KRONIČNE ZLORABE ALKOHOLA**

**CARBOHYDRATE DEFICIENT TRANSFERRIN AND GAMMA-
GLUTAMYL TRANSFERASE AS A BIOCHEMICAL MARKERS OF
CHRONIC ALCOHOL ABUSE**

MASTER'S DEGREE IN LABORATORY BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljal na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo, Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, pod mentorstvom prof.dr. Darko Černe, mag farm., spec. med. biokem. in somentorstvom prof. dr. Joško Osredkar, mag farm., spec. med. biokem.

Zahvala

Zahvaljujem se vsem, ki so pomagali k nastanku magistrske naloge.

Posebna zahvala mentorju prof. dr. Darko Černe, mag farm., spec. med. biokem. in somentorju prof. dr. Joško Osredkar, mag. farm., spec. med. biokem. za strokovno svetovanje, pomoč in sodelovanje pri nastajanju magistrske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof.dr. Darko Černe, mag farm., spec. med. biokem. in somentorstvom prof. dr. Joško Osredkar, mag farm., spec. med. biokem.

Zoran Bačić

Ljubljana, avgust 2016

Predsednik komisije : izr. prof. dr. Tomaž Vovk, mag. farm.

Član komisije : doc. dr. Žiga Jakopin, mag. farm.

VSEBINA

VSEBINA	I-II
KLJUČNE BESEDE	III
SEZNAM OKRAJŠAV	IV
SEZNAM GRAFOV	V
SEZNAM PREGLEDNIC	V
SEZNAM SLIK	VI
POVZETEK.....	VII
ABSTRACT	VIII

VSEBINA

1	Uvod.....	1
1.1	Definicija alkoholizama	1
1.2	Etanol	1
1.3	Presnova etanola.....	2
1.3.1	Oksidativna presnova etanola.....	2
1.3.2	Neoksidativna presnova etanola.....	4
1.4	Biokemični označevalci zlorabe alkohola.....	5
1.4.1	Etanol	5
1.4.2	Aminotransferaze	6
1.4.3	Gama-glutamil transferaza (GGT)	8
1.4.4	Povprečni korpuskularni volumen eritrocita (MCV)	9
1.4.5	Transferin z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov (CDT)	10
1.5	Škodljivi učinki etanola	12
1.5.1	Akutni alkoholizem	12
1.5.2	Kronični alkoholizem.....	13
2	Namen	16
3	Materiali in metode.....	17
3.1	Opis preiskovancev	17
3.2	Materiali in metode za določanje gama-glutamil transferaze	17
3.2.1	Oprema za določanje aktivnosti gama-glutamil transferaze	17
3.2.2	Reagenti za določanje aktivnosti gama-glutamil transferaze	18
3.2.3	Princip določanja gama-glutamil transferaze	18
3.2.4	Opis postopka določanja gama-glutamil transferaze.....	18
3.2.5	Priporočila in opozorila.....	19
3.3	Materiali in metode za določanje transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikovih hidratov	19
3.3.1	Oprema za določanje transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov	19
3.3.2	Reagenti za določanje transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov	19
3.3.3	Princip postopka določanja transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov	20

3.3.4	Opis postopka določanja transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov	20
3.3.5	Priporočila in opozorila.....	20
3.3.6	Priprava serumskih vzorcev z motečimi snovmi.....	21
3.4	Statistična analiza.....	21
4	Rezultati	22
4.1	Skupni rezultati deleža transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov in aktivnosti gama-glutamil transferaze.....	22
4.2	Rezultati deleža transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov in aktivnosti gama-glutamil transferaze pri moških in ženskah	22
4.3	ROC krivulje za delež transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov in aktivnost gama-glutamil transferaze pri moških in ženskah	23
4.4	Korelacijski diagrami za delež transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov in aktivnost gama-glutamil transferaze pri moških in ženskah	26
5	Razprava.....	30
6	Sklep	34
7	Reference.....	35
8	Priloge	37

KLJUČNE BESEDE

Zloraba alkohola, transferin z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov (CDT), gama-glutamil transferaza (GGT)

SEZNAM OKRAJŠAV

ADH	alkoholna dehidrogenaza
ALDH	aldehidna dehidrogenaza
ALT	alanin-aminotransferaza
AP	alkalna fosfataza
AST	aspartat-aminotransferaza
BAC	koncentracija etanola v krvi
CAT	katalaza
CEF	kapilarna elektroforeza
CDT	transferin z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov
CYP2E1	izoencim citokroma P450
EtG	etil glukuronid
FAEE	etilni estri maščobnih kislin
GGT	gama-glutamil transferaza
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
MCV	povprečni volumen eritrocitov
MEOS	mikrosomski etanol oksidirajoči sistem
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid, reducirana oblika
PA	fosfatidna kislina
Peth	fosfatidil etanol
pI	izoelektrična točka
PLD	fosfolipaza D
PLP	piridoksal fosfat
WHO	svetovna zdravstvena organizacija

SEZNAM GRAFOV

Graf 1: Histogram in kvantilni diagram za CDT (%)

Graf 2: Histogram in kvantilni diagram za GGT ($\mu\text{kat/L}$)

Graf 3: ROC krivulja za CDT (%)

Graf 4: ROC krivulja za GGT pri moških ($\mu\text{kat/L}$)

Graf 5: ROC krivulja za GGT pri ženskah ($\mu\text{kat/L}$)

Graf 6: Korelacijski diagram primerjave deleža CDT proti aktivnosti GGT pri moških

Graf 7: Korelacijski diagram primerjave deleža CDT proti aktivnosti GGT pri ženskah

Graf 8: Korelacijski diagram primerjave deleža CDT proti aktivnosti GGT pri moških s potrjeno diagnozo kroničnega alkoholizma

Graf 9: Korelacijski diagram primerjave deleža CDT proti aktivnosti GGT pri ženskih s potrjeno diagnozo kroničnega alkoholizma

Graf 10: Korelacijski diagram primerjave deleža CDT proti aktivnosti GGT pri alkoholikih ne glede na spol

Graf 11: Korelacijski diagram primerjave deleža CDT proti aktivnosti GGT pri nealkoholikih, ne glede na spol

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica I: Skupni rezultati meritev CDT% in aktivnosti GGT v serumu

Preglednica II: Rezultati CDT% ter aktivnosti GGT pri moških in ženskah

SEZNAM SLIK

Slika 1: Analitski analizator Advia 1800 (Siemens)

Slika 2: Analitski analizator Capillarys 2 (Sebia)

POVZETEK

Kljub temu, da je alkoholizem ena izmed najpogostejših bolezni, številni alkoholiki ostanejo neodkriti. Klinični laboratoriji imajo pomembno vlogo v diagnostiki bolezni, predvsem v presejanju ter spremljanju abstinence.

Med različnimi biokemičnimi označevalci kronične zlorabe alkohola je trenutno najbolj specifičen transferin z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov (CDT). CDT predstavlja skupino transferinskih izooblik z nižjo vsebnostjo sialične kisline v ogljikohidratni verigi v primerjavi s prevladujočo transferinsko izoobliko. CDT v kombinaciji z gama-glutamil transferazo (GGT) zagotavlja visoko občutljivost brez nižanja specifičnosti testa.

Namen naloge je vrednotenje medsebojne povezave CDT% in aktivnosti GGT pri moških in ženskah. V nalogi bomo poskusili ugotoviti ali obstaja razlika v zanesljivosti rezultatov CDT% v serumu in serumske aktivnosti GGT med spoloma.

Raziskavo smo izvedli na 93 naključno izbranih pacientih, od tega 62 moških in 31 žensk. Izmed 93 preiskovancev jih je 18 imelo dalj časa trajajoče probleme z zlorabo alkohola, od tega 13 moških in 5 žensk ter so bili zdravljeni zaradi alkoholizma.

Za določanje deleža CDT v serumu smo uporabljali standardizirano metodo kapilarne elektroforeze na analizatorju Capillarys 2 proizvajalca Sebia (Lisses, Francija) CDT% se je v serumu testirancev gibal v razponu od 0,1 do 4,2 %.

Aktivnosti GGT v serumu, določene s standardizirano barvno-encimsko metodo na analizatorju Advia 1800 proizvajalca Siemens (Camberley, Velika Britanija), so se pri moških gibale v razponu od 0,16 do 24,34 μ kat/L, pri ženskah pa od 0,19 do 28,96 μ kat/L.

Rezultati so potrdili da CDT% predstavlja odličen test za določanje zlorabe alkohola, z določeno občutljivostjo 94,4 % in specifičnostjo 97,3 %. Meritve aktivnosti GGT so se pokazale kot bolj zanesljive pri ženskah z občutljivostjo 100 % in specifičnostjo 50 % kot pri moških, pri katerih smo določili občutljivost 46,2 % in specifičnost 61,2 %.

Vrednotenje CDT % in GGT v kombinaciji in njihova bolj sistematična uporaba bi lahko bistveno izboljšali diagnostiko škodljive rabe alkohola. To bi lahko pripomoglo k racionalizaciji stroškov ter poenostavitvi organizacije dela v medicinskem laboratoriju.

ABSTRACT

Despite the fact that alcoholism is one of the most common diseases, many alcoholics may go undetected. Clinical laboratories play an important role in the diagnosis of alcoholism, particularly in screening and monitoring of abstinence.

Among various biochemical markers of chronic alcohol abuse, carbohydrate deficient transferrin (CDT) is currently the most specific. CDT represents the group of transferrin isoforms with lower content of sialic acid at carbohydrate chain, compared with the most common isoform of transferrin. When CDT is combined with the gamma-glutamyl transferase (GGT), it provides high sensitivity without decreasing the specificity of the test.

The purpose of the project is the evaluation of correlation between CDT% and GGT activity in men and women. In the scope of this project we will try to determine if there is a difference in the reliability of the results of CDT% in serum and serum GGT activity between the sexes.

A survey was carried out at 93 randomly selected patients, including 62 men and 31 women. Of the 93 subjects, 18 of them had longer-lasting problems with alcohol abuse, 13 men and 5 women were treated. To determine the CDT% in serum we used a standardized method of capillary electrophoresis on analyzer Capillarys 2, Sebia (Lisses, France). The proportions of CDT% in the serum ranged from 0.1 to 4.2 %.

The activities of GGT in serum were determined by a standardized color-enzymatic method on analyzer Advia 1800, Siemens (Camberley, UK). The values ranged from 0.16 to 24.34 $\mu\text{kat/L}$ in males and from 0.19 to 28.96 $\mu\text{kat/L}$ in females.

The monitoring confirmed that CDT is an excellent test for the detection of alcohol abuse, with a sensitivity 94,4 % and specificity 97,3 %. Measurements of GGT have proved to be more reliable for women with a sensitivity of 100 % and specificity of 50 % than for men in which the sensitivity was 46.2 % and specificity of 61.2 %.

Evaluation of combination of CDT% and GGT as well as a more systematic use could significantly improve the diagnosis of harmful use of alcohol. That can contribute to the rationalization of costs and simplify the organization of work in a medical laboratory.

1 Uvod

1.1 Definicija alkoholizma

Skozi čas so bile predlagane številne definicije alkoholizma. Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) je predložila definicijo kroničnega alkoholizma. Kronični alkoholik je oseba, ki prekomerno uživa alkoholne pijače in pri kateri se je razvila psihična ali fizična zasvojenost z alkoholom. Oseba, ki kaže duševne motnje ali motnje vedenja ter pri kateri je prišlo do poškodbe fizičnega ali psihičnega zdravlja, motenega odnosa do drugih, socialnega ali gospodarskega razmerja. V vsakdanji praktični uporabi definicija ponavadi kaže veliko pomanjkljivosti.

Poznamo dva tipa odvisnosti od alkohola. Prvi tip karakterizira izguba možnosti kontrole, saj alkoholik lahko abstiniira, dokler ne zaužije prve alkoholne pijače. Za drugo skupino je značilna izguba možnosti abstinence, tako da alkoholik ne zdrži niti enega dne brez alkohola. Pri izgubi možnosti kontrole gre za psihično odvisnost, medtem ko gre pri izgubi možnosti abstinence za kombinirano, fizično-psihično obliko odvisnosti. Alkoholik, psihično odvisen od alkohola, pije, da lahko eliminira težave iz realnega okolja. Fizični odvisnik od alkohola čuti takoimenovano metabolično lakoto in brez alkohola ni zmožen opravljati primarnih funkcij.¹

1.2 Etanol

Alkohol v alkoholnih pijačah je po kemijski zgradbi etanol.³ Etanol, imenovan tudi etilni alkohol (EtOH), je alkohol s kemijsko formulo C_2H_5OH . Pri sobni temperaturi je brezbarvna tekočina specifičnega vonja. V večjih količinah je toksičen. Uživanje etanola povzroča kratkotrajne psihofizične odzive in zasvojenost. Etanol v naravi nastaja iz sladkorja v procesu alkoholnega vrenja in iz naftnih derivatov pri oksidaciji etilena. Z vrenjem je možno doseči maksimalni delež 25 % etanola, večja koncentracija pa se lahko doseže z destilacijo.²

1.3 Presnova etanola

Po zaužitju se etanol absorbira primarno v tankem črevesju, nato pa se skozi portalno veno transportira do jeter. V jetrih je etanol izpostavljen encimski aktivnosti in začne se njegova presnova.⁴ Celični mehanizmi pretvorijo etanol v očetno kislino, ogljikov dioksid in vodo.³

Učinek etanola na različna tkiva je odvisen predvsem od njegove koncentracije v krvi (BAC). Na BAC vpliva stopnja metabolizma, hitrost absorpcije, porazdelitve, presnove ter hitrost izločanja iz organizma. BAC je odvisna tudi od hitrosti prehoda alkohola iz želodca v tanko črevo in obsega presnove prvega prehoda. BAC je tudi pod vplivom okoljskih dejavnikov, kot so stopnja pitja alkohola, prisotnost alkohola v želodcu in vrsta alkoholne pijače ter genetskih dejavnikov, kot je sprememba v encimih za presnovo alkohola.^{4,5} Učinkovitost presnove alkohola se razlikuje med populacijami in je odvisna od stopnje ekspresije izooblik aldehyd dehidrogenaze (ADH) in acetaldehyd dehidrogenaze (ALDH) ter genetske variabilnosti, ki vpliva na encimsko aktivnost.⁵ Na hitrost izločanja vpliva način prehranjevanja, kronično uživanje alkohola, starost, kajenje in del dneva. Alkohol enostavno prehaja celično membrano in se razporeja v vse celice in tkiva ter lahko stopa v interakcije z beljakovinami in sestavinami celične membrane ter tako vpliva na celično funkcijo. Med presnovo alkohola se ustvarja acetaldehyd, visoko reaktiven in toksičen produkt, ki prispeva k nastanku reaktivnih kisikovih zvrsti in spremeni redoks potencial jetrnih celic. Kronično uživanje alkohola in njegova presnova sta povezana s številnimi patološkimi posledicami in tkivno poškodbo.⁴

1.3.1 Oksidativna presnova etanola

Večina etanola v krvi se biološko transformira v acetaldehyd s pomočjo treh encimskih sistemov.⁵ V oksidacijski presnovi etanola sodelujejo ADH, citokrom P4502E1 (CYP2E1) in katalaza.^{4,5} Alkohol se v jetrih in tkivih, ki ne vsebujejo ADH, kot so možgani, presnavlja s pomočjo encimov P450 in katalaze. Na splošno presnova alkohola poteka po oksidacijskih in neoksidacijskih poteh.⁴

Aldehyd dehidrogenaza (ADH) predstavlja družino petih razredov encimov, kategoriziranih glede na kinetične in strukturne lastnosti.⁴ 90 do 98 % etanola v organizmu se metabolizira

z alkoholnimi dehidrogenazami do acetaldehida.⁶ ADH prisoten v jetrih in želodcu slabo metabolizira alkohol pri fizioloških koncentracijah ($< 0,50 \text{ mM}$), medtem ko ima pomembno vlogo pri presnovi prvega prehoda v želodcu. Koncentracija alkohola v želodcu lahko med vnosom alkohola doseže molarne vrednosti. Pri visokih koncentracijah se etanol presnavlja z encimskimi izooblikami z visoko Michaelisovo konstanto (K_m), kot je ADH razreda II. Proces oksidacije vključuje vmesne nosilce elektronov, nikotinamid dinukleotid (NAD^+), ki je reducirana oblika NADH. Kot rezultat oksidacije alkohola se v jetrnih celicah ustvarja reducirano okolje, kar omogoči, da postanejo še posebej dovzetne za poškodbe s stranskimi produkti etanola.⁴ Oksidacija alkohola z ADH povzroči redukcijo NAD^+ do NADH, kar posledično zniža količino NAD^+ . NAD^+ je neobhoden v procesu oksidacije maščobnih kislin v jetrih, ter za pretvorbo laktata v piruvat. Pomanjkanje NAD^+ je glavni vzrok kopičenja maščob v jetrnem parenhimu alkoholikov in alkoholne degeneracije. Zvišano razmerje NADH/NAD^+ pri alkoholikih lahko povzroči laktatno acidozo.⁵

Citokrom P450 vključuje CYP2E1, CYP1A2 in CYP3A4, ki so prisotni v mikrosomih in endoplazmatskem retikulumu in sodelujejo pri alkoholni oksidaciji v jetrih.⁴ CYP2E1 je induciran s kroničnim uživanjem alkohola in ima pomembno vlogo pri visokih koncentracijah etanola (K_m med 8 in 10).^{4,5} Indukcija CYP2E1 z alkoholom poveča dovzetnost alkoholikov za druge spojine, ki jih presnavlja taisti encimski sistem, kot so psihoaktivne substance, zdravila, kancerogene snovi in industrijska topila. Alkohol, posebej pri visokih koncentracijah v krvi, tekmuje z drugimi substrati encimskega sistema CYP2E1 ter moti njihovo presnovo.⁵ CYP2E1 prav tako ustvarja reaktivne kisikove zvrsti, vključno s superoksidnim in hidroksilnim radikalom, ki zvišajo tveganje za nastanek poškodb tkiv.^{4,5} S CYP2E1 povzročena oksidacija etanola poteka tudi v drugih tkivih, kot so možgani, kjer je aktivnost ADH nizka.⁴

Katalaza je encim molekulske mase 60 kDa, zgrajen iz štirih podenot, ki vsebujejo atom železa. Lokaliziran je primarno v peroksisomih, manj v citoplazmi in mikrosomih.⁷ V peroksisomih se etanol oksidira v prisotnosti vodikovega peroksida (H_2O_2),⁴ ki nastaja pod vplivom encima glikolat oksidaze.⁷ Katalaza kvantitativno ne presnovi več kot 5 % etanola.⁵ Kronično uživanje alkohola poveča proizvodnjo vodikovega peroksida v pericentralnih regijah jeter in poveča aktivnost katalaze.⁴

Med oksidacijo etanola nastajajo toksične snovi, ki motijo metabolne poti, kot so acetaldehid in acetat.⁵

Acetaldehid nastaja med oksidacijo alkohola s katerikoli od naštetih mehanizmov.^{4,5} Acetaldehid je visoko reaktiven in toksičen stranski produkt, ki lahko prispeva k poškodbi tkiv.⁴ Prispeva k poškodbi celic in tkiv na različne načine, ter je odgovoren za nekatere od akutnih in kroničnih učinkov alkohola.^{4,5} Odgovoren je tudi za razvoj raka ustne votline.⁵ Acetaldehid se veže na encime, mikrosomalne in mikrotubularne proteine. Prav tako tvori adukt salsolinol z nevrottransmitterjem dopaminom, ki lahko prispeva k odvisnosti od alkohola in z DNK tvori kancerogene adukte (1, N2 propanodeoksigvanozin). Nastajanje proteinskih aduktov v hepatocitih zmanjša izločanje proteinov, kar posledično vodi v hepatomegalijo.⁴ Celični mehanizmi acetaldehid pretvorijo naprej v očetno kislino (acetat)³ in NADH.⁴ Presnovo opravljata dva encima, acetaldehid dehidrogenaza 1 (ALDH1) in acetaldehid dehidrogenaza 2 (ALDH2).³ NADH se oksidira v nizu kemičnih reakcij v dihalni verigi v mitohondrijih.⁴ Približno 50 % Aziatov ima zelo nizko aktivnost ALDH zaradi zamenjave lizina z glutaminom v ostanku 487. Alel za normalno delujoč encim je imenovan ALDH2*1, neaktivno varianto označujemo kot ALDH2*2. Slednja je dominantna, tako da ena sama kopija bistveno zmanjša aktivnost encima. Homozigoti za ALDH2*2 niso sposobni oksidirati acetaldehida, ter se že v primeru zaužitja majhnih količin alkohola, lahko pojavljajo slabost, driska, tahikardija in hiperventilacija.

Acetat se tvori z oksidacijo acetaldehida. Večina acetata iz jeter preide v kri, kjer se na koncu v srcu, skeletnih mišicah in možganih presnovi do ogljikovega dioksida. Acetat poveča pretok krvi v jetrih, vpliva na centralni živčni sistem in različne presnovne procese.⁴

Acetat se pretvori tudi v acetil-CoA, ki se vključi v nadaljnje presnovne procese v celicah.³ Acetil-CoA je vpleten v biosintezo lipidov in holesterola v mitohondrijih perifernih in možganskega tkiva.⁴

1.3.2 Neoksidativna presnova etanola

Neoksidativna presnova alkohola je minimalna, vendar pa imajo njeni produkti patološki in diagnostični pomen. Etanol se neoksidativno presnavlja po dveh poteh. Ena

pot vodi do ustvarjanja maščobnih kislin etilnih estrov (FAEE) iz alkohola in maščobnih kislin.

Drugi produkt neoksidativne presnove so maščobne molekule, ki vsebujejo fosfatidiletanol (PEth). Maščobne kisline etilnih estrov so zaznavne v serumu in drugih tkivih po zaužitju alkohola in so obstojne še dolgo časa po prenehanju vnosa alkohola. Druga neoksidativna pot vključuje fosfolipazo D (PLD), ki razgrajuje fosfolipide ter generira fosfatidne kisline (PA). PLD ima visoko K_m za etanol. Do encimske reakcije pride pri višjih koncentracijah alkohola v krvi. Produkt reakcije, PEth se slabo presnavlja in se lahko kopiči med kroničnim uživanjem velikih količin alkohola. Tvorba PEth poteka na račun normalnega delovanja PLD in pridelave PA. Zaradi tega je inhibirana tvorba PA in motena celična signalizacija.

Oksidativna in neoksidativna presnova alkohola sta medsebojno povezani. Zaviranje oksidacije etanola s spojinami, ki inhibirajo ADH, CYP2E1 in katalazo, rezultira s povečanjem neoksidativnega metabolizma alkohola in povečanjem izločanja FAEE v jetrih in trebušni slinavki.⁴

1.4 Biokemični označevalci zlorabe alkohola

1.4.1 Etanol

Koncentracijo etanola lahko določamo v krvi, izdihanemu zraku ali v urinu. Etanol se v bioloških vzorcih določa pri sumu na zastrupitev z etanolom in lahko pripomore k ugotovitvi zlorabe alkohola. Koncentracija etanola, ki presega 33 mmol/l (1,5 ‰) brez očitnih dokazov zastrupitve oziroma 65 mmol/l (3 ‰) kadarkoli, kaže na povečano toleranco za etanol. Povečana toleranca za etanol je karakteristična za zlorabo alkohola pri osebah, odvisnih od alkohola. Ta merila nam pripomorejo razlikovati akutno zastrupitev z etanolom od kroničnega uživanja alkohola. Na hitrost izločanja etanola iz krvi vpliva pogostost konzumacije alkohola. V primeru oseb, ki zlorabljajo alkohol daljše časovno obdobje, je izločanje 1,5-krat hitrejše kot pri osebah, ki alkohola ne pijejo. Meritve koncentracije etanola so specifične, preproste za izvedbo ter so zaradi tega primerne za presejanje. Žal je širša uporaba etanola kot biokemična označevalca omejena s kratko razpolovno dobo.⁸

1.4.2 Aminotransferaze

Aminotransferaze so encimi, ki katalizirajo prenos aminske skupine iz aminokislin na ketokislino. Za delovanje aminotransferaz je nujen koencim piridoksal fosfat (PLP). Iz aminokisline in PLP nastane Schiffova baza, ki disocira proton alfa ogljikovega atoma. Nastali intermediat razpade na ketokislino in piridoksamin fosfat v prisotnosti vode. AST in ALT sta edini široko zastopani aminotransferazi v organizmu.

Aspartat aminotransferaza (AST) katalizira reverzibilno transaminacijo med L-asparaginsko kislino in α -ketoglutarano kislino. AST ima pomembno vlogo v intermediarni presnovi ogljikovih hidratov in presnovi dušikovih snovi. V največji meri je prisotna v jetrih, srcu in skeletnih mišicah, v manjši meri pa v možganih, ledvicah, trebušni slinavki, pljučih ter v telesnih tekočinah. Razlikujemo citoplazemsko in mitohondrijsko izoobliko. Izoobliki se medsebojno razlikujeta po termostabilnosti, občutljivosti na spremembo pH in hitrosti potovanja v elektroforetskem nosilcu, afiniteti za substrat, kromatografskih in imunokemijskih lastnostih. Hitrejšo citoplazemsko izoobliko označujemo kot AST-1, počasnejšo, oziroma mitohondrijsko pa kot AST-2. AST-1 kaže večjo občutljivost na spremembo pH, medtem ko je AST-2 termično stabilnejša. V serumu zdravih oseb in bolnikov z aktivnim hepatitisom je prisotna predvsem citoplazemska izooblika AST-1.

V serumu bolnikov z miokardnim infarktom in jetrno cirozo je zaradi aktivnosti nekrotičnega procesa bolj zastopana mitohondrijska izooblika, AST-2. V procesih, ki prizadanejo tkiva bogata z AST, prehaja encim v krvni obtok, kar se kaže s povečano aktivnostjo v serumu.⁷ Povišane vrednosti AST običajno vztrajajo 1 do 2 meseca, normalizirajo pa se šele čez 3 do 6 mesecev, odvisno od stopnje povišanja.⁹ Povišane vrednosti AST so prisotne pri 39 do 47 % oseb odvisnih od alkohola.⁸

Alanin aminotransferaza (ALT) katalizira reakcijo transaminacije med L-alaninom in 2-oksoglutarano kislino. ALT ima prav tako pomembno vlogo v presnovi aminokislin in proteinov ter ogljikohidratov. Encim je prisoten v citoplazmi celic skoraj vseh organov, razen v kosteh in zobeh. Najvišjo aktivnost doseže v jetrih, skeletnih mišicah, srcu, ledvicah, trebušni slinavki ter v eritrocitih. Kljub temu, da je v jetrih več AST kot ALT, je za jetra bolj specifičen ALT. Aktivnost ALT v serumu se zaradi lokalizacije v celici poveča tudi pri manjši poškodbi tkiva.⁷ ALT ima daljšo razpolovno dobo v primerjavi z AST.¹⁰

Klinični pomen aminotransferaz:

Aktivnost AST v serumu se pri infarktu miokarda poveča maksimalno 10-krat nad zgornjo referenčno mejo. Miokardni infarkt ne zviša ALT nad zgornjo referenčno mejo.⁷

Aktivnost aminotransferaz je še posebej pomembna v diagnostiki, spremljanju in prognozi jetrnih bolezni.⁷ AST in ALT podajata koristne informacije o etiologiji jetrnih bolezni.⁸ Posebej pomemben dejavnik v tem primeru predstavlja razmerje aktivnosti AST in ALT v serumu, tako imenovano De Rittisovo razmerje. Razmerje AST/ALT je pri zdravih osebah ter pri večini bolezni enako ali večje od 1.⁷

Pri akutnem virusnem hepatitisu pride do povečane aktivnosti obeh aminotransferaz. Vrednost AST v virusnem hepatitisu se poviša 50- do 70-, ALT pa 70- do 100-krat nad zgornjo referenčno mejo. V tem primeru je De Rittisov koeficient manjši od 1.⁷

Med kroničnim hepatitisom so aktivnosti aminotransferaz rahlo povišane, in sicer maksimalno 2- do 5-krat. Višja aktivnost ALT kot AST vendar brez povišanja nad zgornjo referenčno mejo, lahko kaže na kronični virusni hepatitis ali nealkoholno steatozo.

V akutnem alkoholnem hepatitisu je vrednost AST redko povišana več kot 8-krat, aktivnost AST je vsaj 2-krat večja od vrednosti ALT.

V kroničnem alkoholnem hepatitisu so aminotransferaze znotraj referenčnih mej. Aktivnost AST je vsaj 2 krat višja od ALT, razmerje AST/ALT je večje kot 2. Povišana je tudi vrednost ALP in GGT.⁷

Pri jetrni cirozi je aktivnost AST povišana za 10- do 20-krat, ALT pa 5- do 6-krat nad zgornjo referenčno mejo. Razmerje AST/ALT je v tem primeru med 1⁷ in 2.¹¹ Med cirozo je tudi aktivnost GGT izredno visoka, nad 1000 U/L.⁷

Holestazno zlatenico spremlja zmerno povečana aktivnost ALT, toda manj kot AST.⁹ Povišana aktivnost AST in normalna vrednost ALT kaže na normalno funkcijo jeter, vendar gre lahko za poškodbo drugih organov ali hemolizo.¹⁰

Vrednost AST se lahko poviša tudi med nosečnostjo.⁹

Oba encima sta odvisna od vitamina B6, v primeru hipovitaminoze tako lahko dobimo lažno zvišane aktivnosti AST in ALT.¹⁰

1.4.3 Gama-glutamil transferaza (GGT)

GGT je na membrano vezan glikoproteinski encim,⁸ v manjši meri se nahaja tudi v prosti topni obliki v jetrih. V različnih organih kaže različno aktivnost. Po kemijski sestavi je glikoprotein, ki vsebuje aminosladkorje in sialično kislino.⁷ Encim katalizira prenos γ -glutamilnega fragmenta, dela glutationa, na različne peptide.⁸ Iz nastalega γ -glutamil dipeptida se s pomočjo encima γ -glutamil ciklotransferaze odcepi aminokislina. Aminokislina s porabo ATP prehaja celično membrano, iz glutaminske kisline pa nastane 5-oksiprolin.⁷

Kronično uživanje alkohola povzroči povečanje serumskega GGT in trenutno predstavlja najpogostejše uporabljan označevalec čezmernega uživanja etanola. Številne študije poročajo o pozitivni korelaciji med vnosom etanola in aktivnostjo GGT v serumu. Občutljivost GGT je večja v primerjavi z občutljivostjo večine označevalcev zlorabe alkohola.

Debelost je prav tako pomemben dejavnik, ki lahko zviša koncentracijo serumskega GGT. Debelost v povezavi z zmerno konzumacijo alkohola delujeta sinergistično, ter povečata metabolično obremenitev in tveganje za jetrno poškodbo. GGT je povezan s tvorbo reaktivnih kisikovih zvrsti, tako da ga štejemo kot označevalca oksidativnega stresa.

Po drugi strani ima GGT lahko tudi hepatoprotektivno vlogo v zgodnji fazi jetrne indukcije z etanolom. GGT na sinusoidalni strani hepatocita pretvori glutation v cistein, ki je ključni regulator celičnega redoks sistema. Aktivnost GGT je v povezavi z življenjsko dobo, aktivnost se viša s starostjo. Medtem ko se pri zmernih in težkih pivcih aktivnost GGT konstantno povečuje, se pri abstinentih aktivnost encima ponavadi niža po 70. letu. Občutljivost GGT kot označevalca zlorabe alkohola se je pokazala nizka pri osebah mlajših od 30 let, tudi v primeru odvisnosti od alkohola. Občutljivost se bistveno izboljša v primeru primerjanja rezultatov z referenčno vrednostjo skupine primerljive starosti. Obstajajo tudi rasne razlike v občutljivosti, predvsem v japonski populaciji, zaradi slabše aktivnosti acetaldehid dehidrogenaze in počasnejega metabolizma etanola. V državah z nenehnim naraščanjem porabe alkohola in prevalence debelosti obstaja tudi trend povečanja srednje vrednosti aktivnosti GGT na ravni prebivalstva. Referenčni interval bi moral temeljiti na populaciji, ki ne vnaša etanola in nima značilne prekomerne telesne teže. Občutljivost GGT je slaba v primeru presejanja populacije na uživanje alkohola pri

bolnikih z nealkoholno jetrno boleznijo ali pri hospitaliziranih bolnikih. Aktivnost je povečana tudi v vseh oblikah jetrnih bolezni, še posebej v posthepatični biliarni obstrukciji. Dva- do petkratno povečanje aktivnosti je prisotno v primeru zamaščenih jeter. Zvišane aktivnosti se pojavljajo tudi pri zastrupitvi z zdravili. Pri alkoholikih, serumska vrednost GGT pomaga razlikovati bolnike z jetrno boleznijo od zdravih. Koncentracija GGT se normalizira po 2 do 3 tednih abstinence. Konstantno povišana vrednost GGT v odsotnosti zlorabe alkohola je znak jetrne bolezni. V začetni fazi je koncentracija zvišana 8- do 10-krat in se ne normalizira po 6 do 8 tednov abstinence. V primeru zvišanja koncentracije GGT za 2- do 3-krat nad zgornjo referenčno mejo ter normalizaciji vrednosti po odsotnosti etanola, gre najverjetneje za bolezen jeter.⁸

1.4.4 Povprečni korpuskularni volumen eritrocita (MCV)

Velikost rdečih krvničk oziroma povprečni korpuskularni volumen eritrocita se pogosto uporablja v okviru presejalnih testov za odkrivanje zlorabe alkohola. Povišan MCV je prisoten pri 4 % odraslih, medtem ko je v 65 % primerov povišana vrednost MCV povezana s prekomernim vnosom alkohola. Obstaja močna pozitivna koleracija med intenziteto vnosa etanola in volumnom eritrocita. Vnos zmernih količin alkohola (do 40 g/dan), lahko zviša vrednosti MCV za 1 do 2 fL v primerjavi z abstinenti. To je pomebno predvsem pri določanju referenčnih vrednosti. Zaradi relativno stabilne narave se MCV lahko uporablja za razkrivanje sprememb pri kroničnih uporabnikih alkohola, ki nimajo očitnih kliničnih znakov. MCV se počasi normalizira, saj normalne vrednosti doseže šele po 2 do 4 mesecih abstinence. Nekatera stanja, kot so pomanjkanje folne kisline, jetrne bolezni, hematološke bolezni, hipotiroidizem in retikulocitoza, predstavljajo omejujoč faktor, saj se pri tem značilno zniža specifičnost. Pri alkoholikih, ki nimajo prizadetih jeter, je prisoten povišan MCV brez anemije, medtem ko se pri bolnikih z alkoholno boleznijo jeter, visoke vrednosti MCV pojavljajo sočasno s pomanjkanjem folatov, megaloblastno ali hemolitično anemijo. Mehanizem zvišanja MCV, inducirane z etanolom, temelji na njegovi hematotoksičnosti in hematotoksičnosti njegovih presnovkov. Etanol lahko prehaja celično membrano, spreminja strukturo lipidov, strukturo celic in celični metabolizem, kar vpliva na stabilnost eritrocitov. Visoke koncentracije aldehida se pojavljajo v notranjosti eritrocitov alkoholikov. Acetaldehid je zaradi visoke reaktivnosti sposoben tvoriti stabilne produkte s proteini in ostalimi sestavinami celične membrane. Posledično postanejo eritrociti bolj dovzetni za poškodbe, hemolizo, ter se jim zmanjša razpolovna doba.⁸

1.4.5 Transferin z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov (CDT)

Humani transferin je transportni protein serumskega železa, sestavljen iz 679 aminokislin z dvema potencialnima glikozilacijskima mestoma, na Asn413 in Asn611, ki običajno vežejo dve di- ali triantenske ogljikohidratne verige.¹² Sintetizira se v jetrih, preko katerih se tudi izloča.⁸ Verige imajo spremenljivo ogljikohidratno strukturo. Vsebuje štiri različne ogljikove hidrate, N-acetilglukozamin, manozo, galaktozo in terminalne sialične kisline.¹² Dve transferinski N-glikanski verigi se razlikujeta v stopnji razvejanja in lahko kažeta bi-, tri- in tetra strukturo. Vsaka antena N-glikanske verige transferina se konča z negativno nabito molekulo sialične kisline. Molekula transferina lahko veže največ dva kovinska iona, s prednostjo vezave Fe^{3+} .¹³

Transferin ni homogena molekula, temveč kaže izrazito mikroheterogenost ter predstavlja skupino podobnih izooblik pod skupnim imenom. Transferinske izooblike kažejo izrazito variabilnost tudi v nepatoloških pogojih.¹³ Mikroheterogenost človeškega transferina je zelo zapletena zaradi različne obremenitve z železom, zapletenosti glikanskih verig, števila vezanih ostankov sialične kisline na glikanske verige in prisotnosti redkih genetskih variant polipeptidne verige.⁸ V serumu se lahko pojavi asialotransferin in sializirane oblike od monosialotransferina do oktasialotransferina.¹³ Prevladujoča izooblika transferina pri zdravih je tetrasialotransferin.⁸ Glavna izooblika transferina vsebuje dve biantenalni N-glikanski verigi s štirimi molekulami sialične kisline.¹² Poznavanje mikroheterogenosti transferina je bistveno za pravilno analizo in interpretacijo CDT.¹³

CDT je relativno nov biokemični označevalec ki se zaradi visoke specifičnosti v laboratorijski diagnostiki vse bolj uporablja za odkrivanje zlorabe alkohola.⁸ CDT vključuje izooblike z izoelektrično točko nad 5.7, oziroma asialo, monosialo in disialotransferin.¹² Količina desializirane izooblike transferina v bioloških vzorcih, je povečana pri alkoholikih. Etanol in acetaldehid okrepi aktivnost sialidaze, encima, ki odstrani ogljikohidratno skupino iz transferina. Moteno delovanje receptorjev jetrnih celic vplivajo na koncentracijo desializiranih frakcij v serumu.

Diagnostično najbolj zanimive oblike, asialo, monosialo in disialotransferina so prisotne pri alkoholnih odvisnikih.⁸

Relativne količine transferinskih izooblik v zdravi populaciji so 1,5 % heptasialotransferina, 1-3 % heksasialotransferina, 12-18 % pentasialotransferina, 64-80 %

tetrasialotransferina, 4,5-9 % trisialotransferina in 2,5 % disialotransferina. Monosialo in asialotransferin predstavljata 0,9 % in 0,5 % od celotne vsote transferina pri nepatoloških pogojih. Glavnima oblikama CDT, disialo in asialotransferinu manjkajo ena ali dve glikanski verigi. Disialotransferin kaže eno samo N-glikansko strukturo z dvema ostankima sialične kisline, monosialo ima eno samo sialično kislino, medtem, ko asialotransferin nima ogljikohidratne strukture.¹³

Zaradi pomanjkljive standardizacije sta občutljivost in specifičnost CDT pogosto natančno nedefinirana, kar ovira primerjanje z drugimi označevalci. V primeru pomanjkanja enotnosti v testiranih populacijah glede na spol, starost, uživanje alkohola, časa trajanja abstinence pred vzorčenjem in prisotnosti ali odsotnosti jetrnih bolezni, je standardizacija pomanjkljiva in rezultati niso primerljivi.⁸

Na izoelektrično točko molekule transferina vpliva nasičenost z železom. Nasičenost transferina je v zdravi populaciji 30 %. V primeru pomanjkanja Fe^{3+} se nasičenost transferina z železom niža, ter se viša količina Fe^0 in Fe^{1+} transferina v serumu. Pri hemokromatozi, se poveča nasičenost transferina, v serumu pa prevladuje Fe^{2+} oblika transferina. Izoelektrična točka molekule transferina, se zmanjša za 0,2 pH enote z vsakim vezanim ionom Fe^{3+} .¹³

Označevalec je bolj občutljiv pri moških kot pri ženskah, saj imajo slednje višje ravni CDT pod naravnimi pogoji, lahko pa producirajo manj CDT kot odgovor na prekomerno uživanje alkohola.⁸ Ženske imajo pogosto subklinično pomanjkanje železa in s tem povečano koncentracijo transferina, kar lahko pojasni višje vrednosti CDT.¹³ Vrednosti CDT se razlikujejo tudi pri ženskah v rodni dobi in po menopavzi. Med nosečnostjo se raven CDT poviša tudi v odsotnosti alkohola⁸ vendar ne presegajo mejo referenčne vrednosti.¹³ Nasprotno pa se vrednosti CDT znižajo pri ženskah v menopavzi.⁸ Drugi vzrok razlike v koncentraciji CDT med spoloma je lahko v povečani dovzetnosti jeter na zastrupitev z alkoholom pri ženskah.¹³

Številne študije poročajo o visoki občutljivosti in odlični specifičnosti CDT. Pri vnosu alkohola od 100 g/dan, je občutljivost znašala CDT 34 %, v primerjavi z občutljivostjima 47 % in 34 % za GGT in MCV. Pri bolnikih s povprečnim vnosom etanola preko 150 g/dan, se je občutljivost zvišala na 64 %, v primerjavi z 55 % za GGT in 39 % za MCV.⁸

Raven CDT se poveča, ko je poraba alkohola med 50 in 80 g/dan čez 2 do 3 tedna, vsaj pri osebah, odvisnih od alkohola. V splošni populaciji količina 60 ali celo 80 g/dan ne zadošča za povečanje vrednosti CDT nad referenčno mejo,⁸ razen če ne gre za kronično zlorabo.¹³ CDT je zelo občutljiv marker relapsa, pri pacientih z anamnezo zlorabe alkohola, tudi pri nižji ravni porabe. Tudi če je občutljivost CDT prenizka za presejanje porabnikov alkohola, se test lahko uporablja za odkrivanje sprememb v vnosu alkohola pri kroničnih alkoholikih. Prednost CDT pred številnimi drugimi označevalci je, da na njegovo koncentracijo ne vplivajo prisotnost jetrnih bolezni in različne zdravilne učinkovine. Zaradi tega je označevalec uporaben pri bolnikih z nealkoholno jetrno boleznijo.⁸

CDT se lahko uporablja tudi kot označevalec za še nekatera patološka stanja, nepovezana z zlorabo alkohola, kot je sindrom glikoproteina z zmanjšano vsebnostjo ogljikovih hidratov (ang. CDGS), nevrolška motnja z genetsko motnjo v glikozilaciji proteinov.¹² Uporablja se lahko tudi za razlikovanje alkoholnega od nealkoholnega pankreatitisa.⁸

Ker se noben biokemični označevalec ni izkazal kot idealen za zanesljivo odkrivanje zlorabe alkohola, so ponujene kombinacije različnih markerjev. Najbolj popularne so kombinacije GGT, AST, ALT, MCV in CDT. Take kombinacije povečajo občutljivost in specifičnost diagnostičnega postopka.⁸

1.5 Škodljivi učinki etanola

Etanol vpliva na skoraj vse organske sisteme, v visokih odmerkih pa lahko povzroči komo, tudi smrt.¹⁴ Škodljive učinke etanola lahko opredelimo kot akutne ali kronične.⁵

1.5.1 Akutni alkoholizem

Ima učinek predvsem na centralni živčni sistem, vendar pa povzroči tudi reverzibilne spremembe na sluznici želodca in v jetrih.

Na centralni živčni sistem alkohol deluje kot antidepresiv.⁵ Etanol vpliva na nevrottransmitterske sisteme, vključno z opioidnim, GABAnergičnim, glutamatnim, serotoninским in dopaminskim. Evforični učinek etanola lahko pojasnimo s povišanimi vrednostimi opioidnih nevrottransmitterjev, medtem ko z delovanjem na GABAnergični sistem izraža sedativni učinek. Alkohol zavira receptorje za glutamat, dolgoročni vnos

rezultira s povečano sintezo glutamatnih receptorjev. Ko alkohol izgine, centralni živčni sistem postane razdražljiv.¹⁴ Pri višjih koncentracijah etanola v krvi prihaja do depresije nevronov možganske skorje in nižjih medularnih centrov, vključno s tistimi, ki uravnavajo dihanje.⁵

Akutne spremembe, ki se lahko pojavijo v želodcu, so gastritis in razjede.⁵ Poškodbe želodčne sluznice so najpogostejši zapleti akutne in kronične zlorabe alkohola. V začetku je prisotno povečano izločanje želodčne kisline, ki privede do gastritisa.¹⁵

Celo zmeren vnos alkohola tudi lahko povzroči akumulacijo maščobnih kapljic v citoplazmi hepatocitov.⁵ Zamaščena jetra ali steatoza se običajno pojavi po kratkoročni zlorabi alkohola in je znak akutnega zaužitja. Postavitev diagnoze zamaščenih jeter je pravzaprav redka, ker klinična slika običajno poteka asimptomatsko, aktivnost jetrnih encimov je ponavadi normalna ali pa rahlo povišana. S prenehanjem vnosa alkohola steatoza postopoma izzveni.¹¹

1.5.2 Kronični alkoholizem

Kronični alkoholizem ne vpliva samo na želodec in jetra, ampak prizadene vse organske sisteme. Kronični alkoholiki imajo značilno smrtnost in krajšo življensko dobo, kar je povezano predvsem s poškodbami jeter, prebavil, centralnega živčnega sistema, srca in ožilja ter trebušne slinavke.

Poškodba jeter

Najpomembnejši kazalec kroničnega alkoholizma, ki se kaže z alkoholnim hepatitisom in jetrno cirozo.⁵

Alkoholni hepatitis se manifestira s povišano telesno temperaturo, zlatenico, hepatomegalijo ter občasno z znaki dekompenzirane bolezni jeter (ascites, portalna hipertenzija, in jetrna encefalopatija). Laboratorijski izid kaže levkocitozo ter AST/ALT razmerje nad 2. Alkoholna ciroza se razvije pri 70 % bolnikov z alkoholnim hepatitisom. Spremljajo jo motena sintezna funkcija jeter ter posledično motena koagulacija, hipoalbuminemija in hiperbilirubinemija. To je kronična in ireverzibilna okvara.¹¹

Zievejev sindrom spremlja hiperlipemija, hemolitična anemija in zlatenica ter zamaščena jetra ali jeterna ciroza. Bolezen nastopi zaradi poškodbe jeter in trebušne slinavke.¹⁵

Poškodba gastrointestinalnega sistema

V prebavnem traktu kronični alkoholizem lahko povzroči obsežne krvavitve zaradi varic požiralnika in razjed na želodcu, kar je lahko usodno.⁵

Pri alkoholikih se pogosto pojavljata vnetje sluznice požiralnika in Mallory Weissov sindrom. Karcinom požiralnika je pri alkoholikih pogostejši kot pri kadilcih.

Med kronično zlorabo alkohola se vzporedno z nastajanjem poškodb želodčne sluznice intenziteta izločanja želodčne kisline postopoma zmanjšuje ali celo ustavi. Pogosta je jutranja slabost in bruhanje kot znak poškodb želodca.¹⁵

Poškodba živčnega sistema

Z alkoholom povzročene poškodbe živčnega sistema so poškodbe in atrofija velikih in malih možganov, spinale poškodbe, degeneracija malih možganov in Wernicke-Korsakoffov sindrom.⁵

Alkoholna polinevropatija prizadene periferno živčevje, manj pogosto pa možganske živce. Gre za poškodbo zaradi pomanjkanja vitaminov. Bolezen povzroča bolečino in parestezije v stopalih, rokah, ter v mišicah rok in nog, paralizo stopal in spodnjih delov nog.

Alkohol poškoduje hrbtenjačo, podaljšano hrbtenjačo ter velike in male možgane. Poškodbe se običajno kažejo kot atrofija živčne strukture, medtem ko niso redke niti krvavitve v možganih ali možganski ovojnici. Pomanjkanje vitaminov skupine B povzroči odmiranje ter posledično zmanjševanje števila možganskih celic in atrofijo.

Atrofija malih možganov pri alkoholikih predstavlja poškodbo povzročeno s pomanjkljivo prehrano in hipovitaminozo B1. Patološko-anatomske razlikujemo dve obliki cerebelarne atrofije, prvo, ki prizadene globlje plasti in drugo, ki vpliva na skorjo malih možganov, predvsem Purkinje-jeve celice. Takšno stanje je prisotno v večji ali manjši meri pri vseh alkoholikih.¹⁵

Poškodba kardiovaskularnega sistema

Alkohol ima različne učinke na kardiovaskularni sistem.⁵ Na miocite ima etanol neposreden toksični učinek. Posreden učinek, ki ga spremlja alkoholizem, je pomanjkanje

vitamina B1, ki povzroči kardiopatijo s povečanjem minutnega volumna srca.¹⁶ Kronični alkoholizem je povezan tudi s povečano incidenco hipertenzije.⁵ Alkoholno srce je lahko posledica hipovitaminoze vitaminov B skupine, takoimenovani alkoholni beri-beri.¹⁵

Poškodba hematopoetskega tkiva

Pomanjkanje vitamina B12 in folatov rezultira v nastanku megaloblastne in sideroblastne anemije. Trombocitopenija ter vaskulizacija eritrocitne in mieloičnin celic je posledica toksičnega učinka etanola na kostni mozeg. Pri osebah, ki zlorablajo alkohol, je motena migracija levkocitov na kraj vnetja, kar zmanjša odpornost organizma in poveča njegovo dovzetnost za okužbe.

Poškodba skeletnih mišic

Toksičnost alkohola in njegovih presnovkov poškoduje skeletne mišice ter povzroča miopatijo. Poškodbe vplivajo na aktivnost kreatin fosfokinaze in vplivajo na elektromiogram (EMG). Mišična moč je značilno zmanjšana, pojavijo se krči v mišicah.

Poškodba kože

Pelagra je najbolj znana dermatoza povezana z zlorabo alkohola. Razvije se zaradi pomanjkanja vitamina B3. Poleg pelagre, alkoholizem spremlja različne druge spremembe na koži, kot so atrofija in motnje prekrvavitve.⁵ Alkoholna poškodba kože ima imunološki izvor, saj so v krvi alkoholikov našli avtoprotitelesa.

Poškodba ostalih organov

Alkohol vpliva tudi na delovanje ledvic. Poveča diurezo ter na ta način poviša izločanje folatov, magnezija, kalcija in amonijevih ionov. Okvara jeter vpliva na delovanje ledvic.¹⁶

Prekomerno uživanje alkohola povečuje tveganje za razvoj vnetja trebušne slinavke.

Pri moških lahko pripelje do impotence in atrofije testisov, pri ženskah lahko povzroči atrofijo jajčnikov, spontane splave in sterilnost.¹⁵

Uživanje etanola med nosečnostjo lahko povzroči fetalni alkoholni sindrom

Kronično uživanje alkohola zviša verjetnost nastanka raka ustne votline, požiralnika, jeter in raka dojke pri ženskah. Acetaldehid je eden izmed glavnih povzročiteljev raka laringsa in požiralnika.⁵

2 Namen

CDT in GGT sta dva najpogostejše uporabljana biokemijska označevalca zlorabe alkoholna.

Namen naloge je primerjati rezultate deleža CDT in aktivnosti GGT pri moških in ženskah.

V nalogi bomo poskusili ugotoviti ali obstaja razlika v zanesljivosti rezultatov CDT% v serumu in serumske aktivnosti GGT med spoloma.

Hipoteza: Zanesljivost rezultatov CDT% in GGT se med spoloma razlikuje.

Naša prva naloga je, da v vzorcih seruma naključno izbranih preiskovancev določimo delež CDT in aktivnost GGT.

V drugem delu bomo s pomočjo statistične analize določili specifičnost in občutljivost CDT% in GGT pri moških in ženskah kot biokemičnih označevalcev kronične zlorabe alkohola ter ugotovili ali obstaja korelacija med rezultati CDT% in GGT pri moških in ženskah.

Za določanje deleža transferinskih izooblik bomo uporabljali metodo kapilarne elektroforeze, aktivnost GGT pa bomo določili s specifično encimsko-barvno metodo.

Glede na to, da CDT v kombinaciji z GGT zagotavlja visoko občutljivost brez znižanja specifičnosti, bi lahko njihovo vrednotenje in bolj sistematična uporaba bistveno izboljšali diagnostiko alkoholizma. Na ta način bi se lahko pripomoglo k racionalizaciji stroškov in poenostavitvi dela v medicinskem laboratoriju.

3 Materiali in metode

3.1 Opis preiskovancev

Raziskavo smo izveli v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana. Določili smo delež CDT v serumu in serumsko koncentracijo GGT pri bolnikih pri katerih obstaja sum na zlorabo alkohola.

Raziskavo smo izvedli na 93 udeležencih, od tega je bilo 62 moških in 31 žensk. Starost moških je bila med 19 in 83 let, s srednjo vrednostjo 51 let. Starost žensk je bila med 19 in 77 let, s srednjo vrednostjo 55 let. Najstarejši udeleženec je bil rojen leta 1932, najmlajši pa leta 1996.

Izmed 93 preiskovancev jih je 18 imelo dalj časa trajajoče probleme z zlorabo alkohola ter so bili zdravljeni za alkoholizem, od tega 13 moških in 5 žensk.

Raziskavo smo opravili v skladu s kodeksom deontologije in etičnimi načeli.

Preiskovancem je bila odvzeta venozna kri v epruveto z rdečim zamaškom brez antikoagulant. Po centrifugiranju v trajanju 15 minut pri 2000 do 3000 g smo previdno odpipetirali zgornjo plast ter serum ločili od celic. Serum predstavlja frakcijo krvi brez fibrinogena.

3.2 Materiali in metode za določanje gama-glutamil transferaze

3.2.1 Oprema za določanje aktivnosti gama-glutamil transferaze

Za določanje aktivnosti GGT v serumu smo uporabljali analitski sistem Advia 1800 proizvajalca Siemens (Camberley, Velika Britanija). Advia 1800 (Siemens) je popolnoma avtomatiziran analitski sistem za določanje aktivnosti encimov, koncentracije elektrolitov in različnih metabolitov v bioloških tekočinah.



Slika 1: Analitski analizator Advia 1800 (Siemens)

3.2.2 Reagenti za določanje aktivnosti gama-glutamil transferaze¹⁷

Reagent	Prozvajalec
Gamma GT	Siemens
Lypo. Assayed Chemistry L1	Bio Rad
Lypo. Assayed Chemistry L2	Bio rad

3.2.3 Princip določanja gama-glutamil transferaze

Aktivnost GGT se določa s pomočjo encimsko-barvnega testa. GGT razgradi substrat L- γ -glutamil-3-karboksi-4-nitroanilid in prenaša glutaminsko skupino na glicilglicin. Nastajata produkt γ -glutamilglicilglicin in 5-amino-2-nitrobenzoat, kateremu merimo absorbanco pri 410/478 nm.

3.2.4 Opis postopka določanja gama-glutamil transferaze

Postopek je popolnoma avtomatiziran. Analizator Advia 1800 (Siemens) lahko pipetira vzorce iz avtomatiziranega predanalitskega sistema ali iz lastnega krožnika za vzorce. Vzorec se redči s fiziološko raztopino v dilucijskem krožniku. V merilno kiveto se najprej odpipetira reagent ter nato doda razredčen vzorec. V reakcijskem krožniku po inkubaciji poteka meritev absorbance. Analizator je priključen na centralni informacijski sistem.

3.2.5 Priporočila in opozorila

Vzorec: serum

Stabilnost vzorca: 7 dni pri 15 do 25 °C, 7 dni pri 2 do 8 °C.

Meritve moti hemoliza (nad 10,0 g/L), lipemija (nad 7,4 mmol/L) ter ikterični vzorci (nad 513 µmol/L).¹⁷

3.3 Materiali in metode za določanje transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov

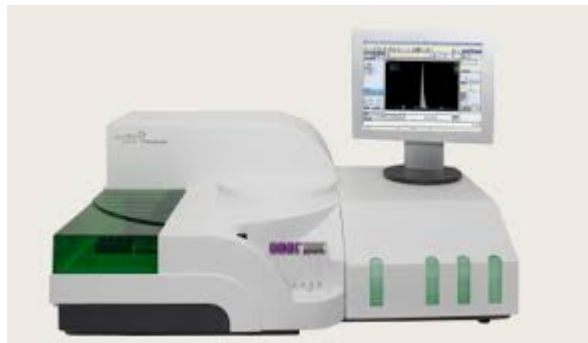
3.3.1 Oprema za določanje transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov

Za določanje deleža CDT v serumu uporabljali smo analitski sistem Capillarys 2, proizvajalca Sebia, (Lisses, Francija).

Capillarys 2 (Sebia) (aparatus za kapilarno elektroforezo)

plastični vsebniki za vodo, za raztopino za spiranje in za odpad,

Phoresis programska oprema za Capillarys 2 (Sebia)¹⁸



Slika 2: Analitski analizator Capillarys 2 (Sebia)

3.3.2 Reagenti za določanje transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov

Reagenčni kit	Prozvajalec
Capillarys CDT PN.2008	Sebia

Reagent	Prozvajalec
Capillary wash solution PN.2052	Sebia
Capiclean PN.2058	Sebia
Capillarys CDT wash solution PN. 2053	Sebia
Capillarys CDT samples treatment solution PN. 2054	Sebia
destilirana voda	
Raztopina natrijevega hipoklorita ¹⁸	

3.3.3 Princip postopka določanja transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov

Ločba delcev poteka v kapilari iz stekla s SiO₂ na osnovi elektroforezne gibljivosti v alkalnem pufru in elektroosmozne toka pufra. Analizator redči serum z diluentom, ki vsebuje železo. Pri tem se vse transferinske molekule nasitijo z železom, tako da ločba izooblik poteka le na osnovi stopnje sialiniziranosti. Na katodnem koncu poteče detekcija pri 200 nm.¹⁸

3.3.4 Opis postopka določanja transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov

Kapilarna elektroforeza (CEF) je popolnoma avtomatizirana metoda s hitro ločljivostjo in dobro detekcijo. Nanos vzorca na anodni konec kapilare poteka avtomatično. Ločba transferinskih izooblik poteka 8 minut pri konstantni temperaturi in konstantni napetosti. Ločba izooblik CDT je odvisna od elektroforetske gibljivosti delcev, ter od toka pufra. Rezultati se prikažejo grafično v obliki elektroferograma na kem so z levega na desno vidljive transferinske izooblike, kot so pentasialo, tetrasialo, trisialo, disialo, monosialo in asialotransferin. Celotni analitski postopek poteka okoli 20 minut.¹⁸

3.3.5 Priporočila in opozorila

Vzorec: serum

Stabilnost vzorca: 30 ur pri 15 do 25 °C, 7 dni pri 4 °C, več mesecev pri -22 °C.

Hemoliza lahko izkrivi elektroforetske pike in povzroči napačno kvantifikacijo.

Ne smemo uporabljati starih in neprimerno skladiščenih vzorcev.

Izogibati se moramo vzorcev plazme, saj fibrinogen potuje pred asialotransferinom ter lahko spremeni elektroferogram. EDTA in citrat lahko izkrivijo elektroferogram in vplivajo na kvantifikacijo izooblik.

3.3.6 Priprava serumskih vzorcev z motečimi snovmi

Serumske vzorce, ki vsebujejo snovi, katere motijo kvantitativno določitev CDT, pred analizo pripravimo z raztopino za pripravo vzorcev.

Dodajanje raztopine za pripravo vzorcev CDT povzroči obarjanje nekaterih motečih snovi. Oborjene snovi se po centrifugiranju odstranijo. Supernatant analiziramo enako kot navadne vzorce.

Predpripravo vzorcev uporabljamo v primeru, ko so na elektroferogramu prisotne dodatne frakcije, neznačilne za CDT. Tudi v primeru pojava široke frakcije pred pikom disialotransferina ter v primeru premika elektroforeznega vzorca.¹⁸

Oprema za pripravo serumskih vzorcev z motečimi snovmi

centrifuga (3000/5000 rpm)

1,5 mL mikroepruvete,

epruvete

pipette¹⁸

3.4 Statistična analiza

Rezultate smo statistično obdelali s pomočjo računalniškega programa Microsoft Excel in MedCalc. Izračunali smo Pearsonov koeficient korelacije, narisali histogram, kvantilni diagram, korelacijski diagram in krivuljo občutljivosti in specifičnosti (ROC) za delež CDT v serumu in serumsko aktivnost GGT pri moških in ženskah..

4 Rezultati

4.1 Skupni rezultati deleža transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov in aktivnosti gama-glutamil transferaze

Razpon CDT v serumu in katalitična aktivnost GGT v serumu prikazan je v Preglednici 1.

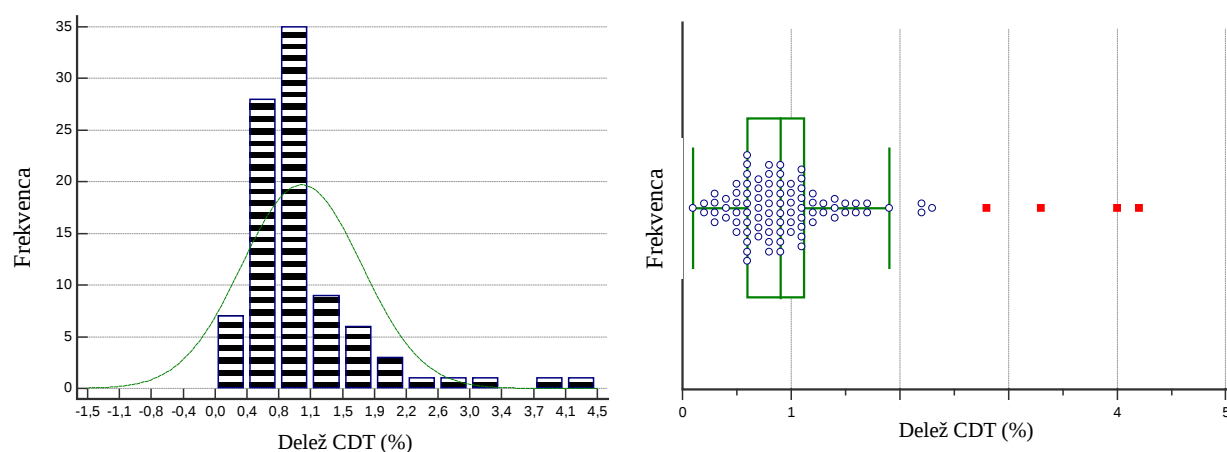
4.2 Rezultati deleža transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov in aktivnosti gama-glutamil transferaze pri moških in ženskah

V Preglednici 2 so prikazane rastoče vrednosti deleža CDT v serumu ter pripadajoče vrednosti GGT v serumu pri moških in ženskah.

Referenčni interval za CDT je do 1,3 % CDT izoblik od celotnega serumskega transferina.

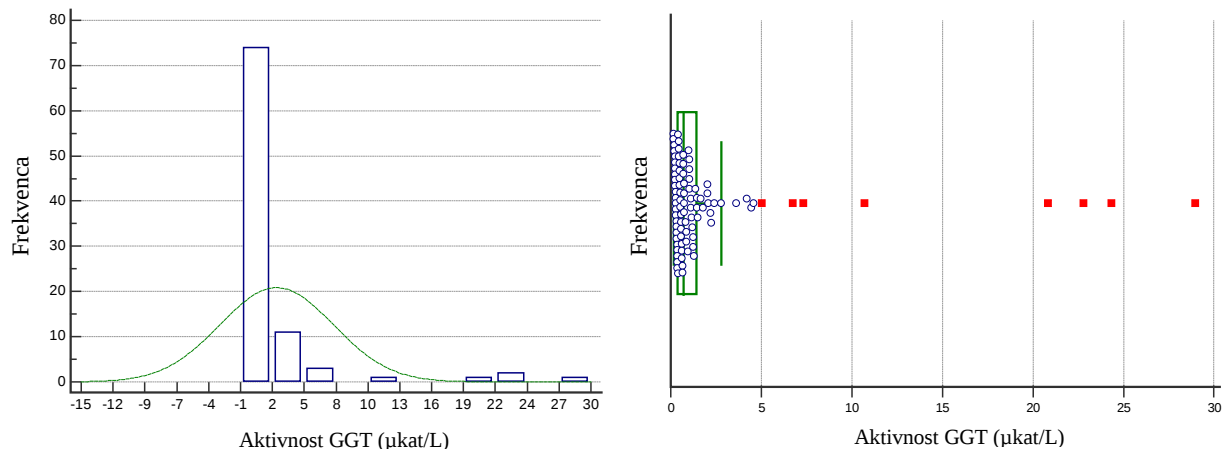
Referenčni interval katalitiške aktivnosti GGT pri ženskah je do 0,63 $\mu\text{kat/L}$, pri moških do 0,92 $\mu\text{kat/L}$.

Histogram in kvantilni diagram prikazujeta vse deleže serumskega CDT.



Graf 1: Histogram in kvantilni diagram za CDT (%)

Histogram in kvantilni diagram prikazujeta vse vrednosti serumske aktivnosti GGT ($\mu\text{kat/L}$).



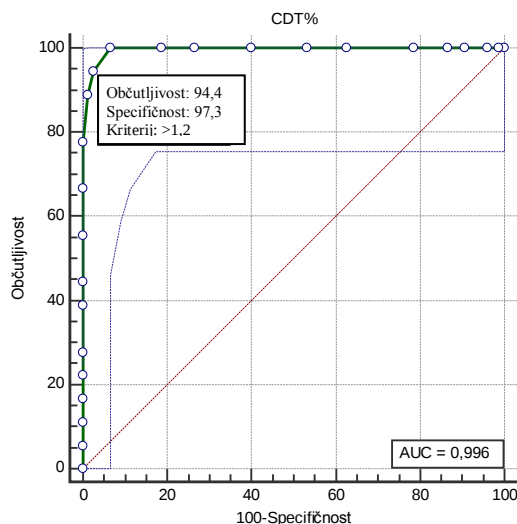
Graf 2: Histogram in kvantilni diagram za GGT ($\mu\text{kat/L}$)

4.3 ROC krivulje za delež transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov in aktivnost gama-glutamil transferaze pri moških in ženskah

S pomočjo ROC krivulje (ang. Receiver Operating Characteristic Curve) smo določili občutljivost in specifičnost CDT% in GGT pri moških in ženskah kot biokemična označevalca kronične zlorabe alkohola. Y-os predstavlja resnično pozitivne rezultate, X-os pa lažno pozitivne rezultate.

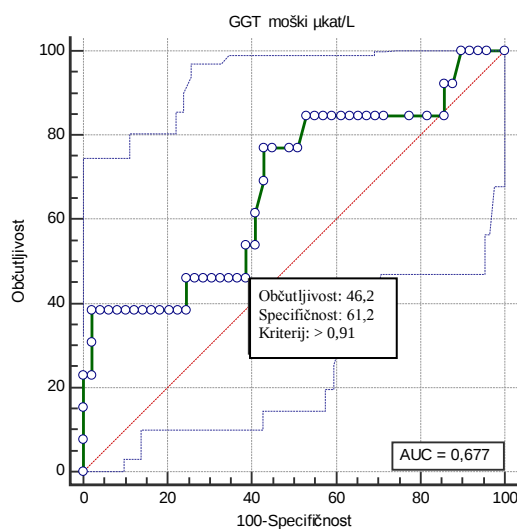
Določena je tudi površina pod krivuljo, ki nam podaja podatek o točnosti testa.

ROC krivulja za CDT% v serumu kot označevalec kroničnega alkoholizma kaže občutljivost 94,4 % in specifičnost 97,3 %. Površina pod krivuljo znaša 0,996 kar kaže odlično točnost diagnostičnega testa. AUC med 0,90 in 1 kaže, da gre za odličen test.



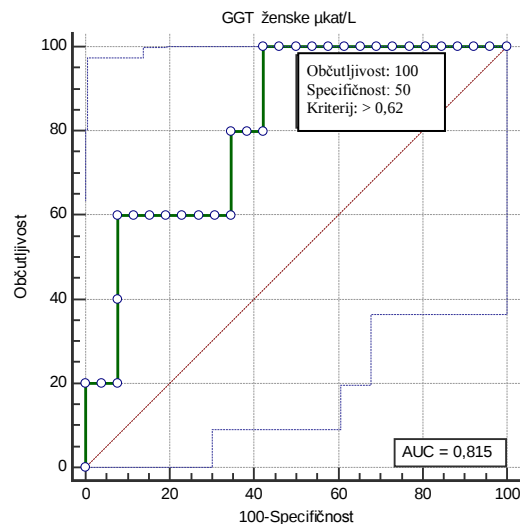
Graf 3: ROC krivulja za CDT (%)

ROC krivulja za aktivnost GGT v serumu pri moških kaže občutljivost 46,2 % in specifičnost 61,2 %. Površina pod krivuljo znaša 0,677, kar kaže da GGT pri moških nima velikega diagnostičnega pomena. AUC med 0,60 in 0,70 kaže, da gre za slabši test.



Graf 4: ROC krivulja za GGT pri moških ($\mu\text{kat/L}$)

ROC krivulja za serumsko aktivnost GGT pri ženskah kaže občutljivost 100 % in specifičnost 50 %. Površina pod krivuljo znaša 0,815, kar kaže dobro točnost diagnostičnega testa.



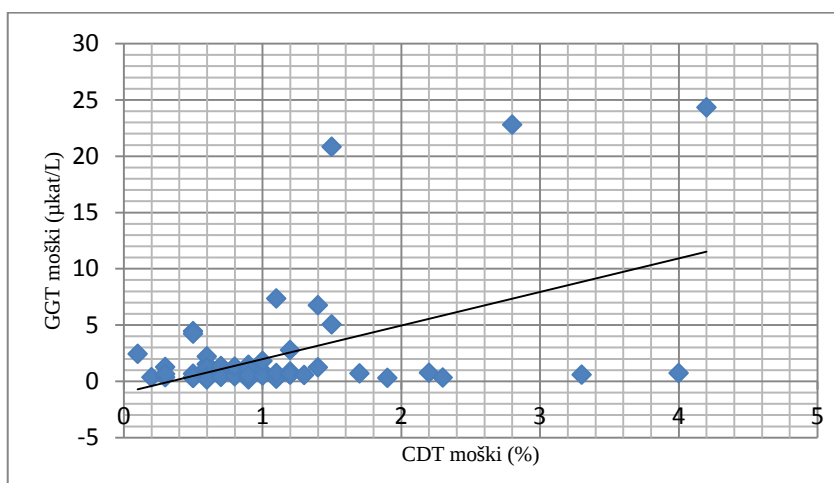
Graf 5: ROC krivulja za GGT pri ženskah (μkat/L)

Rezultati preiskovancev z diagnozo kroničnega alkoholizma, pri katerih je delež CDT bil nad referenčno mejo, predstavljajo pravilno pozitivne rezultate. Rezultate preiskovancev brez diagnoze kroničnega alkoholizma, z deležem CDT nižjim od 1,3 %, smo ovrednotili kot pravilno negativne rezultate. Rezultati skupine z odsotnostjo diagnoze alkoholizma in pozitivnim izidom CDT, predstavljajo lažno pozitivne rezultate. Rezultati kroničnih alkoholikov, pri katerih je delež CDT bil negativen, predstavljajo lažno negativne rezultate.

Ugotovljena je višja diagnostična zanesljivost meritev deleža serumskega CDT kot aktivnosti GGT v serumu.

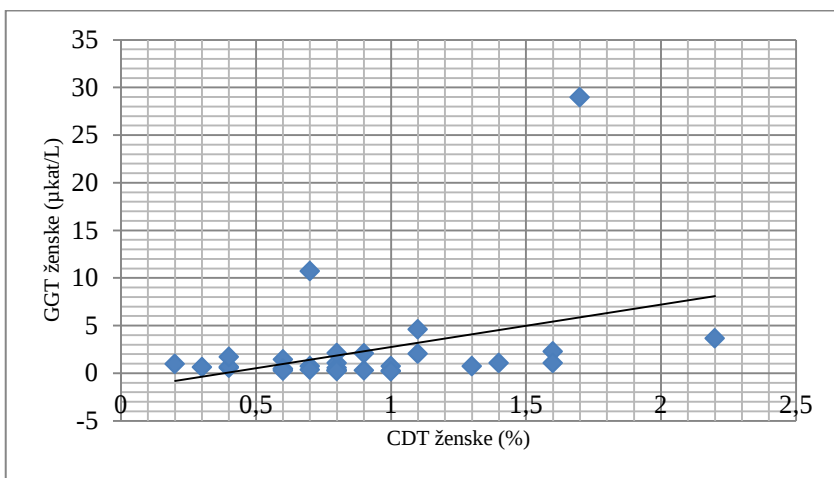
4.4 Korelacijski diagrami za delež transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov in aktivnost gama-glutamil transferaze pri moških in ženskah

Korelacijski diagram primerjave deleža CDT v serumu in serumske aktivnosti GGT pri moških, ne glede na diagnozo. Koeficient korelacije za moške znaša 0,49 in kaže slabo do zmerno povezanost med deležem serumskega CDT in aktivnostjo GGT v serumu.



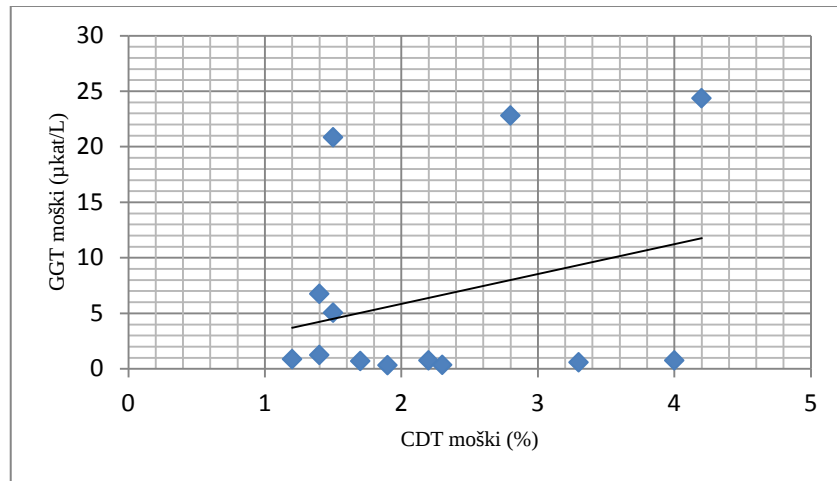
Graf 6: Korelacijski diagram primerjave deleža CDT proti aktivnosti GGT pri moških.

Korelacijski diagram primerjave deleža CDT v serumu in serumske aktivnosti GGT pri ženskah, ne glede na diagnozo. Korelacijski koeficient za ženske znaša 0,37 ter prikazuje slabo povezanost med deležem CDT in aktivnostjo GGT v serumu.



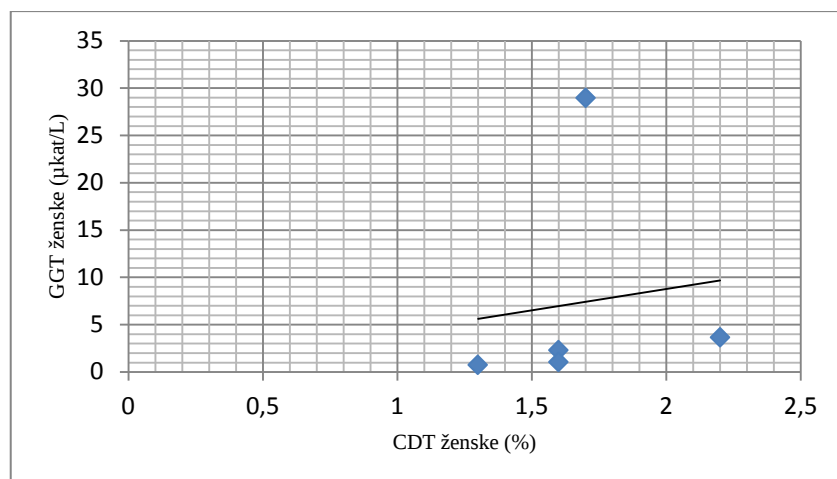
Graf 7: Korelacijski diagram primerjave deleža CDT proti aktivnosti GGT pri ženskah

Korelacijski diagram primerjave deleža CDT v serumu in serumske aktivnosti GGT pri moških z diagnozo kroničnega alkoholizma. Korelacijski koeficient znaša 0,29 ter kaže slabo povezanost med deležem CDT v in aktivnostjo GGT v serumu.



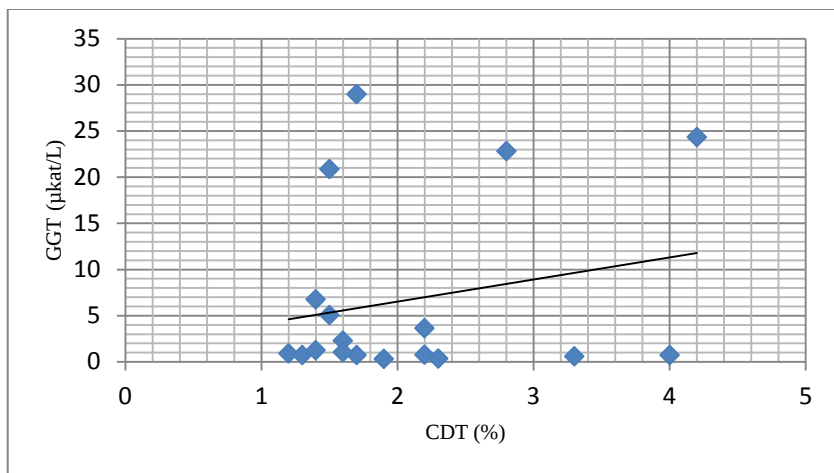
Graf 8: Korelacijski diagram primerjave deleža CDT proti aktivnosti GGT pri moških s potrjeno diagnozo kroničnega alkoholizma

Korelacijski diagram primerjave deleža CDT v serumu in serumske aktivnosti GGT pri ženskah z diagnozo kroničnega alkoholizma. Korelacijski koeficient znaša 0,12 ter kaže da med deležem CDT in aktivnostjo GGT v serumu ni korelacije.



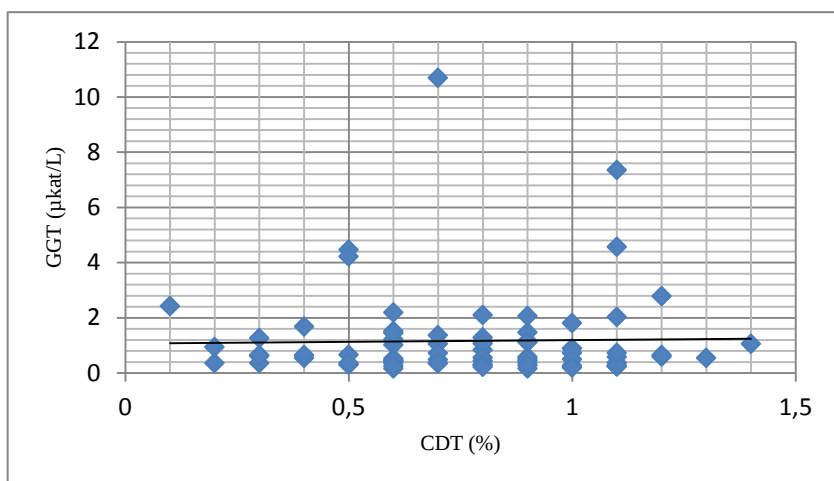
Graf 9: Korelacijski diagram primerjave deleža CDT proti aktivnosti GGT pri ženskah s potrjeno diagnozo kroničnega alkoholizma

Korelacijski diagram primerjave deleža CDT v serumu in serumske aktivnosti GGT pri alkoholikih, ne glede na spol. Korelacijski koeficient znaša 0,22 ter kaže zelo slabo pozitivno povezanost med deležem CDT in aktivnostjo GGT v serumu.



Graf 10: Korelacijski diagram primerjave deleža CDT proti aktivnosti GGT pri alkoholikih ne glede na spol

Korelacijski diagram primerjave deleža CDT v serumu in serumske aktivnosti GGT pri osebah, ki nimajo diagnoze alkoholizma, ne glede na spol. Korelacijski koeficient znaša 0,02 in kaže, da povezave med deležem CDT in aktivnostjo GGT v serumu v tem primeru ni.



Graf 11: Korelacijski diagram primerjave deleža CDT proti aktivnosti GGT pri nealkoholikih, ne glede na spol

V celotni skupini smo ugotovili nekoliko boljšo korelacijo med CDT% in GGT pri moških kot pri ženskah.

V skupini kroničnih alkoholikov smo prav tako ugotovili boljšo korelacijo med deležom CDT v serumu in serumsko aktivnostjo GGT pri moških kot pri ženskah. Korelacija pri moških kaže šibko povezavo, medtem ko pri ženskah povezave sploh ni.

V skupini alkoholikov, v katero smo vključili moške kot tudi ženske, smo ugotovili nekoliko boljšo povezanost med CDT% in GGT kot v skupini brez diagnoze kroničnega alkoholizma, vendar v skupini nealkoholikov korelacije ni.

V vseh primerih je koeficient korelacije pozitiven, kar pomeni, da imajo spremenljivke tendenco skupnega višanja ali nižanja, z naraščanjem ene spremenljivke se viša tudi druga in obratno.

5 Razprava

V raziskavo je bilo vključeno 93 naključno izbranih pacientov, ki so bili naročeni na redno analizo serumskega CDT in katalitične aktivnosti GGT v serumu. Odvzem vzorcev in analiza so bili izvedeni na Inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Rezultati so bili pridobljeni v obdobju malo krajšem od treh mesecev. Primerjali smo rezultate deleža CDT v serumu z vrednostimi serumskega GGT pri moških in ženskah.

Deleži CDT so pri pacientih določeni na enak način s standardizirano in popolnoma avtomatizirano metodo kapilarne elektroforeze. Na interpretacijo rezultatov CDT% poleg spola in starosti pacienta vplivajo tudi količina in pogostost uživanja alkohola.

Katalitična aktivnost GGT je pri pacientih, vključenih v raziskavo, določena s standardizirano encimsko-barvno metodo. Omejitve pri interpretaciji rezultatov vrednosti GGT predstavljajo spol, starost, rasa ter morebitno prisotne jetrne bolezni ali debelost.

Naša študija je bila usmerjena na vrednotenje medsebojne povezave deleža CDT in aktivnosti GGT, kot najpogostejša biokemična označevalca zlorabe alkohola.

Na podlagi podatkov smo opazili, da je imelo 18 od 93 testiranih potrjeno diagnozo alkoholizma, kar znaša 20,4 %. Med njimi je bilo 13 moških (72,2 %) in 5 žensk (27,8 %). Podatki približno ustrezajo odnosu prevalence alkoholizma v populaciji med spoloma, saj je pri ženskah prevalenca alkoholizma več kot 50 % nižja kot pri moških.

Povišan delež CDT je določen pri 19 pacientih, kar je 20,4 % vseh preiskovancev. Od tega pri 13 moških (68,4 %) in 6 ženskah (31,6 %). CDT% je bil povišan pri 17 od 18 pacientov s potrjeno diagnozo alkoholizma, kar pojasnjuje visoko občutljivost testa. CDT% je bil negativen le pri enem pacientu z diagnozo kronične zlorabe alkohola. Pri dveh izmed 75 zdravih testirancev je bil CDT% pozitiven, kar zagotavlja izredno visoko specifičnost. S tem smo potrdili da je CDT% izredno dober kazalec povečane rabe alkohola.

Občutljivost CDT je v naši študiji znašala 94,4 %, specifičnost pa 97,3 %.

Različni pogoji in stanja lahko značino vplivajo na diagnostično občutljivost CDT.

Whitfield J.B s sodelavci ¹⁹ navaja kako je pomembno ustrezno oceniti časovno obdobje uživanja alkohola pred odvzemom vzorca. Kronični vnos manjših količin alkohola vpliva na koncentracijo CDT v serumu, medtem ko občasni vnos velikih doz alkohola, vrednosti CDT ne spremeni. Poleg tega, študija navaja, da se s starostjo niža doza alkohola, ki spremeni raven CDT. Ugotovljena je višja občutljivost serumskega CDT pri kadilcih.

Nekatera stanja lahko povzročijo lažno pozitiven izvid CDT ter na ta način znižajo diagnostično specifičnost.

Stiber H.²⁰ je določil kako CDG sindrom (ang. congenital disorder of glycosylation) povzroča povišanje CDT ne glede na abstinenco. Genetske variante transferina, še posebej Tf-D, lahko zaradi analitične interference lažno poviša vrednost CDT. Primarna biliarna ciroza in kronični hepatitis lahko znižajo točnost meritev CDT.

Ker niso znani vsi vhodni parametri, je interpretacija dobljenih rezultatov CDT lahko pomanjkljiva.

Katalitična aktivnost GGT je bila povišana pri 42 preiskovancih, kar znaša (45,2 %), pri 24 moških (57,1 %) in 18 ženskah (42,9 %). Povišana vrednost GGT je bila prisotna pri 11 od 18 diagnosticiranih alkoholikov (61,1 %), pri 6 moških (54,5 %) in 5 ženskah (45,5 %).

Glauz J. in sodelavci ²¹ so ugotovili povišano aktivnost GGT pri 52 % odvisnih od alkohola, kar je primerljivo s 45,2 % v naši študiji. Občutljivost GGT glede na vir je višja pri moških kot pri ženskah, kar v našem primeru ni potrjeno.

Med 74 pacienti z negativnim CDT%, je bila katalitična aktivnost GGT povišana pri 30 (40,5 %), od tega pri 18 moških (60 %) in pri 12 ženskah (40 %). Kot je že omenjeno, je lahko povišanje serumske aktivnosti GGT posledica različnih drugih stanj, ter gre v teh primerih najverjetneje za pridružene diagnoze. Različna druga bolezenska stanja

zmanjšujejo specifičnost. V naši skupini je bilo 12 primerov (63,2 %), pri katerih je bil delež CDT nad referenčno mejo, vrednost GGT pa normalna. Tu je bila zastopanost moških in žensk v približno enakem razmerju.

Občutljivost GGT pri moških je znašala 46,2 %, pri ženskah pa 100 %. Specifičnost GGT pri moških je znašala 61,2 %, pri ženskah pa 50 %.

Arudt T.²² je objavil da je aktivnost GGT za razliko od vrednosti CDT, v veliki meri pogojena z različnimi zdravilnimi učinkovinami, kot so barbiturati, cefalosporini, estrogeni, oralni kontraceptivi, anabolni steroidi, antirevmatiki itn. Izvid GGT je lahko lažno pozitiven zaradi številnih kliničnih stanj in bolezni, kot so obstrukcija žolčevoda, zamaščena jetra, hepatitis, jetrna ciroza, karcinom jetrnih celic, srčna insuficienca, mononukleoza, hipertiroidizem, pankreatitis in diabetes mellitus.

Zaradi omenjenega je interpretacija naših rezultatov aktivnosti GGT lahko prav tako pomanjkljiva.

Hietala J. in sodelavci²³ so ugotovili občutljivost CDT% 85 % in specifičnost 98 %. V primerjavi s to študijo kaže naša študija nekoliko višjo občutljivost in enako specifičnost za CDT%. Omenjena študija je pokazala občutljivost GGT od 56 % pri moških ter 68 % pri ženskah. Specifičnost je pri moških znašala 98 %, pri ženskah pa 100 %. Naši rezultati kažejo nekoliko nižjo občutljivost GGT pri moških, medtem ko je pri ženskah veliko višja. Specifičnost GGT je pri obeh spolih v naši študiji nižja v primerjavi s podatki, objavljenimi v omenjeni študiji.

Spiegel D. R s sodelavci²⁴ navaja podatke občutljivosti in specifičnosti serumskega CDT ter aktivnosti GGT v serumu. Občutljivost za CDT se giblje v razponu od 55 % do 90 % in specifičnost od 92 % do 97 %. Občutljivost za GGT se giblje v razponu od 37 % do 85 % ter specifičnost od 18 % do 93 %. V primerjavi z vrednostimi omenjenimi v članku, naša študija kaže nekoliko višjo občutljivost in malo višjo specifičnost za CDT. Občutljivost in specifičnost za GGT pri moških ustrezata podatkom navedenim v članku, medtem ko je pri ženskah občutljivost v naši študiji nekoliko višja. Specifičnost GGT se pri ženskah ujema z omenjenimi vrednostmi.

Maskić N. in sodelavci²⁵ so ugotovili pozitivno korelacijo med CDT in GGT. Rezultati te študije so v skladu z našimi.

6 Sklep

Iz statističnih podatkov lahko vidimo, da se je CDT v serumu testirancev gibal v razponu od 0,1 do 4,2 %. Občutljivost znaša 94,4 %, specifičnost pa 97,3 %. Površina pod ROC krivuljo znaša 0,996, kar pomeni da ima CDT% odlično diagnostično vrednost.

Aktivnost GGT v serumu se je pri moških gibal v razponu od 0,16 do 24,34 μ kat/L. Občutljivost znaša 46,2 %, specifičnost 61,2 %, Površina pod ROC krivuljo od 0,671, pomeni, da GGT pri moških nima velikega diagnostičnega pomena.

Vrednost GGT v serumu se je pri ženskah gibal v razponu od 0,19 do 28,96 μ kat/L. Občutljivost v tem primeru znaša 100 %, specifičnost pa 50 %. Površina pod krivuljo ROC znaša 0,815, kar pomeni, da ima GGT pri ženskah relativno dober diagnostični pomen.

Ugotovili smo nekoliko boljšo korelacijo med CDT% in GGT pri moških kot pri ženskah v celotni skupini. Prav tako smo ugotovili nekoliko boljšo korelacijo med deležem CDT v serumu in serumsko aktivnostjo GGT pri moških kot pri ženskah v skupini kroničnih alkoholikov. V tem primeru korelacija pri moških kaže šibko povezavo, medtem ko pri ženskah povezave sploh ni.

Rezultati so potrdili da CDT% predstavlja odličen test za določanje zlorabe alkohola ter spremljanje abstinence.

Iz rezultatov lahko predpostavimo da je meritev aktivnosti GGT v serumu bolj zanesljiva pri ženskah kot pri moških.

7 Reference

1. Hudolin V. Psihijatrija. Zagreb: Stvarnost, 1984.
2. <https://sl.wikipedia.org/wiki/Etanol>: marec, 2016.
3. <http://www.geneplanet.si/genetska-analiza/seznam-analiz/presnova-alkohola.html/>: februar 2016.
4. Zakhari S. Overview: How is alcohol metabolized. Alcohol research and health, 2006;29:245-254.
5. Kumar V, Abbas A, Fausto N, Aster J. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease, 8. Izdaja. Philadelphija: Saunders, 2009.
6. Albano E. Free radical mechanisms of ethanol toxicity. Toxicology of the human environment. Rhodes C, Taylor & Francis, 2000;235-263.
7. Štraus B. Štrausova klinična biokemija. Zagreb: Medicinska naklada, 2009.
8. Niemela O. Biomarkers in alcoholism. Clinica Acta 2007;377:39-49.
9. <http://emedicine.medscape.com/article/2087224-overview>: marec 2016.
10. <http://emedicine.medscape.com/article/2087247-overview>: marec 2016.
11. Levitskoy J, Mailliard ME. Diagnosis and therapy of alcoholic liver disease. Seminar liver disease 2004;24.
12. Bartolotto F, De Paoli G, Tagliaro F. Carbohydrate-deficient transferrin as marker of alcohol abuse: A critical review of the literature 2001-2005. J.Chromatogr. B 2006;841:96-109.
13. Torsten A. Carbohydrate deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse. Clin Chem 2001;47:13-27
14. Vaillant G. A long-term follow-up of male alcohol abuse. Arch Gen Psychiatry 1996;53:243-249.
15. Hudolin V. Alkohološki priručnik. Zagreb: Medicinska naklada, 1991.

16. Fernandez-Sola J, Nicolas JM, Estruch R, Urbano-Marquez. Gender differences in alcohol pathology. In: Preddy VR, Watson RR, eds. Comprehensive handbook of alcohol related pathology. Vol 1. London: Elsevier Academic Press, 2005:261-278.
17. SOP - Določanje katalitične aktivnosti gama glutamiltransferaze. Ljubljana: Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo; 3. izdaja, oznaka 146/51.
18. SOP - PLL S-CDT. Ljubljana: Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo; 2. izdaja, oznaka 53/55.
19. Whitfield JB, Fletcher LM, Murphy TL, Powell LW, Halliday J, Heath AC and Martin NG. Smoking, obesity, and hypertension after the dose-response curve and test sensitivity of carbohydrate-deficient transferrin as a marker of alcohol intake. Clin Chem 1998;44:2480-2489.
20. Stiber H. Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. Clin Chem 1991;37:2029-2037.
21. Glanz J, Grant B, Monteiro M, Tabakoff B. WHO/ISBRA study of state and trait markers of alcohol use and dependence: analysis of demographic, behavioral, physiologic and drinking variables that contribute to dependence and seeking treatment. Alcohol Clin Exp Res 2002;26:1047-1061.
22. Arndt T. Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. Clin Chem 2001;47:13-27.
23. Hietala J, Koivisto H, Antila P, Niemela O. Comparison of the combined marker GGT-CDT and the conventional laboratory markers of alcohol abuse in heavy drinkers, moderate drinkers and abstainers. Alcohol & Alcoholism 2006;41:528-533.
24. Spiegel DR. 'I'm sober, Doctor, really': Best biomarkers for underreported alcohol use. Current Psychiatry 2008;7:15-22.
25. Maskić N, Vodnik T, Stanković M, Milovanović S, Radivojević Lj, Obradović I, Dajak M, Majkić-Singh N. Carbohydrate-deficient transferrin – a contemporary biomarker in comparison with traditional laboratory markers of chronic alcohol abuse. JBM 2010;29:95-101.

8 Priloge

Preglednica I: Razpon rezultatov meritev CDT% in aktivnosti GGT v serumu

Pacient	S-CDT%	S-gama-GT μ kat/L
1	0,9	0,16
2	0,7	0,48
3	0,5	0,66
4	0,6	1,02
5	1,1	0,37
6	0,8	0,83
7	0,8	0,28
8	0,9	1,16
9	1,1	0,23
10	0,9	0,57
11	0,5	0,30
12	1,0	0,89
13	0,8	1,06
14	0,6	1,44
15	0,6	1,52
16	0,1	2,42
17	1,1	2,03
18	0,7	10,69
19	0,3	0,35
20	0,9	0,37
21	0,5	0,31
22	0,6	0,52
23	0,8	1,14
24	0,8	0,44
25	0,8	0,55
26	0,9	0,45
27	0,6	2,19
28	1,1	0,25
29	0,6	1,21
30	0,6	0,43
31	0,6	0,35
32	0,3	0,61
33	0,4	0,54
34	0,4	0,65
35	1,1	7,35
36	0,9	1,47
37	0,2	0,36
38	0,9	1,11
39	0,5	0,36

40	0,8	2,09
41	1,0	0,49
42	0,6	0,40
43	1,4	1,05
44	0,9	0,27
45	0,4	1,68
46	0,6	0,46
47	1,2	2,78
48	1,0	1,81
49	0,8	1,28
50	0,5	4,46
51	1,0	0,26
52	0,2	0,94
53	1,1	0,58
54	0,7	0,71
55	0,6	0,25
56	1,1	0,26
57	1,0	0,73
58	0,7	1,05
59	0,3	1,26
60	1,1	4,57
61	0,9	0,51
62	0,6	0,16
63	1,2	0,59
64	1,2	0,64
65	1,3	0,54
66	0,9	2,06
67	0,7	1,36
68	0,5	4,22
69	1,1	0,73
70	0,7	0,34
71	1,0	0,19
72	0,3	0,64
73	0,8	0,30
74	0,7	0,37
75	0,8	0,22
76	4,2	24,34
77	1,9	0,30
78	1,5	5,05
79	1,4	1,24
80	1,4	6,74
81	3,3	0,58
82	2,2	3,64
83	1,2	0,87

84	1,7	28,96
85	1,6	1,04
86	1,3	0,72
87	1,7	0,70
88	1,5	20,84
89	2,2	0,75
90	4,0	0,73
91	1,6	2,27
92	2,3	0,33
93	2,8	22,80

Z rdečo barvo so označeni bolniki s kronično zlorabo alkohola.

Preglednica II: Rastoče vrednosti CDT% in vrednosti GGT pri moških in ženskah

Pacient	S-CDT%	S-gama-GT μ kat/L pri moških	S-gama-GT μ kat/L pri ženskah
16	0,1	2,42	
37	0,2	0,36	
52	0,2		0,94
19	0,3	0,35	
59	0,3	1,26	
72	0,3	0,64	
32	0,3		0,61
33	0,4		0,54
34	0,4		0,65
45	0,4		1,68
3	0,5	0,66	
11	0,5	0,3	
21	0,5	0,31	
39	0,5	0,36	
50	0,5	4,46	
68	0,5	4,22	
4	0,6	1,02	
15	0,6	1,52	
22	0,6	0,52	
27	0,6	2,19	
29	0,6	1,21	
31	0,6	0,35	
42	0,6	0,4	
62	0,6	0,16	
14	0,6		1,44
46	0,6		0,46
55	0,6		0,25
30	0,6		0,43
2	0,7	0,48	
58	0,7	1,05	
67	0,7	1,36	
74	0,7	0,37	
18	0,7		10,69
54	0,7		0,71
70	0,7		0,34
6	0,8	0,83	
23	0,8	1,14	
24	0,8	0,44	
49	0,8	1,28	

7	0,8		0,28
13	0,8		1,06
25	0,8		0,55
40	0,8		2,09
73	0,8		0,3
75	0,8		0,22
1	0,9	0,16	
8	0,9	1,16	
10	0,9	0,57	
20	0,9	0,37	
26	0,9	0,45	
36	0,9	1,47	
38	0,9	1,11	
61	0,9	0,51	
44	0,9		0,27
66	0,9		2,06
12	1	0,89	
41	1	0,49	
48	1	1,81	
51	1		0,26
57	1		0,73
71	1		0,19
5	1,1	0,37	
9	1,1	0,23	
28	1,1	0,25	
35	1,1	7,35	
53	1,1	0,58	
56	1,1	0,26	
69	1,1	0,73	
17	1,1		2,03
60	1,1		4,57
47	1,2	2,78	
63	1,2	0,59	
64	1,2	0,64	
83	1,2	0,87	
65	1,3	0,54	
86	1,3		0,72
79	1,4	1,24	
80	1,4	6,74	
43	1,4		1,05
78	1,5	5,05	
88	1,5	20,84	

85	1,6		1,04
91	1,6		2,27
87	1,7	0,7	
84	1,7		28,96
77	1,9	0,3	
89	2,2	0,75	
82	2,2		3,64
92	2,3	0,33	
93	2,8	22,8	
81	3,3	0,58	
90	4	0,73	
76	4,2	24,34	

Z rdečo barvo so označeni pacienti z deležom CDT nad zgornjo referenčno mejo. Z oranžno barvo so označeni pacienti moškega spola s povišano aktivnostjo GGT. Z rumeno barvo so označeni pacienti ženskega spola s povišano aktivnostjo GGT.