

Z warsztatów badawczych i doświadczeń klinicznych

DESIALOWANA TRANSFERYNA I INNE BIAŁKOWE BIOCHEMICZNE WSKAŹNIKI NADUŻYWANIA ALKOHOLU

Beata Augustyńska¹, Marcin Ziółkowski², Lech Torliński^{1,3}, Janusz Rybakowski⁴

1. Katedra i Zakład Patobiochemii i Chemii Klinicznej Akademii Medycznej
w Bydgoszczy

2. Zakład Pielęgniarstwa Psychiatrycznego Akademii Medycznej w Bydgoszczy

3. Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej Akademii Medycznej w Poznaniu

4. Klinika Psychiatrii Dorosłych Akademii Medycznej w Poznaniu

CARBOHYDRATE-DEFICIENT TRANSFERRIN AND OTHER PROTEIN BIOCHEMICAL MARKERS OF ALCOHOL ABUSE.

ABSTRACT – Laboratory tests for alcohol abuse, alcohol dependence or drinking relapse are based mainly on detection of metabolic changes produced by alcohol drinking. Data obtained that way are important for identification of current heavy drinkers. Ethanol consumption affects transferrin polymorphism resulting in an increased concentration of carbohydrate-deficient transferrin (CDT). Increased CDT concentration levels are observed in alcohol dependent subjects. Such an increase is irrespective of non-alcohol liver diseases and becomes normalized after about 4 weeks of alcohol abstinence. Specificity of CDT concentration as a marker of alcohol abuse is high. Alcohol abuse results also in an increased activity of beta-hexoaminidase, aspartate transaminase (AspAT), alanine transaminase (AlAT), and gamma-glutamyltransferase (g-GT). Among these enzymes, the one most specific as a marker of alcohol abuse is an increased activity of g-GT. Protein-acetaldehyde adducts (protein-AAAs) are formed in vivo during chronic alcohol ingestion. The protein-AAAs reported so far include a 37KD protein-AA in liver cytosol, cytP450IIE 1-AA in hepatic microsomes, hemoglobin-AA, and serum protein-AAAs. Alcohol abuse leads also to changes in the concentration of electrophoret fractions, immunoglobulins, and C3c protein. However, since specificity of such changes is low, their utility as biochemical markers of alcohol abuse is rather limited.

Key words: alcohol dependence, serum proteins, biochemical markers of alcohol abuse, carbohydrate-deficient transferrin

WSTĘP

Długotrwałe nadużywanie alkoholu prowadzi m.in. do zmian zwyrodnieniowych w mięśniu sercowym, błonach śluzowych przewodu pokarmowego, w trzustce oraz w wątrobie (10, 18, 58). Występowanie zmian strukturalnych w tych narządach o charakterze zwyrodnień lub zaników jest zwykle poprzedzone zmianami biochemicz-

nymi. Najlepszym sposobem ich oceny wydaje się być tzw. „biopsja biochemiczna” polegająca na badaniu w surowicy krwi stężenia białek i aktywności enzymów uwalnianych z komórek tych narządów, a będących biochemicznymi wskaźnikami nadużywania alkoholu (59, 63).

Idealny wskaźnik służący do identyfikacji nadużywania alkoholu powinien charakteryzować się odpowiednią czułością i specyficznością (rzędu 90%), powinien rozpoznawać różne poziomy konsumpcji alkoholu, nie powinien zmieniać się w chorobach wątroby nie związanych z nadużywaniem alkoholu, a jego oznaczenie powinno być łatwe do wykonania (44, 48, 63). Do tej pory nie znaleziono markera, który spełniałby wszystkie te warunki. Niemniej jednak lepsze poznanie procesów związanych ze spożywaniem alkoholu może znacznie ułatwić identyfikację jego nadużywania, która może być przydatna w monitorowaniu leczenia uzależnienia alkoholowego (22, 69).

W niniejszym przeglądzie piśmiennictwa omówiono białkowe wskaźniki nadużywania alkoholu, ze szczególnym uwzględnieniem desialowanej transferyny.

Transferyna oraz transferyna o małej zawartości kwasu sialowego (CDT)

Transferyna jest glikoproteina, zbudowaną z pojedynczego łańcucha peptydowego. Wyróżnić można dwie podobne, chociaż odmienne domeny: C- i N-końcową. W każdej z nich znajduje się miejsce wiążące jon żelaza. Z uwagi na zawartość żelaza w cząsteczce transferyny, w osoczu można wyróżnić cztery pochodne: apotransferynę, monożelazową transferynę z jonem żelaza w domenie N-terminalnej i w domenie C-terminalnej oraz diżelazową transferynę. Domena C-terminalna posiada dodatkowo dwa boczne łańcuchy węglowodanowe, które mogą zawierać tetra-, penta-, względnie heksa-sialowe (N-acetyleneuraminowe) rozgałęzienia (16, 21).

W większości populacji ludzkiej fenotyp związany z transferyną (więcej niż 95% w populacji europejskiej) to fenotyp C. Fenotyp C – główny komponent transferyny zawiera cztery cząsteczki kwasu sialowego w jednej cząsteczce białka (tetrasialto-transferyna). Wykazano obecność ponad 20 polimorficznych form tego białka (16, 40). Oprócz niego występują jeszcze dwa fenotypy: B i D. Fenotyp D wydaje się występować rzadko, prawdopodobnie obecny jest u mniej niż jednego procenta osób rasy białej natomiast może być nieznacznie wyższy w populacji azjatyckiej, afrykańskiej i wśród niektórych Indian z Ameryki Południowej (1).

Synteza transferyny odbywa się w wątrobie, a biologiczną funkcją transferyny jest transport żelaza. Chociaż każda cząsteczka białka może związać dwa jony żelaza, jednak w warunkach fizjologicznych tylko część (30%) cząsteczek transferyny jest wysycona żelazem. Transferyna pełni również ważną rolę w procesach nieswoistej odporności na zakażenie bakteryjne oraz w swoistych reakcjach immunologicznych (16, 35, 40).

Spożywanie etanolu może wpływać na polimorfizm transferyny. U pacjentów nadużywających alkohol wykazano zwiększoną ilość disialotransferyny, mono- i asialotransferyny. Stwierdzono również zwiększone stężenie tetrasialto-transferyny, które powraca do normy w trakcie abstynencji (11). Długotrwałe spożywanie alkoholu

doprowadza do redukcji liczby łańcuchów węglowodanów związanych z cząsteczką transferyny – powstaje transferyna desialowana – CDT (carbohydrate-deficient transferrin) (34, 52, 53). Ta forma transferyny stanowi 5-10% całej transferyny u osób uzależnionych od alkoholu.

Mechanizm przemiany transferyny w transferynę desialowaną nie jest do końca poznany. Najprawdopodobniej nadużywanie alkoholu zmniejsza aktywność glikozylotransferazy glikoproteinowej. Wykazano bowiem, że aldehyd octowy będący produktem przemiany alkoholu w organizmie powoduje hamowanie aktywności tego enzymu (44, 49, 51). Miejszem, w hepatocytach, w którym następuje zakłócenie glikozylacji transferyny po spożyciu dużej dawki alkoholu, jest aparat Golgiego (46, 47).

U osób z transferyną o fenotypie D wykazano tendencję do występowania nieproporcjonalnie wysokich stężeń CDT. Sytuacja odwrotna występuje u osób z transferyną o fenotypie B, gdzie znacznie częściej mogą występować niskie stężenia CDT niezależnie od ilości spożywanego alkoholu (1, 53). Wysokie stężenia CDT, bez względu na picie alkoholu, wykazano u badanych z wrodzoną wadą metabolizmu glikoprotein oraz u osób ze zmianami struktury transferyny uwarunkowanymi genetycznie (11).

Arndt (6), Stowell (56) oraz Cotton i wsp. (14) uważają, że stężenie CDT jest wskaźnikiem szczególnie przydatnym dla identyfikacji osób o wysokim spożyciu alkoholu. Stibler (50) oraz Mihás i Tavassoli (38) na podstawie swych badań doszli do wniosku, że stężenie CDT jest najbardziej dokładnym wyznacznikiem biochemicznym nadmiernej konsumpcji alkoholu. Przy jego zastosowaniu można wykazać, że nadmierne spożycie alkoholu nastąpiło niedawno i odróżnić taki stan od stanu abstynencji lub konsumpcji alkoholu w niewielkich ilościach.

Sillanauke i wsp. (46) wykazali, że u wszystkich badanych, którzy spożywali więcej niż 1000 g etanolu w ciągu tygodnia poprzedzającego badanie, stężenie CDT okazało się czułym wskaźnikiem spożycia alkoholu. Jednak w grupie mężczyzn, którzy wypili mniej niż 1000 g etanolu w ciągu ostatniego tygodnia, wzrost stężenia CDT w surowicy nie korelował z ilością spożytego alkoholu.

Według Kwok-Gain i wsp. (29) stężenie CDT jest niezależne od obecności uszkodzeń wątroby związanych z nadużywaniem alkoholu. Potwierdzają to również badania Behrens i wsp. (8) oraz Allena i wsp. (1), którzy wykazali, że u pacjentów uzależnionych od alkoholu z współistniejącą chorobą wątroby stężenie CDT nie różniło się statystycznie istotnie od wartości u pacjentów uzależnionych ale nie cierpiących na schorzenia wątroby. Wyżej wymienieni autorzy wskazują na brak korelacji między stężeniem CDT, a współistnieniem chorób wątroby (8, 29).

Allen i wsp. (1) przyjmują, że czas utrzymywania się podwyższonego stężenia CDT od momentu rozpoczęcia abstynencji wynosi ok. cztery tygodnie, jednak inni badacze np. Storey i wsp. (55) określili czas ten na trzy tygodnie, a Bell i wsp. (9) stwierdzili normalizację stężenia CDT u pacjentów z początkowymi wysokimi wartościami CDT już po dwóch tygodniach.

Pomiar stężenia CDT stosowano przy monitorowaniu utrzymywania abstynencji w trakcie leczenia odwykowego. Behrens i wsp. (8) i Stibler i wsp. (54) odnotowali podwyższenie stężenia CDT u chorych z nawrotem choroby w okresie krótszym, niż

z reguły wymagany jest do początkowego wzrostu stężenia CDT (tzn. krótszym niż cztery tygodnie).

Jednak u części pacjentów nawrotom picia może nie towarzyszyć podwyższenie stężenia CDT. Np. Carlsson i wsp. (13) u niektórych chorych stwierdzili wzrost stężenia 5-hydroksytryptofolu (markera konsumpcji alkoholu), przy braku wzrostu stężenia CDT. Tak więc kwestia czy podwyższone stężenie CDT może być jednoznacznie traktowane jako wskaźnik nawrotu picia pozostaje dotychczas nierozstrzygnięta.

Większość badań związanych z CDT wykonywana była w grupach mężczyzn w średnim wieku, rasy białej. W badaniu uzależnionych od alkoholu chorych populacji białej i czarnej, Behrens i wsp. (8) nie zauważyli różnic w stężeniu CDT.

Stwierdzono, że stężenie CDT u kobiet spożywających niewielkie dawki alkoholu kształtuje się na wyższym poziomie niż u mężczyzn. Przyczyna tego zjawiska nie jest jeszcze dokładnie poznana. Wydaje się, że nie mogą być za to odpowiedzialne czynniki hormonalne, ponieważ stężenie CDT nie jest podwyższone u kobiet ciężarnych, ani u tych, które przyjmują doustne środki antykoncepcyjne (1, 36). W swoich badaniach Anton i Moak (5) zaobserwowali, że u kobiet stężenie CDT zarówno przy niskiej jak i wysokiej konsumpcji alkoholu wykazywało dodatnią korelację ze wzrostem stężenia żelaza w surowicy krwi. U mężczyzn natomiast korelacja ta występowała tylko u osób spożywających duże ilości alkoholu (5, 55).

Nilssen i wsp. (43) i Wetterling i wsp. (64) nie potwierdzają wysokiej czułości i specyficzności CDT jako wskaźnika nadużywania alkoholu. Według tych autorów stężenie CDT lepiej różnicuje badanych spożywających nieduże dawki alkoholu, natomiast dla różnicowania osób o wysokim spożyciu alkoholu lepsze jest oznaczenie stężenia gammaglutamylotranspeptydazy (GGTP) (39, 43).

Podsumowując można stwierdzić, że zmiany stężenia CDT jako wskaźnika nadużywania alkoholu wydają się najbardziej zbliżone do wzorca „idealnego” wskaźnika nadużywania alkoholu. Większość z przytoczonych danych z badań eksperymentalnych wskazuje, że na stężenie CDT nie mają wpływu niealkoholowe choroby wątroby, wyniki oznaczeń normalizują się w ciągu 4 tygodni od zaprzestania nadużywania alkoholu. Badanie to umożliwia odróżnienie osób nadmiernie spożywających alkohol od osób spożywających alkohol w małych ilościach.

Beta-heksozoaminidaza, transferaza glutamyłowa (g-GT), aminotransferaza asparaginianowa (AspAT) i alaninowa (AlAT)

Jednym z enzymów stosowanym jako wskaźnik nadużywania alkoholu jest beta-heksozoaminidaza. Jest to lizosomalna glikozydaza obecna w komórkach wielu narządów człowieka. Niewątpliwą zaletą oznaczania aktywności tego enzymu jest fakt szybkiego obniżania jego aktywności po przerwaniu picia alkoholu i szybkiego wzrostu aktywności po wznowieniu picia (61). Niektórzy autorzy uznają ten marker za niespecyficzny. Po spożyciu alkoholu aktywność tego enzymu wzrasta zarówno w surowicy, jak i w moczu. Wzrost aktywności beta-heksozoaminidazy w surowicy jest również obserwowany w niealkoholowych chorobach wątroby oraz w ciąży (24, 25,

44, 62). Natomiast wzrost jego aktywności w moczu opisywano także w innych schorzeniach np. cukrzyca, nadciśnieniu, infekcjach dróg moczowych (28).

g-GT katalizuje przeniesienie reszty g-glutamylowej z glutationu na aminokwas. Enzym ten występuje w wielu tkankach, a w największym stężeniu w nerkach, trzustce, wątrobie i mózgu.

Aktywność g-GT w komórkach wątrobowych jest mała, natomiast dużą aktywność wykazują komórki nabłonka wyściełającego przewody żółciowe (44, 45). W stanach prawidłowych w żółci stwierdza się dużą aktywność g-GT, a każdy zastój lub utrudnienie odpływu żółci powodują zwiększenie aktywności enzymu w surowicy krwi (44, 51). Aktywność g-GT zwiększa się również w ostrym wirusowym zapaleniu wątroby i w przebiegu zawału mięśnia sercowego.

U osób nadużywających alkoholu do wzrostu stężenia g-GT dochodzi z jednej strony na skutek indukcji syntezy enzymu przez etanol, z drugiej zaś zjawisko to wynika z toksycznego wpływu alkoholu na wątrobę (3, 4, 17, 57).

Oznaczanie aktywności g-GT jest często stosowanym testem laboratoryjnym w badaniu nadużywania alkoholu. Nie jest on przydatny w badaniach populacyjnych w wykrywaniu osób intensywnie pijących, lecz nadaje się dobrze do śledzenia dynamiki picia w indywidualnych przypadkach, ponieważ w okresie abstynencji aktywność g-GT szybko wraca do normy, a nawrót picia powoduje ponowny jej wzrost (44, 45, 51, 59).

AspAT jest enzymem wewnątrzkomórkowym, który katalizuje odwracalną reakcję przeniesienia grupy aminowej z asparaginianu na α -ketoglutaran z wytworzeniem glutaminianu, z udziałem fosforanu pirydoksalu jako koenzymu.

Najwyższe stężenia AspAT występują w mięśniu sercowym, wątrobie, mięśniach szkieletowych, nerkach i erytrocytach. Enzym ten umiejscowiony jest w mitochondriach oraz w cytozolu komórkowym (27). Podwyższenie aktywności AspAT w osoczu wskazuje raczej na uszkodzenie komórek narządu, niż na zaburzenie jego funkcji. Dlatego też wzrost aktywności enzymu stwierdzany jest u badanych spożywających duże ilości alkoholu (3, 4, 17, 57).

Badania aktywności mitochondrialnej AspAT (mAspAT) w surowicy osób nadużywających alkoholu wykazały, że jest ona wyższa, niż można by oczekiwać biorąc pod uwagę całkowitą aktywność AspAT. Niektórzy badacze proponują więc, aby stosunek mAspAT/AspAT uznać za biochemiczny marker nadużywania alkoholu, uważając, że jego specyficzność sięga 80% (60). Badania Kwoh-Gain i wsp. (29) wskazują, że mAspAT/AspAT może być czułym biochemicznym markerem przewlekłego spożycia alkoholu.

AlAT katalizuje odwracalną reakcję przeniesienia grupy aminowej z alaniny na α -ketoglutaran z wytworzeniem glutaminianu, z udziałem fosforanu pirydoksalu jako koenzymu. Najwyższe stężenie AlAT stwierdza się w wątrobie, a niższe w mięśniach szkieletowych, sercu i nerkach.

Przewlekłe nadużywanie alkoholu może powodować wzrost aktywności AspAT i AlAT w surowicy (2, 9, 14, 19, 43, 56). Może to być skutkiem zwiększonej przepuszczalności błon komórkowych lub obumierania komórek. Czułość AspAT jako wskaźnika nadużywania alkoholu wynosi ok. 35%, czułość AlAT jest jeszcze niższa.

Badanie aktywności AspAT i AlAT jako wskaźników biochemicznych nadużywania alkoholu cechuje relatywnie niska specyficzność. Wydaje się, że w tym celu bardziej przydatna jest ocena stosunku mAspAT/AspAT. Ocena aktywności g-GT wydaje się być przydatna przy indywidualnej ocenie utrzymywania przez osobę badaną abstynencji od alkoholu.

Aldehydowe addukty białkowe, frakcje elektroforetyczne białek surowicy, immunoglobuliny surowicy, składowa dopełniacza – białko C3c surowicy

Podczas chronicznego spożycia alkoholu powstają *in vivo* aldehydowe addukty białkowe (białka-AA), do których zalicza się cytozolowe białko 37KD-AA, mikrosomalny cytochrom P450IIE-AA, aldehydową-hemoglobinę i inne białka surowicy (31, 32, 44). Indukowana etanolem forma hemoglobiny obecna jest w surowicy do kilku dni po spożyciu alkoholu (44). Lin i wsp. oraz inni badacze uznają wzrost stężenia aldehydowej-hemoglobiny za marker nadużywania alkoholu (23, 31, 42, 44). Ma i wsp. stwierdzają podwyższone stężenie adduktów białkowych nie tylko u osób nadużywających alkoholu, ale także u osób chorych na inne niż alkoholowe choroby wątroby (33).

Metoda elektroforezy pozwala uwidocznic 5 głównych frakcji białek o zbliżonej ruchliwości w polu elektrycznym: albuminową oraz a_1 -, a_2 -, b- i g-globulinową. Każda frakcja globulinowa zawiera liczne białka indywidualne (3, 4, 17).

Obniżenie stężenia albumin uważane jest przez niektórych za biochemiczny wskaźnik nadużywania alkoholu (20).

Stwierdzono, że etanol hamuje odpowiedź limfocytów B na niespecyficzną stymulację mitogenną, a także może zahamować proliferację limfocytów B wywołaną pojawieniem się antygeny. Wykazane przez niektórych badaczy obniżenie stężenia g-globulin u osób uzależnionych od alkoholu może być konsekwencją tego procesu (68, 69).

Wyróżnia się pięć klas przeciwciał na podstawie wzorca sekwencji aminokwasów, znajdujących się w stałej części łańcucha ciężkiego: IgD, IgM, IgG, IgA oraz IgE.

Daniluk i wsp. (15) stwierdzili, że oprócz upośledzonej komórkowej odpowiedzi immunologicznej u osób przewlekle nadużywających alkoholu stwierdza się zmiany w humoralnej odpowiedzi immunologicznej. U osób nadużywających alkoholu stwierdza się wysokie stężenie IgA (65, 66). Patomechanizm wzrostu IgA u osób nadużywających alkoholu nie jest w pełni wyjaśniony, ale można przypuszczać, że zwiększenie na skutek działania alkoholu przepuszczalności ściany jelit dla antygenów bakteryjnych powoduje ich przenikanie do krwiobiegu i nadmierne wytwarzanie IgA w tkance limfatycznej obecnej w jelitach (15, 37).

W miarę progresji zmian histopatologicznych rośnie częstość występowania przeciwciał przeciw błonie hepatocytów i wykrywa się je najczęściej u chorych z alkoholową marskością wątroby. Są one charakterystyczne dla autoimmunologicznego zapalenia wątroby, należą do klasy IgG i IgA (15).

W badaniach Augustyńskiej i wsp. (7) wykonanych u mężczyzn leczonych szpitalnie z powodu uzależnienia od alkoholu stwierdzono niższe stężenie immunoglobulin klasy G w porównaniu z osobami pijącymi nadmiernie alkoholu.

Zmiany w mechanizmie odpornościowym humoralnym i komórkowym może wywoływać sam alkohol na drodze toksycznego działania (26, 41, 67). Mogą tu jednak odgrywać rolę i inne czynniki, a wśród nich zwłaszcza niedobory pokarmowe (12). Bogdał (10) stwierdził bardzo niską liczbę limfocytów T u osób uzależnionych od alkoholu odżywiających się nieregularnie oraz niewystarczająco ilościowo i jakościowo.

Białko C3c surowicy jest składnikiem komplementu.. Zmniejszenie jego stężenia (spowodowane zwiększonym zużyciem) jest charakterystyczne dla chorób autoimmunologicznych przebiegających z powstawaniem kompleksów immunologicznych, np. w kłębuszkowym zapaleniu nerek i toczniu rumieniowatym. W chorobach tych zmniejszenie stężenia tego białka jest proporcjonalne do nasilenia procesu chorobowego, a normalizacja ma korzystne znaczenie rokownicze. Natomiast wzrost stężenia C3c jest nieswoistym wskaźnikiem wzrostu białek ostrej fazy, jaki obserwuje się w wielu uszkodzeniach tkankowych i procesach zapalnych.

Leskowski i wsp. (30) stwierdzili obniżenie poziomu białka C3 u osób uzależnionych od alkoholu. Podobnie w badaniach własnych (7) stwierdziliśmy zmniejszenie stężenia białka C3c u chorych leczonych odwykowo z powodu uzależnienia alkoholowego w porównaniu z osobami, które nie nadużywały alkoholu.

Przedstawione wyżej badania wskazują, że ze względu na niską czułość diagnostyczną w ocenie nadużywania alkoholu zmian stężeń frakcji elektroforetycznych surowicy (albuminy, g-globuliny), immunoglobulin (klasa A oraz G) oraz białka C3c surowicy, cechują się one niewielką przydatnością kliniczną jako biochemiczne wskaźniki nadużywania alkoholu.

STRESZCZENIE

Laboratoryjna weryfikacja nadużywania alkoholu, stanu uzależnienia lub przerwania abstynencji opiera się głównie na wykrywaniu zmian metabolicznych spowodowanych przez alkohol. Tak uzyskane dane są ważnym elementem w identyfikacji osób aktualnie pijących duże ilości alkoholu. Spożywanie etanolu wpływa na polimorfizm transferyny powodując zwiększenie stężenia jej postaci desialowanej (CDT). U osób z zespołem zależności alkoholowej obserwuje się wzrost stężenia CDT. Występuje ono niezależnie od towarzyszących niealkoholowych chorób wątroby i normalizuje się po ok. czterech tygodniach utrzymywania abstynencji od alkoholu. Specyficzność oznaczania stężenia CDT jako wskaźnika nadużywania alkoholu jest wysoka. Nadużywanie alkoholu wpływa również na wzrost aktywności beta-heksozoaminidazy, aminotransferaz: asparaginianowej (AspAT) i alaninowej (AlAT) oraz gammaglutamylotranspeptydazy (g-GT). Spośród tych enzymów największą specyficznością jako wskaźnik nadużywania alkoholu charakteryzuje się wzrost aktywności g-GT. Podczas chronicznego spożycia alkoholu powstają in vivo aldehydowe addukty białkowe; wzrost stężenia aldehydowej-hemoglobiny uznawany jest za marker nadużywania alkoholu. Nadużywanie alkoholu doprowadza również do zmian w zakresie stężenia frakcji elektroforetycznych surowicy, immunoglobulin i białka C3c.

Ich specyficzność jest jednak mała, co stanowi o ich niewielkiej przydatności jako biochemicznych wskaźników nadużywania alkoholu.

Słowa kluczowe: uzależnienie alkoholowe, białka osocza, biochemiczne markery nadużywania alkoholu, desialowana transferyna

PIŚMIENNICTWO

1. Allen J. P., Litten R. Z., Anton R. F., Cross G. M.: *Carbohydrate-deficient transferrin as a measure of immoderate drinking: remaining issues*. Alc. Clin. Exp. Res., 1994, 18, 4, 799-812.
2. Allen J., Litten R.Z., Lee A.: *What you need to know: detecting alcohol problems in general medical practice*. Singapore Med. J., 1998, 39, 1, 38-41.
3. Angielski S., Dominiczak M.M.: *Biochemia kliniczna*. Gdańsk 1993.
4. Angielski S., Jakubowski Z., Dominiczak M.M.: *Biochemia kliniczna*, Wyd. Perseusz, Gdańsk 1996.
5. Anton R.F., Moak D.H.: *Carbohydrate-deficient transferrin and gamma-glutamyltransferase as markers of heavy alcohol consumption*, Alc. Clin. Exp. Res., 1994, 18, 3, 747-54.
6. Arndt T., Hackler R., Kleine T.O., Gressner A.M.: *Validation by isoelectric focusing of the anion-exchange isotransferrin fractionation step involved in determination of carbohydrate-deficient transferrin by the CDTest assay*. Clin. Chem., 1998, 44, 1, 27-34.
7. Augustyńska B., Ziółkowski M., Torliński L., Lampka M., Serówka E., Rybakowski J.: *Odporność humoralna u mężczyzn uzależnionych od alkoholu po 30-dniowej terapii odwykowej*. Alkoholizm i Narkomania, 1999, 1, 34, 55-63.
8. Behrens U. J., Womer T. M., Braly L. F., Schaffner F., Lieber C. S.: *Carbohydrate-deficient transferrin, a marker for chronic alcohol consumption in different ethnic populations*. Alc. Clin. Exp. Res., 1988, 12, 427-432.
9. Bell H., Tallaksen Ch., Sjaheim T., Weberg R., Raknerud N., Orjasaeter H., Try K., Haug E.: *Serum carbohydrate-deficient transferin as a marker of alcohol consumption in patients with chronic liver diseases*. Alc. Clin. Exp. Res., 1993, 17, 2, 246-52.
10. Bogdał J.: *Zachowanie się wybranych parametrów immunologicznych u nalogowych alkoholików w odniesieniu do obrazu morfologicznego wątroby*. Pol. Arch. Med. Wewn., 1980, 64, 2, 105.
11. Borg S., Helander A., Beck O., Carlson A.V., Stilber H.: *New markers of alcohol consumption: CDT and 5 HTOL*. Past, Present and Future of Psychiatry, IX World Congress of Psychiatry, 1993, I, 6-12, 3-7.
12. Boyett J.D., Sullivan J.F.: *Distribution of protein-bound zinc in normal and abnormal serum*. Metabolism, 1970, 19, 148.
13. Carlsson A.V., Hiltunen A.J., Beck O., Stilber H., Borg S.: *Detection of relapses in alcohol-dependent patients: comparison of carbohydrate-deficient transferin in serum, 5-hydroxytryptofol in urine, and self-reports*. Alc. Clin. Exp. Res., 1993, 17, 2, 703-708.
14. Cotton F., Adler M., Dumon J., Boeynaems J.M., Gulbis B.: *A simple method for carbohydrate-deficient transferin measurements in patients with alcohol abuse and hepato-gastro-intestinal diseases*. Ann. Clin. Biochem., 1998, 35 (Pt2), 268-73.

15. Daniluk J., Kandefler-Szerszeń M.: *Wpływ alkoholu na układ odpornościowy i cytokiny*. Post. Hig. Med. Dośw., 1998, 52, 1, 49-65.
16. De Jong G., Feelders R., van Noort W.L., van Eijk H.G.: *Transferrin microheterogeneity as a probe in normal and disease states*. Glycoconjugate J., 1995, 12, 219-226.
17. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W.: *Diagnostyka laboratoryjna*. Wyd. Volumed, Wrocław 1998.
18. Flisiak R., Boroń-Kaczmarska A., Bobrowska E.: *Diagnostyczne i prognostyczne znaczenie oceny wybranych wskaźników humoralnej odczynności immunologicznej w poalkoholowej patologii wątroby*. Wiad. Lek., 1992, XLV, 11-12, 418-422.
19. Frezza M., Pozzato G., Chiesa L., Terpin M., Barbone F., Di Padova C.: *Abnormal serum gamma-glutamyltranspeptidase in alcoholics. Clues to its explanation*. Netherl. J. Med., 1989, 34, 22-28.
20. Gjerde H., Amundsen A., Skog O.-J., Morland J., Aasland O.G.: *Serum gamma-glutamyl-transferaze: an epidemiological indicator of alcohol consumption?* Br. J. Addict., 1987, 82, 1027-1031.
21. Graczyk A., Konarski J., Radomska K.: *Żelazo i jego funkcja w organizmie*. Mag. Med., 1993, 11, 49-51.
22. Habrat B.: *Metody rozpoznawania szkód zdrowotnych spowodowanych pićm alkoholu*. Alkoholizm i Narkomania, 1993, 13, 32-45.
23. Hazelett S.E., Liebelt R.A., Brown W.J., Androulakis V., Jarjoura D., Truitt E.B. Jr: *Evaluation of acetaldehyde-modified hemoglobin and other markers of chronic heavy alcohol use: effects of gender and hemoglobin concentration*. Alc. Clin. Exp. Res. 1998, 22, 1813-9.
24. Hultberg B., Isacson A.: *A possible explanation of for the occurrence of increased beta-hexosaminidase activity in pregnancy serum*. Clin. Chim. Acta, 1981, 113, 135-140.
25. Hultberg B., Isacson A., Jansson L.: *Beta-hexosaminidase in serum from patients with cirrhosis and cholestasis*. Enzyme, 1981, 26, 296-300.
26. Israel Y., Orrego H., Niemela O.: *Immune responses to alcohol metabolites: pathogenic and diagnostic implications*. Semin. Liver Dis., 1988, 8, 1, 81-90.
27. Jakubowski Z., Kabata J., Kalinowski L., Szczepańska-Konkol M., Angielski S.: *Badania laboratoryjne w codziennej praktyce*. wyd. IV Makmed, Gdańsk, 1996.
28. Karkkainen P., Poikolainen K., Salaspuro M.: *Serum beta-hexosaminidase as a marker of heavy drinking*. Alc. Clin. Exp. Res., 1990, 14, 187-190.
29. Kwoh-Gain I., Flechter L. M., Price J., Powell L. W., Halliday J. W.: *Desialated transferrin and mitochondrial aspartate aminotransferase compared as laboratory markers of excessive alcohol consumption*. Clin. Chem., 1990, 36, 6, 841-845.
30. Leskowski W., Gorczyca P., Scheller S., Król S., Czuba Z., Żydowicz G., Grylicka-Kroniec W.: *Ocena wybranych parametrów immunologicznych i biochemicznych krwi w zespole zależności alkoholowej*. Psych. Pol., 1996, XXX, 3, 297-306.
31. Lin R.C., Lumeng L.: *Formation of the 37KD protein-acetaldehyde adduct in liver during alcohol treatment is dependent on alcohol dehydrogenase activity*. Alcohol. Clin. Exp. Res., 1990, 14, 766-70.
32. Lin R.C., Lumeng L.: *Further studies on the 37 kD liver protein-acetaldehyde adduct that forms in vivo during chronic alcohol ingestion*. Hepatology, 1989, 10, 807-14.

33. Ma X.L., Baraona E., Hernandez Munoz R., Lieber C.S.: *High levels of acetaldehyde in nonalcoholic liver injury after threonine or ethanol administration*. Hepatology, 1989, 10, 933-40.
34. Mackiewicz A.: *Badanie mechanizmów regulujących glikozylację białek ostrej fazy*. Immunologia Pol., 1990, XV, 102, 47-64.
35. Marcinkiewicz J.: *Rola transferyny w zjawiskach odpornościowych*. Post. Hig. Med. Dośw., 1978, 32, 605-617.
36. Martensson O., Harlin A., Brandt R., Seppa K., Sillanaukee P.: *Transferrin isoform distribution: gender and alcohol consumption*. Alc. Clin. Exp. Res., 1997, 21, 9, 1710-1715.
37. Meillet D., Labrousse F., Benoit M.O., Hervann A., Musset L., van Amerongen G.: *Increased serum concentration of IgA2 subclass and IgA2/IgA1 ratio: specific markers of chronic alcoholic abuse?* Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1997, 35, 4, 275-279.
38. Mihás A.A., Tavassoli M.: *Laboratory markers of ethanol intake and abuse: A critical appraisal*. Am. J. Med. Sci., 1992, 303, 415-428.
39. Mitchell C., Simpson D., Chick J.: *Carbohydrate-deficient transferrin in detecting relapse in alcohol dependence*. Drug Alcohol Depend., 1997, 48, 2, 97-103.
40. Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W.: *Biochemia Harpera*. PZWL, Warszawa 1995.
41. Neuberger J., Crossley I.R., Saunders J.B., Davis M., Portmann B., Eddleston A.L., Williams R.: *Antibodies to alcohol altered liver cell determinants in patients with alcoholic liver disease*. Gut., 1984, 25, 3, 300-304.
42. Niemela O., Israel Y., Mizoi Y., Fukunaga T., Eriksson C.J.: *Hemoglobin-acetaldehyde adducts in human volunteers following acute ethanol ingestion*. Alcohol. Clin. Exp. Res., 1990, 14, 838-41.
43. Nilssen O., Huseby N.E., Hoyer G., Brenn T., Schirmer H., Forde O.H.: *New alcohol markers – how useful are they in population studies: the svalbard study 1988-89*. Alc. Clin. Exp. Res., 1992, 16, 1, 82-86.
44. Rosman A.: *Utility and evaluation of biochemical markers of alcohol consumption*. J. Subst. Abuse, 1992, 4, 277-297.
45. Salaspuro M.: *Characteristics of laboratory markers in alcohol-related organ damage*. Scand. J. Gastroenterol., 1989, 24, 7, 769-780.
46. Sillanaukee P., Seppa K., Lof K., Koviula T.: *CDT by anion-exchange chromatography followed RIA as a marker of heavy drinking among Men*. Alc. Clin. Exp. Res., 1993, 17, 2, 230-33.
47. Skrzydlewska E., Worowski K., Roszkowska-Jakimiec W.: *Metabolizm białek wątroby w zatruciu etanolem*. Post. Hig. Med. Dośw., 1992, 46, 1, 117-130.
48. Sox H.C. Jr: *Probability theory in the use of diagnostic tests. An introduction to critical study of the literature*. Ann. Intern. Med., 1986, 104, 1, 60-66
49. Stiasna I., Grabowska-Hibner J., Szukalski B.: *Biochemiczne aspekty alkoholizmu cz. II*. Post. Hig. Med. Dośw., 1979, 33, 325-343.
50. Stibler H.: *Carbohydrate-deficient transferrin in serum: A new Marker of Potentially Harmful Alcohol Consumption Reviewed*. Clin. Chem., 1991, 37, 2029-2037.
51. Stibler H., Borg S.: *Glycoprotein glycosyltransferase activities in serum in alcohol-abusing patients and healthy controls*. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1991, 51, 1, 43-51.

52. Stibler H., Borg S.: *Glycoprotein sialyl- and galactosyl transferase activities in erythrocyte membranes in alcoholic patients and healthy controls*. Drug Alcohol Depend., 1986, 16, 4, 331-340.
53. Stibler H., Borg S., Beckman G.: *Transferrin phenotype and level of carbohydrate-deficient transferrin in healthy individuals*. Alc. Clin. Exp. Res., 1988, 12, 3, 450-453.
54. Stibler H., Dahlgren L., Borg S.: *Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in serum in women with early alcohol addiction*. Alcohol., 1988, 5, 393-98.
55. Storey E.L., Mack U., Powell L.W., Halliday J.W.: *Use of chromatofocusing to detect a transferrin variant in serum of alcoholic subjects*. Clin. Chem., 1985, 31, 1543-1545.
56. Stowell L., Stowell A., Garrett N., Robinson G.: *Comparison of serum beta-hexosaminidase B activity with serum carbohydrate-deficient transferrin and other markers of alcohol abuse*. Alcohol. Alcohol., 1997, 32, 6, 703-14.
57. Szczeklik E.: *Enzymologia Kliniczna*. PZWL, Warszawa 1974.
58. Vetter B. i wsp.: *Gastroenterol. Clin. Biol.*, 1985, 9, 389.
59. Wehr H.: *Badania laboratoryjne w wykrywaniu nadużywania alkoholu*. Problemy Alkoholizmu, 1984, 10, 6.
60. Wehr H.: *Biologiczne wskaźniki nadużywania alkoholu*. Alkoholizm i Narkomania, 1980, 55-69.
61. Wehr.H., Czartoryska B., Milewski B.: *Aktywność β -heksoaminidazy surowicy w chorobach wątroby pochodzenia alkoholowego i niealkoholowego*. Wiadomości Lekarskie, 1995, 48, 5-9.
62. Wehr.H., Habrat B., Czartoryska B., Górska D., Woronowicz B.: *Aktywność beta-heksoaminidazy w moczu jako marker nadużywania alkoholu u osób uzależnionych*. Psychiatria Polska, 1995, 5, 689-696.
63. Wehr H., Matsumoto H., Abramowska M.: *Ocena wartości diagnostycznej laboratoryjnych wskaźników nadużywania alkoholu*. Pol. Tyg. Lek., 1991, TXLVI, 14-16, 259-261.
64. Wetterling T., Kanitz R.D., Renner F., Fischer D.: *Does carbohydrate-deficient transferrin predict the severity of alcohol withdrawal syndrome?* Alc. Clin. Exp. Res., 1998, 22, 5, 1053-1056.
65. Worrall S., de Jersey J., Wilce P.A., Seppa K., Hurme L., Sillanaukee P.: *Relationship between alcohol intake and immunoglobulin a immunoreactivity with acetaldehyde-modified bovine serum albumin*. Alc. Clin. Exp. Res., 1996, 20, 5, 836-40.
66. Worrall S., de Jersey J., Wilce P.A., Seppa K., Hurme., Sillanaukee P.: *Studies on the usefulness of acetaldehyde-modified proteins and associated antibodies as markers of alcohol abuse*. Alcohol. Alcohol. Suppl., 1994, 2, 503-507.
67. Wybran J., Govartes A., Fundenberg H.: *Alcoholic liver disease and the immune system*. J.A.M.A., 1975, 7, 57-58.
68. Ziółkowski M.: *Ocena kliniczna i laboratoryjna nasilenia uzależnienia alkoholowego*. Praca na stopień doktora nauk medycznych przedstawiona Radzie Wydziału Lekarskiego AM w Bydgoszczy, 1990.
69. Ziółkowski M., Korzybska D., Rybakowski J.: *Białka osocza jako biochemiczne markery nadużywania alkoholu*. Psych. Pol., 1994, XXVIII, 1, 51-60.